

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Bethânia de Araújo Silva Amaral

**Leucemia Promielocítica Aguda na infância: estudo
cromossômico e investigação da ocorrência de mutações
nos genes *FLT3* e *NPM1* e sua importância prognóstica**

Recife

2014

Bethânia de Araújo Silva Amaral

Leucemia Promielocítica Aguda na infância: estudo cromossômico e investigação da ocorrência de mutações nos genes *FLT3* e *NPM1* e sua importância prognóstica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Prof^a Dr^a Neide Santos

Coorientador: Prof^a Dr^a Maria Tereza Cartaxo Muniz

Recife

2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Amaral, Bethânia de Araújo Silva

Leucemia promielocítica aguda na infância; estudo cromossômico e investigação da ocorrência de mutações nos genes FLT3 e NPM1 e sua importância prognóstica/ Bethânia de Araújo Silva Amaral– Recife: O Autor, 2014.

118 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Neide Santos

Coorientadora: Maria Tereza Cartaxo Muniz

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2014.**

Inclui bibliografia e anexos

**1. Leucemia 2. Genética I. Santos, Neide (orientadora) II.
Muniz, Maria Tereza Cartaxo (coorientadora) III. Título**

616.99419 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 224

Bethânia de Araújo Silva Amaral

**Leucemia Promielocítica Aguda na infância: estudo cromossômico
e investigação da ocorrência de mutações nos genes *FLT3* e *NPM1*
e sua importância prognóstica**

Aprovado em 12/03/2014

Banca Examinadora:

Dra. Maria Luiza Macedo Silva
Centro de transplante de medula óssea (INCA)

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Departamento de Biologia (UFRPE)

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Departamento de Biofísica e Radiobiologia (UFPE)

Prof. Dr. Antonio Roberto de Lucena Araújo
Departamento de Biofísica e Radiobiologia (UFPE)

Profa. Dra. Neide Santos
Departamento de Genética (UFPE)

Recife

2014

Dedico...

***À minha querida colega, amiga, mãe adotiva e
exemplo de ser humano, Eliane Maria Soares Ventura.***

Agradecimentos

Eu tenho muito a agradecer. Talvez me tomasse mais tempo escrever tudo que preciso agradecer do que me ocupei escrevendo esta tese. Mas serei breve e pesso àqueles que sabem o quão grata eu sou a eles que me perdoem a brevidade.

Agradeço a Deus pelo seu amor para comigo e por ter colocado verdadeiros anjos em minha vida, que os chamo de amigos, para me amparar e me ajudar a levantar quando eu não tinha mais forças para lutar. Vocês sabem quem são e eu sou a pessoa mais rica do mundo por tê-los em minha vida.

Agradeço a minha família, por mesmo distante fisicamente de mim estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

As minhas orientadoras pela confiança depositada, pelo incentivo e apoio em todos os momentos. Pela compreensão e humanidade nas horas que precisei de mais do que orientadoras, mas amigas e mães adotivas.

A Eliane pela amizade incondicional, pelo cuidado e carinho. Por ter aberto sua casa e seu coração para mim sempre que precisei. Por ser essa pessoa incrível e inspiradora. Pelos ensinamentos diários e por me ensinar a amar a citogenética.

A Dra. Terezinha pelo carinho e motivação, por sua disponibilidade e boa vontade em tudo que precisei. Pelo exemplo de dedicação àqueles que são o motivo maior de nosso projeto, os pacientes.

A todos aqueles que colaboraram com este projeto: a Dra. Maria Luiza pelo apoio e contribuição voluntária e por todos os ensinamentos ao longo de todos esses anos de colaboração e aos seus orientandos Amanda, Mariana, Daniela e Roberto pela ajuda e hospitalidade; Ao Dr. Thomas Liehr por ter sempre as portas abertas ao nosso grupo e por todo treinamento nas técnicas de citogenética molecular e por sua grande generosidade; Ao Prof. Marcos André e à Aleide pela disponibilidade e boa vontade em contribuir nas análises das mutações, muitíssimo obrigada por essa importante ajuda.

À toda equipe do CEONPE por fazerem seu magnífico trabalho doando esperança e amor às crianças e seus familiares na árdua trajetória enfrentada por estes contra esta doença.

Aos colegas de laboratório Marina, Jemima, Camila, Malu, Manu, Cema e Amália, pela amizade, convívio e por todas as experiências trocadas. Aos colegas dos laboratórios de Biologia Molecular e Imunofenotipagem, pela ajuda sempre que solicitada.

Um agradecimento especial aos amigos que fiz na Alemanha: a minha querida Kathleen por ter me apresentado o melhor lado do povo alemão, por ter me salvado de ser extraditada sem visto e por ser essa pessoa linda e generosa. Ao meu amigo e companheiro de laboratório Gopakumar, o indiano mais alemão que eu já conheci, pelas muitas horas de companhia nos finais de semana de trabalho e por ter sempre uma mão estendida quando precisei de ajuda.

Aos órgãos de fomento (UFPE, CAPES e FACEPE), pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto.

A maior felicidade da vida é a convicção de sermos amados, pelo que somos, ou, mais que isso, apesar do que somos.

Victor Hugo

Resumo

A leucemia promielocítica aguda (LPA) requer uma atenção especial dentre as leucemias mielóides agudas devido às suas implicações prognósticas e terapêuticas. A taxa de sobrevivência de no mínimo cinco anos na LPA chega a 80% dos pacientes com a terapia atual e a taxa de cura excede os 70%. No entanto, a real situação dos resultados do tratamento da LPA em países em desenvolvimento, como o Brasil, é desconhecida. Este trabalho visou contribuir na investigação dos casos de LPA infantil em pacientes na nossa população objetivando a identificação de marcadores que possam redirecionar o acompanhamento e tratamento destes pacientes. A investigação da ocorrência de mutações dos genes *FLT3* e *NPM1* é importante na determinação prognóstica das LMAs, contribuindo para a estratificação de grupos de maior ou menor risco e auxiliando o direcionamento do tratamento. Dezesesseis pacientes pediátricos com LPA, representando 29,09% dos casos de LMA infantil, foram atendidos no CEONHPE/HUOC/UPE de 2004 a 2013. A idade variou de 5 a 17 anos (média de 11,81 anos). Análises citogenética e molecular por FISH e RT-PCR foram realizadas para confirmação do diagnóstico genético, na identificação do rearranjo *PML-RAR α* decorrente da t(15;17), além da pesquisa das mutações dos genes *FLT3* e *NPM1*. A análise cariotípica com o bandeamento G revelou alterações cromossômicas em 10 pacientes. Três apresentaram cariótipos complexos com presença de cromossomos marcadores. A técnica de FISH para a t(15;17) confirmou o rearranjo em 14 pacientes. Divergência entre as análises moleculares foram observadas em cinco pacientes, sendo positiva a detecção da t(15;17) pela FISH e negativa pela RT-PCR. A mutação do *FLT3/ITD* foi detectada em dois pacientes (12,5%), enquanto a mutação *FLT3/TKD* foi detectada em apenas um paciente (6,25%). A pesquisa para a mutação no gene *NPM1* foi negativa para todos os casos. Quanto ao *status* oito pacientes encontram-se vivos ou na fase de manutenção do tratamento e oito foram a óbito, sendo que destes sete tiveram óbitos precoces ainda na fase de indução. Os motivos primários dos óbitos foram hemorragias, septicemia e manifestação da síndrome do ATRA. Este dado é alarmante uma vez que estas mortes são difíceis de prevenir e assinalam o alto risco de ocorrência destes eventos em nossa população. Destacamos a importância do uso de técnicas citogenéticas moleculares na confirmação genética do diagnóstico da LPA e a necessidade de uma melhor adaptação do regime terapêutico aos casos de LPA na infância em nossa população.

Palavras-chave: Leucemia promielocítica aguda na infância; diagnóstico genético por FISH e RT-PCR; pesquisa de mutações dos genes *FLT3* e *NPM1*; óbito precoce e estratificação de risco.

Abstract

Acute promyelocytic leukemia require special among acute myeloid leukemia due to its prognostic and therapeutic implications. The rate of survival at least five years in APL reaches 80% of patients with current therapy and the cure rate exceeds 70%. However, the actual situation of the results of APL treatment in developing countries, like Brazil, is unknown. This work aims to contribute to investigation of cases of childhood APL patients in our population with the objective of identifying markers that can redirect the monitoring and treatment of these patients. The investigation of the occurrence of mutations of *FLT3* and *NPM1* genes is important in determining the prognostic of AML, contributing to stratify risk groups and assisting the targeting of treatment. Sixteen pediatric patients with APL, representing 29.09% of childhood AML cases, were treated at CEONHPE/HUOC/UPE between 2004 and 2013. The ages ranged from 5 to 17 years (mean 11.81 years). Cytogenetic and molecular analyzes were performed by FISH and RT-PCR to confirm the genetic diagnosis, which is the identification of the *PML-RAR α* rearrangement resulting from the t(15;17), further the investigation of mutations of *FLT3* and *NPM1* genes. The karyotype analysis with G banding revealed chromosomal abnormalities in 10 patients. Three had complex karyotypes with presence of marker chromosomes. The FISH technique for the t(15;17) confirmed the rearrangement in 14 patients. Divergence between the molecular analyzes were performed in five patients, with positive detection of t(15;17) by FISH and negative by RT-PCR. The *FLT3/ITD* mutation was detected in two patients (12.5%) while the *FLT3/TKD* mutation was detected in only one patient (6.25 %). The search for mutations in *NPM1* gene was negative in all cases. Regarding the status, eight patients are alive or in the maintenance phase of treatment and eight died, and of these seven had early deaths during the induction phase. The primary causes for the deaths were hemorrhage, sepsis and manifestation of the ATRA syndrome. This data is alarming since these deaths are difficult to prevent and indicate the high risk of occurrence of these events in our population. We stand out the importance of using molecular cytogenetic techniques in genetic confirmation of the diagnosis of APL and the need for better adaptation to the therapeutic regimen in childhood cases of APL in our population.

Keywords: Acute promyelocytic leukemia in childhood; genetic diagnosis by FISH and RT-PCR; analysis of mutations in *FLT3* and *NPM1* genes; early death and risk stratification.

Lista de Ilustrações

Ilustração	Título	Pag.
Quadro 1	Comparação entre as classificações FAB e OMS (2001).	07
Quadro 2	Classificação OMS (2008) para LMAs.	08
Figura 1	Características clínicas da LPA.	10
Quadro 3	Frequência e caracteres clínicos dos cinco subtipos da LPA.	14
Figura 2	Desenho esquemático da citogenética e estrutura molecular do rearranjo t(15;17)(q22;q12).	15
Figura 3	Lesões moleculares ocultas detectadas em casos de LPA caracterizadas morfológicamente com análise citogenética bem sucedida.	20
Figura 4	Desenho esquemático da proteína RAR α e proteínas quiméricas X-RAR α .	21
Figura 5	Ativação transcricional modulada pela proteína RAR α selvagem e pelas proteínas quiméricas PML-RAR α e PLZF-RAR α .	25
Quadro 4	Métodos para o diagnóstico genético da Leucemia Promielocítica Aguda.	27
Quadro 5	Esquema de marcação aleatória usando cinco fluorocromos.	33
Figura 6	M-FISH em indivíduo normal exibindo pseudocores geradas a partir de imagens monocromáticas capturadas separadamente. a) Célula em metáfase b) Cariograma 46,XY.	34
Figura 7	Padrão do MCB, perfil da fluorescência e esquema de marcação do MCB baseado na microdissecção dos cromossomo 2 (a), 13 (b) e 22 (c).	36
Figura 8	Microdissecção de fragmento do cromossomo 2.	37
Figura 9	Esquema de marcação e localização dos conjuntos de sondas da biblioteca de MCB.	37
Figura 10	mMCB em célula normal. a) Célula em metáfase mostrando as cores reais dos fluorocromos utilizados no mMCB b) Cariótipo 46,XY exibindo pseudocores do bandeamento multicolorido.	38
Quadro 6	Determinação de risco para SLE	41
Figura 11	Representação esquemática dos três principais transcritos quiméricos PML-RAR α . O ponto de quebra do gene RAR α ocorre sempre no íntron 2. Devido às diferentes quebras do gene PML (íntron 6, éxon 6 e íntron 3), diferentes segmentos deste gene se fusionam ao éxon 3 do RAR α , produzindo os transcritos (isoformas) bcr1 (L), bcr2 (V) e bcr3 (S), respectivamente. Os números representam os	42

	éxons dos genes PML e RAR α .	
Quadro 7	Fatores prognósticos na Leucemia Promielocítica Aguda.	44
Figura 12	Representação esquemática do receptor FLT3. A figura mostra a localização da duplicação interna em tandem dentro do domínio justamembranar e das mutações de ponto no segundo domínio quinase.	46
Figura 13	Representação esquemática da estrutura da NPM selvagem e mutada. Localização dos domínios da NPM1 selvagem e suas funções (A) e sua forma mutada (B).	48
Figura 14	FISH com sondas <i>whole chromosome painting</i> (WCP) para os cromossomos 15 e 17.	72
Figura 15	FISH com sondas <i>whole chromosome painting</i> (WCP) para os cromossomos 9, 15 e 17.	72
Figura 16	MCB para o cromossomos 9.	73
Figura 17	MCB para o cromossomos 15.	73
Figura 18	MCB para o cromossomos 17.	73
Figura 19	FISH com sondas BAC para as regiões 9q13 (RP11-561O23 em vermelho) e 9q21.11 (RP11-430C15 em verde) e sonda WCP para o cromossomo 17 (DEAC em azul).	74
Figura 20	Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR para identificação da t(15;17) pela RT-PCR.	76
Figura 21	Eletroforese em gel de agarose a 4% dos produtos de PCR para identificação da mutação <i>FLT3-ITD</i> .	77
Figura 22	Eletroforese em gel de agarose a 3% dos produtos da digestão para identificação da mutação <i>FLT3-TKD</i> .	77

Lista de Tabelas

Tabela	Título	Pag.
Tabela 1	Composição do mix para marcação de sondas BAC, WCP, M-FISH e MCB.	53
Tabela 2	Condições de ciclagem utilizadas na marcação se sondas para FISH.	54
Tabela 3	Composição dos <i>mixes</i> de hibridização para sondas BAC, WCP, MCB e M-FISH.	57
Tabela 4	Composição do mix para amplificação dos genes <i>FLT3</i> e <i>NPM1</i> .	63
Tabela 5	Sequência dos <i>primers</i> usados na pesquisa das mutações dos genes <i>FLT3</i> e <i>NPM1</i> .	63
Tabela 6	Condições de ciclagem utilizadas na amplificação da mutações nos genes <i>FLT3</i> e <i>NPM1</i> estudadas.	64
Tabela 7	Relação do tamanho dos fragmentos finais nas mutações <i>FLT3/ITD</i> , <i>FLT3/TKD</i> e <i>NPM1</i> .	65
Tabela 8	Sexo, idade, <i>status</i> , protocolo de tratamento e causa do óbito.	68
Tabela 9	Dados das análises citogenéticas clássica (bandeamento G) e molecular (FISH e variantes).	70
Tabela 10	Resultados das análises de RT-PCR para o rearranjo <i>PML/RARA</i> e investigação das mutações <i>FLT3</i> e <i>NPM1</i> .	75

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Abreviatura	Descrição
(-) sinal negativo	Perda de material genético
(,) vírgula	Separa nº de cromossomos, cromossomos sexuais e anormalidades cromossômicas
(/) barra inclinada	Separa os clones de um cariótipo
(;) ponto e vírgula	Separa cromossomos e regiões cromossômicas quando os rearranjos estruturais envolvem mais de um cromossomo
(?) interrogação	Identificação questionável de cromossomo ou estrutura cromossômica
(+) sinal positivo	Ganho de material genético
[Nº], nº entre []	Representa o número de células analisadas
add	Adição cromossômica
ATRA	Ácido Trans-retinóico
bcr	<i>breakpoint cluster regions</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
CMF	Citometria de fluxo
DAPI	4,6-Diamino-2-Fenilindol
del	Deleção cromossômica
der	Cromossomo derivativo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EWP	<i>European Working Party</i>
FAB	Classificação Franco-americana-britânica
FISH	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente
FLT3	Gene da tirosina quinase semelhante a fms 3
FLT3/TKD	Mutação FLT3 do tipo pontual no domínio de ativação
FLT3/ITD	Mutação FLT3 do tipo duplicação interna em tandem
FLT3/Mut	Mutações FLT3

Ins	Inserção cromossômica
Inv	Inversão cromossômica
ISCN	Sistema internacional de nomenclatura para citogenética humana
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
LSI	Sonda <i>locus</i> específica
Mar	Cromossomo marcador
MCB	<i>Multicolor banding</i>
M-FISH	<i>Multicolor FISH</i>
MO	Medula óssea
<i>NPM1</i>	Gene da Nucleofosmina 1
<i>NuMA</i>	Gene do aparato mitótico nuclear
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Braço curto
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>PLZF</i>	Gene da proteína <i>zinc finger</i> da leucemia promielocítica
<i>PML</i>	Gene da leucemia promielocítica
Q	Braço longo
<i>RARα</i>	Gene do receptor alfa do ácido trans retinóico
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Transcriptase Reversa PCR
<i>STAT5b</i>	Gene do transdutor de sinal e ativador de transcrição 5b
t	Translocação recíproca

Sumário

Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de ilustrações	viii
Lista de tabelas	ix
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	x
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1 Características gerais das leucemias	3
2.2 Classificações da Leucemia Mielóide Aguda (LMA)	5
2.3 Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)	8
2.3.1 Breve histórico da Leucemia Promielocítica Aguda	11
2.4 Patogênese molecular da Leucemia Promielocítica Aguda	13
2.4.1 As Funções do RAR α	21
2.5 A importância do diagnóstico genético da LPA	25
2.5.1 Análise Citogenética	27
2.5.2 FISH: Vantagens e Desvantagens	30
2.5.3 Variantes da FISH: M-FISH e MCB	32
2.6 Leucemia Promielocítica Aguda na Infância	38
2.6.1 Os fatores prognósticos na LPA na infância	40
2.7 Marcadores moleculares: os genes FLT3 e NPM1	45
3. Objetivos	50
3.1 Objetivo geral	50
3.2 Objetivos específicos	50
4. Material e Métodos	51
4.1 Local e desenho do Estudo	51
4.2 Pacientes	51
4.3 Métodos	51
4.3.1 Obtenção dos cromossomos mitóticos e bandejamento G	51
4.3.2 Citogenética molecular: FISH, M-FISH e MCB	52
4.3.2.1 FISH para pesquisa da t(15;17)	52

4.3.2.2 FISH com sondas BAC e WCP, M-FISH e MCB	52
4.3.2.2.1 Marcação e precipitação de Sondas de DNA	53
4.3.2.2.2 Pré-tratamento de laminas	55
4.3.2.2.3 Hibridização	56
4.3.2.2.4 Lavagem pós-hibridização	58
4.3.2.2.4.1 Lavagem para marcação direta	58
4.3.2.2.4.2 Lavagem para marcação indireta	59
4.3.3 Biologia Molecular	60
4.3.3.1 Extração de Ácidos Nucléicos	61
4.3.3.1.1 Extração do RNA	61
4.3.3.1.2 Extração do DNA	61
4.3.3.2 Construção do cDNA	61
4.3.3.3 Identificação da t(15;17) pela RT-PCR	62
4.3.3.4 Identificação das mutações dos genes <i>FLT3</i> e <i>NPM1</i>	62
4.4 Aspectos Éticos	65
5. Resultados	67
5.1 Sexo, idade, <i>status</i> e protocolos de tratamento	67
5.2 Análise citogenética	68
5.3 Análise molecular	75
6. Discussão	77
7. Conclusões	84
8. Referências bibliográficas	86
9. Anexos	102
9.1 Anexo 1 (Aprovação CEP)	102
9.2 Anexo 2 (Termo de Consentimento)	103
9.3 Anexo 3 (Artigos)	109
10. Currículo Lattes atualizado	128

1. Introdução

A leucemia promielocítica aguda (LPA) possui frequência aumentada dentre os casos de leucemias mielóide agudas (LMAs) nos países latino americanos, chegando a 28% dos casos de LMA. Ela caracteriza-se pela expansão clonal de promielócitos anormais, sendo classificada pelo grupo franco-americano-britânico (FAB) como LMA-M3 e pode ocorrer em qualquer faixa etária. Os pacientes com este tipo de leucemia frequentemente desenvolvem coagulopatia e podem evoluir rapidamente a óbito por ocorrências hemorrágicas. No entanto, o uso do ácido transretinóico (ATRA) associado à quimioterapia tem contribuído para a boa resposta clínica destes pacientes, sendo a LPA considerada uma das leucemias com melhor prognóstico.

A LPA é geneticamente caracterizada por rearranjos cromossômicos da região 17q21, sendo a mais comum delas a translocação recíproca t(15;17), que resulta na proteína de fusão (PML-RAR α), responsável pela inibição da diferenciação normal de células mielóides e promovendo sua sobrevivência. Mais de 90% dos casos de LPA apresentam esta translocação.

Estudos citogenéticos e moleculares na LPA na Infância são escassos no Brasil e estes possibilitam o preciso diagnóstico e orientação dos pacientes, os quais correm grande risco de morte caso o diagnóstico não seja determinado rapidamente. A investigação da ocorrência de mutações dos genes *FLT3* e *NPM1* pode contribuir na determinação prognóstica da doença, uma vez que estes genes são importantes marcadores moleculares de valor prognóstico das leucemias de linhagem mielóide.

As mutações no gene *FLT3* podem ser do tipo ITD (duplicação interna *in tandem*) ou TKD (mutação pontual no domínio tirosina quinase), as quais são

prevalentes na LPA pediátrica e estão associadas a altas contagens leucocitárias e aumento de óbitos na fase de indução. Enquanto que mutações no gene *NPM1* estão presentes em cerca de 35% dos pacientes adultos com LMA, sendo porém relativamente incomum na LMA pediátrica ocorrendo aproximadamente 10% dos casos e possuem importante associação de coexistência com as mutações do gene *FLT3*. As mutações do gene *NPM1* possuem significativo valor prognóstico favorável em pacientes LMA que não acumulam mutações do gene *FLT3* concomitantemente.

A investigação de tais mutações é essencial para a estratificação de grupos de maior ou menor risco e auxilia o direcionamento do tratamento. O maior entendimento das variações prognósticas baseadas em marcadores citogenéticos/moleculares desta doença em nossa população poderá contribuir para a redução dos casos fatais e aumento nas taxas de sobrevida sem doença. Além disto, este projeto terá um impacto social para a vida dos pacientes e seus familiares no diagnóstico e tratamento do câncer, uma vez que o estudo se dará em instituição pública.

2. Revisão da Literatura

2.1 Características gerais das leucemias

As leucemias são neoplasias malignas originadas de células hematopoéticas multipotentes, caracterizadas pela proliferação anárquica e clonal de blastos anormais na medula óssea (Caligiuri e Bloomfield, 2001), resultam da ocorrência de múltiplas etapas nas quais mutações de múltiplos genes acontecem nas células precursoras do espaço medular. O primeiro evento (mutação) leva a uma hematopoese clonal e este estágio é geralmente marcado por microcitose eritrocitária e leve citopenia. O desenvolvimento de citopenia profunda e displasia em uma ou mais linhagens celulares pontuam o segundo estágio da evidente displasia. Nesta etapa são muito comuns alterações clonais e tais anormalidades são usualmente associadas à perda de genes supressores de tumor. No último estágio é evidenciado o bloqueio da diferenciação (parada maturativa), um aumento da população blástica na medula e a leucemia propriamente dita. Anormalidades cromossômicas adicionais costumam ocorrer levando a alterações complexas nesta etapa (Witte *et al.*, 2002).

A classificação das leucoses é baseada em critérios, como o tipo celular envolvido, o grau de diferenciação e a evolução clínica seguida na doença. Nas leucoses crônicas há um aumento de células neoplásicas maduras não funcionais que substituem paulatinamente os elementos normais da medula óssea, enquanto que nas leucoses agudas acontece a proliferação de elementos celulares imaturos e de rápida evolução clínica. Os sinais e sintomas clínicos mais comuns decorrentes da leucemia são: palidez, fadiga e fraqueza consequentes à anemia devido à escassez eritrocitária, sangramentos (equimoses, petéquias, hemorragias) secundários à plaquetopenia, febre e infecções recorrentes,

refletidas pela deficiente função fagocitária secundária ao comprometimento do setor granulocítico (Jaffe *et al.*, 2001).

As leucemias agudas (LA) abrangem um grupo bem heterogêneo de enfermidades malignas das células precursoras hematopoéticas. A proliferação clonal destes precursores que perderam a capacidade de se diferenciar leva ao acúmulo excessivo de blastos leucêmicos na medula óssea, ocasionando a síndrome da imunodeficiência medular e a infiltração de diversos tecidos do organismo (Gilliand *et al.*, 2004). As LA são divididas em linfóides e mielóides e diferem em seus aspectos clínicos, assim como no curso da doença e resposta ao tratamento. Essa diferenciação entre leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA) é essencial às intervenções terapêuticas. A subclassificação em grupos é também fundamental, uma vez que o tratamento envolve grupos genéticos específicos (Head, 2004).

A LMA engloba um grupo de doenças clonais clínica e molecularmente heterogênea caracterizada pelo acúmulo excessivo de células progenitoras mielóides que perderam a capacidade de se diferenciar, comprometendo este setor do sistema hematopoético (Kundranda *et al.*, 2012). A LMA pode apresentar-se como uma doença *de novo* ou pode ser secundária à crise blástica de LMC, evolução de mielodisplasia e a tratamentos que utilizam agentes alquilantes, inibidores de topoisomerase e/ou radiação ionizante (Rund *et al.*, 2004).

A incidência da LMA é em torno de 1/100.000 por ano na população abaixo dos 30 anos e alcança 10-12/100.000 por ano nos indivíduos acima dos 60 anos, representando 80% dos casos de leucemia aguda nos adultos e 15-20% na infância, além de ser a leucemia mais frequente em recém nascidos (Lichtman e

Liesveld, 2001). Infelizmente, o curso clínico natural deste diversificado grupo de neoplasias é fatal em termos de dias, semanas ou meses a partir do diagnóstico. Isto se deve, principalmente, às complicações advindas da insuficiência medular, podendo ser citadas como as mais comuns: infecções ligadas à neutropenia e hemorragias relacionadas à trombocitopenia. Apesar da clínica comum entre si, as características hematológicas e prognósticas destas doenças são distintas e, portanto, sugerem possuir diferentes trajetórias patogênicas (Clarke e Glaser, 2000).

Virtualmente todas as LMAs são fruto de um clone de células que carregam defeitos em seu DNA, os quais desencadeiam erros nos mecanismos de sinalização celular que controlam os processos de proliferação e diferenciação nas células mielóides. Estes defeitos genéticos podem ser resultado de diversos eventos mutationais possíveis, tais como deleções e translocações cromossômicas, mutações pontuais, entre outras. Nas últimas décadas um imenso progresso foi conquistado na caracterização de leucemias e alterações genéticas que podem ser identificadas na maioria dos casos de LMA. Porém, ainda existem casos onde nenhuma alteração é caracterizada e a razão disto é possivelmente a falta de conhecimento. Portanto, acredita-se que a resolução deste impasse é apenas uma questão de tempo e estudo, pois futuramente serão identificados erros genéticos em todos os casos de LMA (Cucuianu, 2005).

2.2 Classificações da Leucemia Mielóide Aguda (LMA)

Objetivando a padronização dos tipos celulares presentes nas leucemias agudas foram criadas as classificações morfológicas e imunofenotípicas. A primeira classificação morfológica foi criada em 1976 por um grupo de

hematologistas franceses, americanos e britânicos, conhecida também como classificação FAB (Tabela 1), e classificava as LMAs em 6 subtipos principais, M1 a M6, baseados unicamente nos aspectos morfológicos (Bennett *et al.*, 1976). Essa primeira classificação foi então revisada e atualizada em 1985 pelo mesmo grupo e passou a incluir dois novos subtipos, M0 e M7, onde características citoquímicas e imunofenotípicas foram acrescentadas (Bennett, 1985a,b). Apesar da sua importância para a determinação do grau de maturação e identificação da linhagem das células leucêmicas, a classificação FAB se tornou obsoleta, uma vez que restringia os aspectos biológicos, terapêuticos e prognósticos por não atender a necessidade de introdução das características citogenéticas e moleculares que se tornavam cada vez mais proeminentes à fisiopatologia desse grupo de doenças.

A criação de uma nova classificação para as neoplasias hematopoéticas era necessária para que fossem incorporados todos estes aspectos e em 2001 a Organização Mundial de Saúde (OMS) juntamente com a Sociedade dos Hematopatologistas e a Associação de Hematopatologistas Europeus divulgaram uma nova classificação que incorporaria os achados citogenéticos (Jaffe *et al.*, 2001). A introdução de informações citogenéticas e moleculares ajudou a definir mais claramente as distintas entidades envolvidas na LMA. O Quadro 1 apresenta

os subtipos de LMA de acordo com as classificações FAB e OMS (2001) (Cucuianu, 2005).

Quadro 1: Comparação entre as classificações FAB e OMS (2001).

Classificação Francesa-Americana-Britânica (FAB) da LMA	Classificação da OMS (2001) para a LMA
M0 - LMA sem diferenciação	LMA com anormalidades genéticas recorrentes - LMA com t(8;21) - LMA com eosinófilos anormais na medula óssea e inv(16) ou t(16;16) - Leucemia promielocítica aguda (LPA) com t(15;17) e variantes - LMA com anormalidades da 11q23
M1 - LMA minimamente diferenciada	LMA com displasia de múltiplas linhagens - Seguida de Síndrome Mielodisplásica (SMD) - Sem antecedente de SMD
M2 - LMA com diferenciação granulocítica	LMA e SMD associadas a tratamento - Associada a agentes alquilantes/radiação - Associada a inibidores de topoisomerase-II
M3 - Leucemia promielocítica aguda	LMA não categorizada nos itens anteriores
M4 - Leucemia mielomonocítica aguda	
M5 - Leucemia monocítica aguda	
M6 - Eritroleucemia aguda	
M7 - Leucemia megacarioblástica aguda	

Fonte: Modificada de Cucuianu (2005).

Em 2008 a OMS revisou a classificação de 2001 para atender a necessidade de identificação e categorização dos casos onde nenhuma anormalidade citogenética é identificada, sendo considerados como citogeneticamente normais (LMA-CN), os quais correspondem de 30% a 50% dos casos de LMA *de novo*. Diversas anormalidades genéticas não identificáveis ao microscópio têm sido encontradas nesse grande grupo, dentre elas estão mutações e/ou modificação na expressão gênica de genes alvos associados à

leucemogênese e resposta ao tratamento das LMAs. Estes genes são marcadores prognósticos que contribuem para melhoria da caracterização e estratificação de risco dos pacientes com LMA. Atualmente os marcadores prognósticos mais estudados na LMA são as mutações dos genes *NPM1*, *FLT3*, *MLL*, and *CEBPalpha* (Falini *et al.*, 2005; Mrozek *et al.*, 2007; Gregory *et al.*, 2009; Rockova *et al.*, 2011). O Quadro 2 apresenta a atual Classificação da OMS (2008).

Quadro 2: Classificação OMS (2008) para LMAs.

Classificação OMS (2008) para a LMA
LMA com anormalidades genéticas recorrentes - LMA com t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> - LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> - LPA com t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</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)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> - LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i> - <i>subtipo provisório: LMA com mutação NPM1</i> - <i>subtipo provisório: LMA com mutação CEBPA</i>
LMA com alterações relacionadas a mielodisplasia (SMD)
Neoplasias mielóides secundárias a tratamento
LMA não categorizada nos itens anteriores - LMA com diferenciação mínima - LMA sem maturação - LMA com maturação - Leucemia mielomonocítica aguda - Leucemia monoblástica e monocítica aguda - Leucemias eritróides agudas *Leucemia eritróide pura *Eritroleucemia, mieloide/eritróide - Leucemia megacarioblástica aguda - Leucemia basofílica aguda - Pan-mielose aguda com mielofibrose
Sarcoma mieloide
Proliferações mieloides relacionadas à Síndrome de Down - Mielopoese anormal transiente - LMA relacionada com a Síndrome de Down

Fonte: Modificada de Vardiman *et al.* (2009).

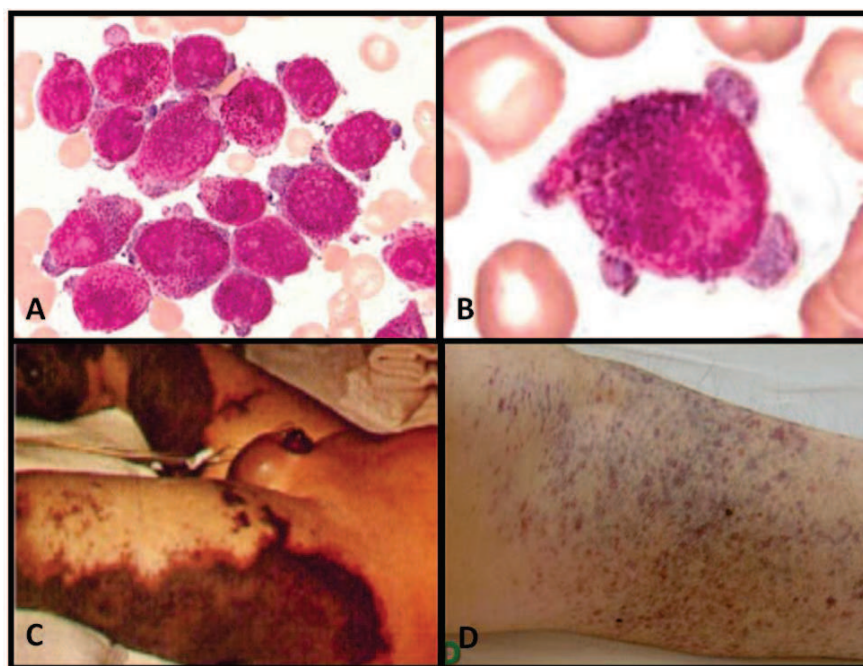
2.3 Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)

A leucemia promielocítica aguda (LPA) ou LMA-M3, de acordo com a classificação morfológica, é caracterizada pela expansão de células leucêmicas

que apresentam parada maturativa em estágio de promielócitos e não se diferenciam em granulócitos maduros, as quais se acumulam na medula óssea e sangue periférico (Figura 1a e 1b). Neste tipo de leucemia os promielócitos anormais apresentam núcleo excêntrico e abundantes granulações no citoplasma, assim como vários bastonetes de Auer que formam feixes citoplasmáticos. Os pacientes com LPA apresentam quadro clínico e alterações laboratoriais compatíveis com coagulação intravascular disseminada (CIVD) e podem evoluir rapidamente ao óbito, devido a fenômenos hemorrágicos (Figura 1c e 1d) (Sagrillo *et al.*, 2005). A CIVD é uma síndrome adquirida, caracterizada pela ativação difusa da coagulação intravascular, levando à formação e deposição de fibrina na microvasculatura (Levi e Ten Cate, 1999). A deposição de fibrina pode levar à oclusão dos vasos e comprometimento da irrigação sanguínea de diversos órgãos, que em conjunto com alterações metabólicas e hemodinâmicas, contribui para a falência de múltiplos órgãos. O consumo e consequente depleção dos fatores da coagulação e plaquetas, resultantes da contínua atividade procoagulante, pode levar a quadros de sangramento grave, o que frequentemente é a primeira manifestação notada (Pintão e Franco, 2001).

