

SUSANA DE CAMPOS BIZARRO

PESQUISA DE METILAÇÃO ABERRANTE
DO GENE *P15^{INK4b}* EM LEUCEMIAS AGUDAS

MESTRADO EM ONCOLOGIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR E THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY



2002

SUSANA DE CAMPOS BIZARRO

PESQUISA DE METILAÇÃO ABERRANTE DO GENE *P15^{ink4b}* EM
LEUCEMIAS AGUDAS

Porto

2002

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE
MESTRE APRESENTADA AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR E À THOMAS
JEFFERSON UNIVERSITY

Agradecimentos

Ao Dr. Ricardo da Luz, Director do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil – Centro Regional do Porto e ao Dr. Vitor Veloso agradeço todo o apoio concedido ao Mestrado de Oncologia.

Ao Professor Sérgio Castedo, responsável pela orientação desta dissertação, um obrigada especial pela disponibilidade, sabedoria, encorajamento e compreensão demonstrados desde sempre.

Ao Doutor Manuel Teixeira, Responsável do Serviço de Genética, um muito obrigada pelo constante apoio moral e científico e por todas as facilidades concedidas para a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Sodrê Borges, à Dr^a Margarida Marques, à Dr^a Tereza Oliva e à Dr^a Maria José Bento o meu sincero obrigada por toda a ajuda prestada, essencial para a elaboração desta tese.

Ao Dr. Guimarães dos Santos e a aos docentes do Mestrado de Oncologia agradeço todo o empenho e qualidade demonstrada.

À D. Maria do Céu agradeço toda a atenção, simpatia e disponibilidade.

A todos os colegas do Serviço de Genética, em especial à Dr^a Cecília Correia e à Dr^a Paula Gomes, cujo trabalho e apoio constantes foram imprescindíveis para a realização deste estudo, e também ao Dr. Nuno Cerveira, à Dr^a Ana Peixoto, à Dr^a Patrícia Rocha e à Doutora Carmen Jerónimo toda a minha gratidão pela colaboração prestada.

À Dr^a Isabel Veiga pela iniciação à “arte”! Obrigada...

A todos os meus amigos, em particular à Carlinha e à Natália pelas inesgotáveis doses de paciência e amizade, e à Bárbara, à Sónia, à Susana, ao Gabriel e ao João pelas “injecções” de ânimo e alegria. A todos o meu mais sincero OBRIGADA.

E, por fim, aos meus pais, à minha irmã e aos meus padrinhos agradeço TUDO, incluindo a paciência, o encorajamento e o INESTIMÁVEL apoio.

Aos meus Pais

Índice

	Pág.
Abreviaturas	7
Introdução	9
Epidemiologia	9
Clínica	11
Genética	18
Epigenética	21
Objectivos	28
Material e Métodos	30
Material biológico	30
Processamento das amostras	30
Extracção de DNA	31
Extracção de RNA	31
Pesquisa dos transcritos de fusão	32
Determinação do padrão de metilação	33
Análise estatística	37
Resultados	39
Discussão	48
Estudos Futuros	53
Referências Bibliográficas	55
Anexo	60

Abreviaturas

Abreviaturas

bp –	Pares de base
CDK –	<i>Cyclin-dependent kinases</i>
DNA –	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs –	deoxinucleósidos trifosfato
DRM –	Doença residual mínima
EDTA –	Ácido etilenodiaminotetraacético
FAB –	Franco-Americo-Britânico
IFN- α –	interferão alfa
KHCO ₃ –	Hidrogenocarbonato de potássio
LAB –	Leucemia aguda bifenotípica
LAL –	Leucemia aguda linfoblástica
LAM –	Leucemia aguda mieloblástica
MeCP –	<i>Methylcytosine binding protein</i>
MSP –	<i>Methylation-specific polymerase chain reaction</i>
NaOH –	Hidróxido de sódio
NH ₄ Cl –	Cloreto de amónia
PBS –	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR –	<i>Polymerase chain reaction</i>
RNA –	Ácido ribonucleico
RT-PCR –	<i>Reverse-transcriptase polymerase chain reaction</i>
SMD –	Síndrome mielodisplásica
SNC –	Sistema nervoso central
tdt –	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TGF- β –	<i>Transforming growth factor beta</i>
TSG –	Gene supressor tumoral

Observação: As abreviaturas encontram-se dispostas por ordem alfabética.

Introdução

As leucemias são um grupo de neoplasias das células hematopoiéticas, que se distinguem pelo tipo celular em que têm origem (principalmente linfóide e mielóide) e pelo comportamento clínico-patológico (agudas e crónicas) (Olsen, 1999).

As leucemias agudas dividem-se em leucemias agudas linfoblásticas (LAL) e mieloblásticas (LAM) e caracterizam-se por uma rápida progressão e comportamento clínico agressivo, necessitando de tratamento adequado imediato (Scheinberg *et al*, 2001).

1. Epidemiologia

A leucemia aguda é uma patologia hematológica maligna que ocorre em todas as idades (Hughes-Jones e Wickramasinge, 1996), apresenta taxas de incidência semelhantes em todo o mundo (i.e., cerca de 4/100 000 indivíduos por ano; Brunning *et al*, 2001) e corresponde a cerca de 3% de todas as formas de cancro (Scheinberg *et al*, 2001). As taxas de incidência por idades diferem bastante entre a LAL, cuja idade média de diagnóstico é aos 10 anos, e a LAM que apresenta uma idade média de diagnóstico aos 65 anos (Scheinberg *et al*, 2001).

Nos adultos a LAL é mais frequente nos indivíduos de sexo masculino do que nos indivíduos de sexo feminino numa proporção de 1,2:1. Nas crianças a LAL apresenta também uma taxa de incidência ligeiramente superior em indivíduos do sexo masculino e em indivíduos de raça caucasiana (Brunning *et al*, 2001).

A LAL é considerada a forma de cancro pediátrico mais comum, com uma incidência de 40 novos casos, por milhão de crianças, por ano, em vários países europeus e Estados

Unidos, com a distribuição etária apresentando um pico distinto entre os 3 e 4 anos de idade (Hughes-Jones e Wickramasinge, 1996; Delgado e Patte, 1999). Pelo contrário, na LAM a incidência é baixa nas crianças (mas, mais frequente nos primeiros anos de vida; Brunning *et al*, 2001), aumentando com a idade até atingir cerca de 10 a 20 casos por 100 000 indivíduos, por ano, a partir dos 65 anos de idade (Hughes-Jones e Wickramasinge, 1996).

Diversos factores de risco para o desenvolvimento de uma leucemia aguda têm sido sugeridos por estudos epidemiológicos. No que respeita a factores ambientais, muitos estudos são ainda inconclusivos, apesar de, segundo alguns autores, haver uma forte associação entre a exposição a radiações ionizantes e a agentes químicos (como o benzeno e drogas alquilantes) e o aumento de risco de desenvolver uma leucemia aguda (Hughes-Jones e Wickramasinge, 1996; Delgado e Patte, 1999; Scheinberg *et al*, 2001).

As infecções virais têm sido também, desde há muito, postuladas como possível causa do desenvolvimento de leucemia aguda, embora apenas existam evidências indirectas inferidas pelo facto de vírus como o *Epstein-Barr* e o vírus HTLV-1 (*human T-cell lymphotropic virus type 1*) estarem envolvidos na oncogénese do linfoma de Burkitt (especialmente do tipo endémico) e da leucemia/linfoma de células T do adulto, respectivamente (Hughes-Jones e Wickramasinge, 1996; Delgado e Patte, 1999).

Embora as leucemias sejam patologias adquiridas, em alguns casos existe uma predisposição genética para o seu aparecimento. Com efeito, verifica-se um aumento do risco de desenvolver uma leucemia aguda (preferencialmente LAM, mas também LAL) em indivíduos portadores de algumas síndromes genéticas, tais como a síndrome de Down, a síndrome de Bloom, a síndrome de Klinefelter, a anemia de Fanconi, a ataxia

telangiectasia e a neurofibromatose (Hoelzer, 1999; Lange, 1999; Scheinberg *et al*, 2001).

Apesar dos estudos epidemiológicos efectuados no intuito de estabelecer uma clara relação entre os possíveis agentes etiológicos e o desenvolvimento de leucemia aguda, a associação entre os diferentes factores de risco estudados apenas permite explicar o aparecimento de uma pequena parte dos casos (Olsen, 1999).

2. Clínica

A leucemia, descrita pela primeira vez por Virchow em 1847 (Virchow *et al*, 1847), pode ser definida, de um modo geral, como uma proliferação neoplásica monoclonal de células imaturas do sistema hematopoiético, que param a sua diferenciação ou apresentam uma diferenciação aberrante (Scheinberg *et al*, 2001). As leucemias agudas caracterizam-se pela acumulação de precursores mielóides ou linfóides na medula óssea, sangue e noutros tecidos e, presumivelmente, surgem devido à ocorrência de alterações genéticas numa única célula de uma população de células progenitoras hematopoiéticas, na medula óssea ou no timo (Hoffbrand e Pettit, 2000). Este tipo de neoplasia pode surgir *de novo* ou pode reflectir um evento terminal de vários distúrbios hematológicos pré-existentes, como por exemplo, a policitemia rubra vera, a leucemia mielóide crónica ou uma síndrome mielodisplásica (Hoffbrand e Pettit, 2000).

As leucemias agudas dividem-se em LAM e LAL, dependendo da linhagem celular afectada ser mielóide ou linfóide, respectivamente (Scheinberg *et al*, 2001). O sistema de classificação Franco-Americo-Britânico (FAB), estabelecido em 1976, divide ainda

as LAM em 8 sub-tipos e as LAL em 3 sub-tipos, com base na morfologia celular (Hoffbrand e Pettit, 2000; Scheinberg *et al*, 2001) (tabela 1).

Leucemias agudas: Classificação morfológica	
Mieloblásticas (LAM)	
M ₀	– minimamente diferenciada
M ₁	– sem maturação
M ₂	– com maturação
M ₃	– promielocítica hipergranular (M _{3v} - variante microgranular)
M ₄	– mielomonocítica
M ₅	– (a) monoblástica, (b) monocítica
M ₆	– eritróide
M ₇	– megacarioblástica
Tipos raros (i.e., eosinofílica, <i>natural killer</i>)	
Linfoblásticas (LAL)	
L ₁	– células pequenas, monomórficas
L ₂	– células grandes, heterogêneas
L ₃	– tipo de células de Burkitt

Tabela 1. Classificação FAB das leucemias agudas (adaptado de Hoffbrand e Pettit, 2000).

Na fase de apresentação da doença, pelo menos 25 a 30% e, normalmente, mais de 80% da população celular da medula é constituída por células leucémicas (Delgado e Patte, 1999; Hoffbrand e Pettit, 2000; Weinstein e Tarbell, 2001). Os sinais clínicos mais comuns nesta fase (palidez, infecções e hemorragias, causados por anemia, neutropenia e trombocitopenia, respectivamente) relacionam-se principalmente com essa acumulação anormal de blastos na medula óssea. Também na fase de apresentação se podem manifestar sinais de infiltração por blastos de diversos tecidos e órgãos (Hughes-Jones e Wickramasinge, 1996). Os órgãos geralmente envolvidos incluem os gânglios linfáticos, baço, fígado, sistema nervoso central (SNC), testículos (particularmente nas LAL) e pele (particularmente nas LAM sub-tipo M4 e M5) (Hoffbrand e Pettit, 2000).

O diagnóstico preciso dos diferentes tipos de leucemia aguda é feito recorrendo a um conjunto de técnicas laboratoriais. Muitos casos de leucemia aguda são rapidamente diagnosticados e classificados recorrendo apenas às características morfológicas e histoquímicas da população blástica da medula óssea. Contudo, testes laboratoriais adicionais, como a imunofenotipagem, a cariotipagem e os estudos moleculares (genotipagem), além de poderosos auxiliares de diagnóstico são também importantes para a avaliação prognóstica (tabela 2).

