

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Amanda da Silva Silveira

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DOS TRANSCRITOS
DA TRANSLOCAÇÃO $t(15;17)(q22;q21)$ NA LEUCEMIA
PROMIELOCÍTICA AGUDA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para o
cumprimento da disciplina BIO
7016 para a obtenção do Grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a, Dr.^a Maria
Cláudia Santos da Silva

Florianópolis
2013

AGRADECIMENTOS

Tenho imensa gratidão por todos que de alguma forma contribuíram para que eu realizasse esse trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina onde realizei meu curso de Graduação em Ciências Biológicas.

Aos membros do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias – LOEH - que auxiliaram em todas as etapas desse trabalho e sempre se demonstraram solícitos em ajudar no que fosse preciso.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Maria Cláudia Santos da Silva, que confiou na minha capacidade e abriu as portas do LOEH para que eu pudesse estudar o que eu sempre quis desde que ingressei na graduação. Ajudou-me muito ao longo de todo o tempo em que estive no laboratório, através de seus ensinamentos, dedicação, paciência e atenção.

À Christiane Coelho, que me ensinou as técnicas laboratoriais e acompanhou o meu trabalho desde o início, me passou muitas teorias e me proporcionou um crescimento enorme como estudante e pesquisadora.

À Mestre Ana Carolina Rabello de Moraes, que, para mim, é um exemplo de dedicação e inteligência, e me proporcionou momentos únicos de ensinamentos, os quais foram muito importantes para a minha evolução acadêmica e pessoal.

À Mestre Letícia Muraro Wildner e Renata Rudolf, que além de estarem sempre dispostas a ajudar no que fosse preciso, me auxiliaram nos métodos estatísticos desse trabalho, sendo de grande importância para a conclusão do mesmo.

À banca examinadora, Dr.^a Joanita Gonzaga Del Moral, a Mestre Ana Carolina Rabello de Moraes e a Mestre Daiane Cobianchi, que gentilmente aceitaram o convite e prontamente se dispuseram a avaliar e contribuir com este trabalho.

Em especial:

Aos meus pais, por todo amor, apoio e suporte que me ofereceram ao longo de toda a minha vida e principalmente durante o período da graduação.

À minha avó, que esteve sempre do meu lado e me apoiou incondicionalmente em todas as minhas decisões.

Ao meu namorado Djalma, que sempre foi um grande companheiro e deu todo o apoio de que precisei.

Às minhas amigas de graduação Maria Luiza, Patrícia e Letícia, pelas quais tenho um enorme carinho e admiro muito, que sempre me ajudaram e me apoiaram. A graduação não teria sido a mesma sem elas ao meu lado.

Aos colegas e amigos que fiz no laboratório, os dias foram mais leves com eles por perto. Espero ter feito pelo menos um décimo de tudo que eles fizeram por mim.

RESUMO

As leucemias agudas (LAs) constituem um grupo de neoplasias malignas caracterizado pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas na medula óssea e nos tecidos linfóides. As LAs podem estar relacionadas a anormalidades genéticas, como é o caso da leucemia promielocítica aguda (LPA) caracterizada pela presença de rearranjos cromossômicos envolvendo o gene da Leucemia Promielocítica (*PML*) e o gene Receptor Alfa do Ácido Retinóico (*RAR α*), a translocação t(15;17)(q22;q21). O gene híbrido *PML-RAR α* , presente em 90% dos casos, codifica uma proteína de fusão essencial para a patogênese da doença. Conforme o ponto de quebra do gene *PML*, no cromossomo 15, os transcritos *bcr1*, *bcr2* e *bcr3* podem ser formados. A correlação entre essas isoformas e os parâmetros clínicos ainda é controversa. O objetivo deste estudo foi determinar a frequência dos subtipos transcricionais *PML-RAR α* em um grupo de 16 pacientes portadores de LPA com a translocação t(15;17)(q22;q21), atendidos no Serviço de Hematologia do HU-UFSC e avaliar a associação desses subtipos com diferentes parâmetros clínicos e laboratoriais, como leucometria, idade, LDH, percentual de blastos, expressão imunofenotípica dos marcadores CD34 e CD2 e presença da mutação *FLT3-DIT*. O método utilizado foi o RT-PCR. Os resultados mostraram uma maior frequência das isoformas *bcr1* e *bcr2* e uma associação entre o aumento da contagem de leucócitos e o transcrito *bcr2* ($P = 0,019$). Não houve nenhuma associação estatisticamente significativa entre os subtipos moleculares e a idade, LDH e porcentagem de blastos. Esses resultados sugerem a importância de analisar a expressão dos transcritos para o diagnóstico e prognóstico, assim como para a terapia individualizada.

Palavras-chave: Leucemia promielocítica aguda; *PML-RAR α* ; Translocação t(15;17)(q21;q22).

ABSTRACT

Acute leukemias (LAs) are a group of malignant neoplasms characterized by the uncontrolled proliferation of hematopoietic cells in the bone marrow and lymphoid tissues. The LAs may be related to genetic abnormalities, such as acute promyelocytic leukemia (APL) characterized by the presence of rearrangements involving the promyelocytic leukemia gene (*PML*) and retinoic acid receptor (*RAR α*) gene, the translocation t(15;17)(q22;q21). The hybrid gene *PML-RAR α* , present in 90% of cases, encodes a fusion protein essential to the pathogenesis of the disease. Depending of the *PML*'s gene breakpoint in chromosome 15, the transcript subtypes bcr1, bcr2 and bcr3 may be formed. The correlation between these isoforms and clinical parameters is still controversial. The objective of this study was to determine the frequencies of the *PML-RAR α* transcripts in a series of 16 APL patients with translocation t(15;17)(q22;q21) treated at the Hematology Service of HU-UFSC and to evaluate the association of these subtypes to different parameters, like white blood cell (WBC) count, age, LDH, percentage of blasts, expression of immunophenotypic markers CD34 and CD2 and presence of the *FLT3-DIT* mutation. The method used was RT-PCR. The results showed a higher frequency of the bcr1 and bcr2 isoforms and an association between increased WBC count and bcr2 transcript (P=0,019). No significant statistical association was found between molecular subtypes and age, LDH and percentage of blasts. In conclusion, these data suggest the importance to analyze the expression of transcripts for diagnosis and prognosis, as well as for the therapy individualized.

Keywords: Acute promyelocytic leukemia; *PML-RAR α* , Translocation t(15;17)(q22;q21).

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Representação esquemática da translocação t(15;17)(q22;q21)	18
Esquema 2 – Representação esquemática do complexo RAR α e RXR na ausência e presença do ácido retinóico (AR)	20

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fotos de géis de agarose 2% corados com brometo de etídio mostrando os produtos de PCR *nested* dos diferentes transcritos 30
- Figura 4 – Classificação e frequência dos diferentes transcritos encontrados nas amostras dos pacientes analisados com diagnóstico de LPA (n=16) 33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação OMS (2008) para as Leucemias Mielóides Agudas.....	15
Quadro 2 – Classificação OMS (2008) para as Leucemias Linfóides Agudas.....	16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo da RT-PCR para cDNA.....	26
Tabela 2 – Protocolo da PCR para GAPDH.....	27
Tabela 3 – Sequência dos iniciadores utilizados na análise da RT-PCR da t(15;17)(q22;q21) com o gene fusionado PML-RAR α	28
Tabela 4 – Protocolo da 1 ^o RT-PCR para t(15;17)(q22;q21).....	28
Tabela 5 – Tamanho dos produtos de PCR nos diferentes transcritos PML-RAR α de acordo com os diferentes conjuntos de iniciadores.....	29
Tabela 6 – Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com translocação t(15;17)(q22;q21) no momento do diagnóstico.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATRA	Ácido transretinóico (do inglês, <i>all-trans-retinoic acid</i>)
BCR1	<i>Breakpoint cluster region 1</i>
BCR2	<i>Breakpoint cluster region 2</i>
BCR3	<i>Breakpoint cluster region 3</i>
β-Me	Beta – Mercaptoetanol
cDNA	DNA complementar (do inglês, <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado (do inglês, <i>deoxyribonucleotide triphosphates</i>)
DRM	Doença residual mínima
DTT	Dicloro-difenil-tricloroetano
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EL	Tampão de lise de eritrócitos (do inglês, <i>erythrocyte lysis buffer</i>)
FLT3	Tirosina cinase 3 semelhante a FMS (do inglês, <i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>)
FLT3-DIT	Mutação do tipo duplicação interna em tandem no gene <i>FLT3</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (do inglês, <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
HU-UFSC	Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina
INCA/MS	Instituto Nacional do Câncer/ Ministério da Saúde
LA	Leucemia aguda
LDH	Lactato desidrogenase
LLA	Leucemia linfóide aguda