A LPA pode ocorrer em qualquer faixa etária, mas sua incidência é muito baixa em crianças com idade abaixo de 10 anos e aumenta progressivamente durante a adolescência, alcançando seu ápice no início da fase adulta (Ribeiro e Rego, 2006). Esta leucemia representa de 5% a 10% das LMAs de acordo com dados de ocorrência em populações de países desenvolvidos. No entanto, em países latino-americanos essa incidência sobe para cerca de 20% a 25% das LMAs. Dados a respeito da epidemiologia da LPA no Brasil são escassos e baseiam-se, sobretudo, nos registros hospitalares. Um estudo realizado em 12

centros nacionais que tratam de neoplasias hematológicas fez um levantamento totalizando 157 pacientes com LPA, os quais representaram 28% dos casos de LMA (Jácomo *et al.*, 2007; 2008). A grande maioria dos casos de LPA são diagnosticados em pacientes com idade entre 20 e 50 anos, contrastando com a incidência das LMAs que em geral aumenta exponencialmente após os 55 anos. Este fato sugere que o evento mutacional inicial envolvido na gênese da doença, no caso o rearranjo da região 17q21, pode ocorrer durante o desenvolvimento hematopoético *in utero*, havendo também relatos dessa neoplasia em neonatos (Ribeiro e Rego, 2006).



Fonte: Modificado de Wang e Chen (2008).

Figura 1: Características clínicas da LPA. Principais manifestações clínicas da LPA: acúmulo de promielócitos anormais na medula óssea (a) e sangue periférico (b), e a severa tendência a hemorragias devido aos baixos níveis de fibrinogênio e ao fenômeno da coagulação intravascular disseminada (c e d).

Embora características morfológicas dos blastos da LPA geralmente permitam o reconhecimento específico deste subtipo particular de leucemia aguda (Bennett *et al.*, 1985b), casos atípicos foram descritos (Allford *et al.*, 1999; Lo

Coco *et al.*, 1999). Por outro lado, a LPA é um tipo de leucemia que possui alta taxa de remissão ao tratamento quando o diagnóstico é rápido e eficaz, pois esse tipo leucêmico possui uma boa resposta ao tratamento com o ATRA (ácido transretinóico), que induzirá a diferenciação granulocitária dos blastos (Villamor *et al.*, 2000; Gomis *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2005).

2.3.1 Breve histórico da Leucemia Promielocítica Aguda

A leucemia promielocítica aguda (LPA) foi primeiramente descrita como uma entidade específica em 1957 por um autor sueco (Hillestad, 1957) que relatou três casos evidenciados por “um curso fatal muito rápido de apenas poucas semanas de duração”, com uma prevalência de promielócitos na contagem leucocitária e uma tendência severa a sangramentos. Neste estudo, Hillestad concluiu que essa doença “parecia ser a forma mais maligna da leucemia aguda”. Posteriormente, Bernard *et al* (1959) descreveram características mais detalhadas da LPA, e a diátese hemorrágica¹ severa foi atribuída à coagulação intravascular disseminada ou hiperfibrinólise.

Até meados da década de 80 o coquetel quimioterápico usado inicialmente no tratamento da LPA era composto por alguma antraciclina e Ara-C (*cytosine arabinoside*) e as taxas de remissão completa alcançada nos pacientes recém diagnosticados variavam entre 75% e 80% (Bernard *et al*, 1973; Sanz *et al* , 1988; Cunningham *et al*, 1989). No entanto, era constantemente notado o agravamento da síndrome hemorrágica após a quimioterapia, o que ocasionava altas taxas de

¹ Diátese hemorrágica é o nome dado a um conjunto de doenças cujo sintoma comum é a tendência à hemorragia sem causa aparente (hemorragias espontâneas) ou hemorragia mais intensa ou prolongada após um traumatismo. Pode ocorrer devido a uma anormalidade da parede vascular, plaquetas e sistemas de coagulação e fibrinólise. A hemorragia pode ocorrer na pele, nas mucosas, nas articulações, espontaneamente ou sob o efeito de causa externa (Cotran *et al.*, 1996).

óbito precoce e se fazia necessário o uso de suporte de plaquetas e fibrinogênio. Neste período apenas 35% a 45% dos pacientes alcançavam a cura com o tratamento quimioterápico pelo critério de sobrevida livre de doença por cinco anos (SLD 5-anos) (Ribeiro e Rego, 2006).

A introdução do ácido *all-trans*-retinóico (ATRA – *all-trans retinoic acid*) a partir de 1985 inaugurou uma nova etapa na história do tratamento da LPA. A otimização de protocolos de tratamento baseados na combinação do ATRA com a quimioterapia elevou a taxa de remissão completa (RC) para 90-95% e a SLD de 6-anos subiu para 86% ($\pm 10\%$) em pacientes de baixo risco. Os principais genes envolvidos nesta leucemia, o gene *PML* no cromossomo 15 e o gene *RAR α* no cromossomo 17, juntamente com seus produtos anormais foram identificados em 1990 (Longo *et al*, 1990a,b; Borrow *et al*, 1990; de Thé *et al*, 1990). Ainda no início da década de 90 a introdução do uso do trióxido de arsênico (ATO - *arsenic trioxide*) melhorou os resultados minimizando os casos refratários ao tratamento e o índice de recaídas. A combinação ATRA/ATO na terapia da LPA permitiu o alcance de maior redução dos transcritos *PML/RAR α* e uma sobrevida mais longa em pacientes recém diagnosticados (Wang e Chen, 2008).

Dessa forma, a história do tratamento da LPA pode ser dividida em quatro períodos: (1) período pré-ATRA: reconhecimento da LPA como uma patologia extremamente fatal e sua resposta a quimioterapia (1957-1985); (2) introdução do ATRA na terapia de diferenciação e otimização de protocolos baseados na utilização do ATRA (1985 até o início da década de 1990); (3) utilização do ATO no tratamento da LPA (a partir do início da década de 1990); e (4) combinação ATRA/ATO como uma terapia sinérgica e desenvolvimento de alguns novos agentes (Wang e Chen, 2008).

2.4 Patogênese molecular da Leucemia Promielocítica Aguda

A LPA é geneticamente caracterizada, invariavelmente, por rearranjos cromossômicos da região 17q21, os quais promovem a fusão do gene que codifica o receptor alfa do ácido retinóico (*RAR α* – *retinoic acid receptor alpha*) com alguns **genes “parceiros” (X)** (Quadro 3) (Mistry *et al.*, 2003).

O mais frequente dos genes parceiros é o gene da leucemia promielocítica (*PML* – *promyelocytic leukemia gene*), ocorrendo em mais de 95% dos casos. Neste rearranjo ocorre a formação de dois genes de fusão, o *PML-RAR α* e seu recíproco *RAR α -PML* (Grimwade *et al.*, 2000). Esta patologia é assinalada pela translocação *t*(15;17)(q22;q21), gerando os dois produtos quiméricos anteriormente citados (Figura 2) (Larson *et al.*, 1984).

Apesar dos mecanismos de formação subjacentes desta translocação ainda não serem conhecidos, Neves *et al.* (1999) relataram que os genes *PML* e *RAR α* estão localizados próximos um do outro na cromatina das células precursoras hematopoéticas em diversas fases do ciclo celular. Além disso, é conhecida a existência de pequenas regiões de identidade entre estes dois genes nas regiões de seus pontos de quebra (Yoshida *et al.*, 1995). Estas evidências apontam para uma justificativa à forte tendência de ocorrência da *t*(15;17).

No entanto, uma pequena parcela dos casos de LPA surgem das translocações $t(11;17)(q23;q21)$, $t(11;17)(q13;q21)$, $t(5;17)(q35;q21)$ ou ainda a partir de uma deleção intersticial no cromossomo 17 (Quadro 3), que são as chamadas translocações variantes da LPA (Chen *et al.*, 1993; Redner *et al.*, 1996; Wells *et al.*, 1997; Arnould *et al.*, 1999). Estas variações do tema clássico apresentam-se como “experimentos da natureza” onde fenótipos semelhantes são associados a diferentes genótipos (Redner, 2002).

Quadro 3: Frequência e caracteres clínicos dos cinco subtipos da LPA.

Alteração Citogenética	Frequência na LPA	Produtos da fusão	Caracteres Clínicos
$t(15;17)$	>95%	PML-RAR α RAR α -PML	Sensível ao ATRA e ao ATO
$t(11;17)(q23;q21)$	0,8%	PLZF-RAR α RAR α -PLZF	Resistente ao ATRA e ao ATO
$t(11;17)(q13;q21)$	Muito rara ¹	NuMA- RAR α Produto recíproco não encontrado	Sensível ao ATRA
$t(5;17)(q35;q21)$	<0,5%	NPM-RAR α RAR α -NPM	Sensível ao ATRA
der(17)	Muito rara ¹	STAT5b- RAR α Produto recíproco não encontrado	Sensível ao ATRA?

¹ apenas um caso descrito

Fonte: Mistry, 2003.

A primeira translocação variante na LPA a ser descrita e também a mais amplamente estudada é a $t(11;17)(q23;q21)$ (Chen *et al.*, 1993), e representa 0,8% dos casos de LPA (Mistry *et al.*, 2003). A translocação $t(11;17)$ fusiona o gene *PLZF* (promyelocytic leukemia zinc finger) com o *RAR α* (Chen *et al.*, 1994). Assim como nos rearranjos *PML-RAR α* o ponto de quebra nesta translocação localiza-se no intron 2 do *RAR α* (de Thé *et al.*, 1990). Ambas as proteínas quiméricas *PML-RAR α* e *PLZF-RAR α* possuem os mesmos domínios B-F do gene

RARα que codificam as regiões da proteína responsáveis pela ligação ao DNA, pela heterodimerização com os RXR e pelas funções de interação com os co-repressores e co-ativadores do *RARα*. Nesta translocação a fusão recíproca *RARα-PLZF* também é expressa (Chen *et al.*, 1994; Licht *et al.*, 1995; Grimwade *et al.*, 2000).

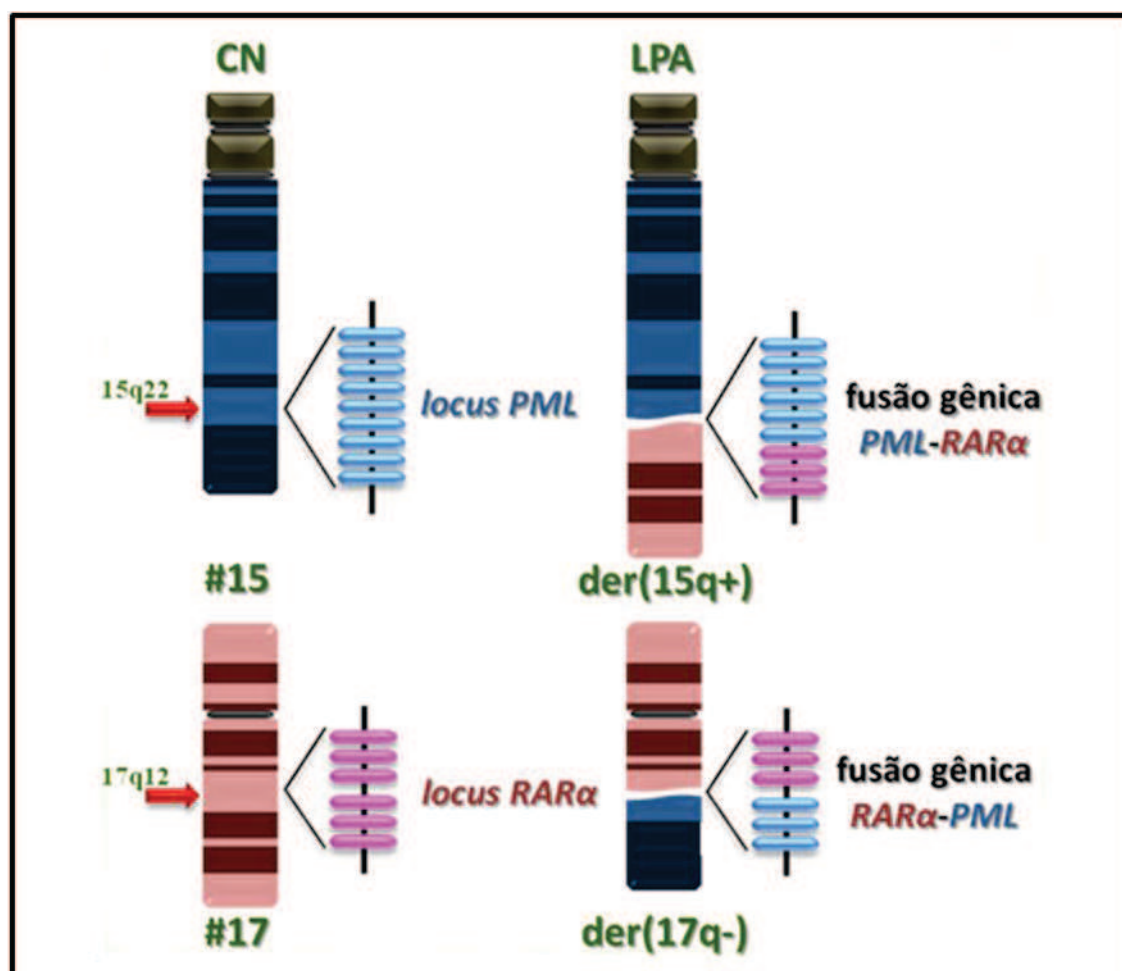


Figura 2: Desenho esquemático da citogenética e estrutura molecular do rearranjo *t(15;17)(q22;q12)*. Os cromossomos normais (CN) 15 e 17 (#15 e #17, respectivamente), e os cromossomos derivados na LPA com *t(15;17)* (LPA) são mostrados esquematicamente, assim como os loci dos genes PML e *RARα* e das fusões PML-*RARα* e *RARα*-PML. As setas vermelhas apontam os pontos de quebras nos cromossomos normais.

Apesar do fenótipo semelhante à *PML-RARα*, as leucemias com *t(11;17)* demonstram uma gama de caracteres morfológicos incomuns à LPA,

apresentando blastos com características intermediárias entre os subtipos morfológicos M2 e M3. Em termos clínicos, a maioria dos casos com t(11;17) não respondem ao tratamento com ATRA, não sendo observada a diferenciação dos blastos expostos a este medicamento (Licht *et al*, 1995). Estudos iniciais indicaram que pacientes com t(11;17) possuem prognóstico pior que aqueles com t(15;17), falhando em alcançarem remissão seja com quimioterapia convencional ou com terapia de diferenciação com o ATRA (Jansen e Lowenberg, 2001).

A segunda translocação variante a ser caracterizada foi a t(5;17)(q35;q21), que é também a segunda mais frequente (Redner *et al*, 1996). Esta variante transloca o gene da Nucleofosmina (*NPM - Nucleophosmin Gene*) que se localiza na região 5q35 para o locus do *RARα* na região 17q21 e representa 0,5% dos casos da LPA (Mistry *et al*, 2003). Igualmente, o ponto de quebra ocorre no segundo intron do gene *RARα*, permitindo que uma proteína quimérica que contenha os domínios B-F do *RARα* juntamente com os domínios N-terminais do *NPM* num mesmo quadro de leitura seja expressa. A nucleofosmina é uma fosfoproteína nucleolar que participa da montagem do RNA ribossomal e apresenta atividades de chaperona² e nuclease. Mais recentemente essa fosfoproteína foi também encontrada em associação com os centrômeros e possivelmente apresenta uma função na regulação da duplicação centromérica. A translocação recíproca *NPM-RARα* foi identificada em três dos quatro casos descritos (Okuda *et al*, 2000). Semelhantemente a LPA com t(15;17), o fenótipo dos blastos encontrados na t(5;17) é compatível com M3. Estudos *in vitro* apresentaram evidências convincentes indicando que blastos que possuem a

² Chaperonas (chaperons eram garotos que ajudavam os nobres renascentistas a vestirem suas roupas complicadíssimas e colocar suas enormes perucas) constituem uma família de muitas proteínas diferentes cuja função é usar energia da hidrólise de ATP para desenovelar proteínas, possibilitando novo enovelamento, no intuito de alcançar a forma correta ou dirigir-se ao destino correto. Além disso, elas podem encaminhar a proteína à destruição, caso não seja possível atingir sua configuração correta (Fenton e Horwich, 2003; Mayer e Bukau, 2005).

t(5;17), podem responder a diferenciação induzida pelo ATRA (Redner *et al*, 1997; Hummel *et al*, 1999).

Apenas um relato da translocação t(11;17)(q13;q21) foi publicado em um lactente com seis meses de idade do sexo masculino que apresentava leucocitose e lesões na pele. Tanto o mielograma como a biopsia de pele e o esfregaço sanguíneo mostraram uma predominância de promielócitos e neutrófilos displásicos. Este paciente iniciou o tratamento com ATRA e alcançou remissão completa (Wells *et al.*, 1997). Análises por Southern blotting demonstraram o rearranjo no intron 2 do gene *RARα*, novamente o mesmo ponto de quebra da LPA com t(15;17). Posteriormente, a clonagem da região do ponto de quebra revelou que o gene co-participante nesse rearranjo era o gene *NuMA* (*Nuclear-mitotic apparatus protein*), tendo como produto final desta fusão a proteína NuMA-RARα. A translocação recíproca deste rearranjo, *RARα-NuMA*, não foi encontrada. A proteína de fusão NuMA-RARα possui 2286 aminoácidos que albergam os 1883 aminoácidos da proteína NuMA, incluindo os domínios que codificam os domínios globulares N-terminais e *coiled-coil* desta, responsáveis pela reorganização nuclear, oligomerização³ e associação ao fuso mitótico da proteína NuMA. Unidos a isto estão os mesmos aminoácidos C-terminais que codificam os domínios B-F que são expressos nas translocações t(15;17), t(11;17), t(5;17) e der(17) (Wells *et al.*, 1997; Redner, 2002).

A alteração cromossômica variante der(17) também foi relatada apenas uma vez. No entanto, diferentemente do caso com a t(11;17)(q13;q21) que ocorreu num lactente, a alteração der(17) foi identificada em um homem com 67

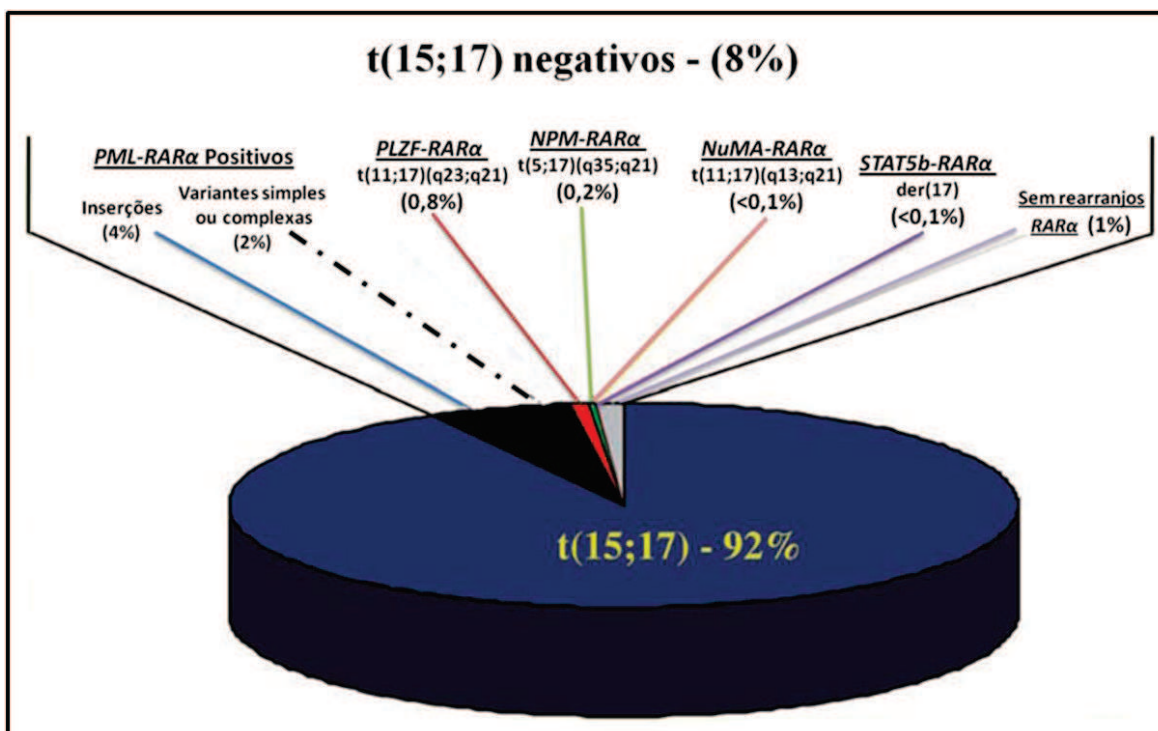
³ É o processo de conversão de um monômero (composto constituído de moléculas, cada uma das quais capazes de dar origem a uma ou mais unidades constitucionais) ou de uma mistura de monômeros em um oligômero (substância constituída de moléculas que contêm poucos átomos de uma ou mais espécies ou grupos de átomos - unidades constitucionais- ligados repetitivamente uns aos outros) (Andrade *et al.*, 2001).

anos inicialmente diagnosticado com LMA-M1. Uma pequena parte dos blastos visualizados na medula apresentou caracteres morfológicos para a variante microgranular M3v da LPA. Em estudos *in vitro* os blastos não apresentaram resposta ao ATRA. A fusão *STAT5b/RARα* ocorreu devido a uma deleção intersticial do cromossomo 17 que levou a criação de uma fusão intrônica ligando os *loci* dos genes *STAT5b* e *RARα*. Assim como o *RARα*, o gene *STAT5b* localiza-se na região 17q21.1-21.2 e estes dois genes são separados por aproximadamente 3Mb (Zelent *et al.*, 2001). O rearranjo do locus *RARα* foi confirmado por Southern blotting e a clonagem desta região demonstrou a presença do gene que codifica a proteína STAT5b, que pertence a uma família de transdutores de sinais e ativadores de transcrição da via de sinalização JAK (*Janus Kinase*), dentro do intron 2 do gene *RARα*, produzindo a fusão *STAT5b/RARα*. Obviamente, devido à natureza da deleção intersticial, o produto reverso da fusão não é produzido. As sequências N-terminais do gene *STAT5b* são fusionadas à mesma sequência do gene *RARα* como ocorre nas outras LPAs variantes (Arnould *et al.*, 1999; Melnick e Licht, 1999).

Muitas variantes citogenéticas foram relatadas, porém muitas destas mostraram ser compostas por rearranjos crípticos dos *loci* *PML* e *RARα*. De acordo com o European Working Party (EWP) a maioria dos casos onde não é possível a visualização da t(15;17) apresenta o rearranjo *PML/RARα* em análises moleculares. De fato, dentre 611 casos de LPA do EWP apenas 19 (3,1%) não apresentaram a fusão *PML/RARα*. Destes 19 casos sete demonstraram fusões do gene *RARα* com locus diferente, cinco não possuíam qualquer rearranjo envolvendo o gene *RARα* e outros sete que não foram caracterizados completamente (Figura 3). Nenhum caso de rearranjo apenas envolvendo o gene

PML foi encontrado, respaldando o importante papel do gene *RARα* na patogênese da LPA (Grimwade e Lo Coco, 2002).

Outras possíveis variantes da LPA que possuem rearranjos da região 17q12-q21, o locus *RARα*, foram descritas na literatura. Dentre estas estão: t(14;17)(q22;q21) (Cigudosa *et al.*, 1995), t(8;17)(p21;q21) (Miura *et al.*, 1994), t(1;17)(p36;q21) e t(7;17)(q36;q22) (Yamada *et al.*, 1983) e t(3,17)(q26.3;q12) (Silva *et al.*, 2005). No entanto, como estas fusões não foram clonadas existe a possibilidade de que algumas delas, senão todas possuam rearranjos crípticos da fusão *PML/RARα* ou das outras variantes da LPA descritas. Portanto, os dados existentes são escassos para a precisa resolução de que estes rearranjos são, de fato, novas variantes da LPA. Translocações complexas envolvendo o rearranjo (15;17) também têm sido descritas, por exemplo a t(2;15;17)(q21;q22;q21) (Chen *et al.*, 1993; Redner *et al.*, 1996), bem como a ins(15;17)(q22;q12q21) (Rolston *et al.*, 2002). A deleção do cromossomo 15 pode ser um diagnóstico primário ou pode surgir durante recaída ou progressão da doença. Esta anormalidade pode ser indicada como um prognóstico muito desfavorável para a LMA sendo seguida de falecimento num período de 3 a 13 meses após o diagnóstico da doença (Berger e Coniat, 2003).



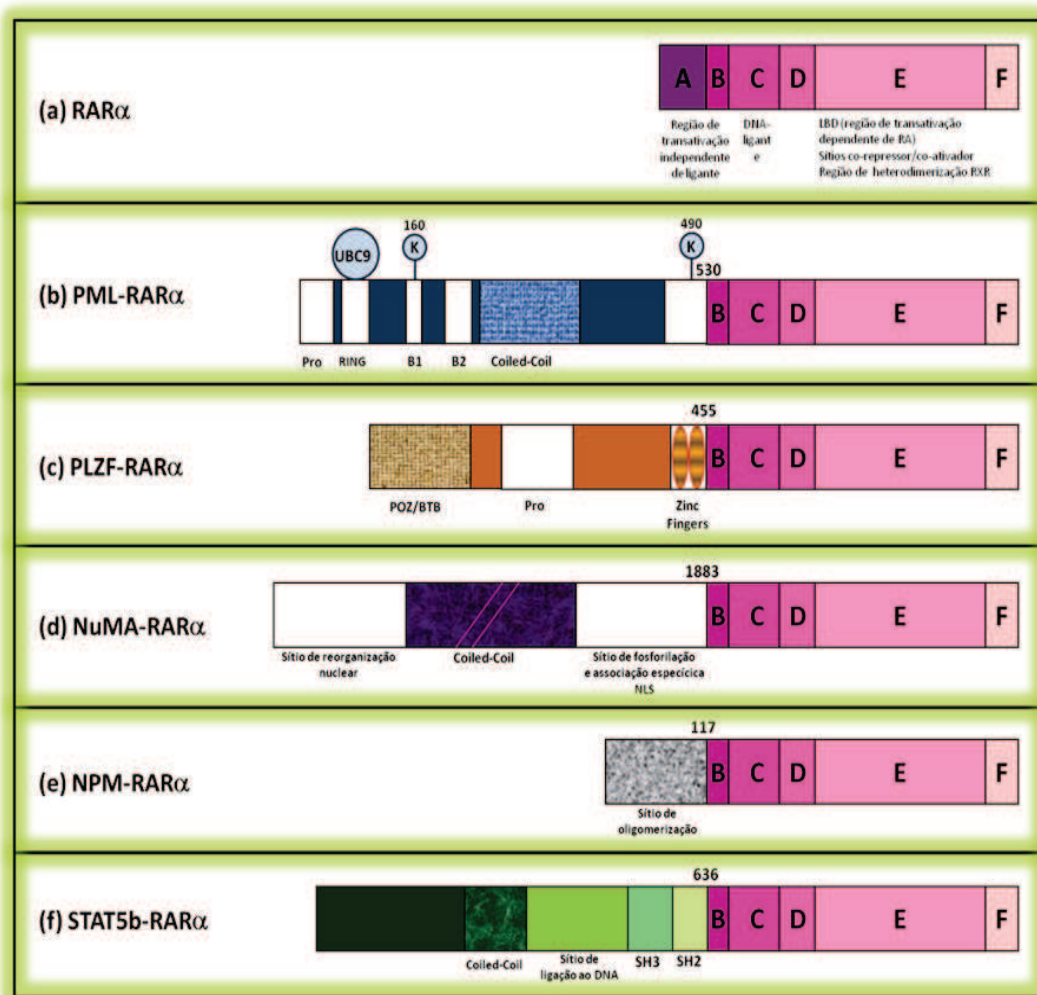
Fonte: modificada de Grimwade e Lo Coco (2002).

Figura 3: Lesões moleculares ocultas detectadas em casos de LPA caracterizadas morfolologicamente com análise citogenética bem sucedida. As frequências dos subgrupos citogenéticos e moleculares estão baseadas no estudo de 611 casos de LPA do European Working Party (EWP).

O papel chave representado pelas proteínas quiméricas **X-RAR α** foi estabelecido, na patogênese da LPA, através do recrutamento de co-repressores e do complexo de histonas desacetilases (HDAC – *histone deacetylase complex*) para reprimir os genes envolvidos na diferenciação mielóide (Figura 4) (Mistry *et al.*, 2003).

As proteínas de fusão **X-RAR α** possuem atributo de mediadoras da diferenciação mielóide quando administradas doses farmacológicas (supra-fisiológicas) de seu ligante, o ATRA, que é dependente da associação HDAC/complexo co-repressor (Figura 5). A natureza do gene parceiro na fusão RAR α é um determinante crítico da resposta ao ATRA e ao Arsênico, que são as drogas de escolha no tratamento anti-LPA, enfatizando a importância da

caracterização citogenética e molecular dos pacientes com esta doença para a determinação da abordagem terapêutica mais adequada (Mistry *et al.*, 2003).



Fonte: Modificado de Mistry *et al.*, 2003.

Figura 4: Desenho esquemático da proteína RARα e proteínas quiméricas X-RARα.

2.4.1 As Funções do RARα

O receptor alfa do ácido retinóico (RARα) é um membro da super-família de receptores hormonais, que atuam como reguladores transcricionais ligante-induzíveis⁴. Uma vez que o gene *RARα* está envolvido em todos os rearranjos

⁴ Reguladores transcricionais ligante-induzíveis é uma família de fatores de transcrição, receptores nucleares, os quais são de suma importância nos processos de crescimento celular, diferenciação, desenvolvimento e manutenção da

conhecidos da LPA, a perturbação deste gene deve contribuir de forma significativa à patogênese desta doença. Dessa forma, o conhecimento da função normal deste receptor no desenvolvimento dos neutrófilos é importante para o entendimento das prováveis funções anormais onde o receptor mutado levaria ao bloqueio da diferenciação promielocítica (Stunnenberg, 1993).

O RAR α se liga a elementos de resposta⁵ conhecidos como elementos de resposta ao ácido retinóico (RAREs - *retinoic acid response elements*), que se localizam nas regiões promotoras dos genes-alvo dos receptores do ácido retinóico (RAR - *retinoic acid receptors*). Os RAREs são compostos por repetições diretas de hexanucleotídeos com número variado de nucleotídeos espaçadores entre os motivos repetidos (Laudet *et al.*, 1992). Os receptores do ácido retinóico necessitam formar heterodímeros com proteínas da família dos receptores de hormônios nucleares, chamados receptores X retinóides (RXRs - *retinoid X receptors*), para se ligarem com eficácia ao DNA (Leid *et al.*, 1992). Estes receptores, os RARs e os RXRs, atuam na transdução do sinal retinóide e são ativados pelo ácido 9-*cis*-retinóico (9-*cis* RA - *9-cis retinoic acid*). Adicionalmente, os RARs também são ativados pelo ATRA. Tanto o ATRA como o 9-*cis* RA são produtos do metabolismo da vitamina A (retinol) que têm como precursores os carotenóides, sendo o mais importante deles o beta-caroteno (Marill *et al.*, 2001).

Acredita-se que o RAR α possui importante papel no controle proliferativo dos promielócitos, assim como na diferenciação destas células em neutrófilos maduros. Evidências oriundas de diversos estudos e observações em linhagens

homeostase metabólica da célula. Eles regulam a expressão genes-alvo através da ligação a sequências de DNA específicas dentro das regiões promotoras, produzindo assim os efeitos biológicos esperados (Cheng, 2005).

⁵ Sequências nucleotídicas de consenso curtas, geralmente no início da cadeia (upstream) a distâncias variáveis do gene a ser regulado, que são reconhecidas por fatores de transcrição reguladores específicos, e que promovem resposta gênica. (Hoffe, 2000).

celulares apontam que a via RA-RAR α representa importante função na maturação neutrofílica. Primeiro, tanto em camundongos como em humanos com deficiência de vitamina A é observada granulopoese imperfeita (Ghosh e Das, 1988). Segundo, os retinóides demonstram-se como inibidores proliferativos, assim como estimulam preferencialmente a granulopoese e não a diferenciação monocítica ou eritróide (Gratas *et al.*, 1993; Tocci *et al.*, 1996). Terceiro, o RAR α é expresso preferencialmente nas células da linhagem mielóide, distintamente dos outros membros da família RAR, o RAR β e o RAR γ (Labrecque *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001). Por fim, camundongos transgênicos carregando uma mutação no domínio LBD (*ligand binding domain*) do RAR α , a qual impossibilitava a ligação do ácido retinóico, demonstraram elevação da contagem dos neutrófilos imaturos (Kogan *et al.*, 2000).

Além de ser importante no processo da diferenciação granulocítica, a via RA-RAR α também tem um papel chave no direcionamento dos progenitores hematopoiéticos pluripotentes ao longo da linhagem granulocítica (Gratas *et al.*, 1993; Labbaye *et al.*, 1994). O trabalho de Tocci *et al* (1996) demonstrou que o ácido retinóico (RA) pode alterar o destino das células hematopoéticas progenitoras (HPCs – *haematopoietic progenitor cells*) fetais do fígado de tal maneira a causar um redirecionamento do programa de diferenciação celular. Desta forma estas células previamente comprometidas a um programa de diferenciação monocítica ou eritróide são conduzidas a via granulocítica devido à indução provocada pelo RA.

O modelo atualmente aceito para os mecanismos normais da função do RAR α , como um fator transcricional ligante-induzível, está baseado na capacidade do RAR α -desligado (desassociado do RA ou ligado a um antagonista)

de ligar-se a elementos de resposta ao DNA com alta afinidade e poder inibir a diferenciação por associação a co-repressores, chamados SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid hormones*) e N-CoR (*nuclear receptor Co-repressor*). Por sua vez, estes co-repressores recrutam o complexo de histonas desacetilases HDAC, induzindo a condensação da cromatina em consequência a desacetilação das histonas. A cromatina no estado condensado torna-se inacessível aos ativadores transcricionais, assim como à maquinaria de transcrição basal, por conseguinte, a transcrição é reprimida e os genes-alvo do RAR α são silenciados (Figura 5a) (Chen e Evans, 1995; Mistry *et al*, 2003).

A união do ligante retinóide (RA) ao receptor (RAR α) induz uma mudança conformacional no domínio LBD (Figura 5a) que permite que moléculas co-ativadoras se liguem a resíduos anteriormente inacessíveis, assim como a dissociação do complexo co-repressor. As várias moléculas co-ativadoras atuam conjuntamente para o início da transcrição de diversas formas incluindo a acetilação de histonas, através da atividade da histona acetilase (HAT), provocando o relaxamento do DNA através da ação da DNA helicase Trip1/sug1 e da interação com componentes da maquinaria de transcrição basal. O estado relaxado da cromatina permite o recrutamento dos fatores transcricionais basais para as regiões promotoras dos genes-alvo do RAR α , seguido pela iniciação da transcrição e promoção da granulopoese (Figura 5a) (Glass e Rosenfeld, 2000). Desta forma, acredita-se que o RAR α possui uma função dual, onde o RAR α -desligado seria um regulador negativo da diferenciação granulocítica, enquanto o RAR α -ligado (associado ao RA) funcionaria como agonista estimulador da diferenciação (Kastner *et al*, 2001).