Tabela 2. Caracterização dos sub-tipos FAB de leucemias agudas (adaptado de Scheinberg *et al*, 2000)

Subtipo (Incidência)	Morfologia Celular	Imunofenótipo Típico	Genótipo Associado	Observações
LAM-M0, LAM indiferenciada (5% das LAM)	Blastos tipo I >30%; citoquímica negativa	CD13, 33, 34, HLA-DR	N/A	Mau prognóstico
LAM-M1, LAM com maturação mínima (15% das LAM)	Blastos tipo I e II >90%; negro do Sudão ou peroxidase positiva; corpos de Auer presentes ocasionalmente	CD13, 14, 15, 33, 34, HLA-DR	Ocasionalmente inv(3)	inv(3) associada com trombocitose
LAM-M2, LAM com maturação (25% das LAM)	Blastos tipo I, II e III >30% e <90%; <20% de células monocíticas; negro do Sudão, peroxidase ou esterase cloroacetato fortemente positivas; múltiplos corpos de Auer	CD 13, 15, 33, 34, HLA-DR	t(8;21) em metade dos casos	t(8;21) tem prognóstico favorável; observada em adultos jovens; associada com envolvimento extramedular e esplenomegalia
LAM-M3, Leucemia Promielocítica (APL), (10% das LAM)	>30% de blastos e promielócitos anormais; múltiplos corpos de Auer, às vezes em grupos, granulação forte; citoquímica fortemente positiva – peroxidases	CD 13, 33, 15, menos CD34, HLA-DR negativa	t(15;17)	Melhor prognóstico de todas as leucemias agudas mieloblásticas; capaz de diferenciação com terapia de ácido retinóico; risco elevado de coagulação intravascular disseminada; observada em adultos mais jovens
LAM-M3v (variante microgranular)	Ausência de corpos de Auer nos promielócitos anormais; citoquímica mais fraca	Como em M3, CD2(+)	Como em M3	Como em M3, pode ser confundida com leucemia monocítica
LAM-M4, leucemia mielomonocítica (25% das LAM)	Como em M2, excepto que as células de linhagem monocítica são >20% e <80%; sangue periférico tem >5000 monócitos/ μ L; coloração alfa-naftol positiva	CD13, 14, 15, 33, 34, HLA-DR positiva	N/A	Evidência de diferenciação tanto monocítica como granulocítica; pode ser observado envolvimento extramedular
LAM-M4eo, leucemia mielomonocítica com eosinofilia	Eosinófilos basofílicos anormais são observados na medula, o que é similar a M4	Como em M4	inv(16), outras alterações do cromossoma 16	Bom prognóstico; envolvimento extramedular frequentemente observado

LAM-M5a, leucemia monoblástica (5% das LAM)	Blastos grandes com >80% de células de linhagem monocítica; >80% das células são monoblastos; coloração alfa-naftol positiva	CD13, 14, 33, 34, HLA-DR	Anomalias em 11q23	Mau prognóstico; frequentemente observado em adultos mais velhos; doença extramedular comum (envolvimento da pele, gengivas e sistema nervoso central)
LAM-M5b, leucemia monocítica com diferenciação (5% das LAM)	Como em M5a, excepto que <80% da linhagem monocítica são blastos	Como em M5a, CD34(-)	Como em M5a	Como em M5a; t(8;16) associado com eritrofagocitose.
LAM-M6, leucemia eritróide (5% das LAM)	>50% de células nucleadas são eritróides; frequentemente dismórficas; >30% de células não-eritróides são blastos; ácido Schiff periódico positivo	CD13, 33, 41, 71, HLA-DR, glicoforina A	Delecção dos cromossomas 5 e 7 frequentemente observada	Mau prognóstico; frequentemente precedida de síndrome mielodisplásica; observada em pacientes mais velhos
LAM-M7, leucemia megacarioblástica (10% das LAM)	>30% de blastos de origem megacariocítica; micromegacarioblastos frequentemente presentes; fragmentos megacariocíticos observados no sangue; peroxidase normalmente negativa; alfa-naftol e ácido Schiff periódico podem ser positivas;	CD41, 61	inv(3) ocasional; t(3;3), trissomia 21; t(9;22); t(1;22) em crianças com idade <1 ano	Mau prognóstico; frequente fibrose medular torna o diagnóstico difícil; pode ser observado em crianças com idade <3 anos, com síndrome de Down, mas deve ser distinguida de síndromes mieloproliferativas transitentes; está frequentemente associada com anteriores síndromes mielodisplásicas ou crise blástica de leucemia mielóide crónica
LAL-L1 (30% das LAL de adulto)	Células pequenas com citoplasma mínimo e ausência de grânulos; nucléolos raros; tdt positivo	Linhagem B: CD10, 19, 20, 22, 34, HLA-DR, Ig citoplásmico; Linhagem T: CD2, 5, 7, 10, 34	t(9;22); t(4;11); t(1;9); hiperdiploidia	Subtipo mais comum em crianças
LAL-L2 (65% das LAL de adulto)	Células maiores com quantidades moderadas de citoplasma e nucléolos proeminentes; tdt positivo	Como em LAL-L1	Como em LAL-L1	Subtipo mais comum em adultos
LAL-L3, leucemia de células B ou tipo Burkitt (5% das LAL)	Células grandes e redondas com citoplasma profundamente basofílico e vacuolizado	CD10, 19, 20, 21, 22, Ig de superfície	t(8;14); t(2;8); t(8;22)	Mau prognóstico com protocolos terapêuticos standard para LAL

Tabela 2. (continuação).

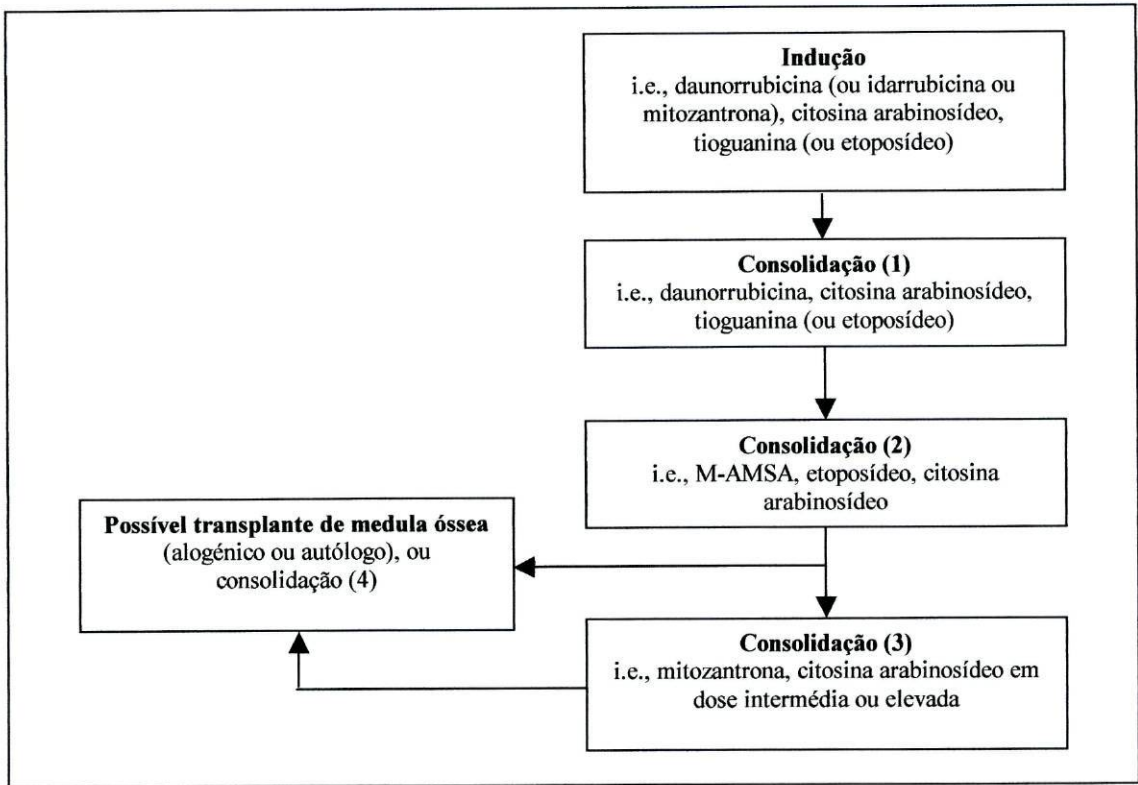
Diversos factores de prognóstico têm sido identificados para os doentes com leucemia aguda. Estes factores de prognóstico incluem combinações de parâmetros clínicos e laboratoriais, características biológicas das células leucémicas e tempo de resposta à quimioterapia, e permitem muitas vezes determinar os esquemas terapêuticos mais adequados a cada caso (Weinstein e Tarbell, 2001). Como exemplo, nas LAL, factores

como a idade inferior a 1 ano ou superior a 10 anos, a elevada contagem de leucócitos, o index de DNA inferior a 1,16, a presença de alterações cromossómicas como o cromossoma de Filadélfia, as translocações t(4;11) (em crianças com menos de 1 ano de idade), t(8;14), t(2;16) e t(11;19), alterações de 9p e 12p (excepto dic (9;12)) (Delgado e Patte, 1999), o envolvimento do SNC na fase de apresentação da doença e a resposta lenta à quimioterapia de indução, são considerados factores que conferem um pior prognóstico. No caso das LAM, também a idade e contagem leucocitária elevadas, a resposta lenta à quimioterapia, bem como o facto de ser uma LAM secundária ou precedida por uma síndrome mielodisplásica (SMD), ou ainda a presença de alterações cromossómicas como a monossomia dos cromossomas 5 e 7 ou deleções de 5q e 7q, conferem um pior prognóstico (Scheinberg *et al*, 2001; Weinstein e Tarbell, 2001). Por outro lado, tanto a presença de hiperdiploidia (excepto quando associada com alterações estruturais de mau prognóstico) como da translocação (12;21) no caso das LAL, e das translocações (15;17), (8;21), (16;16) ou da inversão do cromossoma 16 no caso das LAM, bem como uma rápida resposta à quimioterapia, são características que se associam a um prognóstico mais favorável (Scheinberg *et al*, 2001; Weinstein e Tarbell, 2001).

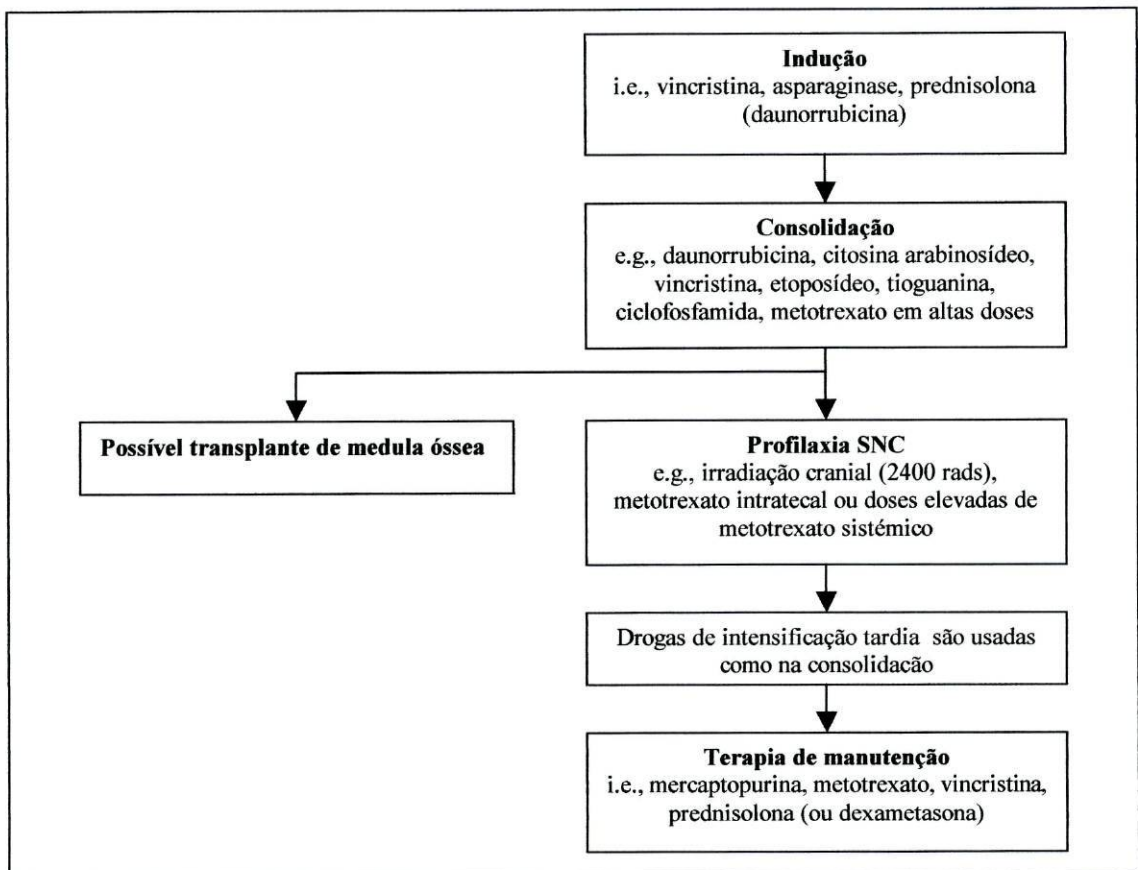
A abordagem terapêutica de eleição no tratamento das leucemias agudas é a quimioterapia associada, em determinados casos, ao transplante de medula óssea autólogo ou alogénico. O tratamento das LAL e de alguns casos de LAM envolve também uma terapia direccionada ao SNC e um período de terapia de manutenção ministrada após a remissão da doença. O objectivo principal da terapia nas leucemias agudas consiste na irradicação do clone leucémico e concomitante restabelecimento da hematopoiese normal (Scheinberg *et al*, 2001). O esquema terapêutico adoptado em

cada situação depende não só do tipo de leucemia aguda, como também dos factores de prognóstico iniciais e de determinadas características do doente (como por exemplo, condição física capaz de tolerar a morbilidade inerente a terapias mais intensivas). Os princípios gerais do tratamento das leucemias agudas encontram-se esquematizados a seguir (esquemas 1 e 2 - adaptados de Hoffbrand e Pettit, 2000).