LMA	Leucemia mieloide aguda
LPA	Leucemia promielocítica aguda
NB	Corpos nucleares (do inglês, <i>nuclear bodies</i>)
<i>NPM</i>	Nucleofosmina
<i>NuMA</i>	<i>Nuclear Matrix-associated</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
<i>PLZR</i>	<i>Promyelocytic leukemia zinc finger</i>
<i>PML</i>	<i>Promyelocytic leukemia</i>
<i>RARα</i>	<i>Retinoic acid receptor alpha</i>
RAREs	Elementos responsivos ao ácido retinóico (do inglês, <i>retinoic acid response elements</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>rybonucleic acid</i>)
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
RXR	Receptor X retinóide (do inglês, <i>retinoid X receptor</i>)
STAT5b	<i>Signal transducer and activator of transcription 5b</i>
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	LEUCEMIA	13
1.2	LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA	16
1.3	GENE <i>PML</i>	18
1.4	GENE <i>RARα</i>	19
1.5	TRANSLOCAÇÃO <i>PML-RARα</i>	20
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVOS GERAIS	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	METODOLOGIA	24
4.1	CASUÍSTICA	24
4.2	CULTURA DE CÉLULAS DE LINHAGEM LEUCÊMICA	24
4.3	EXTRAÇÃO DE RNA	24
4.4	SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR	25
4.5	DETECÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE GAPDH	26
4.6	PESQUISA DA TRANSLOCAÇÃO <i>t(15;17) (q22;q21)</i>	27
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÕES	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

Câncer é um termo usado para descrever um grupo de mais de uma centena de doenças que apresentam em comum a proliferação desordenada de células e a incapacidade de diferenciação celular (LODISH et al., 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Em 2008, o câncer foi responsável por 7,6 milhões de óbitos, o que corresponde a aproximadamente 13% de todas as mortes no mundo, e mais de 70% dessas mortes ocorrem em países de baixa e média renda. A previsão é de que as taxas tendem a continuar crescendo, com um número estimado de 11 milhões de mortes em 2030 (OMS, 2012). No Brasil, as estimativas para 2013, apontam 8.510 novos casos de leucemia, sendo 300 deles no estado de Santa Catarina (INCA/MS, 2011).

Entre 2000 e 2007, os investimentos do Ministério da Saúde com o atendimento de pacientes oncológicos aumentou em 20% ao ano, atingindo R\$ 1,7 bilhão. Esse valor representa a internação de 500 mil pessoas por ano, 235 mil sessões de quimioterapia e 100 mil de radioterapia por mês (INCA, 2011). Esses dados mostram que o câncer consolida-se como um importante problema de saúde pública. Assim, o aumento da eficiência no diagnóstico laboratorial conduz a uma melhora na avaliação clínica do paciente, o que resulta na escolha de tratamentos com protocolos terapêuticos individualizados e específicos que podem diminuir o tempo de internação hospitalar, e, dessa forma, diminuir os custos para o Sistema Único de Saúde e melhorar a qualidade de vida desses indivíduos.

1.1 LEUCEMIA

As leucemias agudas (LAs) constituem um grupo de neoplasias malignas caracterizado pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas na medula óssea e nos tecidos linfoides, que posteriormente, atingem a circulação periférica e podem se infiltrar em outros sistemas orgânicos (SWERDLOW et al., 2008). A proliferação descontrolada de células leucêmicas inibe a produção das células sanguíneas normais, como os leucócitos, os eritrócitos e as plaquetas. Em decorrência da não-funcionalidade dessas células, os indivíduos afetados, além de sofrerem de anemia e desordens hemorrágicas, estão mais sujeitos a infecções (ISLAM, 1992).

As células leucêmicas originam-se a partir de uma mutação somática em uma única célula-tronco ou célula primordial, a qual forma o clone leucêmico. A transformação leucêmica pode ocorrer em diferentes fases da diferenciação de precursores linfóides ou mielóides, o que a caracteriza como uma doença heterogênea, sob o aspecto biológico e morfológico. Por constituírem um grupo heterogêneo de doenças, as leucemias diferem-se quanto à etiologia, patogênese, prognóstico e resposta ao tratamento (PUI; EVANS, 1998; BAIN, 2003). O fato de a leucemia ser uma doença genética faz com que a identificação das alterações nas células blásticas seja imprescindível para a identificação de subgrupos de pacientes com características clínicas distintas, que orientam o tratamento e a monitoração da resposta terapêutica (RUBNITZ; PUI, 1999, SWERDLOW et al., 2008).

Em 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu novos critérios para o diagnóstico e classificação das neoplasias do sistema hematopoiético e linfóide. A leucemia mieloide aguda foi subdividida em 7 subcategorias, como mostra o Quadro 1.

Quadro 1 – Classificação OMS (2008) para as Leucemias Mieloides Agudas.

Leucemia mieloide aguda (LMA):
1. LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes;
<ul style="list-style-type: none"> • LMA com t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>; • LMA com inv(16)(p13;q22) ou t(16;16)(p13;q22); <i>CBF-MYH1</i>; • LMA com t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>; • LMA com t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>; • LMA com inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPNI-EVII</i>; • Leucemia Promielocítica Aguda com t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARα</i>; • LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL</i>; • LMA com <i>NPM1</i> mutado; • LMA com <i>CEBPA</i> mutado.
2. LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia;
3. Neoplasias mieloides associadas ao tratamento;
4. LMA não categorizada nos itens anteriores;
<ul style="list-style-type: none"> • LMA minimamente diferenciada; • LMA sem maturação; • LMA com maturação; • Leucemia mielomonocítica aguda; • Leucemia monoblástica e monocítica aguda; • Leucemia eritróide aguda; • Leucemia megacariocítica aguda; • Leucemia basofílica aguda; • Pan-mielose com mielofibrose aguda.
5. Sarcoma mieloide;
6. Proliferação mieloide relacionada com Síndrome de Down;
7. Neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitoides.

Fonte: Adaptado de Swerdlow et al., 2008.

A leucemia linfóide aguda (LLA) foi subdividida de acordo com a linhagem em B, T ou NK e B com anormalidades genéticas recorrentes (Quadro 2) (SWERDLOW et al., 2008). A LLA de linhagem B pode ser classificada de acordo com o grau de diferenciação celular

em pró-B (B-I), comum (B-II), pré-B (B-III) e LLA-B (B-IV), e a de linhagem T em LLA pró-T (TI), LLA pré-T (TII), T cortical (TIII), T madura (T-IV) (BENE et al., 1995; PUI; EVANS, 1998; BASSO et al., 2001).

Quadro 2 – Classificação OMS (2008) para as Leucemias Linfoides Agudas.

Leucemia linfóide aguda (LLA):
1. Leucemia/linfoma linfoblástica B associada a anormalidades genéticas recorrentes;
<ul style="list-style-type: none"> • Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(9;22)(q34;q11); <i>BCR-ABL1</i>; • Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(v;11q23), rearranjo <i>MLL</i>; • Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(12;21)(p13;q22)<i>TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)</i>; • Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(5;14)(q31;q32) <i>IL3-CMI</i>; • Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(1;19)(q23;p13); <i>TCF3-PBX1</i>; • Leucemia/linfoma linfoblástica B com hiperdiploidia; • Leucemia/linfoma linfoblástica B com hipodiploidia.
2. Leucemia/linfoma linfoblástica B, não categorizada nos itens anteriores;
3. Leucemia/linfoma linfoblástica T.

Fonte: Adaptado de Swerdlow et al., 2008.

Entre os subtipos de LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes descritos pela OMS em 2008, está a leucemia promielocítica aguda (LPA), a qual é foco deste estudo.

1.2 LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA

A LPA é um subtipo de LMA caracterizada pela presença de translocações cromossômicas. Entre elas, a t(15;17)(q22;q21) é a mais frequente, detectada em mais de 90% dos casos (JÁCOMO et al., 2008).

Como resultado dessa translocação pode-se observar uma parada na maturação das células da linhagem mieloide no estágio de

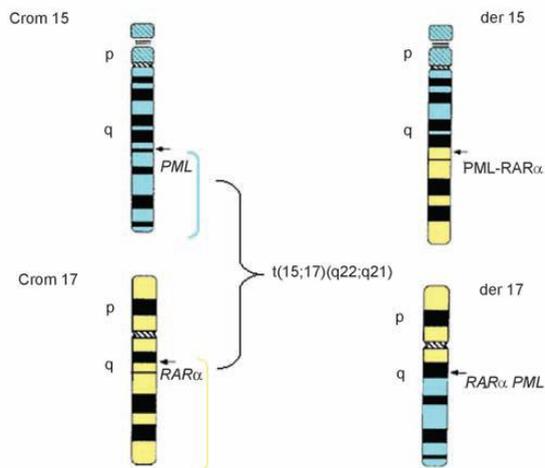
promielócitos (GANZITTI et al., 2010). Morfologicamente, os promielócitos anormais possuem núcleo excêntrico, disforme e abundantes granulações no citoplasma. Além disso, podem apresentar múltiplos bastonetes de Auer, o que dá a estas células a denominação de *Faggot cells* (SAGRILLO et al., 2005).