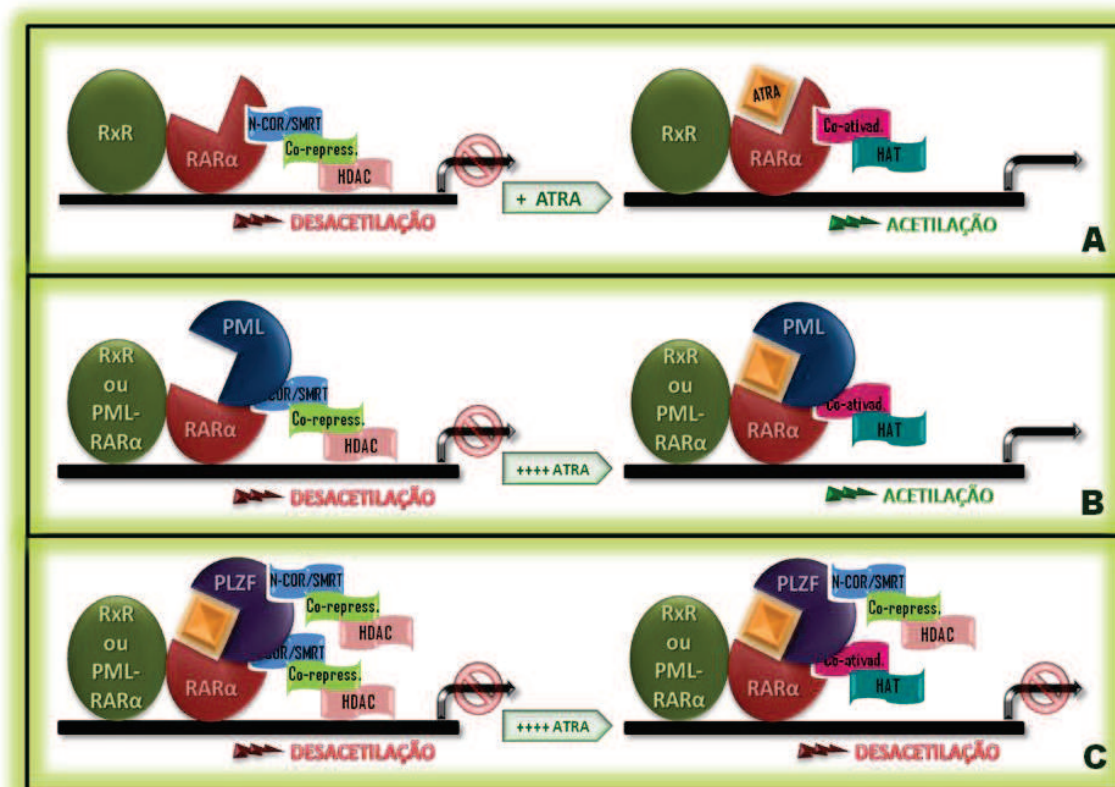


Figura 5: Ativação transcricional modulada pela proteína RARα selvagem e pelas proteínas quiméricas PML-RARα e PLZF-RARα. (a) o heterodímero RXR:RARα (desligado) reprime a transcrição gênica através do recrutamento de um complexo repressor formado por N-CoR, SMRT, HDAC e outros co-repressores, desencadeando a desacetilação histônica. Ao ocorrer a ligação do ATRA, o heterodímero RXR:RARα (ligado) libera o complexo repressor e liga-se a um complexo ativador com atividade de histona acetilase (HAT), resultando em ativação transcricional. (b) Semelhantemente aos receptores selvagens, a proteína quimérica PML-RARα interage com o complexo repressor. No entanto, doses fisiológicas do ATRA não promovem o desligamento das proteínas repressoras. Apenas na presença de altas doses de ATRA os co-repressores são substituídos por co-ativadores que permitem a ativação da transcrição. (c) A proteína PLZF-RARα, por sua vez, não responde às altas doses do ATRA devido à presença de um sítio de ligação aos co-repressores na porção da PLZF que permanece na proteína fusionada (Mistry et al., 2003).

2.5 A importância do diagnóstico genético da LPA

Na LPA o diagnóstico morfológico, apesar de muito preditivo nos casos hipergranulares típicos, é considerado insuficiente. Isto por que pacientes com características morfológicas sugestivas de LPA sem rearranjos do receptor do

ácido retinóico α , ou, contrariamente, pacientes cujos aspectos morfológicos não apontam para um diagnóstico de LPA, mas que possuem alguma das suas alterações genéticas específicas são frequentemente descritas na literatura (Lo Coco *et al.*, 1999). O rápido estabelecimento do diagnóstico de LPA é vital para manejo adequado do paciente. A isto está relacionado o risco significativo de morte por sangramento devido à diátese hemorrágica e o aumento do risco de recaída com baixa sobrevida se os pacientes com LPA responsiva à retinóide não forem tratados com o ATRA combinado à quimioterapia. De fato, o tratamento associado ao ATRA possui uma vantagem adicional, levando a uma rápida melhora do quadro da coagulopatia associada à doença. Além disso, a eficácia do tratamento indutor da diferenciação através dos retinóides é estritamente dependente da presença das fusões da região 17q21 que respondem a este tipo de tratamento. Sendo assim, a confirmação genética do diagnóstico é obrigatória (Burnett *et al.*, 1997; Mistry *et al.*, 2003). Portanto, todos os pacientes, incluindo aqueles com LPA hipergranular típica que iniciaram tratamento específico, devem ser estudados através de análises cariotípica e moleculares para confirmação da fusão gênica específica e caracterização da sua isoforma para a monitorização molecular da doença residual mínima (DRM) (Grimwade e Lo Coco, 2002).

A identificação das alterações genéticas específicas da LPA em células leucêmicas pode ser realizada em nível de cromossomos, DNA, RNA e proteína

com a utilização das técnicas de citogenética clássica (cariótipagem por bandeamento G), FISH, RT-PCR e anticorpo monoclonal anti-PML (PG-M3), respectivamente (Quadro 4) (Sanz *et al.*, 2005).

Quadro 4: Métodos para o diagnóstico genético da Leucemia Promielocítica Aguda.

<i>Nível Celular</i>	<i>Alvo(s)</i>	<i>Método(s)</i>	<i>Tempo gasto (h)</i>	<i>Vantagens principais</i>	<i>Principais inconvenientes</i>
Cromossomos	Rearranjos 17q21	Cariotipagem	16-48	Altamente específico	São necessárias culturas de 24-48h; rearranjos crípticos não são detectados (falso-negativos). Exige metáfases de boa qualidade
DNA	t(15;17) e/ou rearranjo 17q21	1.FISH 2.Southern blot	1. 6-24 2. 96-168	1. Especificidade e não precisa de células em divisão. 2. Altamente específico.	1. Alto custo e não identifica o tipo de fusão. 2. Laborioso e consome muito tempo.
RNA	Fusão <i>PML-RARα</i>	RT-PCR	4-6	Rápido, sensível; monitora a DRM.	Produção de RNA de baixa qualidade, contaminação e artefatos (falso-positivos).
Núcleo	Distribuição microgranular nuclear da proteína PML.	Imunofluorescência ou imunohistoquímica.	2-3	Rápido, simples e de baixo custo	Artefatos devido à degradação celular. Não informa o tipo de fusão <i>PML-RARα</i> .

Fonte: Modificado de Sanz *et al.* (2005).

As abordagens diagnósticas são concentradas essencialmente na determinação da presença da fusão gênica oculta *PML-RAR α* , que prevê uma resposta favorável a administração do ATRA e ATO, e na identificação dos casos com a fusão *PLZF-RAR α* , que constituem quase 1% das LPA, e são refratários ao tratamento com estas drogas como únicos agentes terapêuticos (Sainty *et al.*, 2000). Nas raras situações onde a LPA é confirmada morfológicamente, mas não é detectado o rearranjo *PML-RAR α* , a análise citogenética pode revelar um rearranjo da região 17q12-21 indicando que o gene *RAR α* está fusionado a outro parceiro de fusão alternativo desconhecido. Nestes casos, a identidade deste parceiro pode posteriormente ser confirmada por RT-PCR. Contudo, se a análise

citogenética convencional não se mostra clara nos casos de LPA negativos para a fusão *PML-RAR α* , a análise pela técnica de FISH ou Southern blotting utilizando sondas para o gene *RAR α* pode confirmar se este está rearranjado e então a RT-PCR para análise da presença dos diversos genes alternativos parceiros do *RAR α* pode ser realizada (Grimwade e Lo Coco, 2002).

2.5.1 Análise Citogenética

Atualmente a análise citogenética faz parte da rotina obrigatória de todos os pacientes recém-diagnosticados com qualquer subtipo de LMA. O cariótipo tem se mostrado um fator prognóstico determinante nesta doença, prevendo a probabilidade de sucesso da indução a remissão, do risco de recaída e a sobrevida total. Além disto, o cariótipo está sendo crescentemente usado na determinação da abordagem terapêutica em estudos clínicos de grande escala (Grimwade, 2001).

Na maioria dos pacientes com LPA confirmada morfolologicamente, a presença do rearranjo *PML-RAR α* é confirmada pela presença da t(15;17) (Grimwade, 1999). No entanto, em estudos clínicos multicêntricos esta alteração não foi identificada pela citogenética clássica em cerca de 15% dos casos suspeitos de LPA, todavia na maioria destes foram posteriormente detectados rearranjos crípticos *PML-RAR α* (Burnett *et al.*, 1999). Em alguns casos isto reflete uma falha da técnica citogenética; por exemplo, preparações cromossômicas diretas (culturas de 6-8h) podem levar a um cariótipo falso negativo, que seria apenas um reflexo das células medulares normais residuais, cujo crescimento foi relativamente favorável em relação aos blastos da LPA (Berger *et al.*, 1981). Esta

deficiência é geralmente superada através de culturas mais prolongadas (24-48h) das células leucêmicas antes da avaliação citogenética. Este procedimento vem sendo comumente adotado em casos com suspeita de LPA (Grimwade e Lo Coco, 2002). Contudo, apesar dessa medida, em alguns casos de LPA descritos como cariotipicamente normais, a técnica de nested RT-PCR detecta ambos os transcritos *PML-RAR α* e seu recíproco *RAR α -PML*, significando que a t(15;17) existia, porém não poderia ser detectada pela análise citogenética (Burnett *et al.*, 1999). Adicionalmente, o rearranjo *PML-RAR α* pode também ser resultado de um evento de inserção, onde nestes casos os cromossomos 15 e 17 apresentam-se aparentemente normais, ou ainda resultado de outras alterações complexas envolvendo múltiplos cromossomos (Grimwade *et al.*, 2000).

A ocorrência de todos estes fatos sugere claramente que técnicas moleculares adicionais, tais como RT-PCR, FISH ou imunofluorescência anti-PML, são necessárias para complementar a citogenética clássica na confirmação de um diagnóstico de LPA. Entretanto, isto categoricamente não significa que a citogenética clássica deve ser abandonada ou substituída pelas técnicas moleculares, visto que ela é de fundamental importância na identificação de translocações alternativas e cuja caracterização fornece importantes informações acerca da patogênese da LPA como um todo. Além disso, a análise citogenética é extremamente valiosa na determinação de alterações cromossômicas secundárias, as quais nos casos de LPA, ainda possuem importância biológica e clínica incerta (Grimwade e Lo Coco, 2002). A maior parte dos estudos sugere que a presença de anormalidades citogenéticas adicionais não atribui efeitos deletérios aos resultados. De fato, evidências preliminares insinuam que resultados favoráveis também são observados em casos onde a t(15;17)

convivem juntamente a marcadores citogenéticos, que em outros subtipos de LMA apontariam para um prognóstico desfavorável, tais como alterações na região 3q, -5/del(5q), -7 ou cariótipos complexos. No entanto, estas evidências precisam ser confirmadas em um maior número de pacientes (Grimwade, 2001).

Enquanto a cariotipagem de rotina assim como o FISH são altamente específicos para a confirmação do diagnóstico genético, a RT-PCR trás vantagens adicionais como as definições do ponto de quebra e da isoforma *PML-RAR α* , sendo esta última utilizada como um sensível marcador para a avaliação da resposta ao tratamento e monitorização da DRM (Sanz *et al.*, 2005).

2.5.2 FISH: Vantagens e Desvantagens

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente tem como princípio básico o pareamento de um segmento de DNA (marcado direta ou indiretamente com fluorocromos) que funciona como sonda, com uma sequência alvo complementar no interior da célula visando sua verificação e localização exata (Guerra, 2004).

As análises por FISH podem fornecer uma valiosa abordagem na caracterização dos casos onde a citogenética convencional não revela a translocação clássica t(15;17). Uma importante vantagem da técnica de FISH é a possibilidade da mesma ser aplicada em diversos tipos de amostras (tecidos), isto inclui as células de cultura para a cariotipagem convencional, que permite a avaliação dos cromossomos (metáfase-FISH) e/ou núcleo (interfase-FISH). Além disto, esfregaços de medula óssea e sangue periférico ou *citospins* podem ser utilizados para a realização de interfase-FISH. Isto pode ser particularmente útil em situações em que a citogenética convencional e/ou a RT-PCR não puderam

ser realizadas ou não deram resultados, principalmente quando as amostras são escassas em células (Grimwade e Lo Coco, 2002).

Embora as técnicas de pintura cromossômica (WCP) sejam significativas para a caracterização de translocações complexas e variantes, elas não são adequadas para a investigação da maioria dos casos de LPA com o rearranjo *PML-RAR α* , devido à ocorrência de inserções, visto que as porções do material cromossômico rearranjado dos cromossomos der(15) ou der(17) são geralmente muito diminutas para serem detectadas. Portanto, na caracterização das fusões crípticas *PML-RAR α* são utilizadas sondas locus-específicas (LSI DNA Probe – *Locus Specific Identifier DNA Probe*) que flanqueiam ou abrangem todo o rearranjo cromossômico. No entanto, é de grande importância levar em conta o tamanho e a localização destas sondas, que podem ser adquiridas comercialmente, uma vez que estes parâmetros são necessários para a avaliação dos resultados obtidos, principalmente em pacientes sem a fusão clássica t(15;17). O ideal é o uso de sondas cosmidiais⁶ específicas para a fusão *PML-RAR α* relativamente pequenas, pois tal rearranjo pode não ser detectado se for oriundo de uma pequena inserção utilizando-se sondas muito extensas (Grimwade e Lo Coco, 2002).

Além disto, grupos de sondas projetadas para detecção da fusão gênica recíproca *RAR α -PML* falharão na geração dos sinais de fusão nestes casos de inserção ou de simples translocações variantes, onde o produto recíproco não é

⁶ Cosmídio é um DNA de um vírus bacteriófago dentro do qual é inserido um fragmento de um genoma a ser amplificado e sequenciado. Um cosmídio é uma estrutura construída artificialmente que é utilizada para clonagem (cópia) de sequências de DNA. Tecnicamente, cosmídios são pequenos plasmídeos que possuem o sítio *cos* do fago lambda, necessário para o condensamento do DNA na cabeça fágica. O cosmídio pode ser condensado no revestimento do vírus e transferido para a bactéria (*E. coli*) através de uma infecção viral. Como todos os genes virais, exceto o *cos*, estão ausentes, o cosmídio pode conter aproximadamente o dobro de DNA exógeno (44kb) em relação a um vetor fágico (23kb) (Pierce, 2005).

formado (Grimwade *et al.*, 2000). Outro contratempo diz respeito à interpretação do interfase-FISH, uma vez que os cromossomos 15 e 17 normais podem estar muito próximos em alguns núcleos, e desse modo produzir sinais falso-positivos. Para contornar o problema é indispensável o estabelecimento de um limiar de positividade utilizando diversas amostras normais anteriormente conhecidas. Este limiar está em torno de 10% nos protocolos das sondas disponíveis atualmente (Grimwade e Lo Coco, 2002).

2.5.3 Variantes da FISH: M-FISH e MCB

A partir da FISH outras técnicas foram desenvolvidas utilizando-se o mesmo princípio, dentre elas estão o multiplex-FISH (M-FISH) e o multicolor chromosome banding (MCB) (Chudoba *et al.*, 1999; Mandon *et al.*, 2003; Weise *et al.*, 2003).

O M-FISH permite analisar o genoma diretamente em um único experimento, detectando a presença de rearranjos cromossômicos, não revelados por procedimentos padrões (Bandas G, e FISH), tais como translocações, inserções e rearranjos estruturais complexos que resultam na formação de cromossomos marcadores. A técnica foi introduzida por Speicher *et al.* (1996) e utiliza um conjunto de sondas de DNA específicas para cada cromossomo (*whole chromosome painting* - WCP) que são hibridizadas com os cromossomos metafásicos ao mesmo tempo. Utilizando o princípio da marcação aleatória o coquetel de 24 sondas é gerado pela combinação de cinco fluorocromos, por exemplo: Rodamina, Vermelho-Texas, FITC (Isotiocianato de fluoresceína), DEAC (dietil-aminometil-cumarina) e Cianina 5 (Cy5), os quais podem gerar até 31 pseudocores, o total de cores alcançadas (N) é dado pela equação $N=2n-1$, onde

n é igual ao número de fluorocromos. Cada cromossomo é marcado com uma única combinação: cinco cromossomos são marcados com apenas um fluorocromo, dez cromossomos com dois fluorocromos e nove cromossomos com três fluorocromos (Quadro 5) (Kearney, 2006).

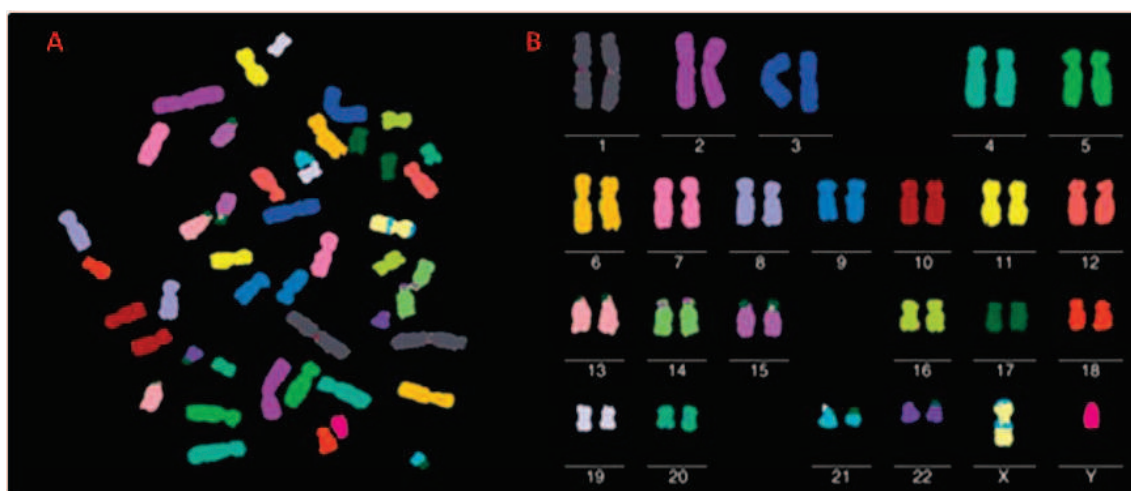
Quadro 5: Esquema de marcação aleatória usando cinco fluorocromos.

Cromossomo	Rodamina	FITC	Cy5	Texas-Red	DEAC
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
X					
Y					

As imagens são analisadas por um microscópio de epifluorescência, utilizando-se uma câmera CCD (*charge coupled devise* – CCD), todos os fluorocromos inclusive o contracorante DAPI são capturados sequencialmente

utilizando-se filtros específicos com diferentes comprimentos de onda. A câmara é acoplada a um computador com um software apropriado que gera uma imagem composta de cada cromossomo em uma visualização pseudocolorida, ou seja, as cores atribuídas pelo computador não são necessariamente as cores reais, mas as cores que refletem a informação composta de cada cromossomo facilitando o reconhecimento (Figura 6) (Van Limbergen *et al.*, 2002).

O M-FISH tem sido utilizado tanto na pesquisa como no diagnóstico de doenças, é aplicado principalmente em casos que apresentam cariótipos complexos, sendo muito útil no estudo dos tumores sólidos, os quais são caracterizados frequentemente por alterações complexas. No entanto, a dificuldade de obtenção de metáfases nos tumores faz com que eles sejam menos estudados que as leucemias. Dois grupos são alvo do M-FISH para identificação de rearranjos cromossômicos crípticos não detectados pelo bandeamento G: aqueles com aparente cariótipo normal e aqueles com cariótipos aberrantes complexos (Kearney, 2006).



Fonte: Geigl *et al.*, (2006) ⁷⁸

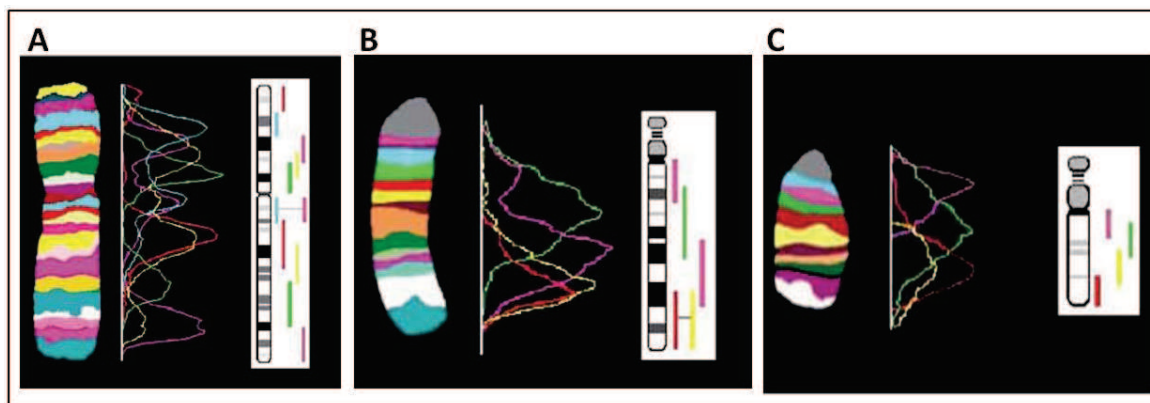
Figura 6: M-FISH em indivíduo normal exibindo pseudocores geradas a partir de imagens monocromáticas capturadas separadamente. a) Célula em metáfase b) Cariograma 46,XY.

A despeito de sua grande utilidade na elucidação de cariótipos complexos, o M-FISH não identifica com segurança rearranjos como microdeleções ou rearranjos muito pequenos, inversões e duplicações (Barouk-Simonet *et al.*, 2005).

Apesar do bandejamento G ser o padrão ouro entre todas as técnicas usadas na citogenética, este possui limitações uma vez que o padrão de bandas claras e escuras não permite em muitos casos a identificação da origem do material adicional presente em cromossomos com morfologia alterada. Além disso a resolução da técnica é extremamente dependente do espalhamento e da condensação cromossômica, parâmetros esses que são geralmente prejudicados em casos de leucemia. Dessa forma, o desenvolvimento da técnica de bandejamento cromossômico multicolorido (MCB) foi de grande importância para a resolução de casos de rearranjos intracromossômicos e determinação de pontos de quebra onde o bandejamento clássico não era elucidativo (Liehr *et al.*, 2002a).

A técnica MCB permite a diferenciação de regiões cromossômicas específicas ao nível de bandas e sub-bandas com uma resolução de 550 bandas ou mais num cariótipo haploide. É baseada na proporção de mudanças de intensidade de fluorescência ao longo do cromossomo, as quais são usadas para designar diferentes pseudocores para regiões cromossômicas específicas formando o bandejamento multicolorido detectados por meio de um programa de computador. Uma grande vantagem da técnica é que os perfis do MCB são

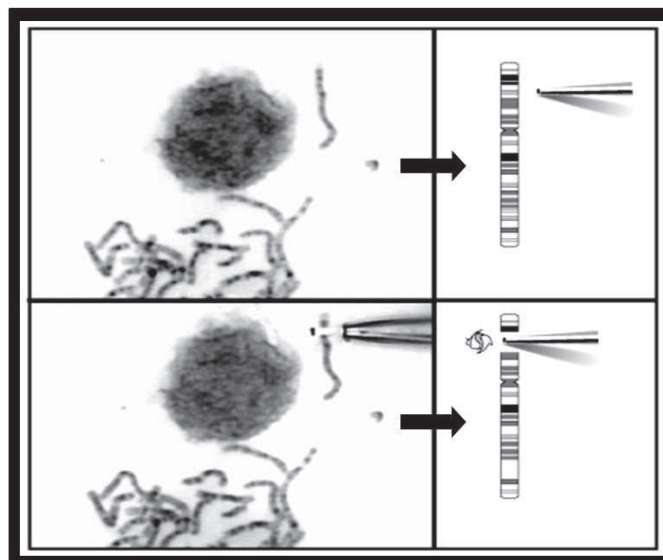
independentes do tamanho dos cromossomos analisados, dentro do limite, o número de bandas pseudocoloridas pode ser ajustado através do programa sem a necessidade de uma nova preparação cromossômica ou de repetição da coloração (Figura 7) (Liehr *et al.*, 2002b; Weise *et al.*, 2008).



Fonte: modificado de Liehr *et al.* (2002b).

Figura 7: Padrão do MCB, perfil da fluorescência e esquema de marcação do MCB. Baseado na microdissecção dos cromossomo 2 (a), 13 (b) e 22 (c).

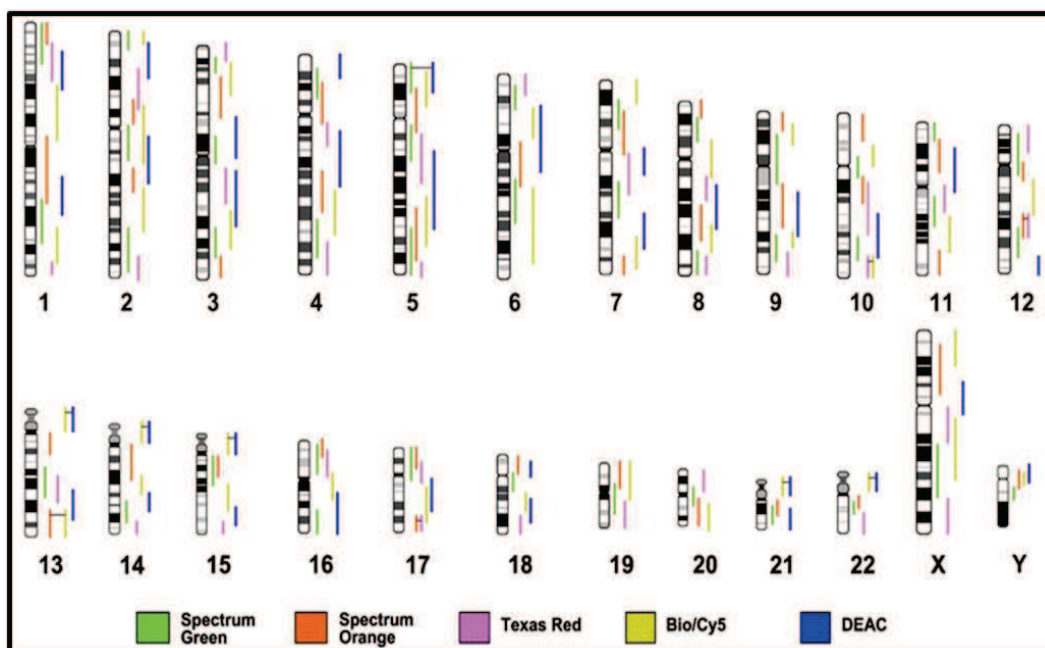
O MCB foi desenvolvido e testado inicialmente por Chudoba *et al.* (1999) no cromossomo 5, e mais tarde, Liehr *et al.* (2002) desenvolveram a técnica para ser aplicada em todos os 24 cromossomos humanos. O DNA de cada região foi isolado através da microdissecção (Figura 8), que consiste na retirada de 15 a 20 fragmentos imprecisos de cada cromossomo em metáfases espalhadas numa lâmina através de um aparelho de micro-manipulação, e posteriormente amplificado e marcado com fluorocromos diferentes, formando uma biblioteca de sondas de regiões específicas que cobrem cada um dos 24 cromossomos humanos (Figura 9).



Fonte: modificado de *National Human Genome Research Institute*.

Figura 8: Microdissecação de fragmento do cromossomo 2.

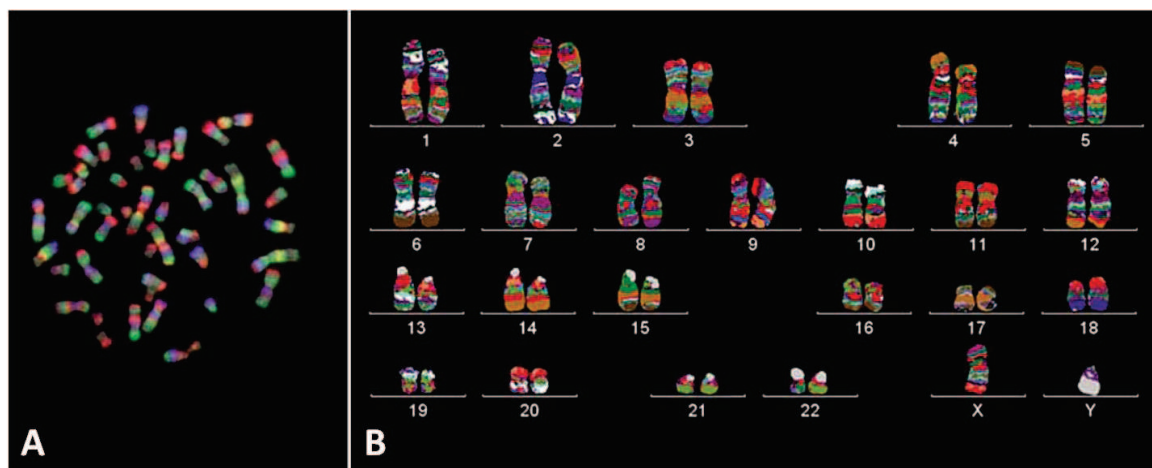
O MCB possui várias aplicações no diagnóstico e na pesquisa, sendo utilizado na caracterização de cromossomos marcadores e cromossomos derivativos, assim como em estudos da estrutura intranuclear, na análise de linhagens celular, na pesquisa de radiação e na citogenética comparativa (Weise *et al.*, 2008).



Fonte: Weise *et al.* (2008).

Figura 9: Esquema de marcação e localização dos conjuntos de sondas da biblioteca de MCB.

A combinação de todas as sondas MCB para os 24 cromossomos humanos em um único experimento de FISH é denominado mMCB (*multitude multicolor chromosome banding* – mMCB), e pode ser utilizado em casos onde há necessidade de uma análise mais rápida dos cariótipos com alta complexidade cromossômica (Figura 10) (Weise *et al.*, 2003; 2008).



Fonte: Weise *et al.* (2003).

Figura 10: mMCB em célula normal. a) Célula em metáfase mostrando as cores reais dos fluorocromos utilizados no mMCB b) Cariótipo 46,XY exibindo pseudocores do bandeamento multicolorido.

2.6 Leucemia Promielocítica Aguda na Infância

A LPA é considerada rara em crianças. Dados de incidência em estudos na população norte americana revelam que os casos de LPA pediátrica representa de 4% a 8% dos casos de LMA na infância e aproximadamente 10% dos casos de LPA em geral (Gregory *et al.*, 2009; Imaizumi *et al.*, 2011).

A LPA na infância é caracterizada por uma alta incidência de características adversas que incluem alto limiar de contagem leucocitária e apresentação da forma variante microgranular (LMA M3v) quando comparada com a doença no adulto. A morfologia variante microgranular possui um

frequência de aproximadamente 30% dos casos pediátricos de LPA (Gregory e Feusner, 2009; Sanz *et al.*, 2009). Uma vez que a apresentação da forma variante é desprovida das marcantes características da forma clássica, seu diagnóstico pode ser retardado e dessa forma aumenta potencialmente as chances de complicações clínicas perigosas instalarem-se na fase inicial da doença, sendo estas invariavelmente potencialmente fatais. Um exemplo destas complicações são os casos de hemorragia intracranial que é uma causa comum de morte precoce na fase de indução do tratamento (Testi *et al.*, 2005).

A vasta maioria dos estudos realizados em LPA quando não excluem pacientes pediátricos incluem ambas populações, pediátrica e adulta, sem analisá-las separadamente. Estudos clínicos onde é avaliada a resposta terapêutica a quimioterapia na LPA infantil são escassos devido a relativa raridade da LPA em crianças e adolescentes. A incidência da LPA, assim como as LMAs em geral, aumenta ao longo da idade, dessa forma a LPA é mais comum em adultos que em crianças. O marco genético da LPA, a t(15;17), torna esta doença aparentemente um tipo de leucemia mais homogêneo do que as outras malignidades que se apresentam em ambos os grupos, pediátrico e adulto. Este fato parece favorecer a lógica da aplicabilidade dos dados obtidos em estudos realizados em populações adultas, referentes à resposta da doença aos regimes terapêuticos, em pacientes pediátricos. Apesar disso o grau de toxicidade deve ser consideravelmente divergente entre adultos e crianças e outras drogas podem ser melhor toleradas de possuir maior potencial de cura em crianças do que as testadas em adultos (Gregory e Feusner, 2009). A dose ideal para administração do ATRA tem sido questionada em estudos devido ao potencial dessa medicação em desenvolver colateralmente a síndrome do ATRA e pseudotumor cerebral

(hipertensão intracraniana benigna) e outros efeitos adversos (Powell *et al.*, 2007; Sanz *et al.*, 2009).

Um estudo recente realizado numa população exclusivamente pediátrica, mostrou que os adolescentes (idade de 13 a 18 anos) aparentemente possuem uma resposta particularmente favorável e dentre as crianças (≤ 12 anos) a faixa etária abaixo de 4 anos mostrou-se de pior prognóstico apresentando uma alta incidência de recaídas. Em geral, nesse estudo ficou demonstrado que crianças de menor idade possuem menor sensibilidade à clássica combinação de ATRA e quimioterapia e maior toxicidade do que os outros grupos etários (Bally *et al.*, 2012).

2.6.1 Os fatores prognósticos na LPA na infância

Diversos fatores prognósticos foram apontados na LPA, sendo que a maioria desses dados foram determinados a partir de estudos em população adulta ou pediátrica e adulta combinadas. Visto que fatores como morfologia variante (M3v), presença de transcrito *bcr3*, mutações do gene *FLT3* e altas contagens leucocitárias estão associados a um pior prognóstico, estes fatores têm se comportado como características interrelacionadas. Sendo dentre estes, a contagem leucocitária, o indicador prognóstico mais consistente e largamente aceito, uma vez que outros fatores apresentam sempre algum dado conflitante na literatura (Gale *et al.*, 2005; Kuchenbauer *et al.*, 2005). Sanz *et al.* (2000), num estudo europeu conseguiram determinar uma estratificação prognóstica que combina as contagens leucocitária (WBC – *white blood cells*) e plaquetária medidas ao diagnóstico. Nesse estudo foi possível a criação de um modelo

preditivo simples para sobrevida livre de eventos usando estes dois parâmetros (Quadro 6).