As taxas de sobrevida aos 5 anos para doentes com leucemia aguda tem aumentado ao longo do tempo, em particular para a LAL de criança, principalmente devido ao uso de quimioterapia mais intensiva, à modulação do tratamento de acordo com o grupo de risco, às melhorias nas terapias de suporte e à introdução de novas drogas (Olsen, 1999).



Esquema 1. LAM – protocolo típico de tratamento.



Esquema 2. LAL – protocolo típico de tratamento.

3. Genética

O conceito de cancro como doença genética foi proposto por Boveri, em 1914, que estabeleceu o paradigma de que mutações em células somáticas são a causa da proliferação celular descontrolada a que chamamos neoplasia (Boveri, 1914).

Os avanços na biologia molecular do cancro demonstraram que a génese das neoplasias se deve à acumulação de diversas alterações genéticas, incluindo o ganho de função de proto-oncogenes e a inactivação dos chamados genes supressores tumorais (*TSGs*) (Fearon *et al*, 1990; Weinberg *et al*, 1991), tendo particular interesse em muitas neoplasias a perda de função de *TSGs* específicos associados ao controlo do ciclo celular (Onishi *et al*, 1997). Também na génese e progressão das leucemias estão envolvidos genes associados a mecanismos reguladores celulares específicos, cuja desregulação tem como consequência a alteração de funções biológicas críticas, em particular as capacidades de proliferação, diferenciação e apoptose (Löwenberg e Burnott, 1999).

Diversas translocações cromossómicas que levam à activação anómala ou desregulação da actividade de cinases de tirosinas ou de factores de transcrição, são comuns em determinados estádios de diferenciação das células hematopoiéticas em leucemias agudas. Os genes de fusão oncogénicos resultantes podem actuar sinergisticamente com a inactivação de *TSGs* no processo multifactorial da génese leucémica (Wong *et al*, 2000).

Na tabela 3 encontram-se descritas as alterações citogenéticas mais frequentemente encontradas nas leucemias agudas.

LAM	LAL
<p>Relativamente específicas</p> <p>M1: t(3;v) M2: t(8;21)(q22;q22) M3: t(15;17)(q22;q12) M4eo: inv(16)(p13q22), t(16;16)(p13;q22) ou del(16)(q22) M5a: t(11;v)(q23;v) M5b: t(8;16)(p11;p13) M6 del(20)(q11) M7: t(1;22)(p13;q13)</p> <p>Outras</p> <p>M1, bifenotípica: t(9;22)(q34;q11) M2, M4: t(6;9)(p23;q34) t(3;3)(q21;q29), inv(3)(q21q26) M6: +9 M0, M1: +11, +13 M4eo: +22 M2, M4 com SMD: +4 M1, M4, M5: +8, +21 LAM secundária, SMD: 5q-/-5, 7q-/-7 LAM secundária: t ou del 12p11-13</p>	<p>percursores de células B</p> <p>t(12;21)(p13;q22) t(9;22)(q34;q11) t(4;11)(q21;q23) t(1;19)(q23;p13) del(6q) t(11;14)(q13;q32) t ou del 12p12 6q- 9p- +21 hiperdiploidia hiperhaploidia</p> <p>LAL-B</p> <p>t(8;14)(q24;q32) t(8;22)(q24;q11) t(2;8)(p12;q24)</p> <p>LAL-T</p> <p>t ou del 14q11 t(11;14)(p13;q11) t(10;14)(q24;q11) t(1;14)(p32;q11) inv(14)(q11q32) 6q- 9p-</p>

Tabela 3. Alterações cromossômicas mais frequentes nas leucemias agudas (v: vários outros cromossomas) (adaptado de Hoffbrand e Pettit, 2001).

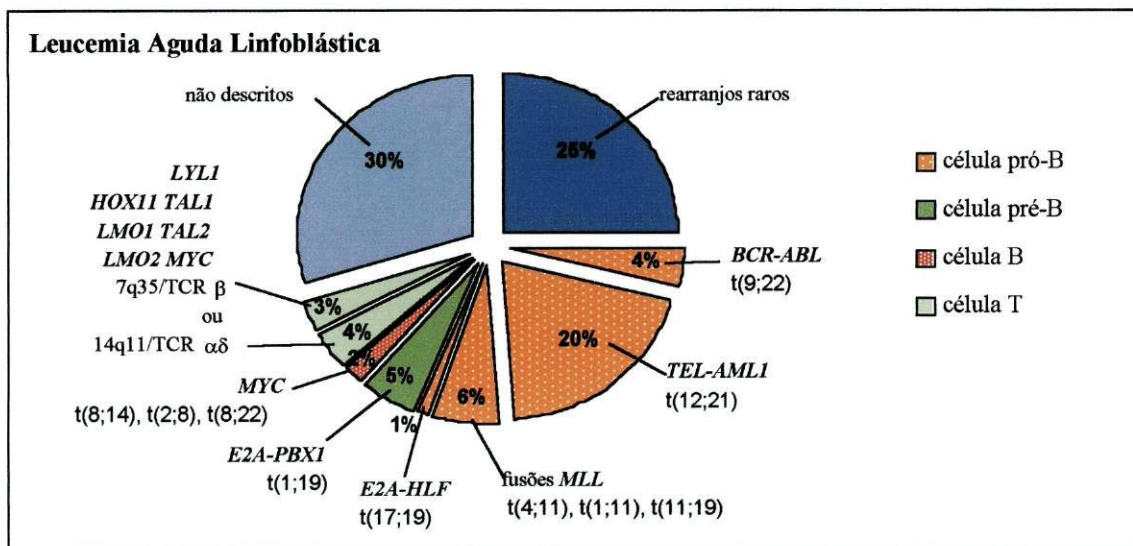


Figura 1. LAL – distribuição dos oncogenes originados por translocações (adaptado de Look, 1997)

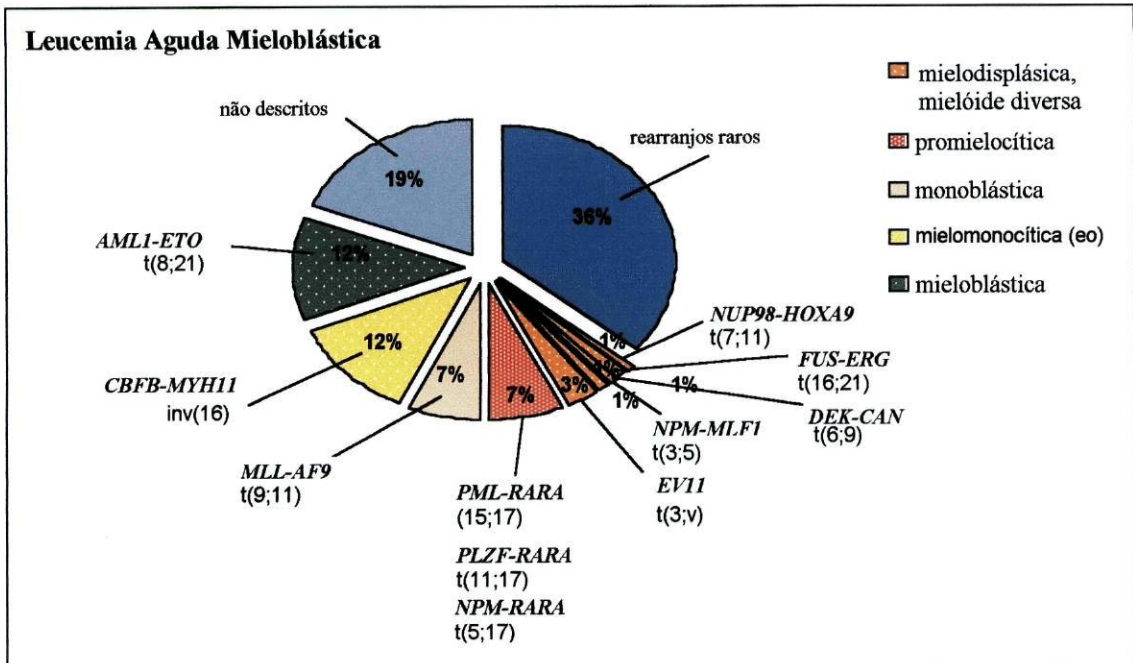


Figura 2. LAM – distribuição dos oncogenes gerados por translocações (adaptado de Look, 1997).

Nas figuras 2 e 3 podem-se observar a distribuição e frequência de cada um dos oncogenes de fusão nos diferentes tipos de leucemia aguda. A pesquisa molecular dos transcritos de fusão resultantes é importante na avaliação do diagnóstico e prognóstico, monitorização da doença residual mínima, detecção precoce da recaída e resposta à terapia (Wong *et al*, 2000).

4. Epigenética

Para além de alterações genéticas, existem também alterações epigenéticas, i.e., eventos que influenciam a função génica sem alterar a sequência de DNA, que parecem estar implicadas na etiologia e patogénese das neoplasias (Ramsahoye *et al*, 1996; Eng *et al*, 2000; Esteller *et al*, 2000).

O fenómeno de metilação das citosinas é a principal alteração epigenética que ocorre no genoma humano (Esteller, 2000). Foi descrito pela primeira vez em 1948 por Hotchkiss e consiste na adição covalente e reversível de um grupo metilo ao carbono 5 do anel de citosina, nas sequências 5' CpG3' (Ramsahoye *et al*, 1996; Singal e Ginder, 1999; Newell-Price *et al*, 2000) (figura 3).

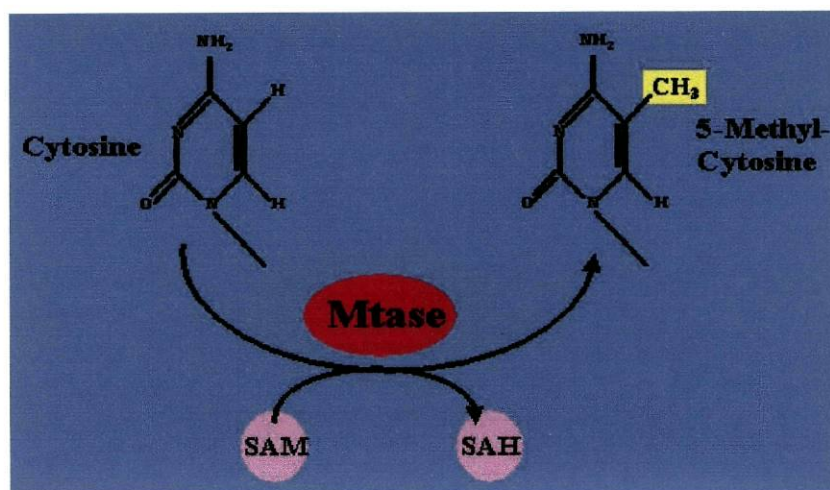


Figura 3. Transferência de um grupo metilo (CH₃) para uma das bases que constituem o DNA. A reacção é catalizada por uma DNAmetiltransferase (Mtase) e usa a S-adenosil metionina (SAM) como dador do grupo metilo. Na espécie humana a metilação encontra-se limitada às citosinas.

Aproximadamente metade de todos os promotores génicos e tipicamente os dos genes *housekeeping* contêm uma região de extensão variável (200 pares de bases a vários

kilobases) muito rica em dinucleótidos CpG, em contraste com o resto do genoma onde estes dinucleótidos não são tão frequentes (Gardiner-Garden e Frommer, 1987; Antequera e Bird, 1993; Singal e Ginder, 1999; Baylin *et al*, 2000; Esteller *et al*, 2000; Costello *et al*, 2001).