Os sinais e sintomas normalmente são comuns as outras LMAs como febre, emagrecimento, palidez, sangramentos, prostração e fraqueza. Ocorrem predominantemente em adultos jovens com quadro clínico de leucopenia e coagulopatia, a qual se caracteriza por estados hemorrágicos com coagulação intravascular disseminada (CIVD) que é a manifestação mais notória da doença (TALLMAN; ALTMAN, 2009; ZHOU et al., 2006).

A LPA é uma malignidade hematológica que combina alterações genéticas e epigenéticas no processo de leucemogênese e alterações cromossômicas estruturais que influenciam no equilíbrio dinâmico da cromatina na região promotora de alguns genes (LEAL et al., 2009).

Geneticamente, ela está associada com alterações cromossômicas estruturais, como a translocação cromossômica t(15;17), que é o resultado da quebra e fusão do gene da Leucemia Promielocítica (*PML*), localizado no braço longo do cromossomo 15, com o gene Receptor Alfa do Ácido Retinóico (*RAR α*), localizado no braço longo do cromossomo 17 (Esquema 1) (JÁCOMO et al., 2008). A presença dessa alteração genética confere bom prognóstico para os pacientes portadores de LPA (SWERDLOW et al., 2008; BACHER et al., 2009). Embora a t(15;17)(q22;q21) seja a mais frequente, outras fusões alternativas, em menor frequência, podem ocorrer, com o gene *PLZF* (Promyelocytic Leukemia Zinc Finger) da t(11;17)(q23;q21), com o *NPM* (Nucleophosmin) da t(5;17)(q35;q21), com o *NuMA* (Nuclear Matrix-associated) da t(11;17)(q13;q21), e com os genes parceiros *STAT5b* (Signal Transducer and Activator of Transcription 5B) da dup17(q11;q21) (WANG; CHEN, 2008). O conhecimento da alteração genética é de extrema importância, pois está relacionada com a resposta aos medicamentos utilizados no tratamento, como o Ácido Transretinóico (ATRA) (LO COCO, et al., 1999; GRIMWADE; LO COCO, 2002; OHNISHI, 2007).

Esquema 1 – Representação esquemática da $t(15;17)(q22;q21)$.



Demonstração da translocação cromossômica recíproca $t(15;17)(q22;q21)$ envolvendo os gene *PML* e *RARα*, localizados nos cromossomos 15 e 17, respectivamente.

Fonte: LEAL et al., 2009.

1.3 GENE *PML*

A proteína codificada pelo *PML* encontra-se organizada em dímeros e atua como supressor de tumor através do controle da apoptose e diferenciação celular (JÁCOMO et al, 2008). Estudos com células em cultura sugerem que ele controla a indução de apoptose dependente de p53, supressão de crescimento e senescência celular em resposta à radiação ionizante e transformação oncogênica (GRIMWADE, 1999; ZHONG; SALOMONI; PANDOLFI, 2000; LO-COCO; AMMATUNA, 2006). Além disso, o *PML* é requerido para a repressão da transcrição mediada por outros supressores de tumor (GURRIERI et al., 2004). A proteína *PML*, no núcleo, é detectada fazendo parte de um complexo de multiproteínas, estruturas nucleares conhecidas como NBs (*nuclear bodies*), juntamente com outras proteínas (LEAL et al., 2009).

Na translocação cromossômica $t(15;17)$, o ponto de quebra no gene *PML* pode ser variável, sendo capaz de gerar produtos de tamanhos diferentes, isoformas do transcrito *PML-RARα*, entre os pacientes. No entanto, no mesmo paciente, o transcrito é invariável, o que demonstra a natureza clonal do fenômeno (LEAL et al., 2009). Três diferentes

isoformas são formadas como resultado de *splicing* alternativo de éxons do gene: a *bcr1* (*breakpoint cluster region 1*), ou isoforma longa, a qual deriva de pontos de quebra no íntron 6 do gene e é detectada em 55-60% de casos de LPA; a *bcr2* (*breakpoint cluster region 2*), ou variável, derivada de pontos de quebra no éxon 6 e ocorre em cerca de 8% dos casos; e a *bcr3* (*breakpoint cluster region 3*), ou isoforma curta, que resulta de pontos de quebra no íntron 3 e tem frequência de 35-40% em pacientes com LPA (HASAN et al., 2010).

Estudos indicam que a variabilidade genética, correlacionada à distribuição geográfica, pode influenciar na frequência de um determinado sítio de quebra do gene *PML*; contudo, a correlação entre esses subtipos de transcritos e parâmetros clínicos ainda é controversa (LEAL et al., 2009).

1.4 GENE *RARα*

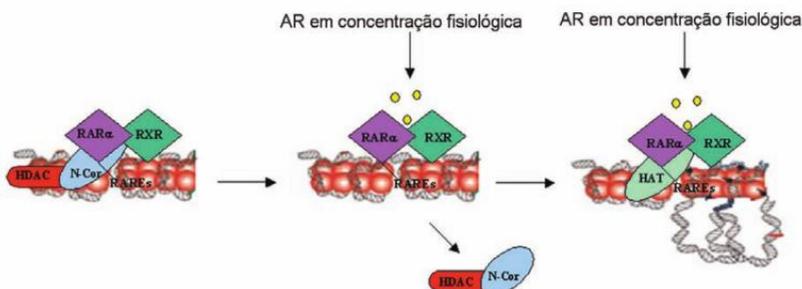
O gene *RARα* codifica o Receptor Alfa do Ácido Retinóico, o qual faz parte da superfamília de receptores nucleares de hormônios que atuam como reguladores da transcrição dependentes do ligante, são capazes de se ligar a segmentos específicos do DNA, denominados elementos responsivos ao hormônio, o qual tem papel fundamental na diferenciação mieloide (LEAL et al., 2009).

Os elementos responsivos ao DNA, denominados Elementos Responsivos ao Ácido Retinóico (RAREs), estão localizados nas regiões promotoras dos genes-alvo específicos. A heterodimerização de *RARα* com a família de receptores X retinóides é requerida para ligar ao DNA de forma eficiente. A ação de *RARα* e RXR é traduzida pelo sinal retinóide e ativada pelo ácido 9-*cis*-retinóico (MISTRY et al., 2003).

Na ausência do ligante (ácido retinóico) o *RARα* forma heterodímeros que se ligam a segmentos específicos do DNA na região promotora de seus genes-alvo associando-se com co-repressores transcripcionais, os quais recrutam um complexo que contém atividade histona desacetilase. Esse complexo formado vai produzir a desacetilação de histonas e induzir à condensação da cromatina na região promotora, o que impede a organização dos fatores de transcrição basal e, dessa forma, reprime a transcrição desses genes (LEAL et al., 2009). Concentrações fisiológicas de ácido retinóico (1 nM) são capazes de liberar o complexo do co-repressor nuclear RXR-*RARα* e recrutar co-ativadores com atividade de histona acetiltransferase. Como consequência da fusão *PML/RARα*, pode ocorrer homodimerização com outra *PML/RARα*, e o híbrido ligar-se ao complexo co-repressor histona

desacetilase com maior afinidade que o *RARα* tipo selvagem. A liberação do complexo híbrido somente é obtida por meio de doses farmacológicas (1 μ M) de Ácido Transretinóico (ATRA), o que possibilita a descondensação da cromatina e permite assim o amadurecimento normal da célula (Esquema 2) (OHNISHI, 2007).

Esquema 2 – Representação esquemática do complexo *RARα* e RXR na ausência e presença do ácido retinóico (AR).



O complexo *RARα* e RXR, na ausência de AR, associa-se a co-repressores e não ocorre a transcrição. Em concentrações fisiológicas, o AR se liga ao complexo *RARα* e RXR, liberando o complexo repressor e recrutando co-ativadores que vão descondensar a cromatina e permitir que ocorra o processo transcricional.

Fonte: Leal et al., 2009.

Por isso, o conhecimento dos processos citogenéticos são de extrema importância, pois estão relacionados com a sensibilidade aos fármacos a serem utilizados no tratamento (LO COCO, et al., 1999).

1.5 TRANSLOCAÇÃO PML-*RARα*

Em 1977, Rowley e colaboradores, da Universidade de Chicago, relataram a translocação entre os cromossomos 15 e 17[t(15;17)] como um marcador genético da LPA (LEAL et al., 2009).