Quadro 6: Determinação de risco para SLE.

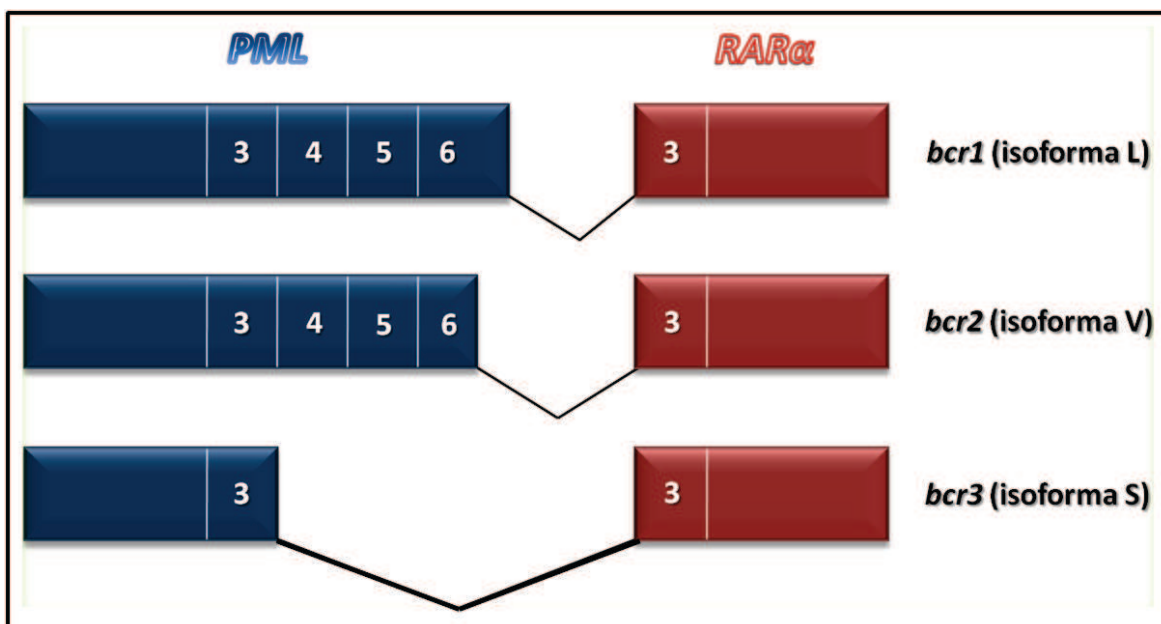
<i>Risco</i>	<i>Parâmetros</i>
Risco Baixo	WBC $\leq$ 10000/ μ L e plaquetas $>$ 40000/ μ L
Risco Intermediário	WBC $\leq$ 10000/ μ L e plaquetas $\leq$ 40000/ μ L
Risco Alto	Quaisquer pacientes com WBC $>$ 10000/ μ L

Legenda: WBC = contagem leucocitária global

Fonte: Sanz *et al.* (2000).

Atualmente, o mecanismo da determinação de como a contagem plaquetária ao diagnóstico interfere na medida da sobrevida livre de eventos permanece duvidosa, pois outros estudos falharam na reprodução do estudo de Sanz *et al.* (2000). No entanto, numerosos estudos demonstraram a redução da sobrevida ao aumento da contagem leucocitária, por isso a maioria dos clínicos utiliza apenas este parâmetro para a estratificação do risco (Gregory e Feusner, 2009).

Técnicas de análise molecular por PCR podem também ser utilizadas no contexto prognóstico da LPA. A RT-PCR (*reverse transcriptase* PCR) para a detecção da fusão *PML-RAR α* permite a determinação das diferentes regiões de quebra que resultam na formação heterogênea de transcritos *PML-RAR α* (Figura 11), que em alguns estudos aparecem correlacionado a diversos caracteres da doença e possuem valor prognóstico (Gallagher *et al.*, 1997; Burnett *et al.*, 1999; Jurcic *et al.*, 2001). O mais frequente ponto de quebra do gene *PML* ocorre no intron 6, sendo o transcrito denominado *bcr1*, seguido da quebra no intron 3 (*bcr3*) e com menor frequência no éxon 6 (*bcr2*). Os transcritos *bcr1*, *bcr2*, *bcr3* são denominados de longo (L), variante (V) e curto (S), respectivamente (Figura 11) (Jurcic *et al.*, 2001).



Fonte: Modificado de Lo Coco et al. (1999).

Figura 11: Representação esquemática dos três principais transcritos quiméricos *PML-RARα*. O ponto de quebra do gene *RARα* ocorre sempre no íntron 2. Devido às diferentes quebras do gene *PML* (íntron 6, éxon 6 e íntron 3), diferentes segmentos deste gene se fusionam ao éxon 3 do *RARα*, produzindo os transcritos (isoformas) *bcr1* (L), *bcr2* (V) e *bcr3* (S), respectivamente. Os números representam os éxons dos genes *PML* e *RARα*.

A RT-PCR tem sido usada em estudos para determinar se pacientes com risco aumentado de recaída podem ser detectados. Para a análise de doença residual mínima (DRM) a RT-PCR é utilizada em diversos protocolos na avaliação prognóstica de pacientes que não alcançaram a remissão molecular ena avaliação prognóstica de pacientes que convertem de PCR negativo para positivo em apenas um momento ou em mais de momento durante o tratamento (Diverio *et al.*, 1996). Vários trabalhos têm sugerido que a presença do transcrito *bcr3* pode conferir um mau prognóstico, sendo identificados nestes pacientes tanto menor sobrevida livre de doença quanto menor sobrevida total (Vahdat *et al.*, 1994; Jurcic *et al.*, 2001). No entanto, este efeito foi mais evidenciado em estudos onde o ATRA foi administrado como único agente indutor durante a terapia e isto

pode estar relacionado à diminuição da sensibilidade ao ATRA observada em estudos *in vitro* de casos com *bcr3* (Cassinat *et al.*, 2001). Em outros trabalhos, onde foram empregados simultaneamente o ATRA e quimioterapia como agentes indutores e antraciclínicos na fase de consolidação, nenhum efeito semelhante foi suficientemente destacado para promover qualquer modificação na abordagem terapêutica (Burnett *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 2000).

A isoforma *bcr2* também tem sido associada a piores resultados. Entretanto, como estes transcritos estão presentes em apenas 5% dos pacientes e são heterogêneos molecularmente (variante), os casos estudados até hoje são insuficientes para excluir a possibilidade que algumas evidências estejam ocorrendo ao acaso e não sejam de fato efeitos biológicos genuínos (Reiter *et al.*, 2000; Mystry *et al.*, 2003). Dessa forma os transcritos *bcr2* e *bcr3* são relacionados à piores prognósticos, sendo que o *bcr2* está mais associado a casos com baixa sensibilidade a terapia com o ATRA e o *bcr3* a altas contagens leucocitárias ao diagnóstico e a morfologia variante hipogranular, além de menor sobrevida livre de doença e menor sobrevida total (Vahdat *et al.*, 1994; Gallagher *et al.*, 1997; Jurcic *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2002; Mystry *et al.*, 2003).

A determinação do ponto de quebra do gene *PML* é também relevante para a escolha dos *primers* que serão usados posteriormente no acompanhamento da DRM, seja usando a RT-PCR convencional ou a técnica quantitativa 'Real-Time' RT-PCR (RQ-PCR) (Grimwade, 2002). O diagnóstico pela RT-PCR possui ainda outra vantagem que é a detecção dos transcritos recíprocos *RAR α -PML*, os quais fornecem mais um alvo potencial para a monitorização da DRM e estão presentes em cerca de 75% dos pacientes (Burnett *et al.*, 1999).

A importância do diagnóstico molecular para o direcionamento terapêutico adequado dos pacientes com suspeita de LPA foi primeiramente sugerido por Miller *et al* (1992) e foi posteriormente destacado em vários estudos incluindo o último estudo clínico MRC ATRA (*Medical Research Council*) (Grimwade *et al.*, 1999). Pacientes com apenas a evidência molecular da fusão *PML-RAR α* possuem o mesmo prognóstico favorável que aqueles pacientes com a t(15;17) detectada, enquanto que os casos que não possuem comprovações molecular e citogenética para o rearranjo *PML-RAR α* têm pior prognóstico (Burnett *et al*, 1999).

Elevadas taxas de óbitos durante a fase de indução e baixa sobrevida global são observadas em pacientes mais velhos e naqueles com altas contagens leucocitárias (Tallman *et al*, 2002). A expressão de CD56, detectado pelas provas imunofenotípicas, também é uma das variáveis preditivas de aumento do risco de recaída juntamente com a presença de elevadas contagens leucocitárias (Murray *et al*, 1999; Ferrara *et al*, 2000).

Um resumo dos principais fatores prognósticos na LPA é apresentado abaixo no Quadro 7.

Quadro 7: Fatores prognósticos na Leucemia Promielocítica Aguda.

<i>Fator Prognóstico</i>	<i>Observações</i>
Gene parceiro de fusão	Pior prognóstico nos casos de LPA com PLZF-RAR α , devido à insensibilidade ao tratamento com ATRA e ATO
Nos casos com rearranjo PML-RARα	
1. Contagem leucocitária/plaquetas	1. Preditiva para SLE, taxa de RC e obtenção da TR
2. Expressão de CD56	2. Associado à maior TR
3. Ponto de quebra PML	3. Dados conflituosos; pior prognóstico para as isoformas <i>bcr2</i> e <i>bcr3</i> em alguns estudos
4. M3 x M3v	4. Piores resultados na morfologia M3v, associada à presença de alta WBC.
Idade	Taxas de óbito na fase de indução significativamente maiores em crianças abaixo de 4 anos
DRM	Fator de risco independente para ocorrência de recaída
<i>Legenda: RC, remissão completa; TR, taxa de recaída; M3, LPA hipergranular clássica; M3v, LPA microgranular variante; WBC, contagem leucocitária; DRM, doença residual mínima</i>	

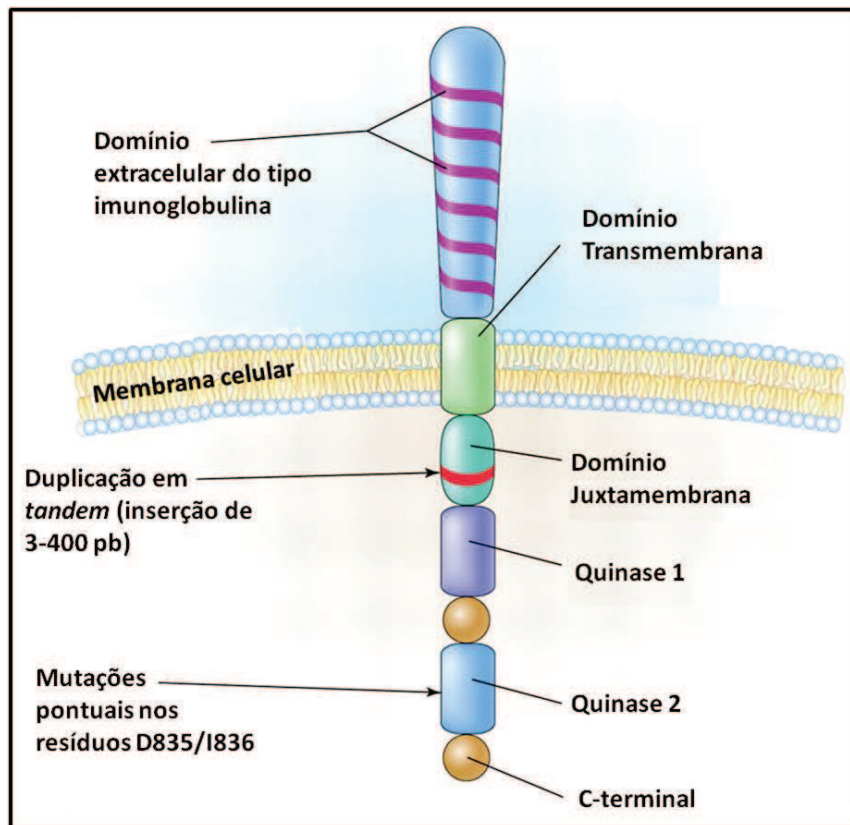
2.7 Marcadores moleculares: os genes *FLT3* e *NPM1*

Atualmente as vantagens da identificação molecular de marcadores que possuem importância prognóstica em pacientes com LMA vêm sendo estudadas, uma vez que tais informações podem ser utilizadas na estratificação para definição dos grupos citogenéticos de risco. Dentre os marcadores de importância prognóstica na LMA, os genes *FLT3* e *NPM1* têm sido de grande destaque na literatura (Rau e Brown, 2009; Barragán *et al.*, 2011; How *et al.*, 2013).

O gene *FLT3* codifica um receptor tirosina quinase de classe III (tirosina quinase 3 semelhante a FMS ou FLT3) que é expresso na superfície de células progenitoras hematopoiéticas e é composto por cinco domínios extracelulares do tipo imunoglobulina, um domínio transmembranar e um juxtamembranar, seguidos de dois domínios intracelulares de tirosina quinase (Figura 12). O gene *FLT3* está localizado na região 13q12 e seu ligante pode ser encontrado sob uma forma solúvel ou forma ligada à membrana em células do estroma da medula óssea (Litzow, 2005).

As mutações no domínio juxtamembranar do gene *FLT3* (FMS-like tyrosine kinase-3) foram uns dos primeiros marcadores identificados e é um achado comum em 1/3 dos casos de LMA, especialmente, naqueles com citogenética normal e com leucemia promielocítica aguda, tornando-se uma das

anormalidades moleculares mais frequentemente identificados na LMA. Estas mutações são do tipo duplicação interna em *tandem* (FLT3/ITD).



Fonte: Modificado de Litzow (2005).

Figura 12: Representação esquemática do receptor FLT3. A figura mostra a localização da duplicação interna em *tandem* dentro do domínio juxtamembranar e das mutações de ponto no segundo domínio quinase.

Mutações pontuais de ativação de *loop* no segundo domínio de quinase (FLT3/TKD) também podem desencadear a ativação constitutiva deste gene em pacientes com LMA, apesar de serem menos frequentes que a do tipo ITD (Naoe e Kiyoi, 2004). Estas mutações pontuais são do tipo *missense* e ocorrem mais frequentemente nos resíduos D835/I836 da quinase 2 (Figura 12). A ocorrência mais frequente (50% dos casos), consiste na substituição do nucleotídeo G por T

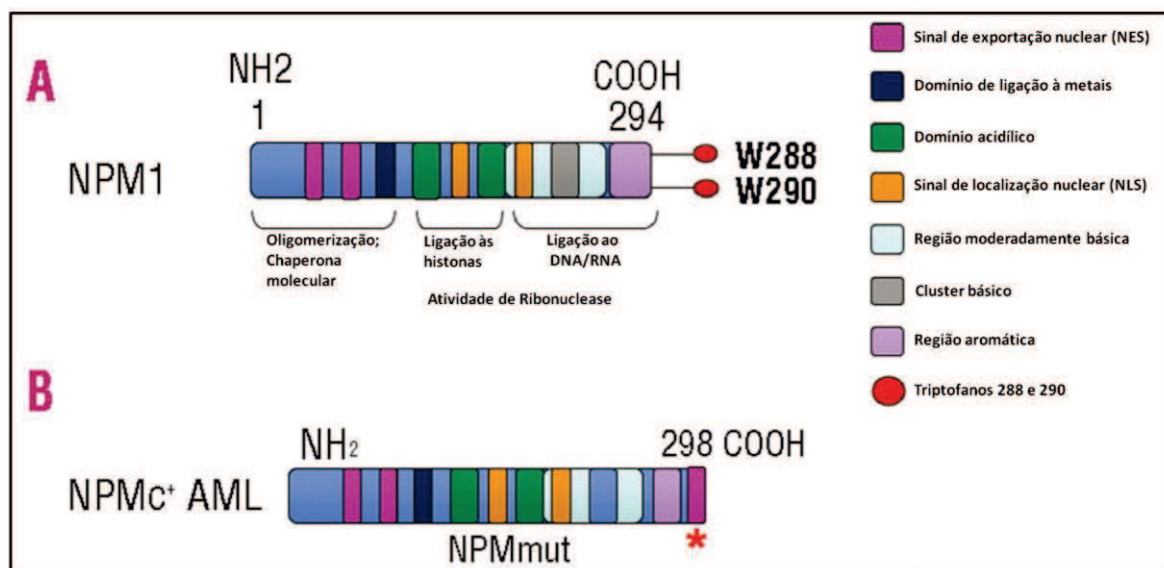
no resíduo D835, levando a mudança do aminoácido aspartato por tirosina na proteína mutante (Whitman *et al.*, 2008).

As mutações do gene *FLT3* (FLT3/Mut) possuem papel essencial na capacidade de sobrevivência das células progenitoras hematopoiéticas e em seus processos de diferenciação e proliferação celular (Small, 2006). A expressão da forma selvagem deste gene é excepcionalmente alta em mais de 90% dos casos de LMA. Esta superexpressão é um dos possíveis mecanismos onde o gene *FLT3* contribui ao desenvolvimento leucemogênico, contudo a existência de mutações ativadoras deste gene constrói uma forte evidência da importância do mesmo (Gilliand e Griffin, 2002; Yanada *et al.*, 2005).

Recentemente, Kutny *et al.* (2012) demonstraram que as FLT3/Mut estavam presentes em cerca de 1/4 dos casos pediátricos de LPA. Apesar de frequentes nos casos de LPA, as mutações do gene *FLT3* não possuem seu valor prognóstico muito bem estabelecido, apesar de estarem associadas a altas contagens leucocitárias, aumento do percentual de células blásticas na medula óssea, aumento do risco de recaída após remissão completa e redução da taxa de sobrevida geral (Gale *et al.*, 2008).

O potencial de interação das FLT3/Mut com outras anormalidades moleculares também apresenta importância quando se considera o significado prognóstico. Exemplo destas interações é a mutação adquirida do éxon 12 do gene da nucleofosmina 1 (NPM1) e sua significativa proporção em pacientes que possuem a mutação FLT3/ITD (Daver *et al.*, 2013).

O gene *NPM1* localiza-se na região 5q35 e possui 12 éxons responsáveis pela codificação da proteína nucleofosmina (anteriormente mencionada no tópico 2.4 desta revisão) (Figura 13).



Fonte: Modificado de Falini (2007).

Figura 13: Representação esquemática da estrutura da NPM selvagem e mutada. Localização dos domínios da NPM1 selvagem e suas funções (A) e sua forma mutada (B).

A proteína NPM selvagem é composta por dois domínios NES (domínio de sinal de exportação nuclear) na região N-terminal, responsáveis pelo transporte da proteína do núcleo para o citoplasma e um domínio NLS (domínio de sinal de ligação ao núcleo) que direciona o transporte do citoplasma para o núcleo e ancoragem no nucléolo) (Figura 13). Nas células normais, o domínio NLS tem atividade predominante sobre os domínio NES, fazendo com que a proteína selvagem seja abundante no núcleo. As mutações do éxon 12 neste gene provocam o surgimento de um novo domínio NES na região C-terminal oriundas de alterações nos resíduos 288 e 290 de triptofano. Estas mudanças são responsáveis pela localização citoplasmática aberrante da proteína NPM mutante (Falini *et al.*, 2006; Bolli *et al.*, 2007; Rau e Brown, 2009).

Em geral, mutações NPM1 são associadas a uma tendência de aumento nas taxas de sobrevida global e significativa melhora nas taxas de sobrevida livre de doença ou recaída. Em análises multivariadas as mutações NPM1 se

comportam como um favorável fator prognóstico independente (Falini *et al.*, 2007).

Devido às suas implicações prognósticas e terapêuticas é requerida uma atenção especial à LPA dentre as leucemias mielóides agudas. A literatura relata que a taxa de remissão completa da doença chega a 90% dos pacientes com a terapia atual e a taxa de cura pode atingir 80% (Bassi e Rego, 2012). No entanto, a real situação dos resultados do tratamento da LPA em países em desenvolvimento, como o Brasil, é desconhecida (Ribeiro e Rego, 2006). Este trabalho contribuirá na melhor investigação dos casos de LPA em pacientes brasileiros objetivando a identificação de marcadores que possam redirecionar o acompanhamento e tratamento destes pacientes.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Esse trabalho visa realizar uma análise citogenética e molecular em pacientes diagnosticados com leucemia promielocítica aguda (LPA) no Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz/UPE.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar o cariótipo dos pacientes diagnosticados com LPA;
2. Determinar a translocação t(15;17) em pacientes com cariótipos normais ou complexos;
3. Realizar o estudo citogenético molecular por M-FISH e/ou MCB em pacientes com cariótipos complexos para determinação das alterações cromossômicas adicionais;
4. Realizar análise molecular (RT-PCR) para determinação do ponto de quebra do gene PML (transcritos bcr1/2 ou 3);
5. Realizar análise molecular para determinação da ocorrência das mutações *FLT3* e/ou *NPM1*;
6. Relacionar os dados citogenéticos clássicos/moleculares e de biologia molecular com a evolução clínica e prognóstica dos pacientes.

4. Material e Métodos

4.1 Local e desenho do Estudo

O estudo foi realizado no Laboratório do Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (CEONHPE/HUOC/UPE). Este estudo é do tipo transversal analítico descritivo, sendo retrospectivo no período de janeiro de 2004 a fevereiro de 2010 e prospectivo no período de março de 2010 a outubro de 2013.

4.2 Pacientes

No estudo foram incluídos os casos de crianças com idade de zero a 18 anos com diagnóstico de LPA acompanhadas nos CEONHPE/HUOC/UPE. As amostras de medula óssea (MO) e/ou sangue periférico (SP) dos pacientes foram colhidas em seringas estéreis e heparinizadas (5-10ml) e enviadas para o Laboratório do CEONHPE/HUOC/UPE para serem realizadas as análises de citogenética e biologia molecular.

4.3 Métodos

4.3.1 Obtenção dos cromossomos mitóticos e bandeamento G

A obtenção dos cromossomos mitóticos para o bandeamento G e FISH foi realizada segundo Testa *et al.* (1985). O bandeamento G foi realizado segundo protocolo padrão. Os cromossomos foram identificados e classificados de acordo com o Sistema Internacional para Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN) de 2013. A análise cromossômica foi realizada em microscopia óptica analisando até 20 células para cada caso. Um caso foi considerado anormal quando mais de

três células apresentaram a mesma alteração cromossômica. A documentação foi feita no sistema de captura de imagens (Meta System Imaging).

4.3.2 Citogenética molecular: FISH, M-FISH e MCB

4.3.2.1 FISH para pesquisa da t(15;17)

Para a técnica de FISH a sonda comercial de sequência homóloga de DNA LSI PML/RAR α para a t(15;17) (Aquarius – Cytocell), foi utilizada seguindo o protocolo do fabricante. A análise de no mínimo 100 núcleos interfásicos ou 3 metáfases para cada caso foi feita por microscópio de fluorescência. As imagens foram analisadas, capturadas e processadas utilizando-se microscópio de fluorescência equipado com Sistema de Captura digital para FISH e programas para análise de imagem IKAROS e ISIS (MetaSystem, Alemanha).

4.3.2.2 FISH com sondas BAC e WCP, M-FISH e MCB

As técnicas de FISH com sondas BAC e WCP, M-FISH e MCB foram realizadas no Laboratório de Citogenética Molecular do Instituto de Genética Humana da Universidade de Jena (Alemanha) coordenado pelo Dr. Thomas Liehr, durante o Estágio de Doutorado Sanduíche realizado com financiamento de bolsa PDSE da CAPES no período de outubro/2012 a abril/2013.

Todas as sondas utilizadas nestas metodologias foram confeccionadas *in house* e seguiram a metodologia descrita a seguir:

4.3.2.2.1 Marcação e precipitação de Sondas de DNA

A marcação de sondas de DNA decorre da conjugação da molécula de fluorocromo ou hapteno com a sequência de DNA a ser marcada. Os seguintes componentes listados na tabela 1 compoem o mix para a marcação de sondas através de DOP PCR (*degenerate oligonucleotide-primed PCR*).

Tabela 1 : Composição do mix para marcação de sondas BAC, WCP, M-FISH e MCB.

Componentes	Volumes (µl)
dH₂O (Aqua ad iniectionabilia, Braun)	11,08
Tampão 10X (0.5µl de 0.05% NP-40 + 1000µl Tampão 10X) (Applied Biosystems)	2,0
Primer DOP PCR (10µM) (5-CCGACTCGAGNNNNNNAT-3) (Biomers.net)	1,0
Label Mix (150µl dH ₂ O + 50µl dTTP + 100µl dATP, dCTP, dGTP) (Applied Biosystems)	2,0
MgCl₂ (Roche)	3,0
Ampli Taq® DNA polimerase (5u/µl) (Applied Biosystems)	0,12
Volume Final do Mix (µM)	19,2

De acordo com o tipo de marcação (direta ou indireta), foram adicionados aos outros componentes no tubo de PCR:

1. Para marcação indireta: 0.5µl de biotina-16-dUTP (Roche Diagnostics GmbH) ou 1µl de digoxigenina-11-dUTP (Roche Diagnostics GmbH)
2. Para marcação direta: 1µl de dietilaminocumarina (DEAC) DY-415-aadUTP (Dyomics), 1µl de *Texas red®*-12-dUTP (Invitrogen), 2µl de *Spectrum orange* (Abbott) ou 2µl de *Spectrum green* (Abbott).

Finalmente, uma vez que todos os componentes foram adicionados acrescenta-se o DNA a ser marcado nos seguintes volumes:

1. 1,5µl de DNA para marcação de sondas de até 1Mb (Ex.: sondas BAC);
2. 3,0µl de DNA para marcação de sondas maiores que 1Mb (Ex.: sondas WCP e MCB).

O mix de sondas para M-FISH é composto de 24 sondas WCP, representando cada um dos cromossomos humanos marcados diferencialmente e o padrão de marcação segue a metodologia descrita por Kearney (2006). Cada mix de sonda MCB é composto pelas bibliotecas das regiões de cada cromossomo marcadas diferencialmente (Ex.: a sonda MCB para o cromossomo 2 possui 12 bibliotecas) e segue o padrão descrito por Liehr *et al.* (2002b).

Todo o processo de marcação foi realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar (Heraeus, Alemanha), para evitar a contaminação de outras possíveis fontes de DNA. Posteriormente os microtubos foram colocados no termociclador e submetidos a 30 ciclos nas seguintes condições descritas na tabela 2:

Tabela 2: Condições de ciclagem utilizadas na marcação se sondas para FISH.

Desnaturação inicial		30 ciclos						Extensão Final	
		Desnaturação		Hibridação		Extensão			
T (°C)	Δt	T (°C)	Δt	T (°C)	Δt	T (°C)	Δt	T (°C)	Δt
94	3'	91	1'	56	1'	70	2'	72	5'

Legenda: T = temperatura; Δt = tempo de duração da etapa

Após a marcação e amplificação por DOP PCR, os produtos da PCR foram submetidos a etapa de precipitação. Nesta fase foram adicionados em cada microtubo 115µl do mix de precipitação que é composto de: 10µl de tRNA (Roche), 5µl de acetato de sódio (3M) e 100µl de etanol 100%. Os microtubos

foram então estocados à -80°C por 60 minutos ou à -20°C *overnight* e posteriormente centrifugados na temperatura de 4°C e rotação de 15300 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e os microtubos foram deixados para secar à temperatura ambiente por 20 minutos. O *pellet* foi então reidratado com 1-2µl dH₂O e homogeneizado a 37°C por 30 minutos. Em seguida foi adicionado Sulfato de dextrano (DS) (2g de Sulfato de sódio dextrano (Sigma), 2ml de 20X SSC, 2ml de tampão fosfato salino (PBS) (0,5M, pH 7) nos seguintes volumes a depender do tipo de sonda:

1. 79µl de DS para sondas BAC;
2. 23µl de DS para sondas WCP;
3. 22µl de DS para sondas M-FISH;
4. 22µl de DS para sondas MCB.

Os microtubos foram novamente homogeneizados por 30 minutos à 37°C. Após a homogeneização as sondas estavam prontas para uso imediato ou eram estocadas à -20°C para uso posterior.

4.3.2.2.2 Pré-tratamento de lâminas

As lâminas utilizadas nos ensaios de FISH com sondas BAC, WCP, M-FISH e MCB passaram por um pré tratamento para desnaturação do DNA total antes da etapa de hibridização. Este pré tratamento seguiu as seguintes etapas:

1. Adicionar 5µl de 0.2N HCl à 95µl de água deionizada ultra pura (Milli-Q[®]) em uma jarra de coplin e aquecer até 37°C em banho maria.
2. Uma vez alcançada a temperatura de 37°C dentro da jarra, adicionar 0,5ml de solução de pepsina (1g de pepsina (Sigma) + 50ml água deionizada).

3. Colocar a(s) lâmina(s) na solução imediatamente após a adição da pepsina por 5 minutos à 37°C.
4. Transferir a(s) lâmina(s) para uma jarra com 1xPBS (47,75g de PBS Dulbecco w/o Mg^{2+} w/o Ca^{2+} (Biochrome AG) + 5000ml de água deionizada, pH 7-7,5) por 5 minutos à temperatura ambiente.
5. Retirar a(s) lâmina(s) da solução 1xPBS e pingar 100µl de solução *post fixative* (5ml paraformaldeído + 4,5ml 1xPBS + 500µl de $MgCl_2$ à 1M) em lamínula (24x60 mm) e cobrir a(s) lâmina(s) por 10 minutos à temperatura ambiente. Trabalhar em capela de exaustão nesta etapa devido aos vapores de paraformaldeído.
6. Remover cuidadosamente a(s) lamínula(s) e lavar a(s) lâmina(s) em 1xPBS por 5 minutos à temperatura ambiente.
7. Lavar a(s) lâmina(s) em água deionizada por 1 minuto à temperatura ambiente.
8. Desidratar a(s) lâmina(s) em série de etanol (70%, 95% e 100%) por 3 minutos cada à temperatura ambiente.
9. Deixar a(s) lâmina(s) para secar à temperatura ambiente.

4.3.2.2.3 Hibridação

A etapa de hibridação para as técnicas de M-FISH, MCB e FISH com sondas BAC e WCP seguiram a sequência descrita abaixo:

1. As sondas marcadas foram misturadas a volumes de sulfato de dextrano (DS) e DNA COT1 humano nas proporções apresentadas na tabela 3 em microtubos de 0,5ml.

Tabela 3: Composição dos *mixes* de hibridização para sondas BAC, WCP, MCB e M-FISH.

Sonda	Volume	Sonda (µl)	DS (µl)	DNA COT1* (µg)
BAC		3	3	2,5
WCP		3-4	6-7	5
MCB		6	6	10
M-FISH		10	10	20

*COT1 Human DNA 1µg/µl (Roche)

2. Os microtubos foram brevemente vortexados e colocados em homogeneizador por 10 minutos à 37°C.
3. A etapa de pré-hibridação das sondas é realizada em termociclador seguindo o programa '*Prehyb*' nas seguintes condições:
 - a) 75°C por 5 minutos;
 - b) 4°C por 2 minutos;
 - c) 37°C por 30 minutos;
 - d) 4°C – temperature final do programa (*for ever*).
4. Enquanto as sondas estão na pré-hibridização a(s) lâmina(s) foram cobertas com 100µl de formamida 70% (140ml formamida + 20ml 20xSSC (Invitrogen) + 40ml água deionizada) e lamínula(s) (24x60 mm) por 3-5 minutos à 72-73°C. Trabalhar em capela de exaustão nesta etapa.
5. Remover a(s) lamínula(s) cuidadosamente e imergir a(s) lâmina(s) em etanol 70% à -20°C por 3 minutos.
6. Imediatamente continuar a série de desidratação da(s) lâmina(s) em etanol 95% e 100% por 3 minutos à temperatura ambiente.
7. Deixar a(s) lâmina(s) para secar à temperatura ambiente.

8. Retirar as sondas do termociclador e aplicar 3-20µl da sonda na(s) lâmina(s) e cobrir com lamínula e selar as extremidades da lamínula com cola *fixo gum* (Marabu).

Uma vez selada(s) a(s) lamínula(s) devem ser incubadas em câmara úmida por 16-72h. Quanto maior a extensão da sonda maior deve ser o seu tempo de incubação.

4.3.2.2.4 Lavagem pós-hibridação

A etapa de lavagem pós-hibridização difere para sondas marcadas diretamente e sondas marcadas indiretamente. Estas últimas ainda precisam ser conjugadas às suas respectivas moléculas sinalizadoras para posterior visualização do sinal fluorescente.

4.3.2.2.4.5 Lavagem para marcação direta

1. Remover cuidadosamente a(s) lamínula(s) e colocar a(s) lâmina(s) em uma jarra de coplin opaca ou de cerâmica com 1xSSC (25ml de 20xSSC (Invitrogen) + 475ml água deionizada, pH 7-7,5) à 62°C em banho maria por 5 minutos.
2. Lavar a(s) lâmina(s) em 4xSSC (100ml de 20X SSC (Invitrogen) + 400ml de água deionizada + 250µl de Tween® 20, pH 7-7,5.) à temperatura ambiente por 5 minutos no homogeneizador.
3. Lavar seguidamente a(s) lâmina(s) em 1xPBS à temperatura ambiente por 5 minutos.

4. Desidratar a(s) lâmina(s) em série de etanol (70%, 95% e 100%) por 3 minutos cada à temperatura ambiente.
5. Deixar para secar em câmara escura.
6. Aplicar 15µl de DAPI (1000µl de meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories/Biozol) + 2µl de DAPI) na(s) lâmina(s) e cobrir com lamínula.
7. Refrigerar a(s) lâmina(s) por no mínimo 30 minutos antes da análise em microscópio de fluorescência.

4.3.2.2.4.6 Lavagem para marcação indireta

1. Remover cuidadosamente a(s) lamínula(s) e colocar a(s) lâmina(s) em uma jarra de coplin opaca ou de cerâmica com 1xSSC à 62°C em banho maria por 5 minutos.
2. Lavar a(s) lâmina(s) em 4xSSC à temperatura ambiente por 5 minutos no homogeneizador.
3. Adicionar 100µl de marvel (0,1g de leite em pó desnatado (Chivers Ireland Ltd) + 2000µl de 4xSSC homogeneizado à 2500 rpm por 5 minutos TA) e cobrir com lamínula (24x60 mm) por 15 minutos à 37°C em câmara úmida.
4. Preparar o *mix* de anticorpos conjugados nas seguintes diluições:
 - 1µl de estreptavidina-FITC (Vector Laboratories/Biozol) com 99µl de marvel.
 - 5µl de estreptavidina-Cy5 (Amersham) com 95µl de marvel.
 - 10µl de anti-digoxigenina rodamina (Roche) com 90µl de marvel.
 - 10µl de anti-digoxigenina fluoresceína (Roche) com 90µl de marvel.
5. Retirar a(s) lamínula(s) e lavar a(s) lâmina(s) em 4xSSC à temperatura ambiente por 1-2 minutos no homogeneizador.