Numa célula “normal” as sequências palindrômicas CpG (ou “ilhas” CpG) das regiões promotoras não se encontram metiladas (com exceção dos genes *imprinted* e da maioria dos genes do cromossoma X inactivo nas mulheres), permitindo a expressão de um conjunto de genes necessários ao tipo celular em causa, na presença dos factores de transcrição adequados (Toyota e Issa, 1999; Esteller *et al*, 2000) (figura 4a). Os restantes dinucleótidos CpG espalhados pelo genoma apresentam-se, normalmente, metilados, sendo este padrão de metilação do DNA conservado através das divisões celulares (Turker, 1999; Esteller *et al*, 2000).

Numa célula tumoral ocorrem diversas alterações, nomeadamente a desregulação de enzimas responsáveis pela metilação (DNA metiltransferases), a desmetilação das sequências CpG ao longo dos genes (hipometilação) e a hipermetilação de locais que, geralmente, não se encontram metilados (Esteller, 2000) (figura 4b).

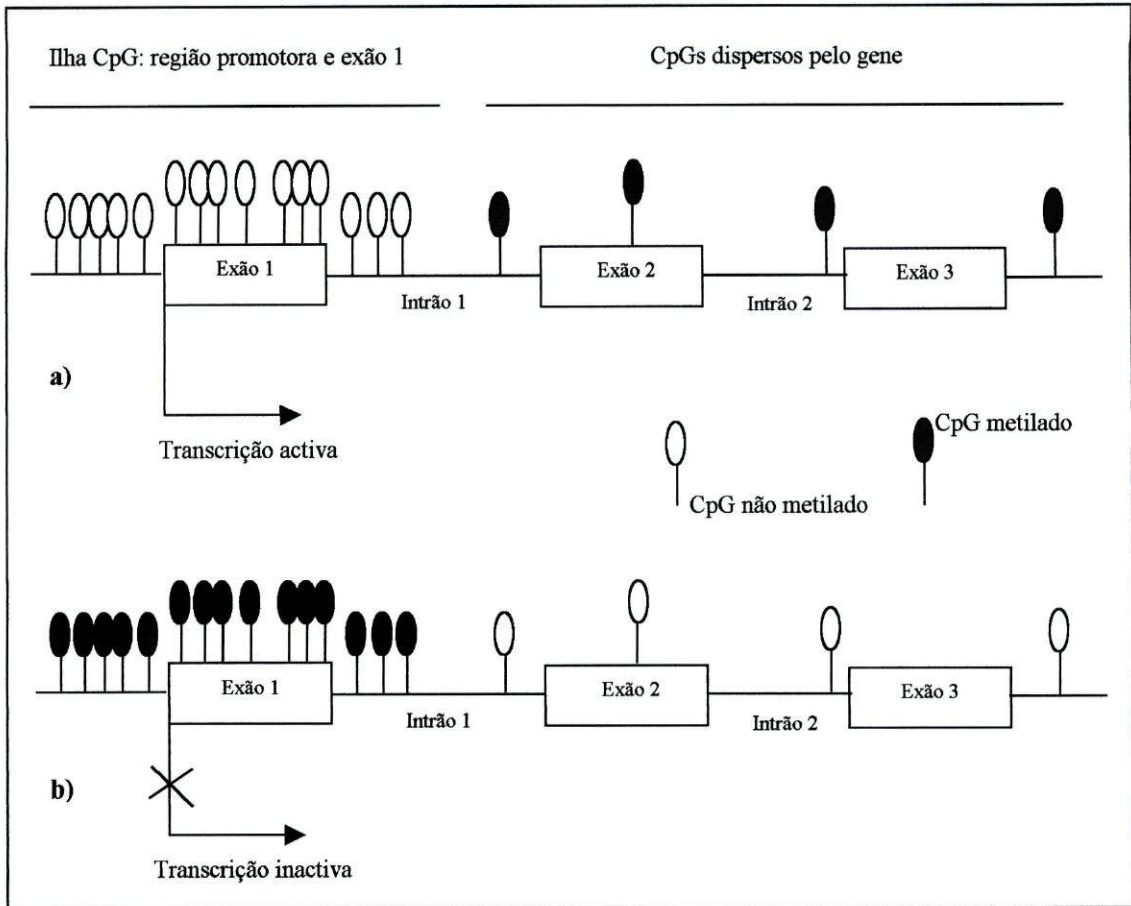
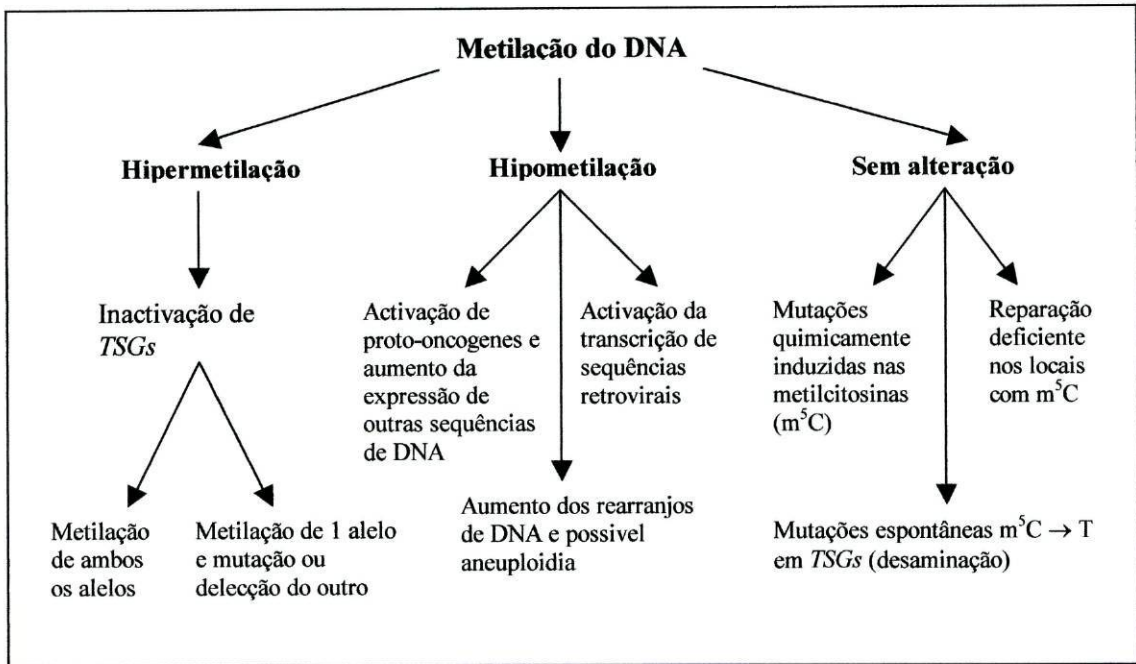


Figura 4. Representação gráfica de um gene com uma ilha CpG. **a)** Numa célula normal a ilha CpG não se encontra metilada permitindo a expressão génica. **b)** Numa célula tumoral a ilha CpG encontra-se metilada impedindo a transcrição do gene (adaptado de Esteller, 2000).

Os desenvolvimentos recentes no estudo da metilação em vários tipos de cancro, têm permitido evidenciar os diferentes mecanismos através dos quais esta alteração epigenética contribui para a carcinogénese (esquema 3) e têm demonstrado o importante impacto clínico do estudo deste fenómeno (Baylin *et al*, 2000).



Esquema 3. Principais mecanismos através dos quais a metilação do DNA contribui para a carcinogênese (adaptado de Ehrlich, 2000).

Foi já demonstrado que a metilação *de novo* dos locais CpG nas regiões promotoras pode contribuir para a inactivação de *TSGs*, resultando na selecção clonal de células com vantagem proliferativa (Merlo *et al*, 1995; Baylin *et al*, 1998, 1999; Singal *et al*, 1999; Robertson *et al*, 2000). A inactivação de *TSGs* por metilação aberrante do promotor foi demonstrada pela primeira vez em 1991, para o gene do retinoblastoma (*RBI*), por Sakai e colaboradores (1991). O mecanismo preciso através do qual a hipermetilação das regiões promotoras inibe a transcrição ainda não foi completamente esclarecido (Rush *et al*, 2001), no entanto tem sido sugerido que a metilação das citosinas impede a ligação de factores de transcrição, por interferência directa com a actividade destes (Eng *et al*, 2000), pela modificação da estrutura da cromatina (Cedar, 1988; Jones e Wolffé, 1999; Eng *et al*, 2000) ou pela ligação de repressores de transcrição ao promotor metilado, como as proteínas MeCP (*methylcytosine binding proteins*) 1 e 2 (Singal e Ginder, 1999).

A hipermetilação da região promotora de determinados genes parece ser comum em todo o tipo de neoplasias hematopoiéticas humanas, estando normalmente associada com a inactivação dos genes envolvidos (Issa *et al*, 1997; Esteller *et al*, 2000).

O silenciamento da expressão génica resultante deste fenómeno, foi demonstrado para diversos genes que regulam a proliferação e a diferenciação das células hematopoiéticas, entre os quais o gene *p15^{ink4b}*, localizado no braço curto do cromossoma 9 (9p21) (Issa *et al*, 1997; Aggerholm *et al*, 1999; Baylin *et al*, 2000). Recentemente, este gene que codifica um inibidor das cinases dependentes da ciclina (*CDK4* e *CDK6*), foi proposto como *TSG*, devido ao facto de se ter demonstrado a sua inactivação selectiva por hipermetilação em algumas neoplasias, nomeadamente em leucemias agudas, contribuindo muito provavelmente para o seu desenvolvimento (Herman *et al*, 1997; Aggerholm *et al*, 1999; Cameron *et al*, 1999; Herman, 1999; Wong *et al*, 2000).

O gene *p15^{ink4b}* está envolvido na regulação negativa do ciclo celular e a sua expressão é regulada pelos inibidores de crescimento extra-celulares IFN- α (interferão-alfa) e TGF- β (*transforming growth factor-beta*). O TGF- β promove a inibição do crescimento das células progenitoras hematopoiéticas através da indução da transcrição do gene *p15^{ink4b}* (Hannon *et al*, 1994; Li *et al*, 1995; Stone *et al*, 1995). Assim, é possível que a perda de função deste gene em leucemias agudas possa conduzir a uma alteração do controlo normal da proliferação celular hematopoiética pelo TGF- β na medula óssea (Herman *et al*, 1996; Wong *et al*, 2000).

Apesar de, actualmente, os transcritos de fusão oncogénicos servirem como marcadores de diagnóstico e prognóstico, monitorização da doença residual mínima, detecção

precoce da recaída e resposta à terapia, em alguns sub-tipos morfológicos de leucemias agudas estes transcritos têm uma frequência reduzida (Wong *et al*, 2000). Em contraste, estudos preliminares revelaram que a metilação aberrante do gene *p15^{ink4b}* é usualmente observada em leucemias agudas de adultos e crianças, podendo ter valor diagnóstico e prognóstico neste tipo de patologia hematológica maligna (Herman *et al*, 1996; Wong *et al*, 2000; Chim *et al*, 2001a).

Objetivos

Os objectivos do presente trabalho foram os seguintes:

1. Determinação do padrão de metilação da região promotora do gene *p15^{ink4b}* num grupo de doentes com leucemia aguda (linfoblástica ou mieloblástica)
2. Correlação dos resultados obtidos com variáveis prognósticas estabelecidas (nomeadamente, características citogenéticas e moleculares) e com a sobrevida global.
3. Avaliação da relevância desta alteração epigenética no diagnóstico e *follow-up* de doentes com leucemia aguda.

Material e Métodos

1. Material biológico

Foram estudados 77 casos de leucemia aguda, diagnosticados no Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO-Porto). Destes, 51 casos eram LAM (M0, 3 casos; M1, 6; M2, 7; M3, 15; M4, 11; M5, 5; M6, 0; M7, 2; e 2 casos sem classificação FAB, um dos quais era uma LAM secundária pós SMD), 25 casos eram LAL (L1, 13 casos; L2, 10; L3, 2) e um caso era uma leucemia aguda bifenotípica (LAB). Do total de casos, 57 eram leucemias agudas de adulto, com idades compreendidas entre 16 e 82 anos (média de 43,2 anos; LAM, 45; LAL, 11; LAB, 1) e 20 eram leucemias agudas de criança, com idades compreendidas entre 1 e 15 anos (média de 8,0 anos; LAM, 6; LAL, 14).

As amostras de medula óssea foram obtidas, na totalidade dos casos, na fase de diagnóstico e antes dos doentes iniciarem o tratamento. Em 8 casos foi também colhida medula óssea durante o *follow-up*. Como controlo foram analisadas 10 amostras de sangue periférico e 1 amostra de medula óssea de dadores de sangue saudáveis. Como controlo positivo para a metilação foi usada a linha celular KG1 (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* “DSMZ”– ACC14).