Como citado anteriormente, a translocação cromossômica recíproca t(15;17) é o resultado da quebra e fusão dos genes *PML* (*Promyelocitic Leukemia*) e *RARα* (*Retinoic acid receptor alpha*). A consequência dessa alteração genética é a produção de dois genes de fusão que codificam as proteínas híbridas PML-*RARα* e *RARα*-PML (JÁCOMO et al., 2008). O híbrido PML-*RARα* é expresso em todos os casos de LPA, enquanto que seu parceiro recíproco de fusão *RARα*-PML é detectado na maior parte dos casos (HASAN et al., 2010), o que

sugere que o PML-RAR α tem um papel na leucemogênese da LPA (LEAL et al., 2009). Como visto anteriormente, os híbridos PML-RAR α retêm a maioria dos domínios funcionais das proteínas parentais e atuam como produtos oncogênicos dominante-negativos, interferindo nas funções da via retinóide e do PML (JÁCOMO et al., 2008).

2 JUSTIFICATIVA

A LPA foi o primeiro modelo de doença genética adquirida tratada com um medicamento específico, ATRA, o qual induz diferenciação terminal seguida de apoptose nos promielócitos leucêmicos (JÁCOMO et al., 2008). Esse progresso no tratamento da doença foi atribuído à introdução de novos agentes terapêuticos que atuam diretamente na lesão molecular, o qual passou a ser o primeiro exemplo de sucesso de terapia alvo molecular (LEAL et al., 2009). Com o protocolo de tratamento atual, 80 a 90% dos pacientes se mantêm com sobrevida livre de doença em cinco anos (TALLMAN; ALTMAN, 2009). Assim, o diagnóstico laboratorial preciso e a detecção rápida da presença da translocação ou de seu equivalente molecular é imprescindível para definir o diagnóstico e a introdução do tratamento com ATRA (SAGRILLO et al., 2005).

A técnica de RT-PCR, por ser altamente sensível e permitir a identificação do ponto de quebra do gene *PML* e as isoformas do transcrito *PML-RAR α* é utilizada para confirmação do diagnóstico genético, o que é importante para a decisão terapêutica e monitoramento da doença (LEAL et al., 2009). No entanto, muitas vezes a variabilidade das isoformas do transcrito *PML-RAR α* pode gerar dúvidas na análise do RT-PCR. Dessa forma, o foco deste trabalho foi analisar a presença dessas isoformas nas amostras dos pacientes com suspeita clínica de LPA encaminhados ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias da UFSC.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a existência de polimorfismos genéticos nas amostras sanguíneas dos pacientes com suspeita clínica de LPA com translocação t(15;17)(q22;q21) atendidos pelo Serviço de Hematologia do Hospital Polydoro Ernani de São Thiago e encaminhados ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias, da Universidade Federal de Santa Catarina, no período de agosto de 2009 a novembro de 2012.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil de expressão das isoformas da t(15;17)(q22;q21) nas amostras dos pacientes com diagnóstico de LPA antes da primeira terapia e durante o tratamento quimioterápico;
- Comparar o perfil de expressão da t(15;17)(q22;q21) entre as amostras analisadas;
- Determinar a frequência dos transcritos encontrados nos pacientes portadores de LPA;
- Analisar se a presença de alguma isoforma está relacionada com a diminuição da expressão dos sintomas durante a detecção de doença residual mínima (DRM) nos pacientes com diagnóstico de LA;
- Associar a presença de diferentes transcritos com as características clínicas e laboratoriais: leucometria, LDH, percentual de blastos, idade, expressão imunofenotípica dos marcadores CD34 e CD2 e presença da mutação *FLT3-DIT*, no momento do diagnóstico e com a evolução clínica dos pacientes portadores de LPA, atendidos pelo Serviço de Hematologia do HU-UFSC.

4 METODOLOGIA

4.1 CASUÍSTICA

Foram analisadas todas as amostras sanguíneas dos pacientes atendidos pelo Serviço de Hematologia do Hospital Polydoro Ernani de São Thiago, e encaminhadas ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), com suspeita clínica de LPA ou análise de DRM, para investigação da presença da anormalidade genética da $t(15;17)(q22;q21)$ no período de agosto de 2009 a novembro de 2012.

Nesse período, foram encaminhadas ao laboratório 62 amostras com suspeita de LPA. Destas, 16 apresentaram banda compatível com a da translocação $t(15;17)(q22;q21)$ no momento do diagnóstico. Outras 22 amostras foram encaminhadas para o acompanhamento de DRM, totalizando 38 amostras incluídas nesse estudo. Foram excluídos aqueles pacientes que não tiveram o diagnóstico final de LPA e aqueles que não foram tratados no HU-UFSC.

A coleta dos dados clínicos e laboratoriais (leucometria, LDH, percentual de blastos, idade, expressão imunofenotípica dos marcadores CD34 e CD2 e presença da mutação *FLT3-DIT*) foi realizada a partir da análise dos prontuários dos pacientes do HU-UFSC.

Foi obtida a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, nº913/2010), como prevê o Comitê de Ética de Pesquisa em Seres humanos da UFSC, previamente à coleta das amostras.

4.2 CULTURA DE CÉLULAS DE LINHAGEM LEUCÊMICA

Como controle positivo para a isoforma bcr1, foram utilizadas células de linhagens de LPA com a translocação $t(15;17)(q22;q21)$ de origem humana (NB-4). As células foram mantidas em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM de tampão HEPES em pH 7.4, e permaneceram em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂.

4.3 EXTRAÇÃO DE RNA

Para a extração de RNA, foi utilizado o QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Austin, Texas, USA). As amostras de sangue periférico ou medula óssea foram coletadas, anticoaguladas com EDTA

e processadas em até duas horas após a coleta. Os processos foram realizados em fluxo laminar exclusivo para extração de RNA, a fim de evitar contaminação das amostras.

Inicialmente, a amostra foi homogeneizada com a solução tampão de lise de eritrócitos (EL) fornecida pelo kit, na proporção de 1 mL de sangue para 5 mL de EL, e incubada no gelo por 15 minutos. Após a incubação, foi centrifugada a 400 x g por 10 minutos na temperatura de 4°C. Depois, o sobrenadante foi descartado e os leucócitos ressuspensos em 2 mL de tampão EL. A amostra voltou a ser centrifugada a 400 x g por 10 minutos, a 4°C. Ao final da centrifugação, os leucócitos obtidos foram lisados com 600 µL de uma solução tampão fornecida pelo kit (RLT), suplementada com β-mercaptoetanol 0,1%, a fim de que o RNA da célula fosse exposto. A amostra lisada foi transferida para a coluna de separação QIAshredder e centrifugada a 10.000 x g por 2 minutos. Adicionou-se 600 µL de etanol 70% ao fluido filtrado, que foi transferido para uma coluna QIAamp e centrifugado por 15 segundos a uma velocidade de 10.000 x g. Após centrifugação, a coluna foi lavada uma vez com 700 µL de tampão RW1 e duas vezes com tampão RPE, fornecidos pelo kit, e centrifugada novamente por 15 segundos na velocidade de 10.000 x g entre as duas primeiras lavagens e na última por 3 minutos. No final da extração, foi adicionado 50 µL de água livre de RNases sobre a membrana da coluna, e a amostra foi submetida a centrifugação de 1 minuto a 10.000 x g a fim de que o RNA fosse eluído da membrana. O filtrado foi armazenado em refrigerador -80°C para ser utilizado posteriormente na transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

4.4 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR

A expressão da anormalidade genética t(15;17)(q22;q21) foi avaliada por RT-PCR. A transcrição reversa consiste na síntese de DNA complementar (cDNA) ao RNA através da enzima transcriptase reversa (RT) que atua em RNA total ou numa fração enriquecida de RNA poliadenilado.

Inicialmente, para a síntese de cDNA, foi realizada a digestão da amostra por DNase, a fim de evitar a presença de DNA “contaminante”. Foram colocados em microtubos de 0,2 mL, 10 µL de amostra de RNA, 1 µL da enzima (1 U/µL) e 1 µL de tampão de reação. Após 15 minutos em temperatura ambiente, a reação foi inativada por 1 µL de EDTA (25mM) e incubada por 10 minutos a 65°C. Depois de

inativar a enzima, as amostras foram incubadas por mais 5 minutos a 70°C e depois colocadas no gelo por 5 minutos.

Posteriormente, foi preparada uma solução mix, segundo a Tabela 1 e foi adicionado 15 µL da mesma em cada tubo de amostra.

Tabela 1 – Protocolo da RT-PCR para cDNA.

Master Mix cDNA	
Reagente	Volume
H ₂ O.DEPC 0,1%	4,6 µL
Tampão para cDNA 5X	5,0 µL
DTT (0,1M)	2,0 µL
dNTP mix (100mM)	0,4 µL
Random Hexamers (100ng/µL)	2,0 µL
RNase OUT [®] (40U/ µL)	0,5 µL
SuperScript II [®] (200U/ µL)	0,5 µL
Volume Final	15,0 µL

Por fim, as amostras foram levadas ao termociclador e submetidas aos ciclos de 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 37 °C e 5 minutos a 90 °C, depois, foram incubadas no gelo por 5 minutos ao término da programação.