6. Aplicar 100µl do *mix* de anticorpos conjugados de acordo com os antígenos utilizados (biotina ou digoxigenina) e cobrir com lamínula (24x60 mm). Incubar a(s) lâmina(s) em câmara úmida por 45 minutos à 37°C.
7. Remover a(s) lamínula(s) e lavar a(s) lâmina(s) em 4xSSC (TA) por 5 minutos no homogeneizador, trocar a solução e homogeneizar por mais 5 minutos.
8. Lavar em 1xPBS por 3-5 minutos (TA) no homogeneizador.
8. Desidratar a(s) lâmina(s) em série de etanol (70%, 95% e 100%) por 3 minutos cada à temperatura ambiente (as jarras de coplin utilizadas devem ser opacas).
9. Deixar para secar em câmara escura.
10. Aplicar 15µl de DAPI na(s) lâmina(s) e cobrir com lamínula.
11. Refrigerar a(s) lâmina(s) por no mínimo 30 minutos antes da análise em microscópio de fluorescência.

Todas as análises foram realizadas em microscópio de fluorescência acoplado a sistema de captura (Axio Imager, Zeiss, Alemanha) e software ISIS (MetaSystems Hard & Software GmbH, Alemanha).

4.3.3 Biologia Molecular

Na análise molecular das amostras de sangue dos pacientes coletadas em EDTA, primeiramente foi realizada a separação de leucócitos utilizando o reagente Ficoll-Paque Plus da Amersham Pharmacia Biotech e o armazenamento em Trizol® (Invitrogen). Após este procedimento, as amostras foram congeladas em freezer -80°C para posterior extração de RNA e DNA.

4.3.3.1 Extração de Ácidos Nucléicos

4.3.3.1.1 Extração do RNA

O RNA celular total, utilizado para a construção do cDNA, foi extraído dos leucócitos congelados. A qualidade do RNA foi observada através de eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio.

4.3.3.1.2 Extração do DNA

O DNA genômico utilizado na identificação das mutações *FLT3/ITD*, *FLT3/TKD* e *NPM1* foi extraído pelo método de Trizol® seguindo o protocolo do fabricante. A qualidade do DNA foi observada através de eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio.

4.3.3.2 Construção do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada a partir do kit comercial da Amersham Pharmacia Biotech, segundo van Dongen *et al.* (1999). O cDNA foi utilizado para a identificação do rearranjo *PML/RAR α* . Para avaliar a qualidade do cDNA foi utilizado um controle interno amplificado através de uma reação de PCR multiplex de acordo com o protocolo descrito por Lion e Kidd (1998). Os primers utilizados neste controle interno foram: PBGD, ABL, β 2MG e BCR.

4.3.3.3 Identificação da t(15;17) pela RT-PCR

Para a identificação da t(15;17) foi utilizado o master mix (Promega) de acordo com as instruções do fabricante com um volume final de 11,5 μ L. Os

primers utilizados para a detecção dos transcritos bcr 1/2 e bcr 3 foram baseados no protocolo descrito por van Dongen *et al.* (1999) e estes foram:

	t(15;17) bcr ½	t(15;17) bcr 3
Oligo 5´	CAGTGTACGCCTTCTCCATCA	CTGCTGGAGGCTGTGGAC
Oligo 3´	GCTTGTAGATGCGGGGTAGA	GCTTGTAGATGCGGGGTAGA

Controles positivo e negativo foram utilizados para validar a reação e para garantir a ausência de produtos inespecíficos foi utilizado um branco sem adição de cDNA do paciente. As amostras foram submetidas a 35 ciclos de amplificação, em termociclador Eppendorf. O programa de amplificação consistiu em: desnaturação das amostras a 94°C, por 30 segundos, nos ciclos subsequentes; pareamento dos primers a 65°C, por 30 segundos; extensão da fita a 72°C, por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 7 minutos. Foram retiradas alíquotas dos produtos de PCR para serem analisadas após migração em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio e marcador de peso molecular de 1kb *plus*.

4.3.3.4 Identificação das mutações dos genes *FLT3* e *NPM1*

O estudo das mutações *FLT3/ITD* e *NPM1* foi realizado através da metodologia de PCR convencional seguida da aplicação dos produtos da PCR para eletroforese em gel de agarose. Enquanto na análise da mutação *FLT3/TKD* foi utilizada a metodologia de PCR-RFLP, utilizando a enzima de restrição *EcoRV* na etapa de digestão como anteriormente descrito por Whitman *et al.* (2008).

A composição dos mixes de amplificação utilizados na pesquisa das mutações *FLT3/ITD*, *FLT3/TKD* e *NPM1* para realização da PCR está descrita na Tabela 4. O volume final do mix apresentado representa o volume final em cada micro tubo para análise de cada paciente estudado.

Tabela 4: Composição do mix para amplificação dos genes *FLT3* e *NPM1*.

Componentes	Volumes (µl) para FLT3 (ITD e TKD)	Volumes (µl) para NPM1
Tampão (10x)	5,0	2,5
MgCl ₂ (50mM)	2,0	1,5
dNTP's (10mM)	1,0	0,5
<i>Primer Sense</i> (10µM)	1,0	0,3
<i>Primer Antisense</i> (10µM)	1,0	0,3
Taq DNA polimerase	0,25	0,25
DNA (200ng)	1,0	0,5
dH ₂ O	38,75	19,15
Volume Final do Mix (µM)	50,0	25,0

As sequências dos *primers* utilizados na composição do mix de cada mutação estudada são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Sequência dos *primers* usados na pesquisa das mutações dos genes *FLT3* e *NPM1*.

Mutação Analisada	Sentido do <i>primer</i>	Sequencia do <i>Primer</i>
<i>FLT3/ITD</i>	Forward	5' GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC 3'
	Reverse	5' CTTTCAGCATTGACGGCAACC 3'
<i>FLT3/TKD</i>	Forward	5' CCGCCAGGGAACGTGCTTG 3'
	Reverse	5' GCAGCCTCACATTGCCCC 3'
<i>NPM1</i>	Forward	5' GTGGTAGAATGAAAAATAGAT 3'
	Reverse	5' CTTGGCAATAGAACCTGGAC 3'

Após a preparação dos mixes das reações, estas foram submetidas à etapa de amplificação em termociclador. As condições das ciclagens programadas são descritas abaixo e resumidas na Tabela 6.

Para a amplificação das reações para a mutação *FLT3/ITD* a ciclagem programada foi quatro minutos a 94°C para desnaturação inicial seguida de 40

ciclos de um minuto a 94°C, 30 segundos a 52°C e 30 segundos a 72°C, finalizando com uma extensão de cinco minutos a 72°C.

A amplificação das reações para a mutação *FLT3/TKD* utilizou a ciclagem de quatro minutos a 94°C para desnaturação inicial seguida de 40 ciclos de um minuto a 94°C, 40 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C, com extensão final de cinco minutos a 72°C.

Para a mutação *NPM1*, a amplificação das reações seguiu as condições de 10 minutos a 94°C para desnaturação inicial seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, um minuto a 56°C e dois minutos a 72°C, finalizando com uma extensão de sete minutos a 72°C.

Tabela 6: Condições de ciclagem utilizadas na amplificação das mutações nos genes *FLT3* e *NPM1* estudadas.

Mutação Analisada	Desnaturação inicial		40 ciclos						Extensão Final	
			Desnaturação		Hibridação		Extensão			
	T (°C)	Δt	T (°C)	Δt	T (°C)	Δt	T (°C)	Δt	T (°C)	Δt
<i>FLT3/ITD</i>	94	4'	94	1'	52	30''	72	30''	72	5'
<i>FLT3/TKD</i>	94	4'	94	1'	55	40''	72	30''	72	5'
<i>NPM1</i>	94	10'	94	30''	56	1'	72	2'	72	7'

Legenda: T = temperatura; Δt = tempo de duração da etapa

No estudo da mutação *FLT3/TKD*, os produtos da amplificação tiveram a qualidade avaliada antes da etapa de digestão, através da observação dos fragmentos da PCR após eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. Tendo sua qualidade da amplificação atestada, os produtos foram submetidos à digestão enzimática pela endonuclease de restrição *EcoRV* por três horas. Os produtos da digestão foram então submetidos novamente à eletroforese em gel (corado com brometo de etídio)

na concentração de 3%. Para a análise das mutações *FLT3/ITD* e *NPM1*, após a amplificação, os produtos da PCR foram corridos em gel de agarose a 4% corado com brometo de etídio.

Os tamanhos dos fragmentos finais das reações para todas as mutações estudadas e seus respectivos genes selvagens estão relacionados na Tabela 7.

Tabela 7: Relação do tamanho dos fragmentos finais nas mutações *FLT3/ITD*, *FLT3/TKD* e *NPM1*.

Mutação Analisada		Tamanho do fragmento amplificado	Tamanho do fragmento após digestão
<i>FLT3/ITD</i>	S	331 pb	-
	M	>331 pb	-
<i>FLT3/TKD</i>	S	144 pb	68 e 46 pb
	M	144 pb	144, 68 e 46 pb
<i>NPM1</i>	S	294 pb	-
	M	298 pb	-

Legenda: S = selvagem; M = mutante; pb = pares de bases

4.4 Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Oswaldo Cruz (CEP - HUOC/UPE nº 83/2011) (Anexo 1). Todos os responsáveis pelos pacientes do período retrospectivo deste projeto assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

Os responsáveis pelos pacientes referentes ao período prospectivo deste projeto foram orientados sobre a proposta de estudo e informados de todos os critérios para a inclusão no projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

5. Resultados

5.1 Sexo, idade, *status* e protocolos de tratamento

Durante o período do estudo, 16 pacientes pediátricos foram diagnosticados com LPA, representando 29,09% dos 55 casos de LMA na infância diagnosticados no mesmo período.

A idade dos pacientes estudados variou de 5 a 17 anos, incluindo ambos os sexos, com média de 11,81 anos. Houve discreta prevalência do sexo feminino na amostra (56,25%) (Tabela 8).

Os pacientes atendidos até o ano de 2006 (31,25%) foram tratados seguindo o regime terapêutico do protocolo BFM 83 + ATRA. Os pacientes atendidos a partir de 2007 (68,75%) seguiram o regime terapêutico PETHEMA/HOVON LPA2005 (Tabela 8).

Quanto ao *status* dos 16 pacientes, oito encontram-se vivos ou na fase de manutenção do tratamento e oito foram a óbito, sendo que destes sete tiveram óbitos precoces ainda na fase de indução. Os motivos primários dos óbitos foram hemorragias (sangramento difuso, hemorragia no SNC ou hemorragia pulmonar), septicemia e manifestação da síndrome do ATRA. A maior parte dos pacientes que foram a óbito apresentaram duas ou mais destas manifestações como causa do óbito (71,42%), sendo a combinação de hemorragia por sangramento difuso e septicemia o evento mais comum (42,85%) (Tabela 8).

Tabela 8: Sexo, idade, *status*, protocolo de tratamento e causa do óbito.

Case	Idade/Sexo	Status	Diagnóstico	PT	CM
1	12a/F	V	LPA	P1	V
2	15a/F	V	LPA	P1	V
3	9a/F	V	LPA?	P1	V
4	11a/F	O	LPA?	P1	D/H3
5	5a/M	MP	LPA	P1	H1
6	12a/F	MP	LPA	P2	H1/S
7	17a/M	MP	LPA	P2	D/H3/S
8	12a/F	MP	LPA	P2	H2
9	15a/M	V	LPA	P2	V
10	15a/F	MP	LPA	P2	H1
11	11a/F	V	LPA	P2	V
12	6a/M	MP	LPA	P2	H1/S
13	12a/M	V	LPA	P2	V
14	13a/M	V	LPA	P2	V
15	15a/M	MP	LPA	P2	H1/S
16	9a/F	T	LPA	P2	V

Legenda: a = anos; F = feminino; M = masculino; V = vivo; T = em tratamento; O = óbito; MP = morte precoce; + = positivo; (-) = negativo; **na** = não analisado; ? = interrogado; PT = protocolo de tratamento; P1 = BFM 83 + ATRA; P2 = PETHEMA/HOVON 2005; CM = causa da morte; H = evento hemorrágico (1 - sangramento difuso, 2 - hemorragia no SNC, 3 - hemorragia pulmonar); D = síndrome de diferenciação ou síndrome do ATRA; S = septicemia.

5.2 Análise citogenética

A análise cariotípica com o bandeamento G revelou alterações cromossômicas em 10 pacientes pesquisados (62,5%), três pacientes apresentaram cariótipo normal e três não apresentaram metáfases para análise. Dentre os pacientes com alterações cromossômicas observadas pelo bandeamento G, três apresentaram cariótipos complexos com presença de cromossomos marcadores (Tabela 9).

A técnica de FISH utilizando a sonda comercial de sequência homóloga de DNA LSI PML/RAR α (Aquarius – Cytocell) para a t(15;17) confirmou o rearranjo em 14 pacientes (87,5%). Em todos os casos positivos para rearranjo PML/RAR α que apresentaram metáfases foi realizada a FISH com sondas *whole*

chromosome painting (WCP) para os cromossomos 15 (marcado com biotina + estreptavidina-FITC) e 17 (marcado com digoxigenina + anti digoxigenina-Rodamina) para investigação do tipo de rearranjo (Figura 14). Todos os 11 casos apresentaram rearranjos balanceados entre estes cromossomos, sendo que um caso (12) apresentou rearranjo do tipo *tree way* envolvendo o cromossomo 9 além dos cromossomos 15 e 17 (Figura 15). A técnica de M-FISH foi realizada nos casos 3 e 4, na tentativa de conhecer a origem das alterações não esclarecidas pelo bandeamento G, mas devido à baixa qualidade das preparações cromossômicas obtidas nestes casos não foi possível a avaliação dos resultados.

Uma vez conhecida a origem do rearranjo complexo variante no caso 12 envolvendo os cromossomos 9, 15 e 17, foi realizada a técnica de MCB para estes cromossomos com o objetivo de determinar seus pontos de quebra neste caso levando determinação do seguinte rearranjo: $t(9;17;15)(q\sim13\sim21;21;24)$ (Figuras 16, 17 e 18). Para elucidação do exato ponto de quebra no cromossomo 9 foi realizada a FISH com sondas BAC (*bacterial artificial chromosomes*) para as regiões 9q13, 9q21.11, 9q21.2 e 9q21.33 (RP11-561O23, RP11-430C15, RP11-574G7 e RP11-65B23, nesta ordem) que revelou o rearranjo final: $t(9;15;17)(q21.11;q21;q24)$ (Figura 19).

Tabela 9: Dados das análises citogenéticas clássica (bandeamento G) e molecular (FISH e variantes).

Caso	Cariótipo Inicial	FISH	Citogenética Molecular	Resultado
1	46,XX[16]	1.nuc ish(PML x 2),(RARA x 2), (PML con RARA x 1)[86/100]	WCP 15 / 17	t(15;17) balanceada confirmada
2	46,XX[18]	1.nuc ish(PML x 2),(RARA x 2), (PML con RARA x 1)[56/100]	WCP 15 / 17	t(15;17) balanceada confirmada
3	47,XX,del(12p),add(14q),del(15q),i(19q),+mar[5]/ 46,XX,-9,del(12p),add(14q),del(15q),+mar[3]/ 46,XX, del(12p),add(14q),del(15q),i(19q)[6]/46,XX[4]	1.nuc ish(PMLx2),(RARA x 2) [100]	M-FISH	insuficiente*-
4	48,XX,+ mar1,+mar2[4]/46,XX[18]	1.nuc ish(PMLx3),(RARA x 2) [60/100]	M-FISH	insuficiente*-
5	46,XY,t(15;17)[20]	1.nuc ish(PML x 2),(RARA x 2), (PML con RARA x 1)[80/100]	WCP 15 / 17	t(15;17) balanceada confirmada
6	sem metáfases	1.nuc ish(PML x 3),(RARA x 2), (PML con RARA x 1)[80/100]	-	-
7	sem metáfases	1.nuc ish(PML x 2),(RARA x 2), (PML con RARA x 1)[50/100]	-	-
8	46,XX,t(15;17)[14]/46,XX[6]	1.nuc ish(PML x 2),(RARA x 2), (PML con RARA x 1)[58/100]	WCP 15 / 17	t(15;17) balanceada confirmada

Continua na próxima página

Legenda: nuc ish - hibridização in situ em núcleo; 1. detecção da t(15;17) utilizando a sonda PML/RARα Translocation Probe Two Color Direct Labelled (Aquarius Probes); * (asterístico): as preparações cromossômicas obtidas foram incompatíveis com a avaliação do M-FISH devido à baixa qualidade.

(Continuação) Tabela 9: Dados das análises citogenéticas clássica (bandeamento G) e molecular (FISH e variantes).

Caso	Cariótipo Inicial	FISH	Citogenética Molecular	Resultado
9	sem metáfases	1.nuc ish(PML x 2),(RARA x 2), (PML con RARA x 1)[68/100]	-	-
10	46,XX,t(15;17)[7]/46,XX,t(15;17),del(11q23)[4]/ 46,XX[7]	1.nuc ish(PML x 2),(RARA x 2), (PML con RARA x 1)[90/100]	WCP 15 / 17	t(15;17) balanceada confirmada
11	46,XX[20]	1.nuc ish(PML x 2),(RARA x 2), (PML con RARA x 1)[67/100]	WCP 15 / 17	t(15;17) balanceada confirmada
12	46,XY,t(15;17),-9,+mar1	1.nuc ish(PML x 2),(RARA x 2), (PML con RARA x 1)[35/100]	WCP 9/15/17 MCB 9 MCB 15 MCB17 BAC rp11-561O23/rp11-430C15 BAC rp11-574G7/rp11-65B23	46,XY,t(9;15;17)(q13;q21;q24)
13	46,XY,t(15;17)[5]/46,XY[12]	1.nuc ish(PML x 2),(RARA x 2), (PML con RARA x 1)[79/100]	WCP 15 / 17	t(15;17) balanceada confirmada
14	46,XY,t(15;17)[9]/45,XY,-15[4]/46,XY[7]	1.nuc ish(PML x 2),(RARA x 2), (PML con RARA x 1)[64/100]	WCP 15 / 17	t(15;17) balanceada confirmada
15	46,XY,t(15;17),del(11q)[5]/46,XY,t(15;17)[5]/ 46,XY,del(11q)[3]/46,XY[7]	1.nuc ish(PML x 2),(RARA x 2), (PML con RARA x 1)[72/100]	WCP 15 / 17	t(15;17) balanceada confirmada
16	46,XX,t(15;17)[15]/46,XX[5]	1.nuc ish(PML x 2),(RARA x 2), (PML con RARA x 1)[65/100]	WCP 15 / 17	t(15;17) balanceada confirmada

Legenda: nuc ish - hibridização in situ em núcleo; 1. detecção da t(15;17) utilizando a sonda PML/RARα Translocation Probe Two Color Direct Labelled (Aquarius Probes); * (asterístico): as preparações cromossômicas obtidas foram incompatíveis com a avaliação do M-FISH devido à baixa qualidade.

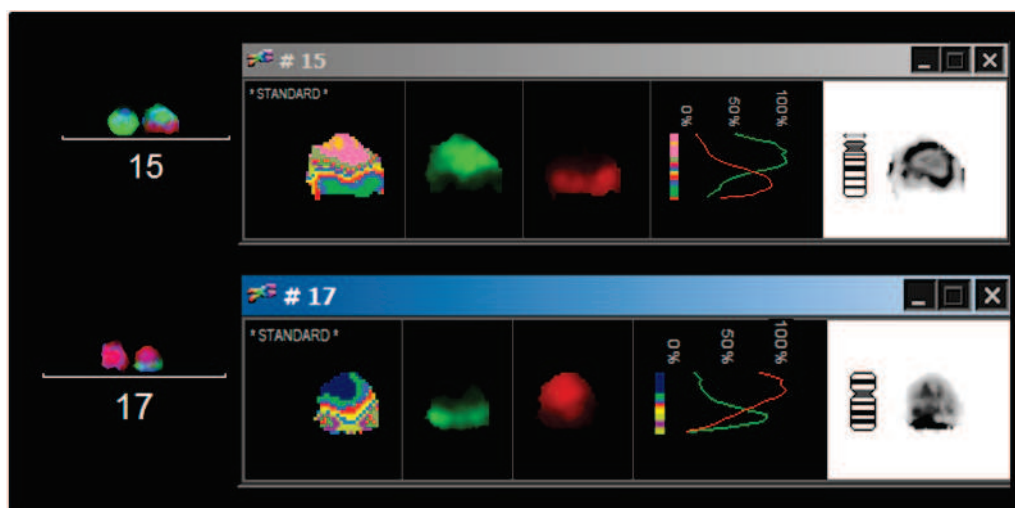


Figura 14: FISH com sondas *whole chromosome painting* (WCP) para os cromossomos 15 e 17. O cromossomo 15 está em verde (biotina + estreptavidina-FITC) e o 17 em vermelho (digoxigenina + anti digoxigenina-Rodamina).

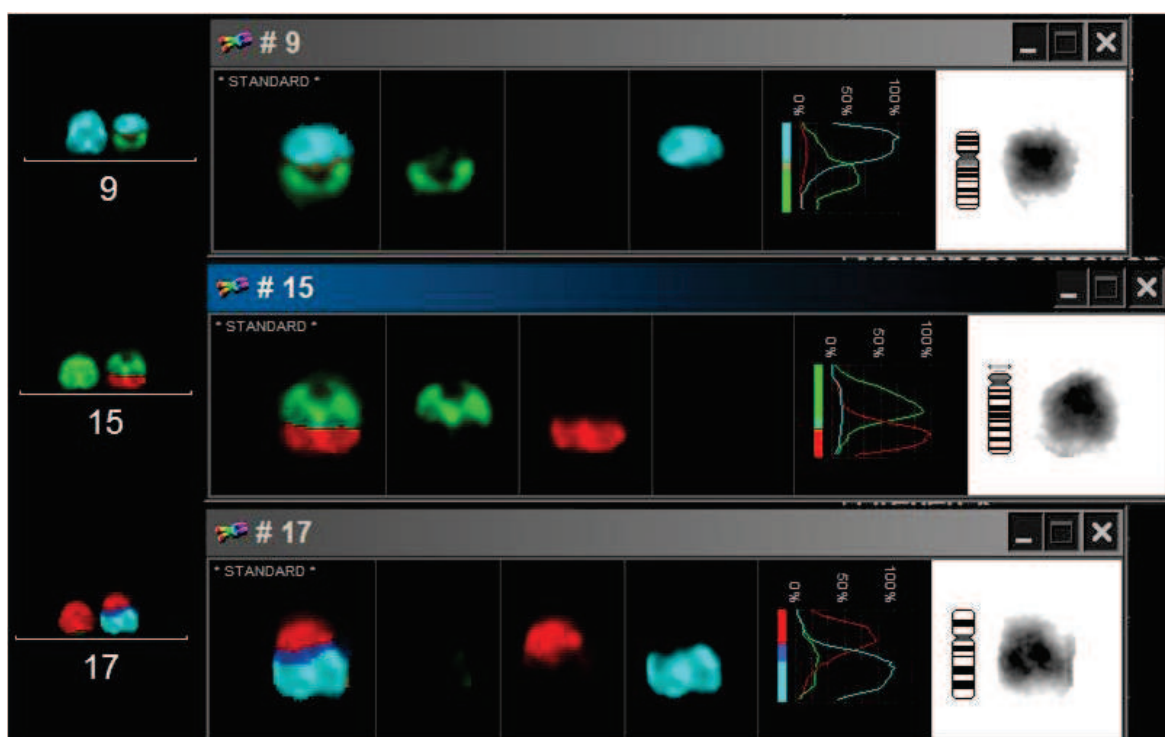


Figura 15: FISH com sondas *whole chromosome painting* (WCP) para os cromossomos 9, 15 e 17. O cromossomo 9 marcado em azul (DEAC), o cromossomo 15 em verde (biotina + estreptavidina-FITC) e o 17 em vermelho (digoxigenina + anti digoxigenina-Rodamina).

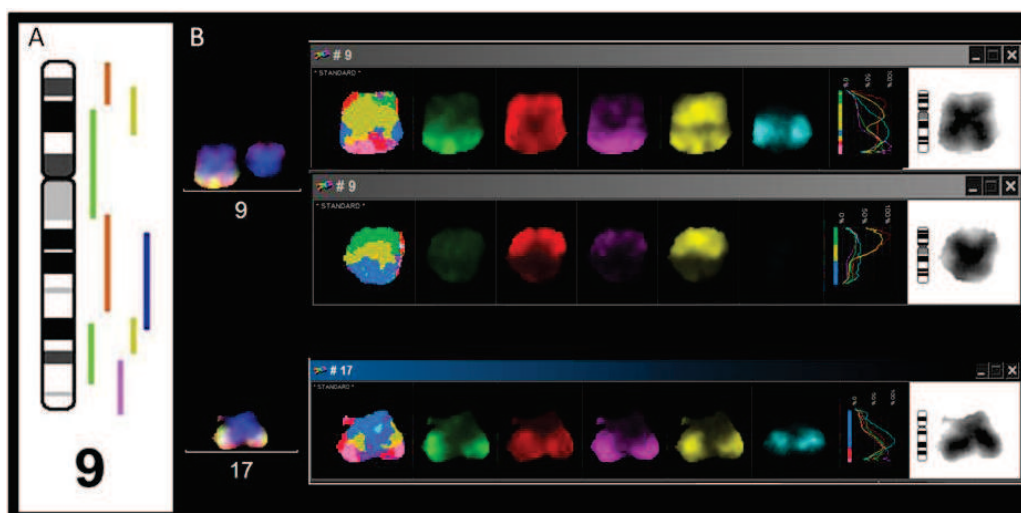


Figura 16: MCB para o cromossomos 9. A) desenho esquemático da marcação do conjunto de sondas para MCB9; B) Resultado da análise no caso 12.

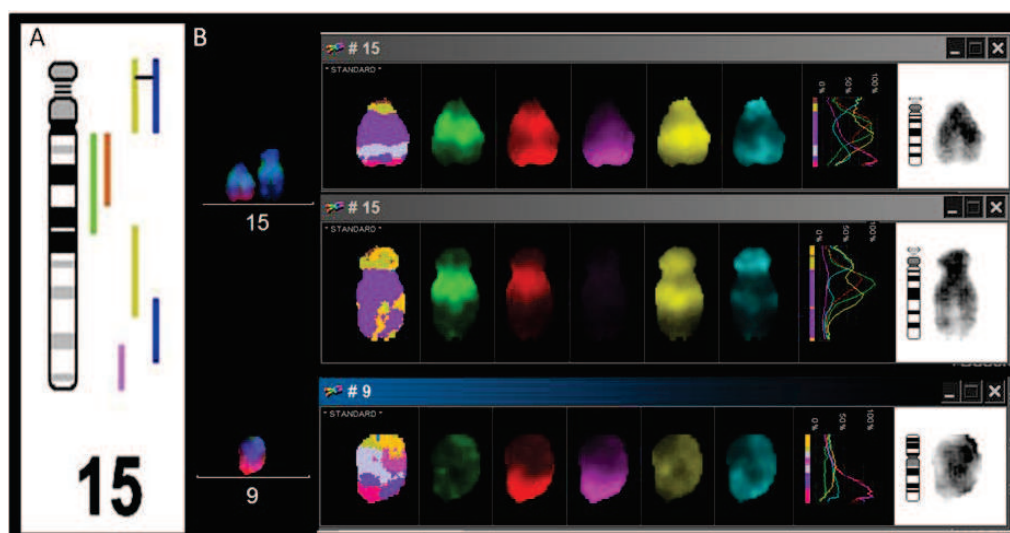


Figura 17: MCB para o cromossomos 15. A) desenho esquemático da marcação do conjunto de sondas para MCB15; B) Resultado da análise no caso 12.

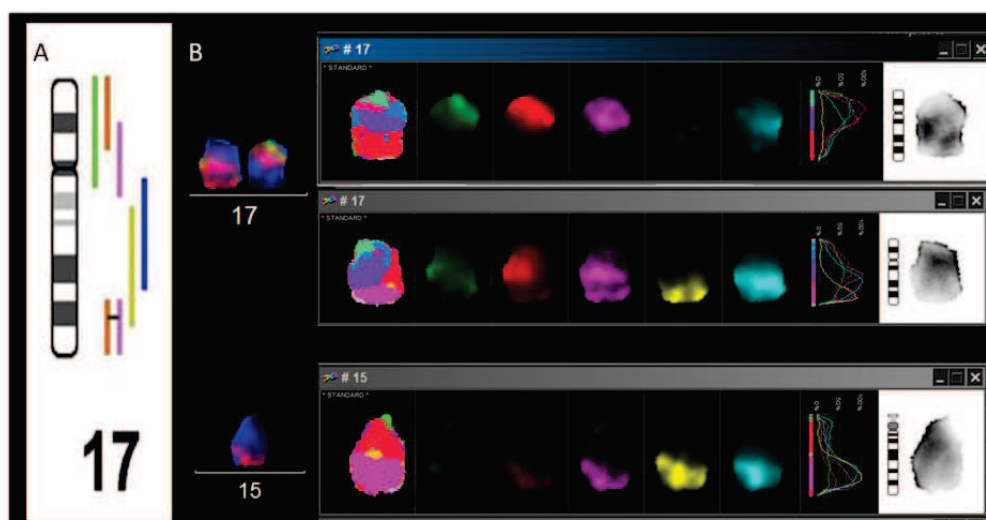


Figura 18: MCB para o cromossomos 17. A) desenho esquemático da marcação do conjunto de sondas para MCB17; B) Resultado da análise no caso 12.

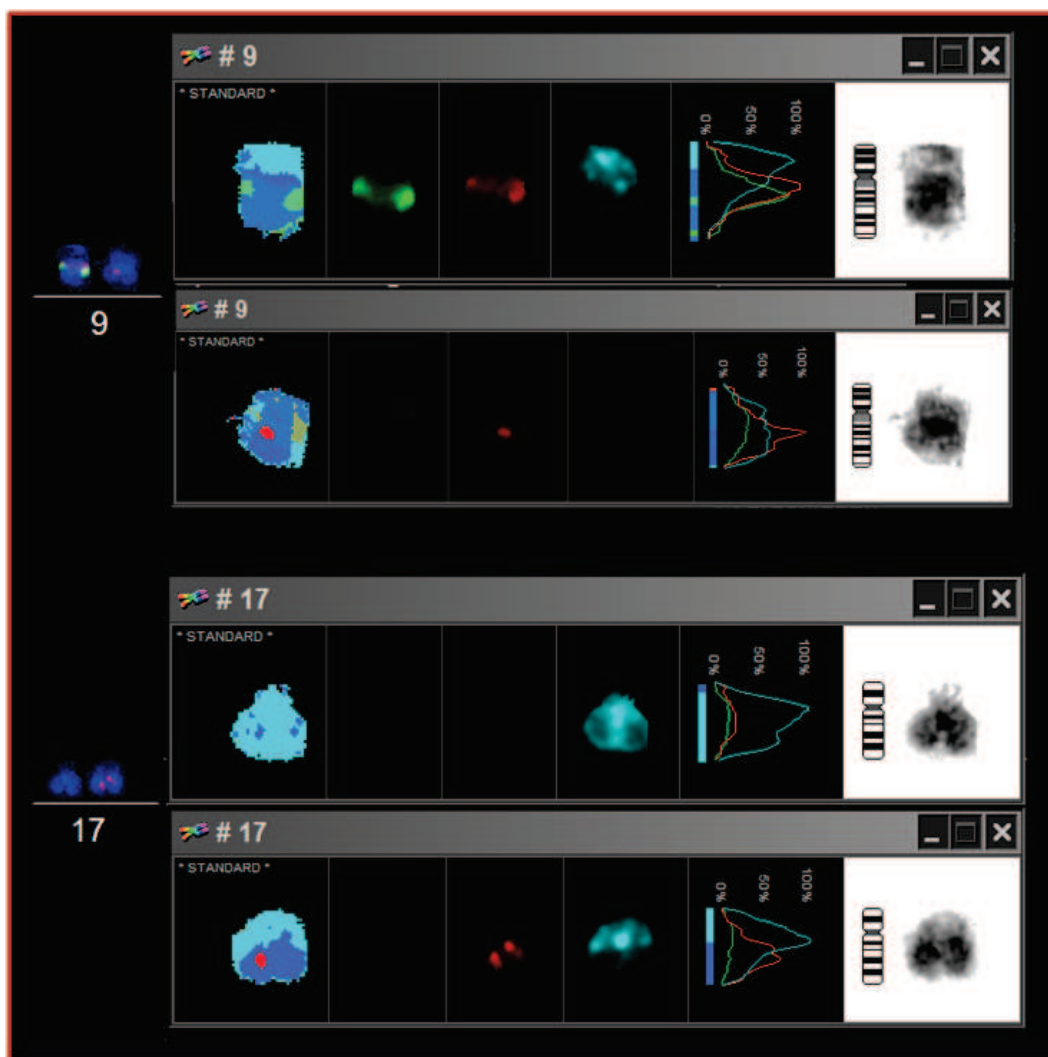


Figura 19: FISH com sondas BAC para as regiões 9q13 (RP11-561O23 em vermelho) e 9q21.11 (RP11-430C15 em verde) e sonda WCP para o cromossomo 17 (DEAC em azul). A região 9q13 foi translocada para o cromossomo 17.

5.3 Análise molecular

A técnica de RT-PCR foi realizada em 14 pacientes, e destes sete foram positivos para o rearranjo *PML/RAR α* (Figura 20). Em dois pacientes (casos 5 e 8) não foi possível a realização da técnica por falta de amostra adequada para a análise (Tabela 10). Divergência entre as análises moleculares foram observadas em cinco pacientes, sendo positiva a detecção da t(15;17) pela FISH e negativa pela RT-PCR. Dentre os pacientes positivos para o rearranjo *PML/RAR α* , um apresentou o transcrito *bcr 3* e seis o transcrito *bcr 1* (Tabela 10)

Tabela 10: Resultados das análises de RT-PCR para o rearranjo *PML/RARA* e investigação das mutações *FLT3* e *NPM1*.

Caso	RT-PCR	FLT3/ITD	FLT3/TKD	NPM1
1	PML/RARA <i>bcr 1</i>	Pos	N	N
2	PML/RARA <i>bcr 3</i>	N	N	N
3	N	N	N	N
4	N	N	N	N
5	na	N	na	N
6	N	N	N	N
7	N	N	N	N
8	na	N	N	N
9	PML/RARA <i>bcr 1</i>	N	N	N
10	PML/RARA <i>bcr 1</i>	Pos	N	N
11	PML/RARA <i>bcr 1</i>	N	N	N
12	N	N	N	N
13	N	N	N	N
14	PML/RARA <i>bcr 1</i>	N	Pos	N
15	N	N	N	N
16	PML/RARA <i>bcr 1</i>	N	N	N

Legenda: Pos = positivo; N = negativo; na = não analisado.

A mutação do *FLT3/ITD* foi detectada em dois pacientes (12,5%) (Figura 21) enquanto a mutação *FLT3/TKD* foi detectada em apenas um paciente (6,25%) (Figura 22). No paciente 5 não foi possível a pesquisa da mutação *FLT3/TKD* por falta de amostra para a análise (Tabela 10).

A pesquisa para a mutação no gene *NPM1* foi realizada em todos os pacientes, sendo negativa para todos os casos (Tabela 10).