2. Métodos

2.1 - Processamento das amostras de medula óssea

As amostras de medula óssea foram colhidas em tubos de hemograma contendo anticoagulante (EDTA) e processadas de imediato. A lise dos eritrócitos foi obtida pela adição de uma solução hipotónica (AKE: NH₄Cl [Merck]; KHCO₃ [Merck]; EDTA 0,1mM; pH – 7,4) a 2ml de aspirado medular numa proporção 9 a 10 vezes esse

volume, seguida de incubação a 4°C durante 30 minutos. Centrifugou-se a 4°C (2000 rpm, 10 min.), desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento de modo a eliminar totalmente a hemoglobina do sedimento. Por último o sedimento foi lavado com PBS (*phosphate buffered saline*) [Sigma] e armazenado a -80°C.

2.2 Extracção de DNA e RNA

Para a extracção de DNA genómico e RNA total das amostras, adicionou-se ao precipitado de células nucleadas (obtido no ponto 2.1) 1-1,5 ml de solução monofásica de fenol e guanidina tiocianato (Tripure™) [Boehringer Mannheim] e lisaram-se as células homogeneizando a mistura com uma seringa. Incubou-se cada amostra homogeneizada durante 4 minutos à temperatura ambiente, de modo a assegurar a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Adicionaram-se 150µl de clorofórmio [Merck], agitou-se vigorosamente e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos.

Para a separação trifásica da solução, centrifugou-se a 4°C (12000rpm, 15 min.). Após a centrifugação a fase aquosa superior foi usada para a extracção de RNA e a interfase para a extracção de DNA.

2.2.1 Extracção de RNA

A fase aquosa superior foi transferida para um *ependorf* de 1,5ml. Adicionaram-se 750µl de isopropanol [Merck] para precipitar o RNA e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos. Centrifugou-se a 4°C (12000rpm, 15 min.) e descartou-se o sobrenadante. O precipitado de RNA foi lavado com etanol [Merck] a 75% (v/v).

Depois de seco à temperatura ambiente o RNA foi eluído em *RNA storage solution* [Ambion] e armazenado a -80°C .

2.2.2 Extracção de DNA

Após a total remoção da fase aquosa usada para a extracção de RNA, adicionou-se à interfase e fase orgânica 300 μl de etanol a 100% (v/v), para precipitar o DNA, e misturou-se invertendo o tubo várias vezes. Incubou-se durante 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se a 4°C (3000rpm, 5 min.). Após descartar o sobrenadante (contendo fenol, etanol e proteínas) e para remover qualquer resíduo de fenol do DNA, adicionou-se 1ml de uma solução de citrato de sódio [Merck] em etanol a 10% (v/v) e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 4°C (3000rpm, 5 min.), descartou-se o sobrenadante e repetiu-se esta lavagem com citrato de sódio mais duas vezes. O precipitado de DNA foi lavado com etanol a 75% (v/v) e, depois de seco à temperatura ambiente, foi eluído em NaOH [Merck] e tampão Hepes e armazenado a -20°C .

2.3 Pesquisa dos transcritos de fusão por RT-PCR (*reverse transcriptase – polymerase chain reaction*)

A pesquisa dos diferentes transcritos de fusão foi feita como parte da rotina laboratorial do Serviço de Genética do IPO – Porto. Resumidamente, todos os casos foram estudados em duplicado e foi feita a análise simultânea de um controlo negativo, de um controlo positivo e de um controlo sem RNA. De forma a confirmar a integridade de cada amostra de RNA, foi co-amplificada em cada reacção de RT-PCR um gene

controlo (β_2 – *microglobulina*). Os *primers* usados e as condições de reacção para RT-PCR encontram-se descritos no protocolo *standard* de pesquisa de transcritos de fusão em leucemias agudas do programa BIOMED (Dongen *et al*, 1999). Os transcritos de fusão que foram pesquisados, para os diferentes tipos de leucemia aguda, encontram-se descritos na tabela 4 *.

Transcrito de fusão	Translocação	Tipo de leucemia aguda
<i>BCR-ABL</i>	t(9;22)(q34;q11)	LAL, LAM-M1, LAB
<i>TEL-AML1</i>	t(12;21)(p13;q22)	LAL
<i>MLL-AF4</i>	t(4;11)(q21;q23)	LAL
<i>E2A-PBX1</i>	t(1;19)(q23;p13)	LAL
<i>AML1-ETO</i>	t(8;21)(q22;q22)	LAM-M2
<i>PML-RARA</i>	t(15;17)(q22;q12)	LAM-M3
<i>CBFB-MYH11</i>	t(16;16) ou inv(16)(p13q22)	LAM-M4

Tabela 4. Transcritos de fusão pesquisados.

2.4 Determinação do padrão de metilação do gene *p15^{ink4b}*

Para a determinação do padrão de metilação do gene *p15^{ink4b}* usou-se a técnica de MSP (*methylation-specific PCR*). Nesta técnica o DNA é modificado através de um tratamento com bissulfito de sódio, que converte as citosinas não metiladas em uracilos. Após esta conversão química estar completa e depois de se remover todo o bissulfito, o DNA modificado é amplificado por PCR em duas reacções distintas, usando em cada reacção oligonucleótidos iniciadores de síntese (*primers*) específicos para a sequência

* Nos casos de LAL-L3 foi pesquisada por PCR a translocação t(8;14)(q24;q32) (*MYCC-IGH*) (Akasaka *et al*, 1996)

alvo metilada e não metilada (i.e., com citosinas não convertidas ou com uracilos, respectivamente) (Herman e Baylin, 1998).

2.4.1 Tratamento do DNA para MSP

A 1µg de DNA genómico adicionaram-se 3µl NaOH 3M e 1µl de esperma de salmão [Invitrogen] e incubou-se a 50°C durante 20 minutos para desnaturar o DNA. Em seguida as amostras foram colocadas em banho de gelo, de modo a prevenir a renaturação do DNA, adicionaram-se 450µl de solução de reacção (bissulfito de sódio [Sigma] 2,5M, hidroquinona [Sigma] a 125mM e NaOH 2M) e incubou-se a 70°C durante 3 horas na obscuridade.

O DNA modificado foi purificado usando o sistema de purificação *Wizard[®] DNA clean-up system* [Promega] e seguindo o respectivo protocolo. O DNA foi eluído em 45µl de água (*nuclease free water* [Promega]) a 80°C. Posteriormente adicionaram-se 5µl de NaOH 3M e incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. Finalmente precipitou-se o DNA adicionando 75µl de acetato de amónia [Sigma] 7,5M, 350µl de etanol a 100% (v/v) e 2µl de glicogénio (5mg/ml) [Roche]. O precipitado foi lavado com etanol a 70% (v/v), seco à temperatura ambiente e eluído em 30µl de água (*nuclease free water*). As amostras tratadas foram armazenadas a -20°C.

2.4.2 Methylation-specific PCR (MSP)

Para a reacção de MSP, a 2µl de DNA tratado adicionou-se, para um volume final de 50µl, uma solução contendo: PCR *buffer* 1x (16,6mM de sulfato de amónia; 67mM Tris, pH8,8; 6,7mM MgCl₂; 10mM 2-mercaptoetanol), dNTPs (1,25mM cada) [Amersham Pharmacia Biotech], 1,25U de *Taq Gold DNA polymerase* [Perkin-Elmer] e 300ng de cada *primer*. Para a amplificação de DNA não tratado (*wild type*) acrescentou-se à reacção 5% de dimetilsulfóxido. As sequências dos primers para o DNA tratado (metilado e não metilado) e para o DNA *wild type* estão descritas na tabela 5 (Herman *et al*, 1996b).

Num termociclador Perkin-Elmer, *Gene-amp PCR system 9700*, as amostras foram inicialmente desnaturadas a 95°C durante 10 minutos, sujeitas a 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, *annealing* a 60°C (amostras tratadas) ou 65°C (amostras *wild type*) durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos, seguiu-se uma extensão final a 72°C durante 4 minutos. Em cada reacção de amplificação foram incluídos um controlo positivo, um controlo negativo e um controlo sem DNA (branco).

<i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')	Posição genómica *
P15 - WF	CGCACCCCTGCGGCCAGA	+ 46
P15 - WR	AGTGGCCGAGCGGCCGG	
P15 - MF	GCGTTCGTATTTTGC GGTT	+ 40
P15 - MR	CGTACAATAACCGAACGACCGA	
P15 - UF	<u>TGTGATGIGTTT</u> GTATTTTGTGGTT	+ 34
P15 - UR	CC <u>A</u> TACAATAACCA <u>AA</u> CA <u>ACC</u> AA	

Tabela 5. *Primers* usados nas reacções de MSP e PCR *wild type*. As diferenças de sequência entre os primers para o DNA tratado (metilado e não metilado) e o DNA *wild type* encontram-se a negrito e, as diferenças entre o DNA tratado metilado e o DNA tratado não metilado encontram-se sublinhadas.

WF/WR – *primers sense/antisense* para DNA *wild type*, MF/MR – *primers sense/antisense* para DNA metilado, UF/UR – *primers sense /antisense* para DNA não metilado. * A posição genómica refere-se à localização do nucleótido 5' do *primer sense* em relação ao local de início da transcrição (Herman *et al*, 1996b).

Os produtos de amplificação foram submetidos a electroforese em gel de agarose [Nusieve - FMC] a 5%, corado com brometo de etideo (5ng/μl) e visualizados num transiluminador de U.V. [Image Master[®] VDS – Pharmacia Biotech]. Os fragmentos amplificados apresentavam os seguintes pesos moleculares: DNA *wild type* - 137 pares de bases (bp), DNA metilado - 148bp, DNA não metilado - 154bp.

2.5 Análise estatística

Na análise dos resultados obtidos foram utilizados o teste exacto de Fisher, o teste χ^2 e o teste de log-rank. As curvas de sobrevida foram apresentadas segundo o método de Kaplan-Meier. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$.

Resultados

1. Metilação do gene $p15^{ink4b}$

Detectou-se metilação do gene $p15^{ink4b}$ em 74% (57/77) do total de casos de leucemia aguda analisados (figura 5). Nas LAM, a frequência de metilação encontrada foi de 78% (40/51), nas LAL foi de 64% (16/25) e no único caso de LAB estudado também se encontrou positividade para a metilação (tabela 6).

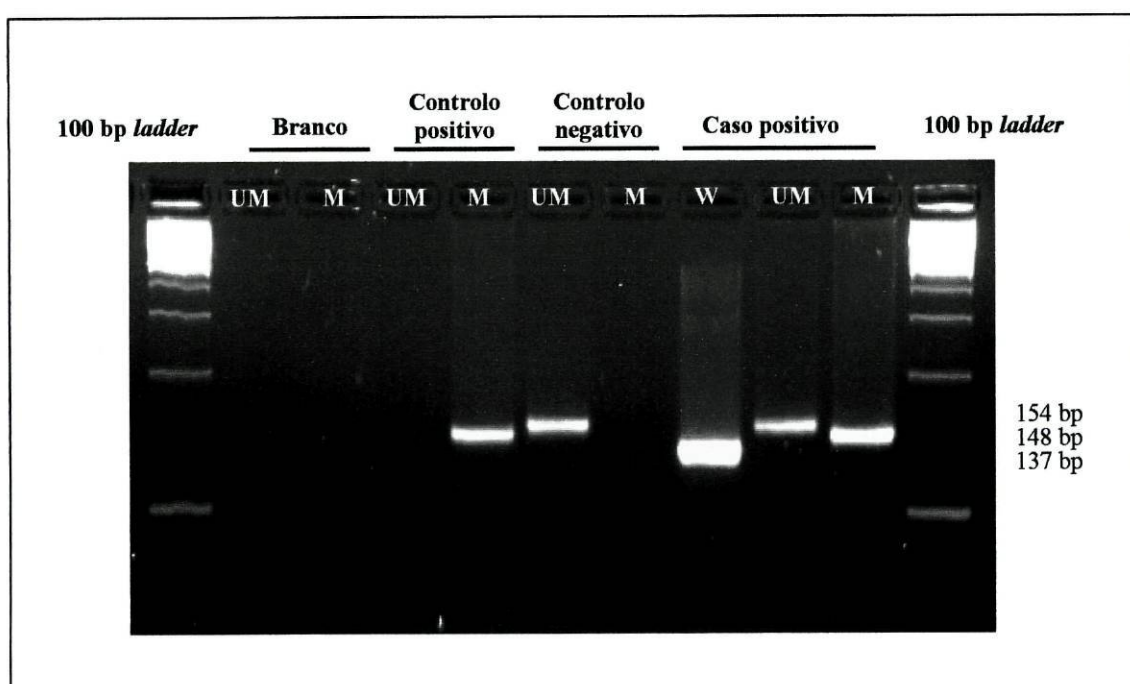


Figura 5. Análise electroforética em gel de agarose de um caso positivo. M – alelo metilado; UM – alelo não-metilado; W - alelo *wild-type*.