4.5 DETECÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *GAPDH*

A fim de confirmar a síntese de cDNA, foi utilizada a expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*). Foi preparada a solução mix de acordo com a Tabela 2 e, em seguida, foi adicionado 1 µL de cDNA da amostra, totalizando 50 µL em cada microtubo.

A sequência dos iniciadores utilizados foi de: 5'-CGTCTTACCACCATGGAGAA-3' para o sense e 5'-GAGGCAGGGATGATGTTCTG-3' para o antisense.

As amostras foram levadas ao termociclador e sofreram desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos. Depois foram submetidas a 25 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, finalizando o programa a 4 °C.

Tabela 2 – Protocolo da PCR para GAPDH.

Master Mix GAPDH	
Reagente	Volume
H ₂ O. PCR	39,7 µl
Tampão para PCR 10X	5,0 µl
MgCl ₂ (50mM)	1,5 µl
dNTP mix (100mM)	0,4 µl
Primer GA sense (10mM)	1,0 µl
Primer GA antisense (10mM)	1,0 µl
Taq DNA polymerase (5U/µL)	0,4 µl
Volume Final	49,0 µl

Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, submetidos a 100 volts por 30 minutos, corados com brometo de etídio e visualizados sob iluminação ultravioleta de 320nm (HOEFER-MacroVue UV-20), utilizando-se um sistema de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT® Biosystems). O tamanho dos fragmentos foi estimado em 330 pares de base (pb), em comparação com o marcador de peso molecular 50pb DNA *ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

4.6 PESQUISA DA TRANSLOCAÇÃO t(15;17)(q22;q21)

Para pesquisar a translocação t(15;17)(q22;q21), foi realizada RT-PCR seguida de *nested* PCR, utilizando os iniciadores descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Sequência dos iniciadores utilizados na análise da RT-PCR da t(15;17)(q22;q21) com o gene fusionado PML-RAR α .

Iniciador	Posição 5' (tamanho)	Sequência (5'-3')
PML-A1	1438 (21)	CAGTGTACGCCTTCTCCATCA
PML-A2	969 (18)	CTGCTGGAGGCTGTGGAC
RAR α -B	485 (20)	GCTTGTAGATGCGGGGTAGA
PML-C1	1546 (21)	TCAAGATGGAGTCTGAGGAGG
PML-C2	997 (19)	AGCGCGACTACGAGGAGAT
RAR α -D	426 (20)	CTGCTGCTCTGGGTCTCAAT
RAR α -E3'	682 (20)	GCCCACTTCAAAGCACTTCT

Fonte: DONGEN et al, 1999.

Nas primeiras PCRs, foram utilizados os pares iniciadores PML-A1 (*sense*) e RAR α -B (*antisense*), PML-A2 (*sense*) e RAR α -B (*antisense*), PML-C1 (*sense*) e RAR α -E3' (*antisense*), PML-C2 (*sense*) e RAR α -E3' (*antisense*) (Tabela 3). A solução *Mix* foi preparada conforme Tabela 4, e ao final foi adicionado 2 μ L de cDNA, totalizando um volume de 50 μ L em cada microtubo.

Tabela 4 – Protocolo da 1 $^{\circ}$ RT-PCR para t(15;17)(q22;q21).

Master Mix 1$^{\circ}$ RT-PCR	
Reagente	Volume
H ₂ O. PCR	37,9 μ l
Tampão para PCR 10X	5,0 μ l
MgCl ₂ (50mM)	2,5 μ l
dNTP mix (100mM)	0,4 μ l
Primer sense (10mM) (A1, A2, C1 ou C2)	1,0 μ l
Primer anti-sense (10mM) (B ou E3')	1,0 μ l
Taq DNA polymerase (5U/ μ L)	0,2 μ l
Volume Final	48,0 μ l

Para a *nested* PCR, o protocolo utilizado foi o mesmo, com exceção da água ultra-pura que foi utilizado 1 μ L a mais. Os iniciadores utilizados foram o PML-C1 (*sense*) e o RAR α -D (*antisense*), e PML-C2 (*sense*) e o RAR α -D (*antisense*) (Tabela 3), e utilizou-se como molde 1

μ L dos produtos amplificados da primeira PCR, com os iniciadores PML-A1 (*sense*) e RAR α -B (*antisense*), e PML-A2 (*sense*) e RAR α -B (*antisense*).

Após preparação, as amostras foram colocadas no termociclador, submetidas a 30 segundos a 95°C para desnaturação inicial, seguida de 35 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 65°C para pareamento, e 1 minuto a 72°C para extensão, finalizando a 4°C. Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, submetidos a 100 volts por 30 minutos, corados com brometo de etídio e visualizados sob iluminação ultravioleta de 320nm. O tamanho dos fragmentos foi estimado, por comparação, com o marcador de peso molecular 50 pb.

Os transcritos foram classificados de acordo com o tamanho estimado dos produtos das PCRs segundo a Tabela 5. Um exemplo ilustrativo de cada um deles pode ser visualizado na Figura 1.

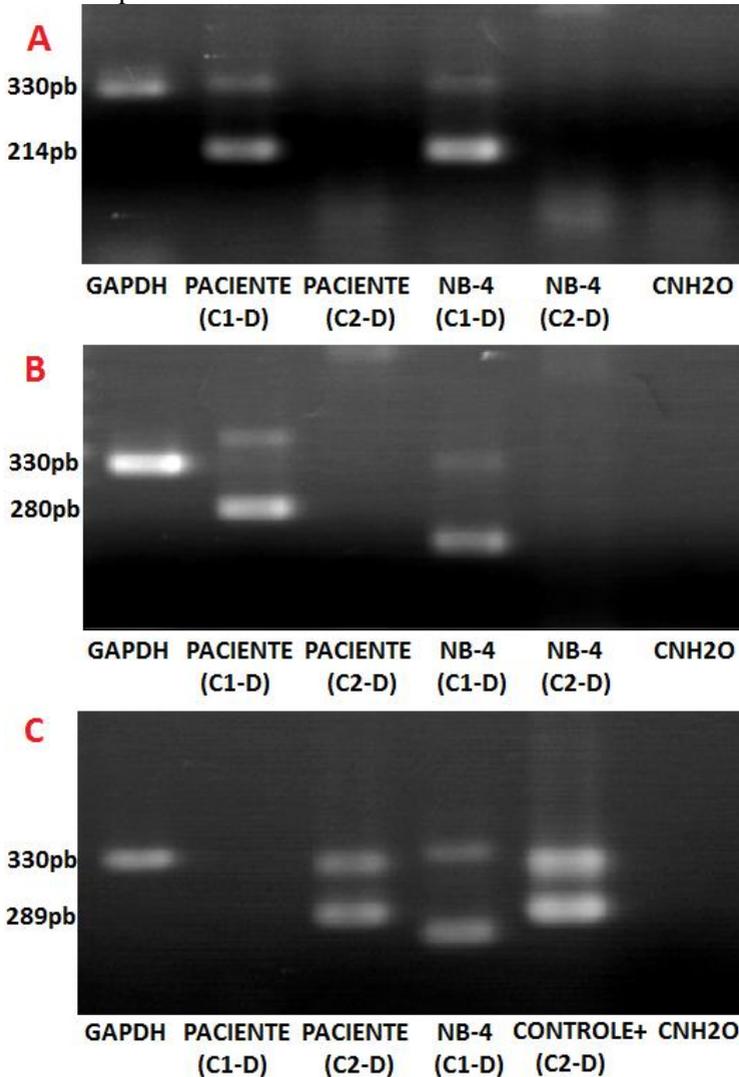
Tabela 5 – Tamanho dos produtos de PCR nos diferentes transcritos PML-RAR α de acordo com os diferentes conjuntos de iniciadores.

Tipo de transcrito	A1–B	A2–B	C1–D	C2–D	C1–E	C2–E
Bcr1	381	(1329)	214	(688)	470	(944)
Bcr2	345*	(819)*	178*	(652)*	434*	(908)*
Bcr3	-	376	-	289	-	545

*O tamanho dos produtos de PCR nos pacientes positivos para o transcrito bcr2 são variáveis devido a variação do ponto de quebra no éxon 6 no gene *PML*.

Fonte: DONGEN et al, 1999.

Figura 1 – Fotos de géis de agarose 2% corados com brometo de etídio mostrando os produtos de PCR *nested* dos diferentes transcritos.