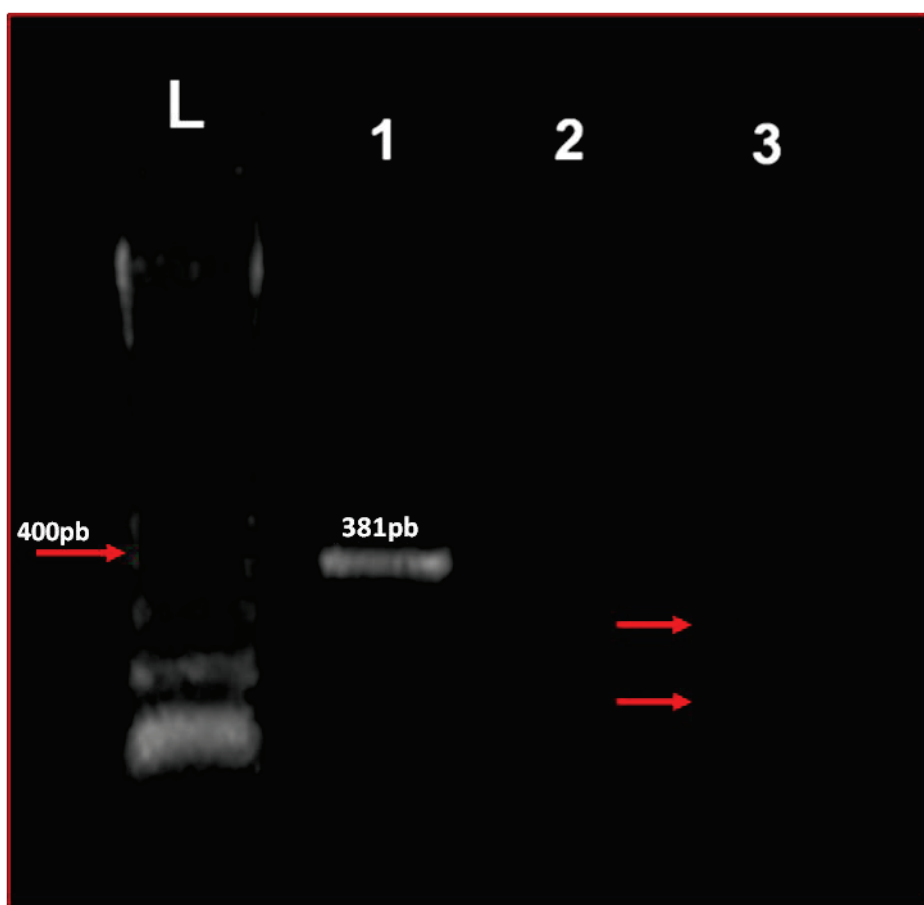


Figura 20: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR para identificação da *t(15;17)* pela RT-PCR. (L) *Ladder 1kb plus*; (1) *Paciente positivo bcr1 (381pb) PML-A1/RARA-B* (2) *Branco*; (3) *Controle interno*.

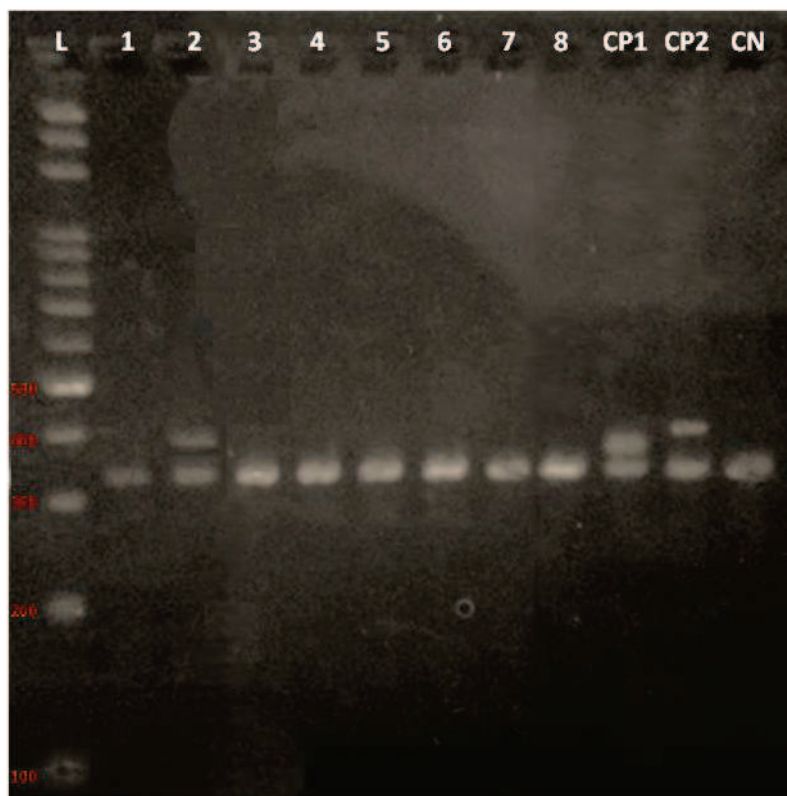


Figura 21: Eletroforese em gel de agarose a 4% dos produtos de PCR para identificação da mutação *FLT3-ITD*. (L) *Ladder 1kb plus*; (2) *Paciente para mutação* (1, 3-8) *Pacientes negativos*; (CP1 e CP2) *Controles positivos*; (CN) *Controle negativo*.

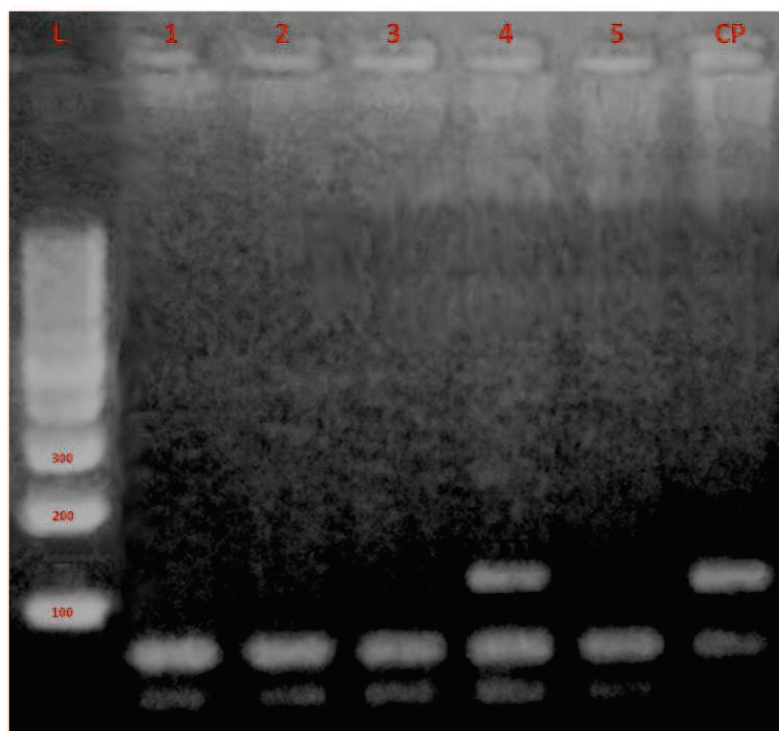


Figura 22: Eletroforese em gel de agarose a 3% dos produtos da digestão para identificação da mutação *FLT3-TKD*. (L) *Ladder 1kb plus*; (4) *Paciente para mutação* (1-3 e 5) *Pacientes negativos*; (CP) *Controle positivo*.

6. Discussão

Pacientes acometidos com LPA possuem grande risco de morte nas fases iniciais do diagnóstico e tratamento, sendo o diagnóstico preciso e avaliação de possíveis complicadores prognósticos de grande valia. A LPA na infância possui escassos estudos citogenéticos e moleculares na nossa população, sendo a geração de conhecimento nesse seguimento essencial no auxílio da busca de melhorias no manejo destes pacientes.

Neste estudo a LPA representou 29,09% dos casos de LMA diagnosticados no mesmo período. Este dado mostra que nossa população segue a tendência de elevação dos casos de LPA observada nos países latino americanos (Jácomo *et al.*, 2007; 2008).

No presente estudo a t(15;17) foi detectada em 50% dos casos através da citogenética clássica, no entanto quando as técnicas moleculares foram aplicadas a taxa de detecção aumentou para 87,5%. Este dado sugere claramente que técnicas moleculares adicionais (RT-PCR e FISH) são necessárias para complementar a citogenética clássica na confirmação de um diagnóstico de LPA. Ainda assim a citogenética clássica é fundamental na identificação de translocações alternativas e cuja caracterização fornece importantes informações acerca da patogênese da LPA como um todo. Além disso, a análise citogenética é valiosa na determinação de alterações cromossômicas secundárias, as quais nos casos de LPA, ainda possuem importância biológica e clínica incerta (Grimwade *et al.*, 2009).

Rearranjos crípticos da fusão *PML-RAR α* são encontrados em cerca de 10% dos casos de LPA (Grimwade *et al.*, 2000). Neste estudo três casos (18,75%) apresentaram cariótipo normal, mas a detecção do rearranjo críptico

pelas técnicas moleculares (FISH e/ou RT-PCR) foi possível em todos estes casos. Além disto, a presença da t(15;17) também foi confirmada nos casos sem metáfase (18,75%).

Dos 14 pacientes analisados por RT-PCR, em sete deles foram detectados os produtos transcritos resultantes da fusão *PML-RAR α* , onde seis apresentaram o transcrito (*bcr 1*) e um o transcrito curto (*bcr 3*). Nos outros pacientes a RT-PCR não detectou a presença de transcritos, sendo que destes, cinco apresentaram o rearranjo *PML-RAR α* na análise por FISH. A presença do transcrito *bcr3* pode conferir um pior prognóstico e está relacionada à maior resistência à terapia de diferenciação com ácido retinóico (Cassinat *et al.*, 2001).

Na análise por FISH, dois casos apresentaram sinais extras para a região do gene *PML*. O significado da presença de cópias extras do gene *PML* ainda não é conhecido, mas sabe-se que a proteína PML está envolvida em diversos processos celulares, os quais incluem apoptose, senescência celular, regulação do crescimento e da transcrição, processamento do RNA, modificações pós-transcricionais, controle da estabilidade genômica, resposta a patógenos virais, apresentação de antígenos e supressão de tumores (Mistry *et al.*, 2003; Carracedo *et al.*, 2011).

Neste estudo dois casos não apresentaram a t(15;17) pelo bandeamento G nem o rearranjo *PML-RAR α* foi detectado nas técnicas moleculares. É fato descrito na literatura a rara ausência de rearranjos *RAR α* em casos de LPA, no entanto não podem ser descartadas mutações do gene *RAR α* (Grimwade *et al.*, 2000). Além disto, a morfologia, imunofenotipagem e evolução clínica destes pacientes foram compatíveis com o diagnóstico de LPA. Ambos os pacientes foram submetidos a protocolo de tratamento de LPA, um sofreu morte precoce

(MP) e o outro é considerado curado (está a mais de 6 anos sem eventos de recaída).

As técnicas citogenéticas moleculares variantes da FISH apresentadas na tabela 6, conseguiram esclarecer o cariótipo complexo apresentado no caso 12 onde a citogenética convencional revelou a presença de um cromossomo marcador além da t(15;17). Através da utilização de sondas WCP para os cromossomos 9, 15 e 17 conjuntamente foi revelada a translocação complexa entre estes cromossomos, t(9;15;17). A técnica de MCB para os mesmos cromossomos e posteriormente o emprego de sondas BAC de *loco* específicos do cromossomo 9 permitiram a exata determinação dos pontos de quebra da t(9;15;17)(q13;q21;q24), sendo esta translocação uma alteração inédita na literatura. Infelizmente as amostras dos casos 3 e 4 não apresentaram metáfases compatíveis com realização da técnica de M-FISH para esclarecimento das alterações complexas. Em todos os outros casos que apresentaram metáfases para análise foi realizada a técnica de WCP para os cromossomos 15 e 17 simultaneamente para avaliação do tipo de rearranjo apresentado, uma vez que a ocorrência de rearranjos não balanceados do tipo inserção em casos de LPA além da translocação balanceada, são relatados (Grimwade *et al.*, 2000; Zaccaria *et al.*, 2002). No entanto, todos os casos analisados apresentaram a t(15;17) balanceada.

Apesar das altas taxas de sobrevida descritas para a LPA (Lo-Coco *et al.*, 2008; Lengfelder *et al.*, 2009), alguns estudos destacam que mortes por causas típicas desta doença, tais como hemorragias devido a coagulopatia e síndrome de diferenciação, ocorrem durante as terceiras e quartas semanas após iniciado o manejo terapêutico (de la Serna *et al.*, 2008). Neste estudo foi detectado uma alta

taxa de mortes precoces (MP), chegando a 43,75%. Este dado é alarmante uma vez que estas mortes são, em sua maioria, difíceis de prevenir e assinalam o alto risco de ocorrência destes eventos em nossa população. Todos os pacientes, exceto um, que passaram por esta perigosa fase estão vivos e sem recaídas.

A definição de MP foi usada para mortes ocorridas dentro de 30 dias a partir do diagnóstico como descrito no estudo do Registro Sueco de Leucemia Aguda em Adultos (Lehmann *et al.*, 2011). O estudo sueco encontrou uma taxa de MP de 29% e um prévio estudo brasileiro achou uma taxa de MP de 32% (Jácomo *et al.*, 2008). Estudos clínicos são considerados a principal fonte de conhecimento sobre a LPA, porém estes estudos frequentemente excluem pacientes com comorbidades, idade avançada, estado geral precário e também pacientes pediátricos. O estudo clínico espanhol PETHEMA (LPA 96 e LPA 99) relatou que devido a hemorragias severas metade dos pacientes estudados foram excluídos (de la Serna *et al.*, 2008; Sanz e Montesinos, 2010). Sem falar nos pacientes que morrem antes do diagnóstico ou do início do tratamento.

Até o momento, a principal causa de MP neste estudo foram os eventos hemorrágicos (sangramento difuso, no SNC ou pulmonar), a síndrome de diferenciação também conhecida como síndrome do ATRA e septicemia. Estes eventos ocorreram entre a segunda e terceira semanas após o diagnóstico durante a primeira fase do tratamento, chamada fase de indução.

Apesar de nenhuma avaliação estatística ter sido aplicada nesse estudo, por conta do tamanho amostral não ser significativo, é preocupante dados de 43,75% de óbito precoce e 50% de mortalidade. É importante que novos regimes terapêuticos sejam testados, como por exemplo, a introdução do trióxido do arsênico (ATO) em combinação com o ATRA na terapia de indução dos pacientes

recém diagnosticados. A atuação sinérgica dessas drogas tem sido explorada e tem tido resultados muito animadores. Um estudo chinês encontrou significativa diferença no tempo de alcance de RC em pacientes que receberam a combinação dessas drogas (Shen *et al.*, 2004). Neste estudo o tempo médio para RC foi de 40,5 dias para os pacientes que receberam apenas o ATRA, 31 dias para pacientes que foram tratados apenas com o ATO, e de 25,5 dias para os que receberam a combinação ATRA/ATO. A diminuição da expressão dos transcritos *PML/RARA* também foi observada na quantificação por *real time*-PCR, onde o ATRA reduziu apenas 6,7 vezes a quantidade de transcritos em relação a medida ao diagnóstico, o ATO provocou a redução de 32,1 vezes e a combinação ATRA/ATO produziu uma redução de 118,9 vezes. Outro estudo realizado na população americana relatou uma significativa vantagem na sobrevida de pacientes que receberam o ATO durante a fase de consolidação. Estes pacientes apresentaram taxa de sobrevida livre de eventos por 3 anos (SLE 3 anos) de 77%, significativamente mais alta quando comparada com os pacientes que receberam a terapia padrão que apresentaram uma SLE 3 anos de 59% (Powel *et al.*, 2007).

Um outro fator de vital importância que normalmente não é levado em consideração nos estudos clínicos é o estado geral clínico do paciente com LPA na infância quando ele chega nos centros de referência para tratamento e/ou diagnóstico. Nos relatos de casos da história clínica dos nossos pacientes é muito comum a observação de um diagnóstico tardio da LPA que é uma doença extremamente perigosa já nas suas primeiras manifestações e necessita de diagnóstico preciso e célere. O CEONHPE é um centro de referência para o tratamento das leucemias agudas pediátricas no Estado de Pernambuco, mas em

muitos casos os pacientes são encaminhados para o CEONHPE após muitos dias em outras instituições de saúde, onde o diagnóstico não foi fechado rapidamente e os pacientes chegam a nossa instituição com graves complicações clínicas e estado geral precário. Este fato contribui muito para os desfechos de morte precoce observada em nossa amostra.

A pesquisa das FLT3/Mut revelou mutações *FLT3/ITD* e *FLT3/TKD* em dois (12,5%) e um (6,75%) pacientes, respectivamente. A presença destas mutações está associada a altas contagens leucocitárias, aumento do percentual de células blásticas na medula óssea, aumento do risco de recaída após remissão completa e redução da taxa de sobrevida geral. No entanto, nenhum estudo conseguiu demonstrar um valor prognóstico independente em pacientes com LPA tratados com protocolos baseados em regimes de ATRA e antraciclinas, como é o caso deste estudo (Barragán *et al.*, 2011). Dois dos pacientes encontram-se vivos e um sofreu morte precoce causada por sangramento generalizado. Alguns estudos mostram uma elevação na taxa de mortes na fase de indução em pacientes com FLT3/Mut, porém sem diferença significativa nas taxas de recaída ou sobrevida global (Gale *et al.*, 2005; Gregory e Feusner, 2009).

A mutação do gene *NPM1* não foi detectada em nenhum dos nossos pacientes. Embora a maioria dos trabalhos mostre ausência de mutações *NPM1* em pacientes com LPA adultos (Thiede *et al.*, 2006; Mullighan *et al.*, 2007; Oelschlaegel *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2013) ou raríssima detecção como no estudo de Verhaak *et al.* (2005) onde apenas um paciente apresentou a mutação *NPM1*, no estudo realizado por Ghosh *et al.* (2012) foi descrita uma frequência de mais de 30% de ocorrência de mutações *NPM1* em pacientes adultos com LPA.

Devido às suas implicações prognósticas e terapêuticas é requerida uma atenção especial à LPA dentre as LMAs. Altas taxas de sobrevida são relatados para esta leucemia (Sagrillo *et al.*, 2005; Ribeiro e Rego, 2006). No entanto, a real situação dos resultados do tratamento da LPA em países em desenvolvimento, como o Brasil, é desconhecida (Ribeiro e Rego, 2006). Neste trabalho a taxa de mortalidade chegou a 50%, o que é um dado preocupante tratando-se de uma patologia considerada e tratada como uma doença que possui bom prognóstico. Além disto, deve-se levar em consideração a incidência aumentada da LPA no Brasil (>20% dos casos de LMA) (Mendes *et al.*, 2004; Jácomo *et al.*, 2007;), que segue a tendência dos países de origem latina. Esta tendência elevada levanta a hipótese de que a LPA possa estar relacionada à origem étnica e/ou à exposição a fatores ambientais distintos. O estudo de Jácomo *et al.* (2007) observou uma alta taxa de mortalidade e levanta a hipótese de que o suporte deficiente durante a fase de indução, período onde ocorre a maioria dos óbitos precoces, é o principal problema enfrentado pelos países em desenvolvimento. Ainda, neste mesmo trabalho os autores sugerem que o prognóstico da LPA não é tão favorável como é estabelecido.

Desta forma, o pronto diagnóstico e uma melhor atenção de suporte durante o tratamento, principalmente em suas fases iniciais se faz necessária ao trato desta malignidade, podendo-se constatar a vital importância da união de técnicas para a detecção, confirmação e monitoramento desta doença de evolução rápida e fatal. Uma maior casuística também é necessária para maiores conclusões sobre a LPA da infância o Brasil.

7. Conclusões

1. A t(15;17) foi detectada a em 71,42% dos casos com cariótipos normais e complexos, pela técnica de FISH com sonda LSI PLM/RAR α , mostrando a importância do uso de técnicas citogenéticas moleculares na confirmação genética do diagnóstico da LPA;
2. A união das técnicas utilizadas no estudo foi essencial à conclusão final do diagnóstico de LPA, destacando-se, o MCB, na resolução de cariótipos complexos.
3. Alta taxa de MP (43,75%) durante a fase de indução pode estar relacionada ao diagnóstico tardio da LPA e a necessidade de uma melhor adaptação do regime terapêutico aos casos de LPA na infância em nossa população. Deve-se levar em consideração também a origem étnica e/ou à exposição a fatores ambientais específicos.
4. As mutações do gene *FLT3* somaram 19,25% dos casos. Sendo este um dado importante na caracterização da população com LPA infantil estudada uma vez que estas mutações estão associadas a características clínicas desfavoráveis com altas contagens leucocitárias, maior risco ocorrência hemorrágica e de coagulopatia e maior taxa de recaída da doença.

5. Nenhuma mutação *NPM1* foi detectada nos pacientes estudados, reforçando a hipótese de raríssima ocorrência ou ausência de mutações deste gene nos casos de LPA na infância.

8. Referências Bibliográficas

- Alcalay M, Zangrilli D, Pandolfi P P, et al (1991). Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukemia lies within the retinoic acid receptor α locus. *Proceedings National Academy Science USA* 88:1977-1981.
- Allford S, Grimwade D, Langabeer S, Duprez E, et al (1999). Identification of the t(15;17) in AML FAB types other than M3: evaluation of the role of molecular screening for the PML/RAR α rearrangement in newly diagnosed AML. The Medical Research Council (MRC) Adult Leukaemia Working Party. *Br J Haematol* 105:198-207.
- Andrade CT, Oliveira CMF, Tabak D, Lucas EF, Coutinho FMB, Dias ML (2001). Dicionário de Polímeros. In: Editora Livraria Interciência, Rio de Janeiro, 1ª edição.
- Arnould C, Philippe C, Bourdon V, Grogire MJ, Berger R, Jonveaux P (1999). The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor α in acute promyelocytic-like leukaemia. *Hum Mol Genet* 8:1741-1749.
- Bain BJ, Barnett D, Linch D, Mattutes F (2002) Revised guideline on immunophenotyping in acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Haem* 24:1-13.
- Ball HJ, Melnick A, Shaknovich R, Kohanski RA, Licht JD (1999). The promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein binds DNA in a high molecular weight complex associated with cdc2 kinase. *Nucleic Acids Res* 27:4106-4113.
- Bally C, Fadlallah J, Leverger G, Bertrand Y, Robert A, Baruchel A, Guerci A, Recher C, Raffoux E, Thomas X, Leblanc T, Idres N, Cassinat B, Vey N, Chomienne C, Dombret H, Sanz M, Fenaux P and Adès L. Outcome of Acute Promyelocytic Leukemia (APL) in Children and Adolescents: An Analysis in Two Consecutive Trials of the European APL Group. *J Clin Oncol*, 14:1641-1646.
- Bardwell VJ and Treisman R (1994). The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev* 8:1664-1677.
- Barouk-Simonet E, Soenen-Cornu V, Roumier C, Cosson A, Lai J, Fenaux P, *et al.* (2005) Role of multiplex FISH in identifying chromosome involvement in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias with complex karyotypes: a report on 28 cases. *Cancer Genet Cytogenet.*, 157:118-26.
- Barragán E, Montesinos P, Camos M, González M, Calasanz MJ, Román-Gómez J, Gómez-Casares MT, Ayala R, López J, Fuster Ó, Colomer D, Chillón C, Larrayoz MJ, Sánchez-Godoy P, González-Campos J, Manso F, Amador ML, Vellenga E, Lowenberg B, Sanz MA; PETHEMA; HOVON Groups (2011) Prognostic value of FLT3 mutations in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy. *Haematologica*.96(10):1470-7.
- Bassi SC and Rego EM (2012) Molecular basis for the diagnosis and treatment of acute promyelocytic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*.34(2):134-9.
- Beckwith J. and Sihavy TJ (1992). The Power of Bacterial Genetics: A Literature-based Course. In: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1st edition.

- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C (1985a). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103:620-625.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C (1985b). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann Intern Med* 103:626-629.
- Berger R and Coniat MB (2003). Double trisomy 8 and 21 in acute myelocytic leukemias, one with rearrangement of the RUNX1 gene. *Cancer Genet Cytogenet* 142(2):158-161.
- Berger R, Bernheim A, Daniel MT, Valensi F, Flandrin G (1981). Karyotype and cell phenotypes in primary acute leukemias. *Blood Cells* 7:287-292.
- Bernard J, Mathe G, Boulay J, Ceoard B, Chome J (1959). Acute promyelocytic leukemia: a study made on 20 cases. *Schweiz MedWochenschr* 89:604-608.
- Bernard J, Weil M, Boiron M (1973). Acute promyelocytic leukemia: results of treatment by daunorubicin. *Blood* 41:489-496.
- Borden KL (2002). Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol* 22:5259-5269.
- Borrow J, Goddard A D, Sheer D, Solomon E (1990). Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science* 249:1577-1580.
- Brendel C, Neubauer A (2000). Characteristics and analysis of normal and leukemic stem cells: current concepts and future directions. *Leukemia* 14:1711-1717.
- Brown P, Levis M, McIntyre E, Griesemer M, And Small D (2006) Combinations of the FLT3 inhibitor CEP-701 and chemotherapy synergistically kill infant and childhood MLL-rearranged ALL cells in a sequence-dependent manner. *Leukemia* 20:1368-1376.
- Brown P, McIntyre E, Rau R, Meshinchi SL, Lacayo N, Dahl G, Alonzo TA, Chang M, Arceci RJ And Small D (2007) The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML. *Blood* 110:979-985.
- Brunner and Suddarth (2002). *Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgico*. In: Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 9ª edição.
- Burnett AK, Goldstone AH, Gray RG, Wheatley K, on behalf of the UK MRC Adult Leukemia Working Party (1997). All trans retinoic acid given concurrently with induction chemotherapy improves the outcome of APL: Results of the UK MRC ATRA trial. *Blood* 90:330a, (abstr, suppl 1).
- Burnett AK, Grimwade D, Solomon E, Wheatley K, Goldstone AH (1999). Presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: result of the randomized MRC trial. *Blood* 93:4131-4143.
- Caligiuri MA and Bloomfield CD (2001). Molecular biology of leukemia. In: De Vita Vt Jr, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 2389-404.
- Carracedo A, Ito K and Pandolfi PP (2011) The nuclear bodies inside out: PML conquers the cytoplasm. *Current Opinion in Cell Biology* 23:1-7.
- Cassinat B, Chevret S, Zassadowski F, Balitrand N, Guillemot I, Menot M-L, Degos L, Fenaux P, and Chomienne C for the European APL Group (2001) In vitro all-trans retinoic acid sensitivity of acute promyelocytic leukemia blasts: a novel indicator of poor patient outcome. *Blood* 98:2862-2864.

- Chan LL, Abdel-Latif ME, Ariffin WA, Ariffin H and Lin HP (2004) Treating childhood acute myeloid leukaemia with the AML-BFM-83 protocol: experience in a developing country. *British Journal of Haematology*, 126:799–805.
- Chan PK and Chan FY (1995). Nucleophosmin/B23 (NPM) oligomer is a major and stable entity in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta* 1262:37-42.
- Chan PK and Chan FY (1999). A study of correlation between NPM-translocation and apoptosis in cells induced by daunomycin. *Biochem Pharmacol* 57(11):1265-1273.
- Chan PK, Aldrich M, Cook RG, Busch H (1986a). Amino acid sequence of protein B23 phosphorylation site. *J Biol Chem* 261:1868-1872.
- Chan PK, Chan FY, Morris SW and Xie Z (1997). Isolation and characterization of the human nucleophosmin/B23 (NPM) gene: identification of the YY1 binding site at the 5' enhancer region. *Nucleic Acid Research* 25:1225-1232.
- Chan PK, Chan W, Yung B, Cook R, Aldrich M, Ku D, Goldknopf I, Busch H (1986b). *J Biol Chem* 261:14335-14341.
- Chan WY, Liu QR, Borjigin J, Busch H, Rennert OM, Tease LA, Chan PK (1989). Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. *Biochemistry* 28:1033-1039.
- Chang CC, Ye BH, Chaganti RSK and Dalla-Favera R (1996). BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6947-6952.
- Cheadle C, Fan J, Cho-Chung YS, Werner T, Ray J, Do L, Gorospe M, Becker KG (2005). "Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. *BMC Genomics* 6(1):75.
- Chen JD, Evans RM (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377:454–457.
- Chen Z, Brand NJ, Chen A, Chen SJ, Tong JH, Wang ZY, Waxman S, Zelent A (1993). Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *Embo J* 12:1161–1167.
- Chen Z, Guidez F, Rousselot P, Agadir A, Chen SJ, Wang ZY, Degos L, Zelent A, Waxman S, Chomienne C (1994). PLZF-RAR alpha fusion proteins generated from the variant t(11;17)(q23;q21) translocation in acute promyelocytic leukemia inhibit ligand-dependent transactivation of wild-type retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1178–1182.
- Cheng S-Y (2005). Molecular Basis of Thyroid Cancer. In: Book Serie Cancer Treatment and Research, Springer US, 1st edition.
- Chudoba I, Plesch A, Lörch T, Lemke J, Claussen U, Senger G (1999) High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 84:156–60.
- Cigudosa JC, Calasanz MJ, Odero MD, Marin J, Bengoechea E, Gullon A (1995). A variant t(14;17) in acute promyelocytic leukemia. Positive response to retinoic acid treatment. *Cancer Genet Cytogenet* 80:160–161.
- Clarke CA and Glaser SL (2000). Acute myeloid leukaemia. *N Eng J Med* 342:358-61.
- Cohen N, Sharma M, Kentsis A, Perez JM, Strudwick S, Borden KLB (2001). PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *EMBO J* 20:4547–4559.

- Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 4:529–533.
- Compton DA and Cleveland DW (1993). NuMA is required for the proper completion of mitosis. *J Cell Biol* 120:947-957.
- Compton DA, Szilak I, Cleveland DW (1992). Primary structure of NuMA, an intranuclear protein that defines a novel pathway for segregation of proteins at mitosis. *J Cell Biol* 116:1395-1408.
- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins (1996). *Patologia Estrutural e Funcional*. In: Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 5ª edição.
- Cucuianu A (2005). Dominant and opportunistic leukemic clones: Proposal for a pathogenesis-oriented classification in acute myeloid leukemia. *Med Hypotheses* 65:107-113.
- Cunningham I, Gee TS, Reich LM, *et al* (1989). Acute promyelocytic leukemia: treatment results during a decade at Memorial Hospital. *Blood* 73:1116-1122.
- Darnell Jr. JE (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-1635.
- de la Serna J, Montesinos P, Vellenga E, Rayon C, *et al* (2008) Causes and prognostic factors of remission induction failure in patients with acute promyelocytic leukemia treated with alltrans retinoic acid and idarubicin. *Blood* 111: 3395–3402.
- de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A (1990). The t(15; 17) translocation of acute promyelocytic leukemia fuses the retinoic acid receptor a gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347:558-561.
- de Thé H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, Dejean A (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66:675–684.
- Dionne MA, Howard L, Compton DA (1999). NuMA is a component of an insoluble matrix at mitotic spindle poles. *Cell Motil Cytoskeleton* 42:189-203.
- Dong F, Liu X, de Koning JP, Touw IP, Henninghausen L, Larner A, Grimley PM (1998). Stimulation of Stat5 by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is modulated by two distinct cytoplasmic regions of the G-CSF receptor. *J Immunol* 161:6503-6509.
- Dong S and Tweardy DJ (2002). Interactions of STAT5b-RAR, a novel acute promyelocytic leukemia fusion protein, with retinoic acid receptor and STAT3 signaling pathways. *Blood* 99:2637-2646.
- Dong S, Zhu J, Reid A, Strutt P, Guidez F, Zhong H-J, Wang Z-Y, Licht J, Waxman S, Chomienne C, Zelent A, Chen S-J (1996). Amino-terminal protein-protein interaction motif (POZ-domain) is responsible for activities of the promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor-alpha fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3624-3629.
- Dumbar TS, Gentry GA and Olson MO (1989). Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry* 28: 9495-9501.
- Dyck J, Warrell RP, Evans RM, Miller WH (1995). Rapid diagnosis of acute promyelocytic leukemia by immunohistochemical localization of PML/RAR-A protein. *Blood* 86:862–867.
- Falini B, Flenghi L, Fagioli M, Lo Coco F, Cordone I, Diverio D, Pasqualucci L, Biondi A, Riganelli D, Orleth A, Liso A, Martelli MF, Pelicci PG, Pileri S (1997). Immunocytochemical diagnosis of acute promyelocytic leukemia (M3) with the monoclonal-antibody PGM3 (anti-PML). *Blood* 90:4046–4053.

- Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C (2007) Acute Myeloid Leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc-AML): biologic and clinical features. *Blood* 109:874-885.
- Fenaux P, Chastang C, Chevret S et al (1999). A randomized comparison of all transretinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. The European APL Group. *Blood* 94:1192–1200.
- Fenaux P, Wang ZZ, Degos L (2007). Treatment of acute promyelocytic leukemia by retinoids. *Curr Top Microbiol Immunol* 313:101-128.
- Ferrara F, Morabito F, Martino B et al (2000). CD56 expression is an indicator of poor clinical outcome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with simultaneous all-trans-retinoic acid and chemotherapy. *J Clin Oncol* 18:1295–1300.
- Freitas FA, Zambaldi LJG, Araújo M, Gatti E, Otubo R, Tsuchiya MR, Matsuda EI, Brandalise SR, Yunes JA (2004). A novel der(12)t(p15;q24.3) in a patient with childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 151:78-81.
- Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, And Linch DC (2008) The impact of *FLT3* internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with *NPM1* mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 111: 2776-2784.
- Gale RE, Hills R, Pizzey AR, et al. (2005) Relationship between *FLT3* mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 106:3768-3776.
- Gallagher RE, Willman CL, Slack JL et al (1997). Association of PML-RAR α fusion mRNA type with pretreatment hematologic characteristics but not treatment outcome in acute promyelocytic leukemia: an intergroup molecular study. *Blood* 90:1656–1663.
- Geigl BG, Uhrig S, Speicher MR (2006) Multiplex-fluorescence *in situ* hybridization for chromosome karyotyping. *Nature Protocols*, 1:1172 – 84.
- Ghosh J, Das S (1988). A study on the effect of vitamin A deficiency and supplementation on tumorigenesis in mice. *Neoplasma* 35:41–49.
- Gilliland DG and Griffin JD (2002) The roles of *FLT3* in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 100:1532-1542.
- Glass CK, Rosenfeld MG (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14:121–141.
- Gomis F, Sanz J, Sempere A, Plumé G, Senent ML, Pérez ML, Cervera J, Moscardó F, Bolufer P, Barragán E, Martín G, Sanz MA (2004). Immunofluorescent analysis with the anti-PML monoclonal antibody PG-M3 for rapid and accurate genetic diagnosis of acute promyelocytic leukemia. *Ann Hematol* 83(11):687-90.
- Gordon MB, Howard L, Compton DA (2001). Chromosome movement in mitosis requires microtubule anchorage at spindle poles. *J Cell Biol* 152:425-34.
- Gratas C, Menot ML, Dresch C, Chomienne C (1993). Retinoid acid supports granulocytic but not erythroid differentiation of myeloid progenitors in normal bone marrow cells. *Leukemia* 7:1156–1162.
- Gregory J and Feusner J (2009) Acute promyelocytic leukemia in childhood. *Curr Oncol Rep*, 11:439-445.