	LAM		LAL		LAB	
	adultos	crianças	adultos	crianças	adultos	crianças
Metilação do gene $p15^{ink4b}$	37/45	3/6	9/11	7/14	1/1	0/0

Tabela 6. Frequências de metilação do gene $p15^{ink4b}$ nos casos de leucemia aguda (LAM, LAL e LAB) em adultos e crianças (os valores correspondem a n° de casos metilados/n° casos total de cada grupo).

Subdividindo os casos analisados pelos sub-tipos FAB obtivemos as seguintes frequências de metilação (ver figura 6):

- a) Para as LAM – M0 (3/3); M1 (4/6); M2 (6/7); M3 (11/15); M4 (9/11); M5 (3/5); M7 (2/2)
- b) Para as LAL – L1 (7/13); L2 (7/10); L3 – (2/2)

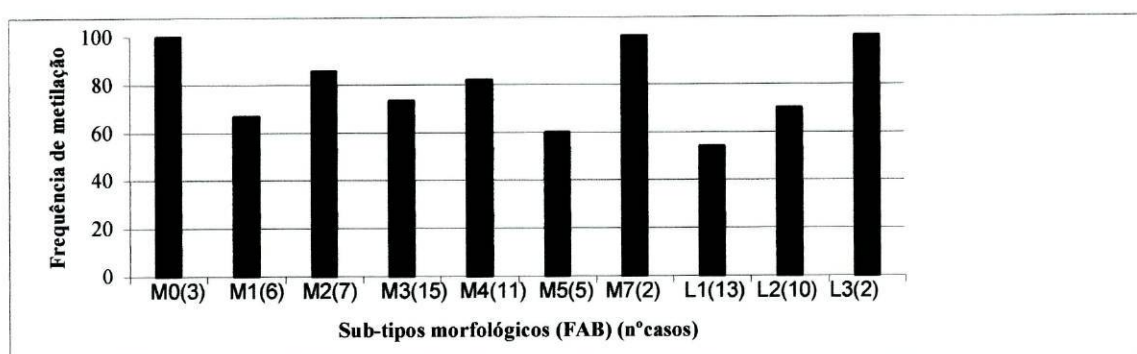


Figura 6. Frequência de metilação do gene $p15^{ink4b}$ nos diferentes sub-tipos FAB, dos casos de leucemias agudas analisados.

Nas amostras controlo de sangue periférico e medula óssea não foi detectada metilação do gene $p15^{ink4b}$.

Nos casos de adulto, a frequência de metilação observada para as LAM e para as LAL foi a mesma, i.e., 82,2% (37/45) nas LAM e 82,2% (9/11) nas LAL. Nos casos de criança as frequências de metilação encontradas também foram as mesmas para as LAM e para as LAL, i.e., LAM 50% (3/6) e LAL 50% (7/14) (tabela 6).

Entre as frequências de metilação das leucemias agudas de adulto e das leucemias agudas de criança não foram encontradas diferenças significativas ($p=0,1$, teste exacto de Fisher).

2. Metilação do gene *p15^{ink4b}*/cariótipos/transcritos de fusão

Em 61 casos foi possível obter informação citogenética (ver anexo). Destes casos, 26 apresentavam um cariótipo normal, 13 casos apresentavam um cariótipo com alterações de bom prognóstico (i.e., t(8;21); t(15;17); t(16;16), inv(16) ou hiperdiploidias não associadas a alterações cromossômicas estruturais de mau prognóstico) e 22 casos apresentavam um cariótipo com alterações consideradas de mau prognóstico ou outras alterações sem implicação prognóstica descrita.

Dos 61 casos cariotipados, foi detectada metilação do gene *p15^{ink4b}* em 47. Destes, 44,7% (21/47) tinham um cariótipo normal, 19,1% (9/47) tinham um cariótipo com alterações de bom prognóstico e 36,2% (17/47) apresentavam um cariótipo com alterações de mau prognóstico ou outras (tabela 7), não tendo sido encontradas diferenças significativas entre estas frequências ($p=0,721$, teste χ^2). Dos 26 casos com cariótipo normal, observou-se metilação do gene *p15^{ink4b}* em 81% (21/26).

A pesquisa de transcritos de fusão no diagnóstico foi possível em 69 casos estudados, tendo sido detectado RNA de fusão oncogénico em 40,6% (28/69) dos mesmos (ver anexo). A frequência de metilação observada nos mesmos 69 casos foi de 71,0% (49/69).

Nos casos em que se detectou RNA de fusão oncogénico, foi detectada metilação em 75% (21/28) dos casos.

No total, a pesquisa de alterações genéticas por técnicas moleculares e/ou de citogenética convencional foi possível em todos os casos excepto numa LAM-M7 devido à má qualidade da amostra de medula óssea e ao facto de nenhum dos rearranjos

pesquisados estar associado a este sub-tipo morfológico de LAM. Dividindo os casos analisados apenas em dois grupos, i.e., sem alterações (33 casos) ou com alterações (43 casos) (tabela 8), também não se encontraram diferenças significativas entre as frequências de metilação dos dois grupos ($p=0,796$, teste exacto de Fisher).

	Cariótipo normal	Cariótipo com alterações de bom prognóstico	Cariótipo com alterações de mau prognóstico ou outras
Casos com metilação do gene $p15^{ink4b}$ (n=47)	44,7% (21/47)	19,1% (9/47)	36,2% (17/47)
Casos sem metilação do gene $p15^{ink4b}$ (n=14)	35,7% (5/14)	28,6% (4/14)	35,7% (5/14)

Tabela 7. Percentagem do total de casos (cariotipados) com ou sem metilação para o gene $p15^{ink4b}$, em cada grupo cariotípico

	Sem alterações genéticas*	Com alterações genéticas*
Casos com metilação do gene $p15^{ink4b}$ (n=56)	44,6% (25/56)	55,4% (31/56)
Casos sem metilação do gene $p15^{ink4b}$ (n=20)	40,0% (8/20)	60,0% (12/20)

Tabela 8. Percentagem do total de casos (em que foram pesquisadas alterações genéticas) com ou sem metilação para o gene $p15^{ink4b}$. *Detectáveis com as técnicas e condições usadas.

3. Análise de casos em *follow-up*

Em 8 dos casos para os quais foi pesquisada a presença de transcritos de fusão para *follow-up* molecular, foi também analisada a metilação do gene $p15^{ink4b}$ tendo-se verificado total concordância nos resultados obtidos, i.e., em 3 casos detectou-se a presença de doença residual mínima (DRM) e nos restantes 5 casos não, tanto pela análise de genes de fusão como pela análise do padrão de metilação.

Num dos casos em que foi detectada DRM pela análise molecular, a metilação do gene $p15^{ink4b}$ foi detectada apenas na amostra em *follow-up* e não na amostra em diagnóstico.

4. Sobrevida global

O tempo mediano de *follow-up* para todos os casos estudados foi de 13 meses (com um mínimo de 1 mês e um máximo de 53 meses) (figura 7).

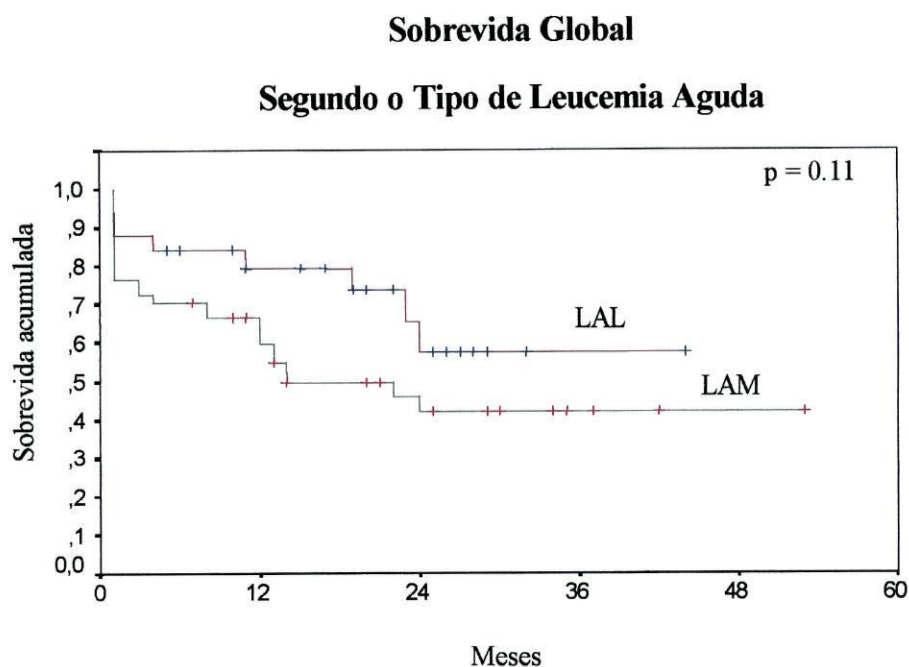


Figura 7. Sobrevida global do conjunto de casos estudados de LAL e LAM.

Para os 40 casos de LAM com metilação do gene $p15^{ink4b}$ as taxas de sobrevida global aos 12 e 36 meses não foram significativamente diferentes das taxas de sobrevida dos 11 casos de LAM sem metilação do gene $p15^{ink4b}$ ($p=0,55$, teste de log-rank) (tabela 9) (figura 8).

Para os 16 casos de LAL com metilação do gene $p15^{ink4b}$ as taxas de sobrevida global aos 12 e 24 meses foram significativamente menores do que as taxas de sobrevida

global ao mesmo tempo para os 9 casos de LAL sem metilação do gene $p15^{ink4b}$ ($p=0,02$, teste de log-rank) (tabela 9) (figura 9).

Sobrevida global (LAM)	Casos com metilação (n=40)	Casos sem metilação (n=11)
12 meses	61%	55%
36 meses	44%	27%
Sobrevida global (LAL)	Casos com metilação (n=16)	Casos sem metilação (n=9)
12 meses	68%	100%
24 meses	36%	100%

Tabela 9. Variação das taxas de sobrevida global nos casos de LAM e LAL em função da metilação do gene $p15^{ink4b}$.

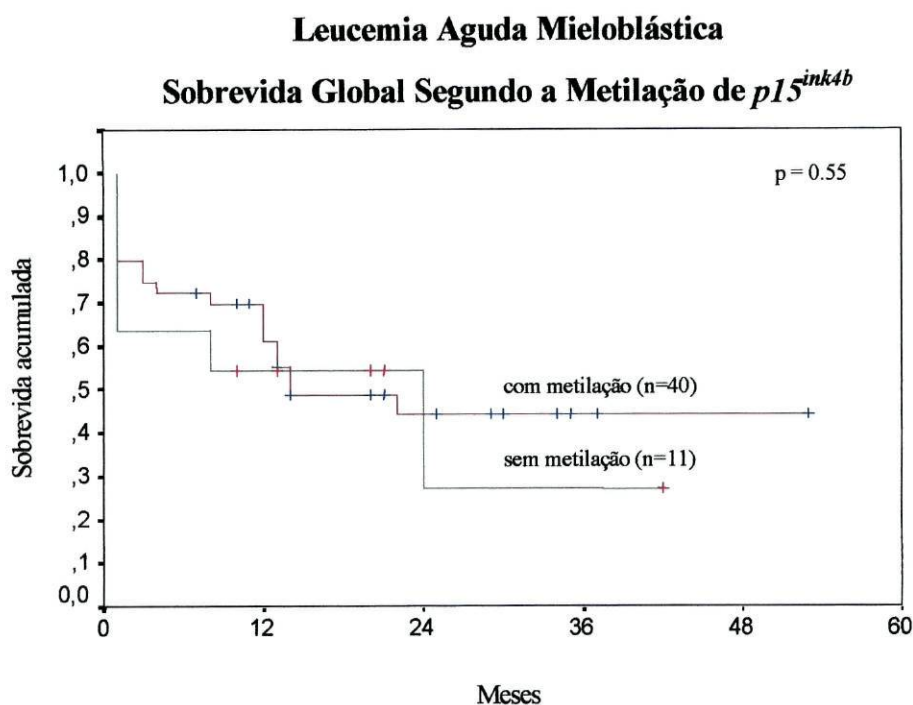


Figura 8. Sobrevida global dos casos de LAM em função da metilação do gene $p15^{ink4b}$.