A) A banda do paciente com o par de iniciadores PML-C1 e RAR α -D é igual ao do controle positivo NB-4 e corresponde a 214 pb, caracterizando a isoforma bcr1. B) A banda do paciente corresponde a aproximadamente 280pb e difere do controle positivo NB-4 devido a variabilidade da isoforma bcr2 no ponto de quebra. C) A banda apareceu no paciente no par de iniciadores PML-C2 e RAR α -D com aproximadamente 289pb, caracterizando a isoforma bcr3.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o *software* SPSS Statistics 17.0.

Para a avaliação da distribuição das amostras foram utilizados os testes Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov. Para variáveis não-paramétricas, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, para as paramétricas, o ANOVA com post-hoc-Tukey entre os diferentes transcritos da translocação t(15;17)(q22;q21).

Para expressão dos resultados foi utilizado a mediana ou a média, e valores máximos e mínimos. Os resultados que apresentaram valor de $P < 0,05$ foram considerados significantes.

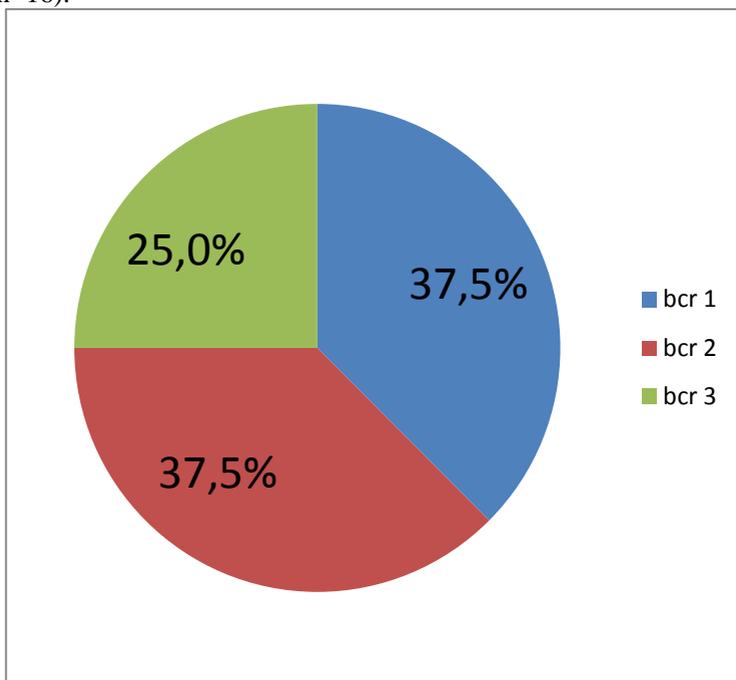
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de agosto de 2009 a novembro de 2012, foram incluídas nesse estudo 38 amostras, das quais 16 (42,1%) tiveram diagnóstico de LPA com a presença de banda compatível com a translocação $t(15;17)(q22;q21)$. Em 10 pacientes, foi possível o acompanhamento de DRM.

Como visto anteriormente, na translocação cromossômica $t(15;17)(q22;q21)$, o ponto de quebra no gene *PML* pode ser variável, e, por isso, é capaz de gerar produtos de tamanhos diferentes, ou seja, diferentes isoformas do transcrito *PML-RAR α* entre os portadores da translocação. Três isoformas podem ser formadas como resultado de *splicing* alternativo de éxons do gene *PML*, a bcr1, ou isoforma longa, derivada de pontos de quebra no íntron 6 do gene; a bcr2, ou variável, derivada de pontos de quebra no éxon 6 do gene *PML*; e a bcr3, ou isoforma curta, resultante de pontos de quebra no íntron 3 (HASAN et al, 2010).

Nesse estudo, do total dos pacientes que apresentaram a $t(15;17)(q22;q21)$, em 6 (37,5%), 6 (37,5%) e 4 (25%) casos apresentaram os transcrito bcr1, bcr2 e bcr3, respectivamente (Figura 4).

Figura 2 – Classificação e frequência dos diferentes transcritos encontrados nas amostras dos pacientes analisados com diagnóstico de LPA (n=16).



HASAN et al. (2010) em um estudo com pacientes portadores de LPA com $t(15;17)(q22;q21)$, observaram uma frequência de 55-60% para bcr1, 8% para bcr2 e 35-40% para bcr3. Em outro estudo, realizado por AMMATUNA et al. (2011), com 30 pacientes com a mesma doença, constataram que 87% apresentaram o bcr1 e 13% o bcr3. Outros estudos mostraram que os subtipos bcr1 e bcr2 são os mais frequentes (CHAUFFAILLE et al., 2001; SUCIC et al., 2002; MELO et al., 2006) e demonstraram como tendência a maior taxa desses transcritos em pacientes latino-americanos (DOUER et al., 2003; MELO et al., 2006). Como pode ser observado, com exceção do primeiro estudo (HASAN et al., 2010), as frequências encontradas neste trabalho se aproximam do que foi citado pela literatura (DOUER et al., 2003; MELO et al., 2006), com frequência de 75% para os transcritos bcr1 e bcr2. Sendo assim, as diferentes frequências de transcritos em pacientes portadores de LPA com $t(15;17)(q22;q21)$ parecem estar relacionadas com grupos populacionais de diferentes regiões do mundo. Por exemplo, DOUER et

al. (2003), demonstraram que no Peru as isoformas *bcr1* e *bcr2* são mais frequentes (85% dos casos) que em países da Europa como a Itália (51%), a Espanha (54%) e a Inglaterra (61%).

Várias características de apresentação da LPA são consideradas como fatores de prognóstico, os quais são importantes na decisão da conduta terapêutica. Entre elas, a coagulopatia combinada com episódios de CIVD e de fibrinólise representam o principal risco de morte (KWAAN; WANG; BOGGIO, 2002; ADÈS et al., 2010). No entanto, outras características biológicas dos promielócitos leucêmicos, estão associadas com maior risco de recaída, como a expressão do CD2 e CD34, e a mutação do gene *FLT3*. Todos esses parâmetros estão associados a leucometria aumentada (ADÈS et al., 2006; CALVINO; IRISH, 2007; BALJEVIC et al., 2011). Logo, a contagem de leucócitos no momento do diagnóstico é utilizada para a estratificação do grau de risco da doença, quanto maior o número, pior o prognóstico e mais intensivo deve ser direcionado o tratamento (ADÈS et al., 2006; BEITINJANEH et al., 2010; SANZ et al., 2000).

Enquanto alguns trabalhos na literatura fazem associações entre os diferentes transcritos e algumas características clínicas e prognósticas em pacientes portadores de LPA com *t(15;17)(q22;q21)* (BORROW, 1992; CASSINAT, 2009), em outros a importância do ponto de quebra de *PML* em termos de prognóstico tem sido controversa (VAHDAT, 1994; GONZALES, 2001). Por outro lado, alguns estudos demonstram que a presença das isoformas *bcr3* e *bcr2* estão relacionadas com pior prognóstico em portadores de LPA com *t(15;17)(q22;q21)* (MISTRY et al., 2003).

Dessa forma, neste trabalho, as características clínicas e laboratoriais no momento do diagnóstico dos pacientes incluídos nesse estudo foram avaliadas (Tabela 6).

Tabela 6 – Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com translocação t(15;17)(q22;q21) no momento do diagnóstico.

SUBTIPOS PML-RARα				
Parâmetros biológicos	bcr1	bcr2	bcr3	P
Idade - anos*	25,0 (23-55)	44,5 (23-86)	28,5 (19-59)	0,300
Sexo [n (%)]				
Feminino	2 (33,3)	3 (50,0)	2 (50,0)	
Masculino	4 (66,7)	3 (50,0)	2 (50,0)	
LDH* (U/L)	273 (189-353) n=5	277 (121-490) n=5	194 (125 -871) n=4	0,805
Blastos* (%)	63,2 (24,0-79,5) n=4	53,0 (7,8-98,8) n=6	82,2 (26,1-90,0) n=3	0,627
Leucometria (x10³)**	1,5 (0,3-2,2)	23,8 (4,5-89,4)	12,0 (0,4-44,6)	0,022#

*Mediana (limite), **Média (desvio-padrão), #Valor de P<0,05 foram considerados estatisticamente significante . Nos casos em que não foi especificado o n, foi considerado o número total de amostras (bcr1=6, bcr2=6 e bcr3=4)

Como demonstrado na Tabela 6, com exceção da leucometria, não foram observadas diferenças estatísticas entre os subtipos de transcritos dos pacientes portadores de LPA com t(15;17)(q22;q21) em relação a idade, sexo, LDH e percentual de blastos.