- Gregory J, Kim H, Alonzo T, *et al.* (2009) Treatment of children with acute promyelocytic leukemia: Results of the first North American Intergroup trial INT0129. *Pediatr Blood Cancer* 53:1005-1010.
- Gregory TK, Wald D, Chen Y, Vermaat JM, Xiong Y, Tse W (2009) Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *J Hematol Oncol.* 2;2:23.
- Grimwade D (1999). The pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: evaluation of the role of molecular diagnosis and monitoring in the management of the disease. *Br J Haematol* 106:591–613.
- Grimwade D (2001). The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Baillière's Best Pract Res Clin Haematol* 14:497–529.
- Grimwade D (2002). The significance of minimal residual disease in patients with t(15;17). *Baillière's Best Pract Res Clin Haematol* 15:137–158.
- Grimwade D and Lo Coco F (2002). Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 16:1959-1973.
- Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, Hagemeijer A, Berger R, Neat M, Howe K, Dastugue N, Jansen J, Radford-Weiss I, Lo Coco F, Lessard M, Hernandez JM, Delabesse E, Head D, Liso V, Sainty D, Flandrin G, Solomon E, Birg F, Lafage-Pochitaloff M (2000) Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Francais de Cytogénétique Hematologique, Groupe de Francais d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action 'Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies. *Blood* 96:1297–1308.
- Grimwade D, Diverio D, Harrison G, Wheatley K, Rogers J, Lo Coco F, Goldstone AH, Solomon E, Burnett AK (1999). Detection of minimal residual disease (MRD) in APL by 'real-time' RT-PCR: analysis of cases entered into the UK MRC ATRA trial. *Blood* 94 (Suppl. 1):625a (Abstr.).
- Grimwade D, Gorman P, Duprez E, Howe K, Langabeer S, Oliver F, Walker H, Culligan D, Waters J, Pomfret M, Goldstone A, Burnett A, Freemont P, Sheer D, Solomon E (1997). Characterization of cryptic rearrangements and variant translocations in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 90:4876–4885.
- Grimwade D, Howe K, Langabeer S, Davies L, Oliver F, Walker H, Swirsky D, Wheatley K, Goldstone A, Burnett A, Solomon E (1996). Establishing the presence of the t(15;17) in suspected acute promyelocytic leukaemia (APL): cytogenetic, molecular and PML-immunofluorescence assessment of patients entered into the MRC ATRA trial. *Br J Haematol* 94:557–573.
- Grimwade D, Jovanovic JV, Hills RK, Nugent EA, *et al* (2009) Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy. *J Clin Oncol* 27(22):3650-8.
- Grimwade D, Moorman A, Hills R, *et al* (2004) Impact of karyotype on treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 83 Suppl 1: S45–48.
- Gu BW, Xiong H, Zhou Y *et al* (2002). Variant-type PML-RAR (a) fusion transcript in acute promyelocytic leukemia: use of a cryptic coding sequence from intron2 of the RAR (a) gene and identification of a new clinical subtype resistant to retinoic acid therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7640–7645.

- Gueth-Hallonet C, Weber K, Osborn M (1997). Cleavage of the nuclear matrix protein NuMA during apoptosis. *Exp Cell Res* 233:21-24.
- Harborth J, Wang J, Gueth-Hallonet C, Weber K, Osborn M (1999). Self assembly of NuMA: multiarm oligomers as structural units of a nuclear lattice. *EMBO J* 18:1689-1700.
- Harborth J, Weber K, Osborn M (2000). GAS41, a highly conserved protein in eukaryotic nuclei, binds to NuMA. *J Biol Chem* 275(41):31979-85.
- He D, Zeng C, Brinkley BR (1995). Nuclear matrix proteins as structural and functional components of the mitotic apparatus. *Int Rev Cytol* 162B:1-74.
- Head DR (2004) Classification and differentiation of the acute leukemias. In: Wintrobe's Clinical Hematology. Greer, J P; Foerster, J; Lukens, J N; Rodgers, G M; Paraskevas, F; Glader, B. 11th, Bippincott Williams & Wilkins, p. 2063-2076.
- Head DR (2004) Classification and differentiation of the acute leukemias. In: Wintrobe's Clinical Hematology. Greer, J P; Foerster, J; Lukens, J N; Rodgers, G M; Paraskevas, F; Glader, B. 11th, Bippincott Williams & Wilkins, p. 2063-2076.
- Hillestad LK (1957) Acute promyelocytic leukemia. *Acta Med Scand* 159:189-194.
- Hoffe PA (2000) Genética Médica Molecular. In: Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1ª edição.
- Hummel JL, Wells RA, Dube ID, Licht JD, Kamel-Reid S (1999). Deregulation of NPM and PLZF in a variant t(5;17) case of acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 18:633-641.
- Imaizumi M, Tawa A, Hanada R, *et al.* (2011) Prospective study of therapeutic regimen with all-trans retinoic acid and anthracyclines in combination of cytarabine in children with acute promyelocytic leukemia: The Japanese childhood acute myeloid leukaemia cooperative study. *Br J Haematol*, 152:89-98.
- ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013) Cytogenetic & Genome Research. Editors: Shaffer LG, McGowan-Jordan J and Schmid M. Ed. Karger.
- Jácomo RH, Figueiredo-Pontes LL, Rego EM (2008) Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. *Rev Assoc Med Bras* 54(1):82-9.
- Jácomo RH, Melo RAM, Souto FR, Mattos ER, Oliveira CO, Fagundes EF, *et al* (2007) Clinical features and outcomes of 134 Brazilians with acute promyelocytic leukemia who received ATRA and anthracyclines. *Haematologica*, 92:1431-32.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, Eds. (2001) World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press.
- Jansen JH, Lowenberg B (2001). Acute promyelocytic leukemia with a PLZF-RARalpha fusion protein. *Semin Hematol*. 38:37-41.
- Jurcic JG, Nimer SD, Scheinberg DA, DeBlasio T, Warrell RP, Miller WH (2001). Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RAR isoform type: long-term follow-up in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 98:2651-2656.
- Kakizuka A, Miller WJ, Umesono K, Warrell RJ, Frankel SR, Murty VV, Dmitrovsky E, Evans RM (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute

- promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor PML. *Cell* 66:663-674.
- Kastner P, Lawrence HJ, Waltzinger C, Ghyselinck NB, Chambon P, Chan S (2001). Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RARα. *Blood* 97:1314–1320.
- Kearney L (2006) Multiplex-FISH (M-FISH): technique, developments and applications. *Cytogenet Genome Res*, 114:189-98.
- Kieslinger M, Woldman I, Moriggl R, Hofmann J, Marine JC, Ihle JN, Beug H, Decker T (2000). Antiapoptotic activity of Stat5 required during terminal stages of myeloid differentiation. *Genes Dev*. 14:232-244.
- Kogan SC, Hong SH, Shultz DB, Privalsky ML, Bishop JM (2000). Leukemia initiated by PMLRARα: the PML domain plays a critical role while retinoic acid-mediated transactivation is dispensable. *Blood* 95:1541–1550.
- Koken MHM, Reid A, Quignon F, Chelbi-Alix MK, Davies JM, Kabarowski JHS, Zhu J, Dong S, Chen S-J, Chen Z, Tan CC, Licht J, Waxman S, de The H, Zelent A (1997). Leukemia-associated retinoic acid receptor alpha fusion partners, PML and PLZF, heterodimerize and colocalize to nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10255-10260.
- Kondo T, Minamino N, Nagamura-Inoue T, Matsumoto M, Taniguchi T, Tanaka N (1997). Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity. *Oncogene* 15:1275-1281.
- Kuchenbauer F, Schoch C, Kern W, et al. (2005) Impact of FLT3 mutations and promyelocytic leukemia-breakpoint on clinical characteristics and prognosis in acute promyelocytic leukemia. *Br J Haematol*, 130:196-202.
- Kundranda MN, Tibes R, Mesa RA (2012) Transformation of a chronic myeloproliferative neoplasm to acute myelogenous leukemia: does anything work? *Curr Hematol Malig Rep*. 7(1):78-86.
- Kutny MA, Moser BK, Laumann K, Feusner JH, Gamis A, Gregory J, Larson RA, Powell BL, Stock W, Willman CL, Woods WG, Meshinchi S (2012) FLT3 mutation status is a predictor of early death in pediatric acute promyelocytic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 59(4):662-7.
- Labbaye C, Valtieri M, Testa U et al (1994). Retinoic acid downmodulates erythroid differentiation and GATA1 expression in purified adult progenitor culture. *Blood* 83: 651–656.
- Labrecque J, Allan D, Chambon P, Iscove NN, Lohnes D, Hoang T (1998). Impaired granulocytic differentiation in vitro in hematopoietic cells lacking retinoic acid receptors α1 and c. *Blood* 92:607–615.
- Lai HK, Borden KL (2000). The promyelocytic leukemia (PML) protein suppresses cyclin D1 protein production by altering the nuclear cytoplasmic distribution of cyclin D1 mRNA. *Oncogene* 19:1623-1634.
- Larson RA, Kondo K, Vardiman JW, Butler AE, Golomb HM, Rowley JD (1984). Evidence for a 15;17 translocation in every patient with acute promyelocytic leukemia. *Am J Med* 76: 827-841.
- Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J* 11:1003-1013.
- Le XF, Vallian S, Mu ZM, Hung MC, Chang KS (1998). Recombinant PML adenovirus suppresses growth and tumorigenicity of human breast cancer

- cells by inducing G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Oncogene* 16:1839-1849.
- Lee JH and Welch DR (1997). Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int J Cancer* 71:1035-1044.
- Lee YD, Cho HI, Kang YH, Yun SS, Park SY, Lee YS, Kim Y, Lee DS (2004). The role of fluorescence in situ hybridization (FISH) for monitoring hematologic malignancies with BCR/ABL or ETO/AML1 rearrangement: a comparative study with FISH and G-banding on 919 consecutive specimens of hematologic malignancies. *Cancer Genet and Cytogenetics* 152:1-7.
- Lehmann S, Ravn A, Carlsson L, Antunovic P, et al (2011) Continuing high early death rate in acute promyelocytic leukemia: a population-based report from the Swedish Adult Acute Leukemia Registry. *Leukemia* 1–7.
- Leid M, Kastner P, Lyons R et al (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68:377-395.
- Lengfelder E, Haferlach C, Saussele S, Haferlach T, et al. (2009) High dose ara-C in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: long-term results of the German AMLCG. *Leukemia* 23: 2248–2258.
- Levi M and Ten Cate H (1999). Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 341: 586-592.
- Li Y, Busch R, Valdez B, Busch H (1996). C23 interacts with B23, a putative nucleolar-localization-signal-binding protein. *Eur J Biochem* 237:153-158.
- Licht JD, Chomienne C, Goy A, Chen A, Scott AA, Head DR, Michaux JL, Wu Y, Deblasio A, Miller WH Jr (1995). Clinical and molecular characterization of a rare syndrome of acute promyelocytic leukemia associated with translocation (11;17). *Blood* 85:1083-1094.
- Lichtman MA and Liesveld JL (2001). Acute Myelogenous Leukemia. In: Williams Hematology, Chap. 93, p.1047, 6st edition.
- Liehr T, Weise A, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, et al. (2002b) Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries. *Cytogenet Genome Res.* 97:43–50.
- Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, et al. (2002a) Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med.*, 9:335-9.
- Lion T and Kidd V. Appropriate controls for RT-PCR (1998) *Leukemia* 12:1983-1993.
- Lo Coco F, Diverio D, Falini B, Biondi A, Nervi C, Pelicci PG (1999). Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 94:12-22.
- Lo Coco F, Ammatuna E, Montesinos P, Sanz MA (2008) Acute promyelocytic leukemia: recent advances in diagnosis and management. *Semin Oncol* 35: 401–409.
- Longo L, Donti E, Mencarelli A, et al (1990a). Mapping of chromosome 17 breakpoints in acute myeloid leukemias. *Oncogene* 5:1557-1563.
- Longo L, Pandolfi P P, Biondi A, et al (1990b). Rearrangements and aberrant expression of the RAR α gene in acute promyelocytic leukemias. *J Exp Med* 172:1571-1575.

- Luderus ME, den Blaauwen JL, de Smit OJ, Compton DA, van Driel R (1994). Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol* 14:6297-6305.
- Madon P, Athalye A, Bandkar V, Dhumal S, Sopariwala A, Parikh F (2003) Fluorescence in-situ hybridization (FISH) – A rapid and useful technique for diagnosis and management in leukemia. *Int J Hum Genet*, 3(2):115-9.
- Marill J, Capron C, Idres N, Chabot G (2001). Human cytochrome P450s involved in the metabolism of 9-cis- and 13-cis-retinoic acids. *Biochemical Pharmacology* 63:933-94.
- Martins SLR and Falcão RP (2000) A importância da imunofenotipagem na Leucemia Mielóide Aguda. *Rev Assoc Med Bras* 46(1):57-62.
- Masetti R, Vendemini F, Zama D, Biagi C, Gasperini P, Pession A (2012) All-trans retinoic acid in the treatment of pediatric acute promyelocytic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*. 12(9):1191-204.
- Matikainen S, Sareneva T, Ronni T, Lehtonen A, Koskinen PJ, Julkunen I (1999). Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, c-myc, and pim-1 genes in human T cells. *Blood* 93:1980-1991.
- Mayani H (1996). Composition and function of the hemopoietic microenvironment in human myeloid leukemia. *Leukemia* 86:1041-1047.
- Mayer MP and Bukau B (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62:670-684.
- Mclaughlin P, Estey E, Glassman A, Romaguera J, Samaniego F, Ayala A, Hayes K, Maddox AM, Preti HA, Hagemester FB (2005). Myelodysplasia and acute myeloid leukemia following therapy for indolent lymphoma with fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone (FND) plus rituximab and interferon alpha. *Blood* 105:4573-4575.
- Melnick A, Licht JD (1999). Deconstructing a disease: RARa, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93:3167–3215.
- Mendes WL, Coser VM, Ramos G, Pereira W, et al (2004) The apparent excess of acute promyelocytic leukemia in infant acute leukemias in Brazil. *Haematologica* 89:(11)e135
- Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E, Grimwade D (2003) The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Reviews* 17:71-97.
- Miura I, Nishinari T, Hashimoto K, Nimura T, Miura S, Miura AB (1994). Translocation (8;17)(p21;q21), a possible variant of t(15;17), in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 72:75-77.
- Muller S, Matunis MJ, Dejean A (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* 17:61-70.
- Mullighan CG, Kennedy A, Zhou X, et al (2007) Pediatric acute myeloid leukemia with NPM1 mutations is characterized by a gene expression profile with dysregulated HOX gene expression distinct from MLL-rearranged leukemias. *Leukemia*. 21:2000–2009.
- Murray CK, Estey E, Paietta E et al (1999). CD56 expression in acute promyelocytic leukemia: a possible indicator of poor treatment outcome. *J Clin Oncol* 17:293-297.

- Nakamaki T, Hino K, Yokoyama A, Hisatake J, Tomoyasu S, Honma Y, Hozumi M, Tsuruoka N (1994). Effect of cytokines on the proliferation and differentiation of acute promyelocytic leukemia cells: possible relationship to the development of "retinoic acid syndrome". *Anticancer Res.* 14:817-823.
- Naoe T, Kiyoi H (2004) Normal and oncogenic FLT3. *Cell Mol Life Sci.* 61: 2932-2938.
- Neves H, Ramos C, da Silva MG, Parreira A, Parreira L (1999). The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARa genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* 93:1197-1207.
- Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, Knudsen ES, Hofmann,, IA, Snyder JD, Bove KE, Fukasawa K (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103:127-140.
- Peter M, Nakagawa J, Doree M, Labbe JC, Nigg EA (1990). Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell* 60:791-801.
- Petrilli AS, Toledo SRC (2001). Aspectos Genéticos das Neoplasias Pediátricas. Cap. 35, p. 345-349, In: Doenças Genéticas em Pediatria.
- Pierce BA (2005). Genetica. In: Editore Zanichelli, Itália. 1ª ed. Pintão MCT e Franco RF (2001). Coagulação Intravascular Disseminada. *Medicina Ribeirão Preto* 34:282-291.
- Powell BL, Moser B, Stock W, et al. (2007) Effect of consolidation with arsenic trioxide (As₂O₃) on event-free survival (EFS) and overall survival (OS) among patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL): North American Intergroup Protocol C9710 [abstract]. *J Clin Oncol*, 25 (Suppl 18):A-2.
- Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM (2004). Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* (1):118-45.
- Rapaport SI (1990). *Hematologia Introdução*. 2ª ed. São Paulo: Ed. Roca. 192-194.
- Rashidi A, Silverberg ML, Conkling PR, Fisher SI (2013) Thrombosis in acute promyelocytic leukemia. *Thromb Res.* 131(4):281-9
- Redner RL (2002). Variations on a theme: the alternative translocations in APL. *Leukemia* 16:1927-1932.
- Redner RL, Corey SJ, Rush EA (1997). Differentiation of t(5;17) variant acute promyelocytic leukemic blasts by all-*trans* retinoic acid. *Leukemia* 11:1014-1016.
- Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA, Corey SJ (1996). The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosminretinoic acid receptor fusion. *Blood* 87: 882–886.
- Rego EM, Falcão RP (2002). Leucemia Mielóide Aguda Diagnóstico: Morfologia, Imunofenótipo e Citogenética. *Série Monografia Escola Brasileira de Hematologia* 9:54-65.
- Reid A, Gould A, Brand N, Cook M, Strutt P, Li J, Licht J, Waxman S, Krumlauf R, Zelent A (1995). Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood*, 86:4544-4552.

- Ribeiro RC and Rego E (2006) Management of APL in developing countries: epidemiology, challenges and opportunities for international collaboration. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*, p.162-168.
- Rimsza LM, Douglas VK, Tighe P, Saxonhouse MA (2004) Benign B-cell precursors (hematogones) are the predominant lymphoid population in bone marrow of preterm infants. *Biol Neonate* 86:247-53.
- Rockova V, Abbas S, Wouters BJ, Erpelinck CA, Beverloo HB, Delwel R, van Putten WL, Löwenberg B, Valk PJ (2011) Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers. *Blood*. 28;118(4):1069-76.
- Rolston R, Weck KE, Tersak JM, Sherer ME, Cumbie K, Shekhter-Levin S (2002). New cytogenetic variant, insertion (15;17)(q22;q12q21), in an adolescent with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 134(1):55-9.
- Rowley JD (1999). The role of chromosome translocations in leukemogenesis. *Semin Hematol* 36(suppl 7):59-72.
- Rund D, Ben-Yehuda D (2004). Therapy-related leukemia and myelodysplasia: evolving concepts of pathogenesis and treatment. *Hematology* 9(3):179-87.
- Ruthardt M, Orleth A, Tomassoni L, Puccetti E, Riganelli D, Alcalay M, Mannucci R, Nicoletti I, Grignani F, Fagioli M, Pelicci PG (1998). The acute promyelocytic leukaemia specific PML and PLZF proteins localize to adjacent and functionally distinct nuclear bodies. *Oncogene* 16(15):1945-53.
- Ruthardt M, Testa U, Nervi C, Ferrucci PF, Grignani F, Puccetti E, Grignani F, Peschle C, Pelicci PG (1997). Opposite effects of the acute promyelocytic leukemia PML-retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and PLZF-RAR alpha fusion proteins on retinoic acid signalling. *Mol Cell Biol* 17:4859-4869.
- Sagrillo MR, Cardoso SH, Silva LRJ, Graça CHN, Ferreira E, Hamerschlag N, Guerra JCC, Bacal NS, Andrade JAD, Borovik CL (2005). Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). *Rev Bras Hematol Hemoter* 27(2):94-101.
- Sainty D, Liso V, Cantú-Rajnoldi A, Head D, Mozziconacci MJ, Arnoulet C, Benattar L, Fenu S, Mancini M, Delabesse E, Duchayne E, Mahon F-X, Gutierrez N, Birg F, Biondi A, Grimwade D, Lafage-Pochitaloff M, Hagemeijer A, Flandrin G (2000). A new morphological classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying *PLZF-RARA* rearrangements. *Blood* 96:1287–1296.
- Santos SC, Lacronique V, Bouchaert I, Monni R, Bernard O, Gisselbrecht S, Gouilleux F (2001). Constitutively active STAT5 variants induce growth and survival of hematopoietic cells through a PI 3-kinase/Akt dependent pathway. *Oncogene* 20(17):2080-90.
- Sanz M, Martin G, Gonzalez M, et al (2005) Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with alltransretinoic acid and anthracycline monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group. *Blood*. 103:1237-43.
- Sanz MA and Montesinos P (2010) Open issues on bleeding and thrombosis in acute promyelocytic leukemia. *Thromb Res* 125 (Suppl 2):S51–S54.
- Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, et al. (2009) Management of acute promyelocytic leukemia: Recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 113:1875-1891.

- Sanz MA, Jarque I, Martin G, et al (1988). Acute promyelocytic leukemia: therapy results and prognostic factors. *Cancer* 61:7-13.
- Sanz MA, Lo Coco F, Martin G et al (2000). Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood* 96:1247–1253.
- Sanz MA, LoCoco F, Martin G, et al. (2000) Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PATHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood*, 96:1247-1253.
- Sanz MA, Tallman MS and Lo Coco F (2005) Tricks of the trade for the appropriate management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 105:3019-3025.
- Sanz MA, Tallman MS, Lo Coco F (2005). Tricks of the trade for the appropriate management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 105:3019-3025.
- Saredi A, Howard L, Compton DA (1997). Phosphorylation regulates the assembly of NuMA in a mammalian mitotic extract. *J Cell Sci* 110:1287:1297.
- Shaknovich R, Yeyati PL, Ivins S, Melnick A, Lempert C, Waxman S, Zelent A, Licht JD (1998). The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis. *Mol Cell Biol* 18:5533-5545.
- Shen ZX, Shi ZZ, Fang J, et al. (2004) All-trans retinoic acid/As₂O₃ combination yields a high quality remission and survival in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:5328-5335.
- Shiota M, Nakamura S, Ichinohasama R, et al (1995). Anaplastic large cell lymphomas expressing the novel chimeric protein 80NPM/ALK: a distinct clinicopathologic entity. *Blood* 86:1954–1960.
- Silva EM, Silva EM, Silva SM (2003). Cálculo básico para cursos superiores. In: Editora Atlas, 1ª edição.
- Silva MLM, Land M, Heller A, Abdelhay E, Oliveira MSP, Ribeiro R, Lerner D, Liehr T (2005). New reagement t(3;17)(q26.3;q12) in an AML patient with poor outcome. *Oncology Reports* 3:663-666.
- Sirri V, Roussel P, Gendron MC, Hernandez-Verdun D (1997). Amount of the two major Ag-NOR proteins, nucleolin, and protein B23 is cell-cycle dependent. *Cytometry* 28:147-156.
- Small D (2006) FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 178-184.
- Speicher MR, Ballard SG, Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genet*, 12:368-75.
- Spiegelman BM, Heinrich R (2004). Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell* 119 (2):157–67.
- Stunnenberg HG (1993). Mechanisms of transactivation by retinoic acid receptors. *Bioessays* 15:309–315.
- Sucic M, Zadro R, Burazer B, et al (2002) Acute promyelocytic leukemia M3: cytomorphicologic, immunophenotypic, cytogenetic and molecular variants. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 11:941-950.
- Szebeni A, Mehrotra B, Baumann A, Adam SA, Wingfield PT, Olson MO (1997). Nucleolar protein B23 stimulates nuclear import of the HIV-1 Rev protein and NLS-conjugated albumin. *Biochemistry* 36:3941–3949.

- Tallman MS, Nabhan C, Feusner JH, Rowe JM (2002). Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies. *Blood* 99:759–767.
- Tang TK, Tang CJ, Chao YJ, Wu CW (1994). Nuclear mitotic apparatus protein (NuMA): spindle association, nuclear targeting and differential subcellular localization of various NuMA isoforms. *J Cell Sci* 107:1389-1402.
- Tang TK, Tang CJ, Chen YL, Wu CW (1993). Nuclear proteins of the bovine esophageal epithelium. II. The NuMA gene gives rise to multiple mRNAs and gene products reactive with monoclonal antibody W1. *J Cell Sci* 104:249-260.
- Tariq Z, Phinney RC, Mohamed I (2013) A Case of Life-Threatening Retinoic Acid Syndrome and Review of Literature. *Am J Ther.* 22;3:125
- Tawfic S, Olson M, Ahmed K (1995). Role of protein phosphorylation in post-translational regulation of protein B23 during programmed cell death in the prostate gland. *J Biol Chem* 270:21009-21015.
- Testa JR, Misawa S, Ogurema N, Van Slaten K, Wiernik PH (1985) Chromosomal alterations in acute leukemia patients. Studies with improved culture methods. *Cancer Res.* 45, p. 430-434.
- Testi AM, Biondi A, Lo Coco F, et al. (2005) GIMEMA-AIEOP AIDA protocol for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL) in children. *Blood*, 106:447-453.
- Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al (2006) Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 107:4011–4020.
- Tocci A, Parolini I, Gabbianelli M et al (1996). Dual action of retinoic acid on human embryonic/fetal hematopoiesis: blockade of primitive progenitor proliferation and shift from multipotent/erythroid/monocytic to granulocytic differentiation program. *Blood* 88:2878–2888.
- Vahdat L, Maslak P, Miller WH Jr, Eardley A, Heller G, Scheinberg DA, Warrell RP Jr (1994). Early mortality and the retinoic acid syndrome in acute promyelocytic leukemia: impact of leukocytosis, low-dose chemotherapy, PMN/RAR-alpha isoform, and CD13 expression in patients treated with all-trans retinoic acid. *Blood* 84(11):3843-9.
- Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Díaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A (1999) Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*, v. 13, n. 12, p. 1901-28.
- Van Limbergen H, Poppe B, Michaux L, Herens C, Brown J, Noens L *et al.* (2002) Identification of cytogenetics subclasses and recurring chromosomal aberrations in AML and MDS with complex karyotypes using M-FISH. *Genes Chromosome Cancer*, 33:60-72.
- Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, et al (2005) Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. 106:3747–3754.
- Villamor N, Costa D, Aymerich M, Esteve J, Carrió A, Rozman M, Aguilar JL, Falini B, Montserrat E, Campo E, Colomer D (2000). Rapid diagnosis of acute promyelocytic leukemia by analyzing the immunocytochemical pattern of the

- PML protein with the monoclonal antibody PG-M3. *Am J Clin Pathol* 114(5):786-92.
- Wang Z-Y and Chen Z (2008). Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 111:2505-2515.
- Weise A, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Pool-Zobel BL, *et al.* (2003) Multitude multicolor chromosome banding (mMCB) – a comprehensive one-step multicolor FISH banding method. *Cytogenet Genome Res*,103:34–9.
- Weise A, Mrasek K, Fickelscher I, Claussen U, Cheung SW, Cai WW, Liehr T, Kosyakova N (2008). Molecular definition of high-resolution multicolor banding probes: First within the human DNA sequence anchored FISH banding probe set. *J Histochem Cytochem.*, 56(5)487-93.
- Wells RA, Catzavelos C, Kamel-Reid S (1997). Fusion of retinoic acid receptor alpha to NuMA, the nuclear mitotic apparatus protein, by a variant translocation in acute promyelocytic leukaemia. *Nat Genet* 17:109-113.
- Wiegand U, Chou R (1998). Pharmacokinetics of oral isotretinoína. *J Amer Acad Dermatol* 39:S8-12.
- Witte T de, Oosterveld M, Span B, Muus P, Schattenberg A (2002) Stem cell Transplantation for leukemias following myelodysplastic syndromes or secondary to cytotoxic therapy. *Rev Clin Exp Hematol* 6:72-85.
- Wolkoff AG (2005). Dicionário Ilustrado de Termos Médicos e Saúde. In: Editora Rideel, 1ª edição.
- Yamada K, Sugimoto E, Amano M, Imamura Y, Kubota T, Matsumoto M (1983). Two cases of acute promyelocytic leukemia with variant translocations: the importance of chromosome No. 17 abnormality. *Cancer Genet Cytogenet* 9:93-99.
- Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Kiyoi H, Naoe T (2005) Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia*. 19: 1345-1349.
- Yang CH, Lambie EJ, Snyder M (1992). NuMA: an unusually long coiled-coil related protein in the mammalian nucleus. *J Cell Biol* 116:1303-1317.
- Yeyati PL, Shaknovich R, Boterashvili S, Li J, Ball HJ, Waxman S, Nason-Burchenal K, Dmitrovsky E, Zelent A, Licht JD (1999). Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene* 18:925-934.
- Yoshida H, Naoe T, Fukutani H, Kiyoi H, Kubo K, Ohno R (1995). Analysis of the joining sequences of the t(15;17) translocation in human acute promyelocytic leukemia: sequence non-specific recombination between the PML and RARA genes within identical short stretches. *Genes Chrom Cancer* 12:37-44.
- Zaccaria A, Valenti A, Toschi M, Salvucci M, Cipriani R, Ottaviani E, Martinelli G (2002) Cryptic translocation of PML/RARA on 17q. A rare event in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 15;138(2):169-73.
- Zatsepina OV, Rousselet A, Chan PK, Olson MO, Jordan EG, Bornens M (1999). The nucleolar phosphoprotein B23 redistributes in part to the spindle poles during mitosis. *J Cell Sci* 112:455-466.
- Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht JD (2001). Translocations of the RARa gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 20:7186-7203.
- Zeng C, He D, Brinkley BR (1994). Localization of NuMA protein isoforms in the nuclear matrix of mammalian cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 29:167-176.
- Zhong S, Muller S, Ronchetti S, Freemont PS, Dejean A, Pandolfi PP (2000). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95:2748-2752.

- Zhu J, Heyworth CM, Glasow A et al (2001). Lineage restriction of the RARa gene expression in myeloid differentiation. *Blood* 98:2563-2567.
- Zhu M, John S, Berg M, Leonard WJ (1999). Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFNgamma-mediated signaling. *Cell* 96:121-130.
- Zweyer M, Riederer BM, Ochs RL, Fackelmayer FO, Kohwi-Shigematsu T, Bareggi R, Narducci P, Martelli AM (1997). Association of nuclear matrix proteins with granular and threaded nuclear bodies in cell lines undergoing apoptosis. *Exp Cell Res* 230:325-336.

9. Anexos

Anexo 1 (Aprovação CEP)



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
COMPLEXO HOSPITALAR HUOC/PROCAPE

Reunião: 18/10/2010

Protocolo CEP – HUOC/PROCAP: nº 83/2011
CAAE: 0078.0.117.000-11

Projeto: Leucemia Promielocítica Aguda na infância: estudo cromossômico, molecular, investigação da ocorrência de mutações nos genes FLT3 e NPM1 e sua importância prognóstica.

Pesquisador Principal: Maria Tereza Cartaxo Muniz

Resultado:

- Resultado do Projeto – APROVADO após corrigir as pendências

Recife, 05 de Novembro de 2011

Magaly Bushatsky
Vice-coordenadora
CEP-HUOC/PROCAPE

Pavilhão Ovídio Montenegro – 1º andar
Rua Arnóbio Marques, 310 – Santo Amaro – 50100-130 – Recife-PE.
Fone: (81) 3184.1460 – Fone/Fax: (81) 3184.1271 - E-mail: cep_huoc.procape@yahoo.com.br

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo cromossômico consecutivo multicêntrico da Leucemia Mielóide Aguda da Infância

Nome do Voluntário:

Você, em breve, será submetido a um estudo citogenético. Por isso está sendo convidado a participar de uma pesquisa que envolve análise cromossômica de células de aspirado de medula óssea ou de sangue periférico.

Os estudos citogenéticos são coadjuvantes no diagnóstico morfológico e de um fator de risco de recaída da doença. Além disso, estes estudos são a base fundamental para detectar genes envolvidos na leucemogênese e contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde inclui o diagnóstico citogenético de pacientes com hemopatias malignas para classificar o diagnóstico clínico e o risco de recaída da doença.

Este estudo contribuirá como desenvolvimento clínico, diagnóstico e experimental dos pacientes com leucemia mielóide aguda da infância.

Para você decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DO ESTUDO

Descrever os grupos com alterações citogenéticas dos pacientes pediátricos com LMA, correlacionando-os com os aspectos clínicos e prognósticos.

Detectar a porcentagem de anomalias cromossômicas da LMA na infância. Correlacionar as anomalias cromossômicas presentes no diagnóstico com a evolução da doença. Caracterizar anomalias variantes através de processos moleculares.

PROCEDIMENTO DO ESTUDO

Se você concordar em participar deste estudo citogenético será coletado 2 amostras do seu aspirado de medula óssea, pelo procedimento de punção de medula óssea ou sangue periférico numa quantidade variante de 5 a 10 mililitros (referente a uma colher de sopa) para serem submetidas a exame de citogenética. A amostra de aspirado de medula óssea ou sangue periférico será encubado e será cultivada, a partir deste material, uma cultura celular, onde o objetivo é obter metáfases, as quais serão devidamente estudadas, por microscopia óptica, apontando as anomalias cromossômicas envolvidas na LMA da infância.

Para exames envolvidos neste estudo será utilizada uma parte do material (sangue) obtido para realização de exames rotineiros.

RISCOS

O seu tratamento será o mesmo caso você participe ou não deste estudo. A coleta de aspirado de medula óssea ou sangue periférico para o estudo coincidirá com a coleta de aspirado de medula óssea ou sangue periférico para os exames rotineiros de forma a não ser prevista punção de medula óssea ou de sangue adicional. Essas punções para exames laboratoriais, que são parte de seu tratamento regular, podem resultar em dor no local da punção ou manchas rochas transitórias chamadas de equimoses. No entanto, essas coletas de material não oferecem maior risco à sua saúde, uma vez que, são realizadas por profissionais especializados. Dessa forma, não há risco adicional aos existentes para os exames de rotina durante o tratamento padrão ou nenhum risco adicional conhecido.

BENEFÍCIOS

O estudo citogenético será de grande relevância para o seu tratamento, pois permitirá o fornecimento de indicação diferencial de diagnóstico e escolha de tratamento apropriado para o risco da doença e possibilita a cura da doença.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital Oswaldo Cruz e equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano recorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente pela sua participação no estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

O médico responsável por sua internação pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização.

AUTORIZAÇÃO DE MENOR

Nos casos em que o paciente for menor de idade os pais ou responsáveis também deverão concordar com a participação do menor neste estudo. Sendo estes consultados e devidamente esclarecidos sobre os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios do estudo.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Qualquer dúvida poderá ser esclarecida com os responsáveis pelo estudo: Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz (81 9905-6802) e Bethânia de Araújo Silva Amaral (81 9984-8348) – Laboratório de Citogenética Humana e Biologia Molecular/CEONHPE; Hospital Universitário Oswaldo Cruz (81 2101-1536) e Comitê de Ética (81 3184-460). Se o Sr(a) tiver perguntas com relação aos direitos do seu filho(a) como participante desta pesquisa, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial, o coordenador do Comitê de Ética do Hospital Universitário Oswaldo Cruz Dr. Wilson Oliveira - Av. Arnóbio Marques s/n.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA
(Paciente Maior de 18 anos)

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

Recife, _____ de _____ de 20____

Assinatura do Paciente

Nome do Paciente (letra de forma)

Assinatura de testemunha (se necessário)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento)

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA
(Paciente Menor de 18 anos)

Através deste termo e após os esclarecimentos devidos quanto ao tratamento a ser submetido o (a) menor _____, na condição de seu responsável legal, concordo com o respectivo tratamento, consciente dos riscos, vantagens e possíveis efeitos adversos que possam ser resultantes do mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Desta maneira, apresento meu livre consentimento para que o (a) paciente acima indicado (a) participe do referido tratamento.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

Recife, _____ de _____ de 20____

Assinatura do responsável pelo paciente

Nome do responsável pelo paciente (letra de forma)

(Assinatura de testemunha, se necessário)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

Assinatura da pessoa que obteve o consentimento

Anexo 3

A new complex variant t(9;17;15)(q21.11;q21;q24) in a pediatric Acute Promyelocytic Leukemia.