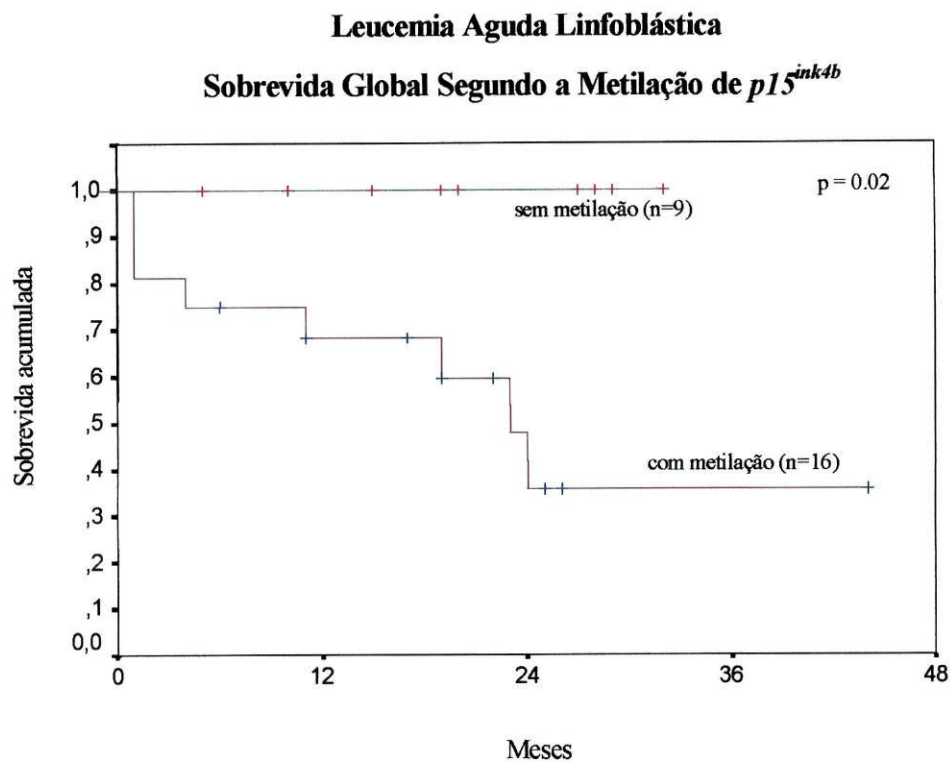


Figura 9. Sobrevida global dos casos de LAL em função da metilação do gene $p15^{ink4b}$.

Discussão

Neste estudo demonstramos que a metilação aberrante da região promotora do gene *p15^{ink4b}* é um evento frequente nas leucemias agudas de adulto e criança de praticamente todos os sub-tipos morfológicos, desempenhando possivelmente um papel crucial na gênese destas neoplasias hematológicas. As frequências de metilação obtidas no nosso estudo são comparáveis às obtidas noutros trabalhos (Wong *et al*, 2000; Chim *et al*, 2001a) nos quais foram analisados um número total de casos semelhante. Nos estudos dos autores referenciados também se verifica uma maior percentagem de casos com metilação nas LAM do que nas LAL, sendo comum em todos os sub-tipos morfológicos estudados.

Nos controlos de sangue periférico e medula óssea analisados não foi encontrada positividade para a metilação, o que indica que este é um evento que surge *de novo*, facto demonstrado também por outros autores (Herman *et al*, 1997; Chim *et al*, 2001a). Segundo Wong e colaboradores (2000), a metilação aberrante da região promotora do gene *p15^{ink4b}* surge durante a transformação e progressão leucémica, nos progenitores hematopoiéticos que dão origem às linhagens celulares linfóide e mielóide ou em progenitores hematopoiéticos mais primitivos com potencial de diferenciação em qualquer uma das linhagens celulares, sendo provavelmente um dos eventos mais precoces na leucemogénese.

Ao contrário do descrito por outros autores, que verificaram que a grande maioria dos casos sem metilação do gene *p15^{ink4b}* apresentavam um cariótipo normal ou hiperdiploidias associadas a bom prognóstico (Wong *et al*, 2000), neste estudo não foi encontrada nenhuma associação significativa entre metilação do gene *p15^{ink4b}* e os diferentes grupos cariotípicos. No entanto, no nosso trabalho, o facto da maioria dos

casos (55,4%) possuírem simultaneamente alterações genéticas e metilação do gene estudado, poderá indicar que as alterações genéticas e epigenéticas actuam sinergisticamente na génese e progressão de grande parte das leucemias agudas. Contudo, no sub-grupo em que foi encontrada metilação mas no qual não se detectaram alterações genéticas (44,6%), é de admitir a possibilidade de alterações epigenéticas poderem por si só ser responsáveis pelo desenvolvimento neoplásico ou, em alternativa, de haver concomitância com alterações genéticas não detectadas.

Nos 69 casos em diagnóstico em que pesquisámos os transcritos de fusão mais comuns de cada sub-tipo morfológico foram detectados rearranjos em 39,1% e nos 61 casos analisados citogeneticamente encontraram-se alterações em 57,4%, enquanto a frequência de metilação nos mesmos casos foi de 71,0% e 77,0%, respectivamente.

Nos casos em que analisámos simultaneamente a presença de transcritos de fusão e a metilação do gene *p15^{ink4b}* durante o *follow-up* verificamos uma total concordância nos resultados obtidos relativamente à presença ou ausência de DRM. Este facto deve-se à elevada sensibilidade de ambas as técnicas de MSP e de RT-PCR (10^{-3} a 10^{-5} e 10^{-5} a 10^{-6} , respectivamente) (Chim *et al*, 2001b). Esta elevada sensibilidade da técnica de MSP permite também que a análise da metilação seja efectuada em sangue periférico ou plasma nos casos em que não existe medula óssea disponível para os estudos moleculares. O facto de termos encontrado metilação do gene *p15^{ink4b}* na análise em *follow-up* num caso negativo para esta alteração em diagnóstico, poderá significar que a metilação, além de ser um marcador molecular de malignidade relativamente específico e um evento inicial na génese das leucemias agudas, é também um marcador de progressão clonal nestas neoplasias.

Estes resultados levam-nos a sugerir que, nos casos em que não existem marcadores moleculares específicos para serem pesquisados, quando a pesquisa dos transcritos de fusão é negativa no diagnóstico ou ainda quando não há RNA disponível para novos estudos, a análise da metilação do gene $p15^{ink4b}$, quando detectada em diagnóstico, poderá eventualmente ser uma estratégia alternativa para a pesquisa de doença residual mínima. Nos casos em que esta alteração epigenética não seja detectada em diagnóstico, a sua análise por MSP poderá ser útil no *follow-up* molecular, como marcador de progressão da doença.

Neste trabalho verificámos uma diminuição significativa na sobrevida global dos casos de LAL com metilação do gene $p15^{ink4b}$, o que está de acordo com o demonstrado noutro estudo semelhante (Wong *et al*, 2000). No entanto, outros autores que analisaram uma série maior de casos de LAL, não encontraram uma relação estatisticamente significativa entre a sobrevida global na presença e ausência de metilação do gene $p15^{ink4b}$ (Chim *et al*, 2001a). Assim, a diferença entre os nossos resultados e os de Wong e colaboradores relativamente aos de Chim e colaboradores poderá dever-se não apenas ao diferente número de casos analisado, mas também a diferenças na composição das séries estudadas, i.e., diferenças nas características clínico-patológicas (com importância prognóstica) e diferenças nos protocolos terapêuticos aplicados. O estudo de um maior número de casos será necessário para confirmar o valor prognóstico da metilação do gene $p15^{ink4b}$ nas LAL, bem como para avaliar a sua independência em relação a factores de prognóstico já estabelecidos.

Em conclusão, o facto da metilação aberrante do gene $p15^{ink4b}$ ser uma alteração bastante frequente, inicial e específica das patologias hematológicas malignas (Esteller

et al, 2001), torna a sua pesquisa pela técnica de MSP nas leucemias agudas uma nova alternativa para a monitorização molecular da doença, algo que é de extrema importância para a adaptação e eficácia dos esquemas terapêuticos (Dongen *et al*, 1999). Nos casos de leucemia aguda em que marcadores moleculares específicos como os transcritos de fusão estão presentes, a pesquisa de metilação aberrante do gene *p15^{ink4b}* poderá servir como marcador de progressão clonal caso a metilação aberrante seja adquirida no decurso da doença. Por último, a metilação da região promotora do gene *p15^{ink4b}* pode vir a revelar-se um factor de prognóstico importante nas LAL, caso os nossos achados venham a ser confirmados numa série maior de doentes.

Estudos Futuros

Futuramente pretendemos aumentar a série de casos estudados, de modo a validar os resultados obtidos tendo em vista a implementação da análise da metilação aberrante do gene *p15^{ink4b}* como rotina laboratorial no estudo molecular das leucemias agudas. Especial relevo deverá ser dado à confirmação da relevância prognóstica da metilação do gene *p15^{ink4b}* nas LAL e à avaliação desta alteração epigenética como marcador de progressão da doença hematológica maligna.

É também nosso objectivo, num próximo estudo, fazer a quantificação da metilação deste gene pela técnica RTQ-MSP (*real-time quantitative MSP*), de modo a comparar a eficiência das técnicas e determinar se a quantificação desta alteração epigenética tem algum significado prognóstico adicional.

Tendo em consideração que nas LAL a inactivação do gene *p15^{ink4b}* por deleção homozigótica foi descrita em 20 a 30% dos casos (Herman *et al*, 1996a, 1997; Drexel, 1998), será também importante incluir esta pesquisa num novo estudo.

Por último, a reversibilidade desta alteração epigenética (Jones *et al*, 1999, Baylin *et al*, 2000, Esteller *et al*, 2001) poderá permitir o desenvolvimento futuro de novas terapias, como o uso de agentes desmetilantes (Wong *et al*, 2000). Se e quando tal for uma realidade, o estudo da metilação da região promotora de genes alvo passará a fazer parte integrante da avaliação individual do doente leucémico.

Referências bibliográficas

- Aggerholm A, Guldberg P, Hokland M, Hokland P. Extensive intra- and interindividual heterogeneity of *p15^{INK4b}* methylation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 1999; **59**: 436-441.
- Akasaka T, Muramatsu M, Ohno H, Miura I, Tatsumi E, Fukuhara S, *et al.* Application of long-distance polymerase chain reaction to detection of junctional sequences created by chromosomal translocation in mature B-cell neoplasms. *Blood.* 1996; **88**: 985-994.
- Antequera F, Bird A. CpG islands. In *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. Edited by Jost JP, Saluz HP. 1993. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis. *Trend Genet.* 2000; **16**: 168-174.
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: A fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 1998; **72**: 141-196.
- Baylin SB. The regulation of gene expression by methylation. *Semin Cancer Biol.* 1999; **9**: 327-328.
- Boveri T. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Jena: Gustav Fisher, 1914.
- Brunning RD, Matutes E, Harris NL, Flandrin G, Vardimen J, Burnett J, Head D. Acute myeloid leukaemia. In *Pathology and Genetics: Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Edited by Elaine SJ, Harris NL, Stein H, Vardimen JW. World Health Organization Classification of Tumours. 2001. IARC Press, Lyon.
- Cameron EE, Baylin SB, Herman JG. *p15^{INK4B}* CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. *Blood.* 1999; **94**: 2445-2451.
- Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell.* 1988; **53**: 3-4.
- Chim CS, Liang R, Tam CYY, Kwong YL. Methylation of *p15* and *p16* genes in acute promyelocytic leukaemia: potential diagnostic and prognostic significance. *J Clin Oncol.* 2001b; **19**: 2033-2040.
- Chim CS, Liang R, Tam CYY, Kwong YL. Methylation of *p15* and *p16* genes in adult acute leukaemia: lack of prognostic significance. *Cancer.* 2001a; **91**: 2222-2229.
- Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet.* 2001; **38**: 285-303.
- Delgado RF, Patte C. Lymphoid malignancies in childhood. In *Textbook of Malignant Haematology*. Edited by Degos L, Linch DC, Löenberg B. 1999. Martin Dunitz Ltd, London.
- Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, *et al.* Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations

- in acute leukaemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1999; **13**: 1901-1928.
- Drexler HG. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes *p15*, *p16*, *p18* and *p19* in human leukaemia-lymphoma cells. *Leukemia*. 1998; **12**: 845-859.
- Ehrlich M. DNA hypomethylation and cancer. In *DNA Alterations in Cancer: Genetic and Epigenetic Changes*. Edited by Ehrlich M. 2000. Eaton Publishing, MA.
- Eng C, Herman JG, Baylin SB. A bird's eye view of global methylation. *Nature Genet*. 2000; **24**: 101-102.
- Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer*. 2000; **36**: 2294-2300.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman G. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*. 2001; **61**: 3225-3229.
- Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, *et al*. Hypermethylation-associated inactivation of *p14^{ARF}* is independent of *p16^{INK4a}* methylation and *p53* mutational status. *Cancer Res*. 2000; **60**: 129-133.
- Fearon ER, Vogelstein B. A model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; **61**: 759-767.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*. 1987; **196**: 261-282.
- Hannon GJ, Beach D. *p15^{INK4b}* is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature*. 1994; **371**: 257-260.
- Herman JG, Baylin SB. Methylation-Specific PCR. In *Current Protocols in Human Genetics*. 1998. John-Wiley and sons, Inc.
- Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of *p15^{INK4b}* and *p16^{INK4a}* characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res*. 1997; **57**: 837-841.
- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Acad Sci. USA*. 1996b; **93**: 9821-9826.
- Herman JG. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol*. 1999; **9**: 359-368.
- Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for *p15^{INK4B1}*. *Cancer Res*. 1996a; **56**: 722-727.