Em relação a leucometria, foi observado diferença estatística significativa entre os pacientes com P=0,022. Ao aplicar o teste *post-hoc-Tukey*, observou-se que a diferença está entre os portadores dos transcritos bcr1 e bcr2, com P=0,019. Nos casos que apresentaram bcr1 os valores de leucometria foram mais baixos, com média de 1,54 x 10³/μL e limites de 0,3 e 2,24 x 10³/μL. Já nos pacientes que apresentaram isoforma bcr2 a média foi maior, ou seja, de 23,78 x 10³/μL, com limites entre 4,5 e 89,41 x 10³/μL. Segundo a literatura, os grupos de alto risco de recidiva são aqueles que apresentam o número de leucócitos > 10 x 10³/μL (COUTRE, 2010), o que foi de encontro ao reportado nesse estudo. Embora alguns estudos como o realizado por Gonzalez et al. (2001) demonstre correlações entre o transcrito bcr3 e o aumento da leucometria, neste estudo, provavelmente devido ao

pequeno número de casos avaliados, não foi encontrado diferenças estatísticas significativas entre esse subtipo e os demais

Em um estudo com 576 pacientes portadores de LPA, mostrou que aqueles que apresentaram alta contagem de leucócitos tiveram maior incidência de recidiva (ADÈS et al., 2010). Em um outro trabalho, realizado por MISTRY et al. (2003), o ATRA teve baixa resposta em alguns casos de pacientes portadores de LPA que possuem o transcrito *bcr2* e naqueles que apresentavam a associação de *bcr3* com a alta contagem de leucócitos. Dos casos em que foi possível acompanhamento de doença residual mínima (n=10), 2 deles (20%) apresentaram recidiva pela análise molecular, ambos eram portadores do transcrito *bcr2*, mas somente 1 deles possuía alta contagem de leucócitos. Esse fato corrobora com a associação acima de que o transcrito *bcr2* está relacionado a baixa resposta ao tratamento com ATRA.

Embora não tenha sido encontrada nenhuma diferença estatística em relação aos subtipos de transcritos e a idade, a idade avançada é considerada um fator de mau prognóstico independente nas LAs, sendo de 19% a frequência da mortalidade em pacientes com mais de 70 anos, comparado a mortalidade de 1% em pacientes com menos de 60 (BALJEVIC et al., 2011). Ao analisar os casos individualmente, somente um dos pacientes possuía mais de 70 anos, apresentava a isoforma *bcr2* e alta contagem de leucócitos. Ele foi a óbito, antes do final da indução. Esses resultados corroboram a literatura, onde descrevem que as maiores taxas de morte e pior sobrevida são observadas em pacientes mais idosos, leucometria aumentada e presença do transcrito *bcr2* (MISTRY et al., 2003). Além disso, pacientes idosos geralmente apresentam outros fatores de mau prognóstico como maior susceptibilidade aos efeitos tóxicos da quimioterapia, anormalidades citogenéticas desfavoráveis, e contraindicações à terapia intensiva (KRUG et al., 2011).

Alguns trabalhos relatam que a expressão de CD34 na LPA está associado com o aumento do número de leucócitos, co-expressão de CD2, e a presença da isoforma *bcr3* de *PML-RAR α* (FOLEY et al., 1998; LEE et al., 2003; ALBANO et al., 2006). Além disso, foi descrito associação entre a presença das mutações no gene *FLT3* com a isoforma curta *bcr3* em pacientes portadores de LPA com t(15;17)(q22;q21) (BEITINJANEH et al., 2006; SMITH et al., 2011). Alguns estudos mostram que a presença da mutação *FLT3-DIT* nesses pacientes tem pouco efeito sobre a indução da remissão, mas possui um impacto significativo sobre o risco de recaída e sobrevida global. Além disso, ela

está associada clinicamente com a leucocitose no sangue ou na medula óssea (SMITH et al., 2011). Outro estudo associou a presença da mutação *FLT3-DIT*, em pacientes portadores de LPA com t(15;17)(q22;q21), com a expressão de CD2 e CD34, alto risco de recidiva, mais de 70% de blastos, alta leucometria, isoforma bcr3, LDH maior que 600 U/L e hemorragias (BARRÁGAN et al., 2011). Do total das amostras analisadas, duas delas (12,5%) apresentaram co-expressão de CD2 e CD34, ambas apresentaram o transcrito bcr3, e somente uma delas (6,25%) apresentou alta leucocitose e presença da mutação *FLT3-DIT*, bem como alto LDH e 90% de blastos. Outras 2 amostras (12,5%), apresentaram somente a expressão de CD34, sendo negativas para CD2. Apresentaram a isoforma bcr2, alta leucometria e baixo LDH.

Poucos estudos são realizados avaliando os diferentes transcritos e associando as características clínicas e laboratoriais. O conhecimento das frequências das isoformas nas diferentes regiões geográficas e suas relações com os parâmetros clínicos e laboratoriais, permite a detecção precoce das complicações, bem como o correto diagnóstico e a pronta instituição do tratamento mais adequado.

7. CONCLUSÕES

Nossos resultados mostram que:

- Do total de pacientes portadores de LPA com t(15;17)(q22;q21) os transcritos mais frequentes foram o bcr1 (37,5%) e bcr2(37,5%);
- Com exceção da leucometria, não foram observadas diferenças estatísticas entre os subtipos de transcritos dos pacientes portadores de LPA com t(15;17)(q22;q21) em relação a idade, sexo, LDH e percentual de blastos.
- Pacientes portadores da isoforma bcr2 apresentaram maior leucometria do que as outras isoformas, e, dessa forma, pior prognóstico;
- Do total das amostras analisadas, dois casos (12,5%) apresentaram co-expressão de CD2 e CD34, ambas apresentaram o transcrito bcr3, e somente uma delas (6,25%) apresentou alta leucocitose e presença da mutação *FLT3-DIT*, bem como alto LDH e 90% de blastos, as quais são características clínicas associadas a mau prognóstico
- Em dois casos (12,5%), foi observada a expressão de CD34, sem associação com a expressão de CD2, presença da isoforma bcr2 e leucometria aumentada, que também estão relacionados a prognóstico desfavorável.

Esses resultados sugerem que a análise da expressão dos transcritos é importante para o diagnóstico e prognóstico de pacientes portadores de LPA com t(15;17)(q22;q21) e na avaliação da doença residual mínima. Além disso, as isoformas estão associadas com as características clínicas e laboratoriais dos pacientes, e, dessa forma, podem servir de apoio para a escolha terapêutica mais adequada para cada indivíduo.

REFERÊNCIAS

ADÈS, L.; CHEVRET, R. E.; DE BOTTON, S. G. A.; PIGNEUX, A. et al. **Is cytarabine useful in the treatment of acute promyelocytic leukemia? Results of a randomized trial from the European Acute Promyelocytic.** Leukemia Group. J Clin Oncol 24:5703-1, 2006.

ADÈS, L.; GUERCI, A.; RAFFOUX, E.; et al. **Very long-term outcome of acute promyelocytic leukemia after treatment with all-trans retinoic acid and chemotherapy: the European APL Group experience.** Blood 115:1690-6, 2010.

ALBANO, F.; MESTICE, A.; PANNUNZIO, A.; LANZA, F.; MARTINO, B.; PATORE, D.; et al. **The biological characteristics of CD34+ CD2+ adult acute promyelocytic leukemia and the CD34 CD2 hypergranular (M3) and microgranular (M3v) phenotypes.** Haematologica 91(3):311-6, 2006.

AMMATUNA, E.; MONTESINOS, P.; HASAN, S. K.; RAMADAN, S. M.; ESTEVE, J.; HUBMANN, M.; PAGONI, M.; GRIMWADE, D.; SANZ, M. A.; LO-COCO, F. **Presenting features and treatment outcome of acute promyelocytic leukemia arising after multiple sclerosis.** Haematologica, 96(4): 621-625, 2011.

BACHER, U.; SCHNITTGER, S.; HAFERLACH, C.; HAFERLACH, T. **Molecular diagnostics in acute leukemias.** Clin Chem Lab Med. v.47(11), p.1333-41, 2009.

BAIN, B. J. **Diagnóstico em Leucemias.** 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 2003.

BALJEVIC, M.; PARK, J. H.; STEIN, E.; DOUER, D.; ALTMAN, J. K.; TALLMAN, M. S. **Curing All Patients with Acute Promyelocytic Leukemia: Are We There Yet?** Hematol Oncol Clin N Am 25: 1215–1233, 2011.

BARRAGÁN, E.; MONTESINOS, P.; CAMOS, M.; GONZÁLEZ, M.; CALASANZ, M. J.; ROMÁN-GOMÉZ, J.; et al. **Prognostic value of FLT3 mutations in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline monotherapy.** Haematologica 96(10):1470-1477, 2011.

BASSO G.; BULDINI B.; DE ZEN L.; ORFAO A. **New methodological approaches for immunophenotyping acute leukemias.** Haematologica. V.86, p.675-92, 2001.

BEITINJANEH, A.; JANG, S.; ROUKOZ, H.; MAJHAIL, N. S. **Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations in acute promyelocytic leukemia: A systematic review.** Leukemia Research 34: 831–836, 2010.

BÉNÉ M. C.; CASTOLDI G.; KNAPP W.; LUDWIG W. D.; MATUTES E.; ORFAO A.; VAN'T VEER M. B. **Proposals for the immunological classification of acute leukemias.** Leukemia. V.9, p.1783-6, 1995.

BORROW, J.; SOLOMON, E. **Molecular analysis of the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukaemia.** Baillieres Clin Haematol 5: 833–856, 1992.

CALVINO, I.; IRISH, J. **Flow cytometry analysis of acute promyelocytic leukemia: the power of ‘surface hematology’.** Leukemia 21, 4–8, 2007.

CASSINAT, B.; BOTTOMB, S.; KELAIDIC, C.; ADÈS, L.; ZASSADOWSKIA, F.; et al. **When can real-time quantitative RT-PCR effectively define molecular relapse in acute promyelocytic leukemia patients? (Results of the French Belgian Swiss APL Group).** Leukemia Research 33: 1178–1182, 2009.

CHAUFFAILLE, M. L.; FIGUEIREDO, M. S.; BELTRANI, R.; et al. **Acute promyelocytic leukemia: the study of t(15;17) translocation by fluorescent in situ hybridization, reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytogenetic techniques.** Braz J Med Biol Res 34:735-743, 2001.

COUTRE, S. **Classification and Risk Stratification for Acute Promyelocytic Leukemia.** Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia, Vol. 10, Suppl. 3, S127-S129, 2010.

DOUER, D.; SANTILLANA, S.; RAMEZANI, L.; SAMANEZ, C.; SLOVAK, M. L.; LEE, M. S.; WATKINS, K.; WILLIAMS, T.; VALLEJOS, C. B. **Acute promyelocytic leukaemia in patients originating in Latin America is associated with an increased frequency of the bcr1 subtype of the PML/RAR α fusion gene.** British Journal of Haematology. Vol 122, Issue 4, p. 563-570, 2003.

DONGEN, J. V.; MACINTYRE, E. A.; GABERT, J. A.; DELABESSE, E.; ROSSI, V. SAGLIO, G.; GOTTARDI, E.; et al. **Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease.** Leukemia 13, 1901–1928, 1999.

FOLEY, R.; SOAMBOONSRUP, P.; KOUROUKIS, T.; LEBER, B.; CARTER, R. F.; SUNISLOE, L.; et al. **PML/RAR alpha APL with undifferentiated morphology and stem cell immunophenotype.** Leukemia 12: 1492–1493, 1998.

GANZITTI, L.; FACHECHI, G.; DRIUL, L.; MARCHESONI, D. **Acute promyelocytic leukemia during pregnancy.** Fertility and Sterility. V.94, N° 6, 2010.

GONZALES, M.; BARRAGAN, E.; BOLUFER, P.; et al. **Pretreatment characteristics and clinical outcome of acute promyelocytic leukaemia patients according to the PML-RAR α isoforms: a study of the PETHEMA group.** Br J Haematol 114: 99–103, 2001.

GRIMWADE, D. **The pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: evaluation of the role of molecular diagnosis and monitoring in the management of the disease.** Br J Haematol. 106(3):591-613, 1999.

GRIMWADE, D.; LO COCO, F. **Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia.** Leukemia, Paris, v. 16, n. 10, p. 1959–1973, oct. 2002.

GURRIERI, C.; CAPODIECI, P.; BEMARDI, R.; SCAGLIONI, P. P.; NAFA, K.; RUSH, L. J.; et al. **Loss of the tumor suppressor PML in**

human cancers of multiple histologic origins. J Natl Cancer Inst. 96(4):269-79, 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** Cell. V.144(5), p.646-74, 2011.

HASAN, S. K.; LO-COCO, F. **Utilization of Molecular Phenotypes to Detect Relapse and Optimize the Management of Acute Promyelocytic Leukemia.** Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia, Vol. 10, Suppl. 3, S139-S143, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil.** Brasil, 2011. 118p.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/comunicacao/informacao/site/home/sala_imprensa/releases/2011/dia_mundial_do_cancer_120_pais_es_se_mobilizam> Acesso em: novembro de 2011.

ISLAM, A. The origin and spread of human leukemia. **Med hypotheses**, v. 39, n. 1, p. 110-118, 1992.

JÁCOMO, R. H.; FIGUEIREDO-PONTES, L. L.; REGO, E. M. **Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda.** Rev Assoc Med Bras. V.54(1), p.82-9, 2008.

KRUG, U.; BUCHNER, T.; BERDEL, W. E.; MULLER-TIDOW, C. **The treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia.** Dtsch Arztebl Int, v. 108, n. 51-52, p. 863-70, 2011.

KWAAN, H. C.; WANG, J.; BOGGIO, L. N. **Abnormalities in hemostasis in acute promyelocytic leukemia.** Hematol Oncol. 20(1):33-41, 2002.

LEAL, A. M.; KUMEDA, C. A.; VELLOSO, E. D. R. P. **Características genéticas da leucemia promielocítica aguda de novo.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2009.

LEE, N. S.; CHEONG, H. J.; KIM, S. E.; KIM, C. K.; LEE, K. T.; PARK, S. K.; BAICK, S. H.; HONG, D. S.; PARK, H. S.; WON, J. H. **Ex vivo purging of leukemia cells using tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand in hematopoietic stem cell transplantation.** *Leukemia* 17(7): 1375-83, 2003.

LO COCO, F.; DIVERIO, D.; FALINI, B.; BIONDI, A.; NERVI, C.; PELICCI, P. G. **Genetic Diagnosis and Molecular Monitoring in the Management of Acute Promyelocytic Leukemia.** *Blood*, Washington, v. 94(1), p. 12-22, jul. 1999.

LO-COCO, F., AMMATUNA, E. **The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 156-61, 514, 2006.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology.** 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000.

MELO, R. A. M.; VASCONCELOS, J. F.; MELO, F. C. B. C.; MACHADO, C. G. F.; LACERDA, T. M. S.; SOUTO, F. R. **PML-RAR α fusion gene transcripts and biological features in acute promyelocytic leukemia patients.** *Clin. Lab. Haem.* 28, 126-129, 2006.

MISTRY, A. R.; PEDERSEN, E. W.; SOLOMON, E.; GRIMWADE, D. **The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease.** *Blood Reviews*. V.17, p71-97, 2003.

OHNISHI, K. **PML-RAR α inhibitors (ATRA, tamibaroten, arsenic trioxide) for acute promyelocytic leukemia.** *Int J Clin Oncol*, Tokyo, v. 12, n. 5, p. 313-317, oct. 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. Câncer. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> Acesso em: novembro de 2012.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*, v. 339, p. 605-615, 1998.

RUBNITZ, J. E. Childhood acute myeloid leukemia. **Curr Treat Options Oncol**, v.9, n.1, p.95-105, 2008.

SAGRILLO, M. R.; CARDOSO, S. H.; SILVA, L. R. J.; GRAÇA, C. H. N.; FERREIRA, E.; HAMERSCHLAK, N.; GUERRA, J. C. C.; BACAL, N. S.; ANDRADE, J. A. D.; BOROVNIK, C. L. **Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH)**. Rev Bras Hematol Hemoter. V.27(2), p.94-101, 2005.

SANZ, M. A.; LO-COCO, F.; MARTIN, G.; et al. **Definition of relapse risk and role of nonan- thracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups**. Blood 96(4):1247–53, 2000.

SMITH, M. L.; HILLS, R. K.; GRIMWADE, D. **Independent prognostic variables in acute myeloid leukaemia**. Blood Reviews 25: 39–51, 2011.

SUCIC, M.; ZADRO, R.; BURAZER, B.; et al. **Acute promyelocytic leukemia M3: cytomorphic, immunophenotypic, cytogenetic and molecular variants**. Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research 11:941-950, 2002.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H., et al. **WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC Press; 2008.

TALLMAN, M. S.; ALTMAN, J. K. **How I treat acute promyelocytic leukemia**. Blood. V.114(25), p.5126-35, 2009.

VAHDAT, L.; MASLAK, P.; MILLER, W. H. Jr ; et al. **Early mortality and the retinoic acid syndrome in acute promyelocytic leukemia: impact of leukocytosis, low-dose chemotherapy, PML/RAR-a isoform, and CD13 expression in patients treated with all-trans-retinoic acid**. Blood 84: 3843–3849, 1994.

ZHONG, S.; SALOMONI P.; PANDOLFI P. P. **The transcriptional role of PML and the nuclear body**. Nat Cell Biol. 2(5):E85-90, 2000.

ZHOU, J.; et al. **Dimerization-induced corepressor binding and relaxed DNA-binding specificity are critical for PML/RARA-induced immortalization.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 9238–9243, 2006.

WANG Z. Y.; CHEN, Z. **Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable.** Blood. V.111(5), p. 2505-15, 2008.