- Hoelzer D. Acute Lymphoblastic Leukaemia in adults. In *Textbook of Malignant Haematology*. Edited by Degos L, Linch DC, Löenberg B. 1999. Martin Dunitz Ltd, London.
- Hoffbrand AV, Pettit JE. *Color Atlas of Clinical Hematology*. Third edition, 2000. Harcourt Publishers Limited, Barcelona.
- Hughes-Jones NC, Wickramasinghe SN. *Lecture Notes on Haematology*. Sixth edition, 1996. Blackwell Science, Oxford.
- Issa JP, Baylin SB, Herman JG. DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications. *Leukemia*. 1997; **11**: suppl 1, S7-11.
- Jones PL, Wolffe AP. Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Semin Cancer Biol*. 1999; **9**: 339-348.
- Lange BJ. Acute Myeloid Leukaemia in Children. In *Textbook of Malignant Haematology*. Edited by Degos L, Linch DC, Löenberg B. 1999. Martin Dunitz Ltd, London.
- Li JM, Nichols MA, Chandrasekharan S, Xiong Y. Transforming growth factor β activates the promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor $p15^{INK4b}$ through an SP1 consensus site. *J Biol Chem*. 1995; **270**: 26750-26753.
- Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*. 1997; **278**: 1059-1064.
- Löwenberg B, Burnett AK. Acute myeloid leukaemia in adults. In *Textbook of Malignant Haematology*. Edited by Degos L, Linch DC, Löenberg B. 1999. Martin Dunitz Ltd, London.
- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, *et al*. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor $p16/CDKN2/MTS1$ in human cancers. *Nature Med*. 1995; **1**: 686-692.
- Newell-Price J, Clark AJL, King P. DNA methylation and silencing of gene expression. *TEM*. 2000; **11**: 142-145.
- Ohnishi H, Guo SX, Ida K, Taki T, Naritaka S, Bessho F, *et al*. Alterations of $p16$ and $p15$ genes in acute leukemia with MLL gene rearrangements and their correlation with clinical features. *Leukemia*. 1997; **11**: 2120-2124.
- Olsen JH. Epidemiology. In *Textbook of Malignant Haematology*. Edited by Degos L, Linch DC, Löenberg B. 1999. Martin Dunitz Ltd, London.
- Ramsahoye BH, Davies CS, Mills KI. DNA methylation: biology and significance. *Blood Rev*. 1996; **10**: 249-261.

- Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future direction. *Carcinogenesis*. 2000; **21**: 461-467.
- Rush LJ, Dai Z, Smiraglia DJ, Gao X, Wright FA, Frühwald M, *et al.* Novel methylation targets in *de novo* acute myeloid leukemia with prevalence of chromosome 11 loci. *Blood*. 2001; **97**: 3226-3233.
- Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapport M, Dryja TP. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet*. 1991; **48**: 880-888.
- Scheinberg DA, Maslak P, Weiss M. Acute Leukemias. In *Cancer – Principles and Practice of Oncology*. Edited by De Vita V, Hellman S, Rosenberg AS. Sixth edition, 2001. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood*. 1999; **93**: 4059-4070.
- Stone S, Dayananth P, Jiang P, Weaver-Feldhaus JM, Tavtigian SV, Cannon-Albrigh L, *et al.* Genomic structure expression and mutational analysis of *p15* (MTS2) gene. *Oncogene*. 1995; **11**: 987-991.
- Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol*. 1999; **9**: 349-358.
- Turker MS. The establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mouse somatic cells. *Semin Cancer Biol*. 1999; **9**: 329-338.
- Virchow R. Weisses, Blut and MilzTumoren. *Med Z* 1847; 16:19.
- Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science*. 1991; **254**: 1138-1146.
- Weinstein HJ, Tarbell NJ. Leukemias and Lymphomas of Childhood. In *Cancer – Principles and Practice of Oncology*. Edited by De Vita V, Hellman S, Rosenberg AS. Sixth edition, 2001. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Wong IHN, Ng M, Huang D, Lee JCK. Aberrant *p15* promotor methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. *Blood*. 2000; **95**: 1942-1949.

Anexo

Anexo. rearranjos detectados/cariótipos/metilação

Caso	Tipo de LA	Análise molecular	Cariótipo	Metilação p15ink4b
1	LAM-M4	inv(16) / <i>CBFB-MYH11</i>	46,XX,inv(16)(p13q22)[24]/46,XX[6]	sim
2	LAM-M2	ND	46,XY[30]	sim
3	LAM-M3	t(15;17) / <i>PML-RARA</i>	46,XX,t(15;17)(q22;q12)[20]/46,XX[10]	sim
4	LAM-M3	t(15;17) / <i>PML-RARA</i>	sem metafases	não
5	LAM-M1	NA	47,XX,+13[21]/46,XX[9]	sim
6	LAM-M4	ND	46,XX[30]	sim
7	LAM-M4	ND	46,XX[11]	não
8	LAM-M1	ND	46,XY,3mar,inc[3]/46,XY[9]	sim
9	LAL-L3	t(8;14) / <i>CMYC-IgH</i>	NA	sim
10	LAM-M3	t(15;17) / <i>PML-RARA</i>	46,XY,t(15;17)(q22;q12)[18]/46,XY[2]	sim
11	LAM-M4	ND	46,XX[30]	não
12	LAM-M1	NA	46,XX[30]	sim
13	LAL-L1	t(12;21) / <i>TEL-AML1</i>	NA	não
14	LAM-M4	ND	46,XY[25]	sim
15	LAM-M5	ND	46,XY[16]	sim
16	LAM-M3	t(15;17) / <i>PML-RARA</i>	sem metafases	sim
17	LAL-L2	t(9;22) / <i>BCR-ABL</i>	53,XX,+5,t(9;22)(q34;q11),+17,+19,+21,+3mar[6]	não
18	LAM pós SMD	NA	45,XX,-7[19]	sim
19	LAM-M4	inv(16) / <i>CBFB-MYH11</i>	46,XX,inv(16)(p13q22)[6]/47,idem,+21[24]	sim
20	LAM-M0	NA	46,XY[5]	sim
21	LAM-M?	ND	46,XY,t(7;12)(p22;q13),del(21)(q22)[30]	sim
22	LAM-M1	ND	45,X,-Y,der(13;18)(q10;q10)x2,+13,+18[24]	não
23	LAM-M2	ND	44~45,XY,-9,-13,-15,-17,+2~3mar[28]/46,XY[2]	sim
24	LAM-M1	ND	NA	sim
25	LAL-L3	t(8;14) / <i>MYCC-IGH</i>	47,XY,+7,t(8;14)(q24;q32)[20]/45,idem,-der(14)t(8;14)(q24;q32),+add(14)(q32),+mar[2]/45,X,-Y[5]/46,XY[3]	sim
26	LAM-M4	ND	46,XX[8]	sim
27	LAM-M2	ND	46,XX,del(7)(q22)[30]	sim
28	LAL-L2	ND	46,XY[3]	sim
29	LAM-M3	t(15;17) / <i>PML-RARA</i>	46,XX,t(15;17)(q22;q12)[17]/46,XX[3]	não
30	LAM-M0	ND	45~46,r,inc[6]	sim
31	LAL-L1	ND	46,XX[22]	sim
32	LAM-M4	inv(16) / <i>CBFB-MYH11</i>	sem metafases	sim
33	LAM-M3	ND	sem metafases	não
34	LAM-M2	t(8;21) / <i>AML1-ETO</i>	45,XY,-7,del(12)(p12),add(17)(p11)[13]/45,idem,add(9)(p13)[8]	não
35	LAM-M4	ND	NA	sim
36	LAM-M3	t(15;17) / <i>PML-RARA</i>	46,XX,t(15;17)(q22;q12)[26]/46,XX[4]	sim
37	LAM-M0	NA	46,XX[30]	sim
38	LAL-L2	t(4;11) / <i>MLL-AF4</i>	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[13]/46,XX[11]	sim
39	LAM-M3	t(15;17) / <i>PML-RARA</i>	46,XY,t(15;17)(q22;q12)[5]/46,XY[8]	sim
40	LAM-M3	t(15;17) / <i>PML-RARA</i>	77,XXY,+Y,+4,+7,+8,+10,t(12;12)(p13;q13),+14,t(15;17)(q22;q12)x2,+21[19]	sim

LA - leucemia aguda

NA - não analisado

ND - não detectado nenhum dos rearranjos pesquisados

Anexo. rearranjos detectados/cariótipos/metilação

41	LAL-L2	ND	47,XX,+21[9]/48,idem,+21[15]/46,XX[6]	não
42	LAM-M4	inv(16) / <i>CBFB-MYH11</i>	47,XY,der(3)t(3;14)(p21;q24),der(14)t(3;14)(p21;q22), inv(16)(p13q22),+21[30]	sim
43	LAM-M3	t(15;17) / <i>PML-RARA</i>	NA	sim
44	LAM-M5	ND	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[14]/46,XX[16]	sim
45	LAL-L2	ND	45,XX,-5[10]/46,XX[10]	sim
46	LAM-M2	t(8;21) / <i>AML1-ETO</i>	45,XX,-7[15]/45,idem,del(12)(p11)[2]	sim
47	LAM-M3	t(15;17) / <i>PML-RARA</i>	46,XY,t(15;17)(q22;q12)[30]	sim
48	LAL-L2	ND	46,XY,del(6)(q21q23),t(8;14)(q24;q11)[22]/46,XY[8]	sim
49	LAL-L1	ND	sem metafases	sim
50	LAM-M2	ND	47,XX,+19[30]	sim
51	LAB	ND	46,XY[11]	sim
52	LAL-L1	ND	sem metafases	não
53	LAL-L1	t(12;21) / <i>TEL-AML1</i>	46,XY[1]	não
54	LAL-L2	ND	46,XY[4]	sim
55	LAL-L1	ND	52~53,inc[3]	não
56	LAM-M3	t(15;17) / <i>PML-RARA</i>	46,XY,t(15;17)(q22;q12)[29]	não
57	LAM-M5	ND	46,XX[30]	sim
58	LAM-M5	NA	46,XX,inv(16)(p13q22)[30]	não
59	LAL-L2	ND	46,XY[6]	sim
60	LAL-L1	t(12;21) / <i>TEL-AML1</i>	46,XX[30]	sim
61	LAL-L1	t(1;19) / <i>E2A-PBX1</i>	46,XY[9]	sim
62	LAL-L1	ND	sem metafases	não
63	LAL-L2	ND	46,XY[30]	sim
64	LAM-M5	ND	47,XX,+8[15]/46,XX[15]	não
65	LAM-M7	NA	sem metafases	sim
66	LAL-L1	ND	46,XY[12]	sim
67	LAM-M3	t(15;17) / <i>PML-RARA</i>	46,XX,t(15;17)(q22;q12)[9]	sim
68	LAM-M3	t(15;17) / <i>PML-RARA</i>	46,XY,t(15;17)(q22;q12)[17]	sim
69	LAM-M3	t(15;17) / <i>PML-RARA</i>	46,XX,-6,t(15;17)(q22;q12),+mar[10]/46,XX[4]	sim
70	LAM-M1	ND	46,XX[14]	não
71	LAM-M4	ND	46,XY[29]	sim
72	LAM-M7	NA	sem metafases	sim
73	LAM-M2	ND	46,XX[14]	sim
74	LAL-L1	ND	46,XY[10]	sim
75	LAL-L2	ND	sem metafases	não
76	LAL-L1	ND	sem metafases	sim
77	LAL-L1	ND	52~54,XY,+Y,+21,+21,inc[7]/46,XY[21]	não

LA - leucemia aguda

NA - não analisado

ND - não detectado nenhum dos rearranjos pesquisados