**Bethânia de Araújo Silva Amaral^{1, 4*}, Samarth S. Bhatt², Thomas Liehr³,
Eliane Maria Soares-Ventura⁴, Terezinha de Jesus M. Salles⁴, Maria Luiza M.
Silva⁵, Maria Tereza Cartaxo Muniz⁶, Neide Santos¹**

¹ Federal University of Pernambuco (UFPE), Genetics Department, Recife, Pernambuco, Brazil.

² Samarth's institute

³ Institute for Human Genetic, Universitätsklinikum Jena, Germany

⁴ Pediatric Oncohematology Center (CEONHPE), University Hospital Oswaldo Cruz (HUOC), University of Pernambuco (UPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

⁵ Nacional Institute of Cancer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

⁶ Institute of Biology Sciences, University of Pernambuco (UPE), Recife, Pernambuco, Brazil

Keywords: Acute Promyelocytic Leukemia in Childhood, variant translocation,

***Corresponding author:**

Bethânia de Araújo Silva Amaral

Departamento de Genética, CCB/UFPE,

Av. da Engenharia, s/n Cidade Universitária

CEP: 50740-600

Recife, Pernambuco, Brasil.

Phone: (+55081) 2126-8520, Fax: (81)2126-8569

E-mail: bas_amaral@yahoo.com.br

INTRODUCTION

Acute promyelocytic leukemia (APL), AML M3 under French-American-British (FAB) classification, is a entity specifically associated with the acquired translocation $t(15;17)(q24;q21)$ [1]. This reciprocal translocation leads the disruption of *PML* (promyelocytic leukemia gene) and retinoic acid receptor alpha gene (*RAR α*), localized on 15q and 17q respectively [2]. The formation of the PML-RARA chimeric protein plays a vital role in determining the phenotype of this illness, taking part in the characteristic differentiation block by acting on repression of genes involved in myelopoiesis process, which is overwhelm by treatment with high doses of retinoic acid [3,4]. However, it's known that a small group of patients present variant translocations. This report present a tree way complex variant $t(9;17;15)(q21.11;q21;q24)$ in a case of pediatric APL studied by FISH (fluorescent *in situ* hybridization) and MCB (multicolor banding).

MATERIAL AND METHODS

Patient

A 6-year-old boy was admitted to the Pediatric Oncohematology Center of University Hospital Oswaldo Cruz with a history of intense bleeding after dental extraction that showed no clinical improvement after suture and evolved with weakness, fatigue, fever and rectal bleeding. The peripheral blood examination evidenced severe anemia with 2.0g/dL of hemoglobin and hematocrit 5.9%. Physical examination revealed hepatosplenomegaly and bilateral lymphadenomegaly of submandibular region. White blood cell count was $37.67 \times 10^9/L$ and his platelet count was $23 \times 10^9/L$. Morphological examination in bone marrow was compatible with classical promyelocytic morphological characteristics including abundant Auer rods. Flow cytometry analysis revealed that the blasts were positive for CD13, CD33, CD45, and MPO markers, but negative for CD15, CD34, and HLA-DR markers. The patient's coagulation tests reveled prothrombin time of 18.1 s, activated partial thromboplastin time of 30.6 s and international normalized ratio (INR) 1.36. The patient was treated according to the PETHEMA

LPA 2005 protocol. In intensive care, he received aggressive blood product support (platelet, fibrinogen and red blood cells replacements) and started ATRA, Idarubicin and Cytarabine and Dexamethasone. However his clinical condition evolved with fever (38,9°C) and worsening of the respiratory status with airways bleeding and suspected of developing ATRA syndrome. The chest X-rays evidenced diffuse focal infiltrate. Amikacin, Fluconazole, Azithromycin, Tazobactam and Sulfamethoxazole were added to therapy and the patient was sedated and intubated in the second day of his hospital stay in the intensive care unit. At the end of the third day in intensive care the patient succumbed and died.

Chromosomal Analysis

The bone marrow culture was performed as previously described by Silva *et al.* (2002) [5] and G-banding for chromosomal identification was performed according to standard protocols, and the karyotype was described following the International System for Human Cytogenetic Nomenclature [6].

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) experiment on metaphase spreads was performed using the PML/RAR α Translocation Probe Two Color Direct Labelled (Aquarius Probes), according to the manufacturer's instructions. Whole chromosome painting (WCP) probes for chromosomes 9, 15 and 17 and probes obtained from bacterial artificial chromosomes (BAC) for the chromosomal regions 9q13, 9q21.11, 9q21.2, and 9q21.33 (RP11-561O23, RP11-430C15, RP11-574G7 and RP11-65B23, in that order). Multicolor chromosome banding (MCB) was performed for chromosomes 9, 15 and 17 as previously reported [7]. The BAC, WCP and MCB probes were produced and labeled in the Molecular Cytogenetics Laboratory of the Institute of Human Genetics, Jena, Germany. The procedures were performed as previously described [8].

RESULTS

The G-banding cytogenetic analysis defined the karyotype as 46,XY,-9,t(15;17),+mar[11]/46,XY,t(15;17)[6]/46,XY[3] (fig. 1a). FISH analyses confirmed the PML-RAR α gene fusion, but instead of two fusion signals as expected seeing in essays with a duo fusion probe for PML/RAR α rearrangement, our patient showed in most of cells only one fusion signal. The application of whole

chromosome painting for chromosomes 9 (DEAC, for blue signal), 15 (biotin + streptavidin-FITC, for green signal) and 17 (digoxigenin + anti digoxigenin-rhodamine, for red signal) revealed that the marker chromosome was a derivative chromosome 9 involved in a tree way translocation among this chromosomes (9, 15 and 17) (figure 1b). Performing multicolor chromosome banding for chromosomes 9 (8 pcp), 15 (6 pcp) and 17 (7 pcp) we could ascertain the breakpoints for chromosomes 15 and 17, but 9 wasn't accurated (9q~13~21) (figure 2). Therefore, FISH with specific bacterial artificial chromosome probes for chromosome 9 (RP11-561O23, RP11-430C15, RP11-574G7 and RP11-65B23) were used to determine the breakpoint region on this chromosome which has been shown to be 9q21.11(figure 3). Thus the final karyotype was redefined as 46,XY,t(9;15;17)(q21.11;q21;q24)[11]/ 46,XY,t(15;17)[6]/46,XY[3].

DISCUSSION

Although the hallmark of APL is the t(15;17) accounting for more than 90% of APL cases [9], several complex variant translocations have been reported in APL with tree-way or more complex rearrangements. Recurrent breakpoints have been recognized among these translocations, such as 1q36, 11q13, 2q21, 3p21, 4q21, 6q23, 19p13, 20p13, Xq13 [10-18]. To our knowledge, this case is the first that reports a tree-way translocation involving the band 9q21 in APL. In general patients with simple variant translocations, such as t(11;17)(q23;q21), t(11;17)(q13;q21) and t(5;17)(q32;q21) [19-21], do not respond to conventional treatment regimens with ATRA, with regard to treatment outcome, on the other hand almost all APL cases with complex translocations harboring PML/RARA fusion have shown no difference when compared with typical APL cases with t(15;17), in which current treatment of APL with all-transretinoic acid in combination with an anthracycline is very effective [22]. Unfortunately, our patient evolved to a fatal denouement in few days.

The role of chromosome translocations other than t(15;17) in APL is still unclear and additional studies are required to clarify the effectiveness of treatment and prognosis in APL with complex variant translocations [23]. Further identification of *loci* involved in complex translocations would help to elucidate new candidate genes that could potentially affect the prognosis of APL.

This case also demonstrates the importance of combining a variety of methods, such as cytogenetic and FISH analyses, for better diagnose atypical chromosome translocations in APL.

Acknowledgment

The authors thank all who contributed to this work, patients and their families and the Grupo de Apoio à Criança com Câncer (GAC). This study was supported by FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Stock AD, Dennis TR and Spallone PA. Precise localization by microdissection/reverse ISH and FISH of the t(15;17)(q24;q21.1) chromosomal breakpoints associated with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* (2000) 119:15-17.
- [2] de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Jejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* (1990) 347:558-61.
- [3] Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E, Grimwade D. The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev.* 2003;17:71-97.
- [4] Sanz MA, Iacoboni G, Montesinos P. Acute promyelocytic leukemia: do we have a new front-line standard of treatment? *Curr Oncol Rep.* (2013) 15(5):445-9.
- [5] Silva MLM, Land M, Heller A, Abdelhay E, Oliveira MSP, Ribeiro R, Lerner D, Liehr T. New reagent t(3;17)(q26.3;q12) in an AML patient with poor outcome. *Oncology Reports.* 2005; 3:663-666.
- [6] ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Shaffer LG, McGowan-Jordan J and Schmid M, editors. S. Karger Medical and Scientific Publishers. Cytogenetic and Genome Research, 2013.
- [7] Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U: Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med* 2002; 9:335–339.
- [8] Weise A, Mrasek K, Fickelscher I, Claussen U, Cheung SW, Cai WW, Liehr T, Kosyakova N: Molecular definition of high-resolution multicolor banding probes: first within the human DNA sequence anchored FISH banding probe set. *J Histochem Cytochem* 2008; 56:487–493.
- [9] Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, et al: Management of acute promyelocytic leukemia: Recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2008;113:1875-1891,
- [10] Park JP, Fairweather RB. Complex t(1;15;17) in acute promyelocytic leukemia with duplication of RAR alpha and PML sequences. *Cancer Genet Cytogenet.* 1996;89:52–6.
- [11] Chen Z, Morgan R, Stone JF, Sandberg AA. Identification of complex t(15;17) in APL by FISH. *Cancer Genet Cytogenet.* 1994;72:73–4. doi:10.1016/0165-4608(94)90114-7.
- [12] Fujishima M, Takahashi N, Miura I, et al. A PML/RAR chimeric gene on chromosome 2 in a patient with acute promyelocytic leukemia (M3) associated with a new variant translocation: t(2;15;17)(q21;q22;q21). *Cancer Genet Cytogenet.* 2000;120:80–2.
- [13] Ogawa S, Mitani K, Sato Y, et al. Detection of the PML/RAR alpha fusion gene in acute promyelocytic leukemia with a complex translocation involving chromosomes 15, 17, and 18. *Cancer Genet Cytogenet.* 1993;69:113–7.
- [14] Liu S, Li Q, Pang W, et al. A new complex variant t(4;15;17) in acute promyelocytic leukemia: fluorescence in situ hybridization confirmation and literature review. *Cancer Genet Cytogenet.*

- [15] Brunel V, Lafage-Pochitaloff M, Alcalay M, Pelicci PG, Birg F. Variant and masked translocations in acute promyelocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1996;22:221–8.
- [16] Saitoh K, Miura I, Kobayashi Y, et al. A new variant translocation of $t(15;17)$ in a patient with acute promyelocytic leukemia (M3): $t(15;19;17)(q22;p13;q12)$. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998;102:15–8.
- [17] Yamamoto K, Hamaguchi H, Nagata K, Kobayashi M, Takashima T, Taniwaki M. A new complex translocation $(15;20;17)(q22;p13;q21)$ in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998;101:89–94.
- [18] Wan TS, Chim CS, So CK, Chan LC, Ma SK. Complex variant 15;17 translocations in acute promyelocytic leukemia. A case report and review of three-way translocations. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999;111:139–43.
- [19] Chen SJ, Zelent A, Tong JH, Yu HQ, Wang ZY, Derre J, et al. Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from $t(11;17)(q23;q21)$ in a patient with acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest*. 1993;91:2260–7.
- [20] Wells RA, Catzavelos C, Kamel-Reid S. Fusion of retinoic acid receptor α to NuMA, the nuclear mitotic apparatus protein, by a variant translocation in acute promyelocytic leukaemia. *Nat Genet*. 1997;17:109–13.
- [21] Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA, Corey SJ. The $t(15;17)$ variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin–retinoic acid receptor fusion. *Blood*. 1996;87:882–6.
- [22] Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Miyoshi K, Azuma T, Sakai I, Yasukawa M. A new four-way variant $t(5;17;15;20)(q33;q12;q22;q11.2)$ in acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol*. 2011;94(4):395–398.
- [23] Freeman CE, Mercer DD, Ye Y, Van Brunt-III J, Li MM. Cytogenetic and molecular characterization of complex tree-way translocations in acute promyelocytic leukemia. *J Pekin Univ*. 2009;41(4):477–479.

FIGURES

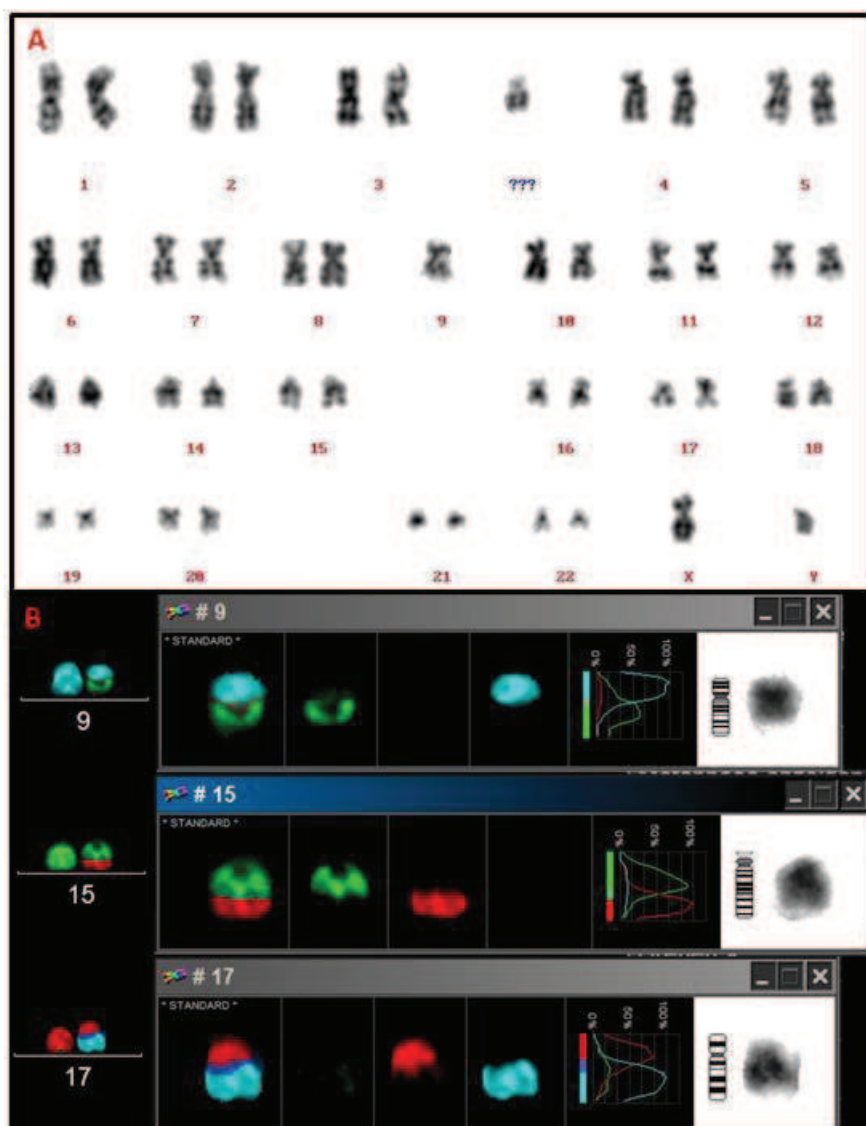


Figure 1: a) G-banded karyogram of the patient, showing 46,XY,-9,t(15;17),+mar.
b) FISH with WCP probes for chromosomes 9, 15 e 17.

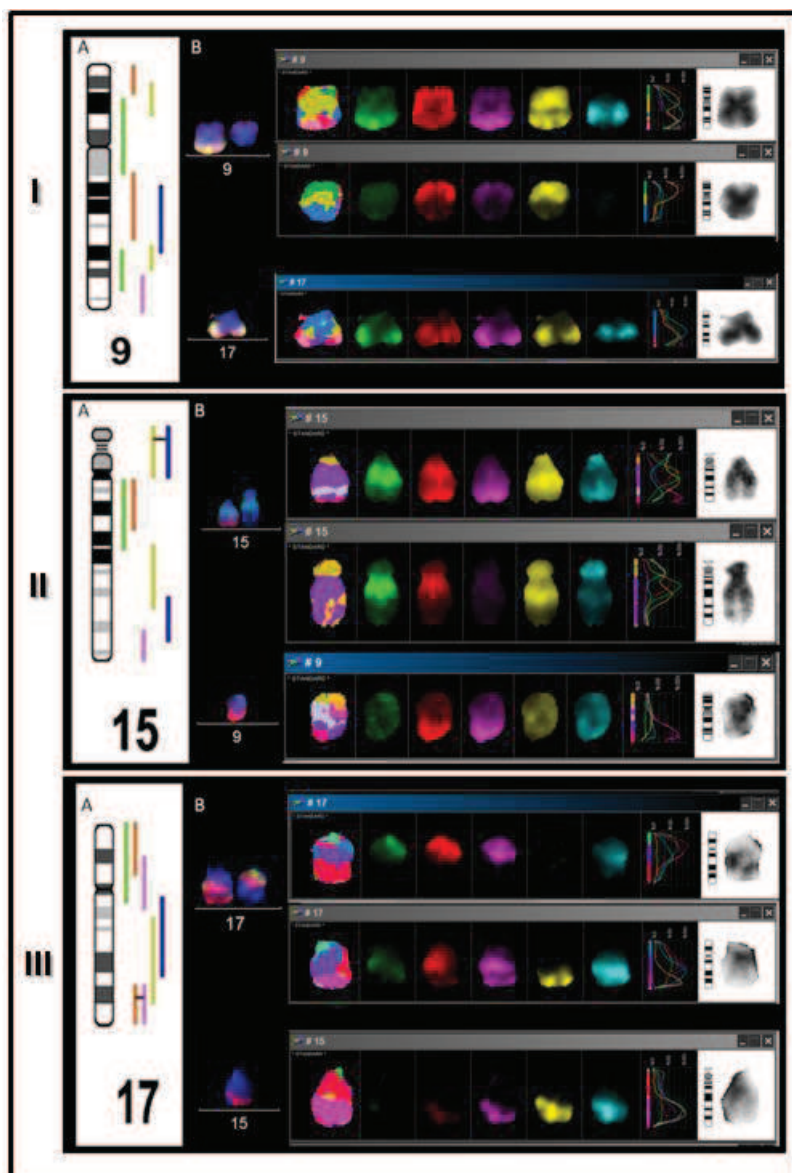


Figure 2: (I) MCB 9 a) diagram for MCB9 labeling, b) results for MCB9; (II) MCB 15 a) diagram for MCB15 labeling, b) results for MCB 15; (III) MCB 17 a) diagram for MCB17 labeling, b) results for MCB 17.

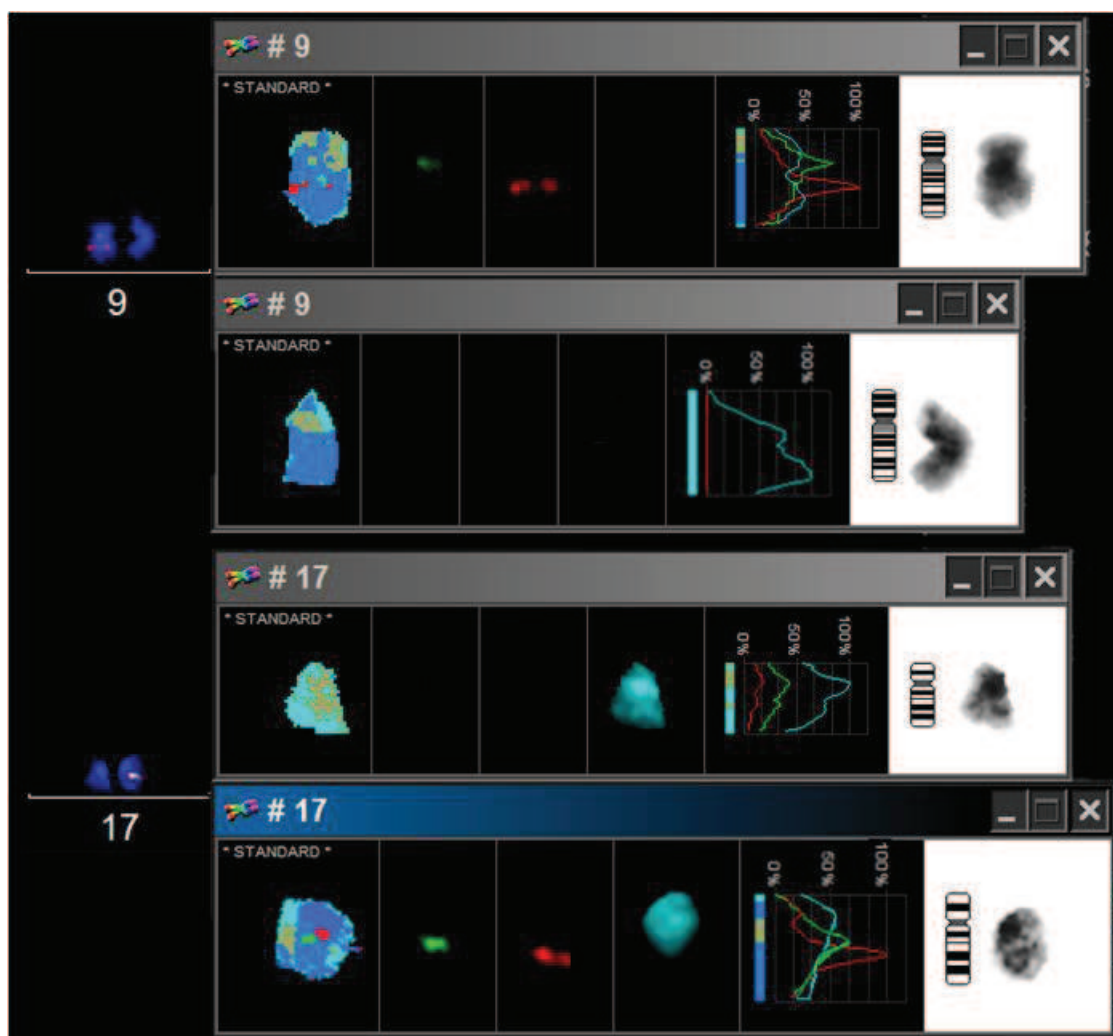


Figure 3: FISH with BAC probes to regions 9q13 (RP11-561O23 in red) e 9q21.11 (RP11-430C15 in green) and WCP for 17 (DEAC in blue).

10. Curriculum vitae (Lattes)

An Unusual Cytogenetic Rearrangement Originating from Two Different Abnormalities in Chromosome 6 in a Child with Acute Promyelocytic Leukemia

R.R.C. Matos^{a, b} H. Mkrchyan^f B.A. Amaral^{c, d} T. Liehr^f M.T. de Souza^{a, b}
D.R. Ney-Garcia^{a, b} N. Santos^c T.J. Marques-Salles^e R.C. Ribeiro^g
A.F. Figueiredo^{a, b} M.L.M. Silva^{a, b}

^aBone Marrow Unit, Cytogenetics Department and ^bPost-Graduation Program in Oncology, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, and ^cDepartment of Genetics and ^dPost-Graduation Program in Genetics, Department of Genetics, Federal University of Pernambuco and ^eLaboratory of Human Cytogenetics, Pediatric Oncohematology Center, University Hospital Oswaldo Cruz, Recife, Brazil; ^fInstitute of Human Genetics, Jena University Hospital, Jena, Germany; ^gDepartment of Oncology and International Outreach Program, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tenn., USA

Key Words

Childhood acute promyelocytic leukemia · Cryptic cytogenetic abnormality · *PML-RARα* · Secondary chromosome changes

Abstract

Acute promyelocytic leukemia (APL) is usually associated with a favorable outcome, but about 10% of patients tend to relapse. The genetic hallmark of APL is a balanced translocation involving chromosomes 15 and 17, and the *PML-RARα* gene fusion is found in more than 90% of these cases. Other chromosomal abnormalities are commonly found in APL, but their clinical significance has yet to be determined. Here we report a case of childhood APL that was studied by conventional cytogenetics along with molecular cytogenetic techniques. The patient showed a complex karyotype with an unusual cytogenetic rearrangement originating from two different abnormalities in a single chromosome 6. Our case is an exceptional example of a cryptic cytogenetic anomaly in APL and underscores the importance of detailed genetic characterization.

Copyright © 2013 S. Karger AG, Basel

Introduction

Acute promyelocytic leukemia (APL) is characterized by the accumulation of promyelocytes in the bone marrow and peripheral blood and is often accompanied by disseminated intravascular coagulation [1, 2]. Distinct from other acute myeloid leukemia subtypes, APL is usually associated with a favorable outcome with long-term disease-free survival approaching 80%. For the 20% of patients whose outcome is not favorable, early complications cause mortality in 10%, and disease relapse or drug resistance affects the other 10%. Prompt diagnosis and early initiation of treatment are critical to lowering the risk of early mortality [3]. Factors associated with specific therapeutic failure are not well established.

The genetic hallmark of APL is a balanced translocation involving chromosomes 15 and 17, *t*(15;17)(q22;q21), which results in the fusion of the promyelocytic leukemia (*PML*) gene with the retinoic acid receptor (*RARα*) gene [2]. The *PML-RARα* gene fusion is found in more than 90% of the cases of APL [2]. Other translocations involving the *RARα* gene account for the remaining APL cases.

© S. Karger AG, Basel

PROOF Copy
for personal
use only

ANY DISTRIBUTION OF THIS
ARTICLE WITHOUT WRITTEN
CONSENT FROM S. KARGER
AG, BASEL IS A VIOLATION
OF THE COPYRIGHT.

Additional chromosomal abnormalities are commonly found in APL cases with t(15;17), but their clinical significance remains elusive. In leukemias and myelodysplasia in general, deletions or translocations involving a breakpoint at the 6p region have been associated with a dismal prognosis [4]. In APL, 6p abnormalities have been described in only two cases [4].

Here we report a case of childhood APL that showed an unusual cytogenetic rearrangement originating from two different abnormalities in a single chromosome 6. The response to therapy of this patient and others reported with a similar abnormality does not support the idea that 6p and 6q abnormalities have adverse implications in APL.

Material and Methods and Case Report

From May 2006 to March 2012 we received samples from 67 children with acute myeloid leukemia. Twenty-six (38.8%) of these patients had APL with the characteristic t(15;17)(q22;q21). Among these APL cases, 5 (19.2%) showed secondary chromosomal anomalies including 1 with cryptic abnormalities in a single chromosome 6.

Case Report

A 10-year-old boy was admitted to the Service of Pediatric Oncohematology of Lagoa's Hospital with a history of intense bleeding after dental extraction and pancytopenia. Physical examination revealed petechiae and widespread hematomas. His white blood cell count was $2.93 \times 10^9/l$ and his platelet count was $11 \times 10^9/l$. Morphological examination of his bone marrow showed a hypercellular content with 95% blast cells, 84% of these with classical promyelocytic morphological characteristics including abundant Auer rods. Staining of the leukemia cells was intensive with both myeloperoxidase and Sudan black B stains. Flow cytometry analysis revealed that the blasts were positive for CD13, CD33, CD38, and CD117 markers, but negative for CD15, CD34, and HLA-DR markers. The patient's coagulation profile test confirmed normal clotting function. His prothrombin time was 14.5 s; international normalized ratio was 1.02, and activated partial thromboplastin time was 29.9 s. His fibrinogen level was not available at diagnosis. There was no clinical evidence of disseminated intravascular coagulation. The patient was treated according to the AML-BFM-2004 protocol. He achieved complete remission and has remained in remission for 15 months.

Conventional Cytogenetics

Cytogenetic analysis was performed at presentation on bone marrow cells according to standard protocols, and the karyotype was described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature [5].

Molecular Cytogenetics

We performed fluorescence in situ hybridization (FISH) experiments on metaphase spreads, using the LSI *PML/RARα* probe (Abbott™), according to the manufacturer's instructions, whole

chromosome painting probes for chromosome 6, partial chromosome painting probes for 6qter and 6pter, and probes obtained from bacterial artificial chromosomes for the chromosomal regions 6p23-6p22.3, 6p24.1, 6p21.3, and 6q16.3 (RP1-232K4, RP11-97A19, RP11-174N13, and RP11-1145D19). The whole chromosome painting and partial chromosome painting probes were produced and labeled in the Molecular Cytogenetics Laboratory of the Institute of Human Genetics, Jena, Germany. The procedures were performed as previously described [6]. Multicolor chromosome banding was done for chromosome 6 as previously reported [7].

Results

The G-banding cytogenetic analysis defined the karyotype as 46,XY,-6, t(15;17)(q22;q21),+mar in 21 of the 23 metaphases analyzed (fig. 1a). FISH analyses confirmed the *PML-RARα* gene fusion (fig. 1b). The application of multicolor chromosome banding and FISH with specific bacterial artificial chromosome probes for chromosome 6 showed that the marker chromosome was a derivative chromosome 6 and presented two different chromosomal aberration types (fig. 1c-e). Thus the final karyotype was redefined as 46,XY, t(15;17)(q22;q21),inv(6)(p24;q15)[10]/46,XY, t(15;17)(q22;q21),der(6)(p21.3>6q16.1)[4].

Discussion

Current treatment of APL with all-*trans* retinoic acid in combination with an anthracycline is very effective in inducing remission and eradicating APL. More than 90% of patients newly diagnosed with APL achieve remission. However, about 10% of the patients in remission eventually relapse. Prognostic factors associated with treatment failure have included biological features such as persistent disease after consolidation, high WBC count at diagnosis, FLT3 ITD mutations, and bcr3 transcripts.

Although secondary cytogenetic abnormalities occur in about 30% of cases of APL, their prognostic importance has not been determined, and these additional cytogenetic abnormalities are often complex [8, 9]. The techniques of molecular cytogenetics make possible a better clarification of complex karyotypes, such as the one we present here, providing critical information along with a more accurate diagnosis and prognostic markers [10]. According to published data, 6p rearrangements occur preferentially with other chromosomal events. Only a few cases with chromosome 6 abnormalities have been confirmed to have cryptic t(15;17) rearrangements,

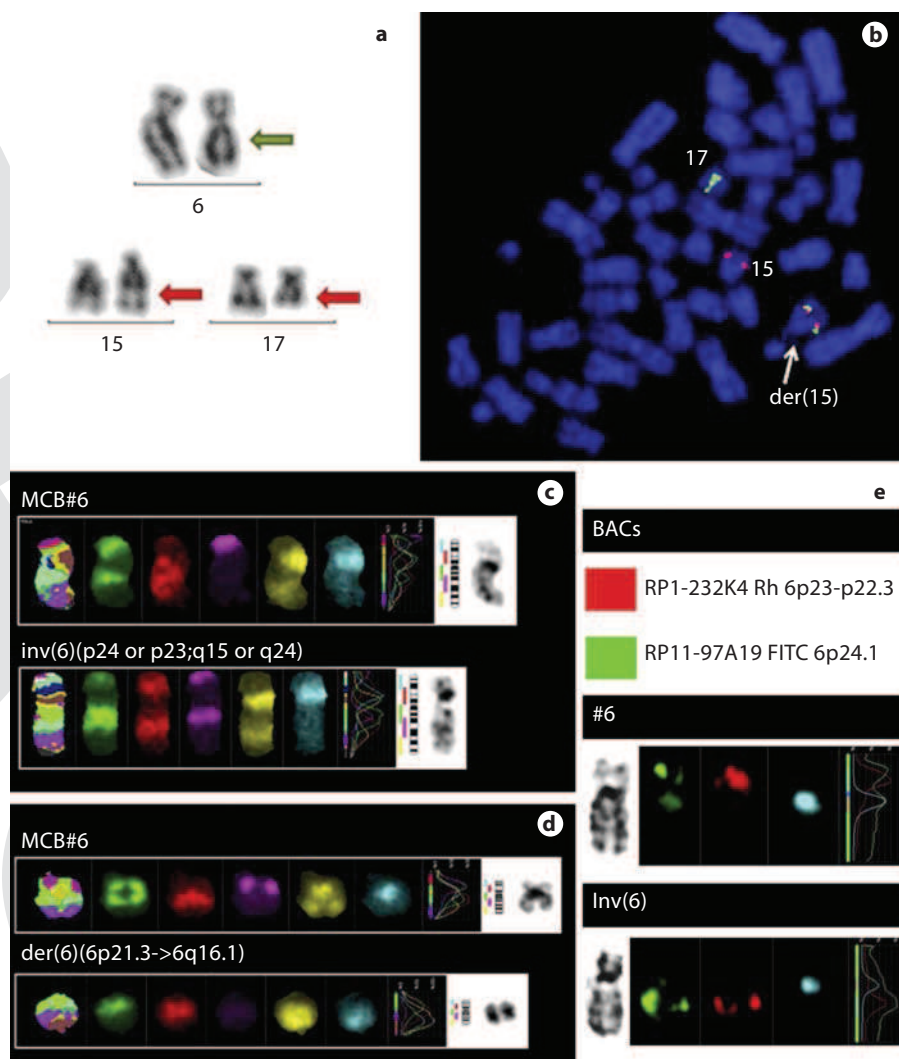


Fig. 1. **a** Translocation (15;17)(q22;q21) and marker chromosome (G-banding). **b** Application of LSI *PML/RARα* probe revealed fusion. **c** Inv(6)(p24 or p23;q15 or q24) and **d** der(6)(6p21.3->6q16.1) were described using multicolor chromosome banding probe for chromosome 6. **e** Bacterial artificial chromosomes for the chromosomal regions: 6p23-6p22.3 in red (rhodamine), 6p24.1 in green (FITC), and centromeric region in turquoise (DEAC).

and only 2 previously reported cases involved the 6p region [4].

We present an interesting observation in which conventional cytogenetics showed only two chromosomal changes, including the t(15;17) and a marker chromosome. However, molecular approaches showed that one of these two chromosomes 6 presented an inversion and a deletion. Our case is an exceptional example of a cryptic cytogenetic anomaly in APL and underscores the importance of detailed cytogenetic characterization of APL cases. It is possible that when many patients are systematically tested and uniformly treated, prognostic markers might be identified. Outcome data from our patient and those [4] reported with a similar abnormality do not suggest that secondary abnormalities in chromosome 6 are associated with adverse prognosis.

Acknowledgments

The authors acknowledge with gratitude the help of Tarsis Pava Vieira and Dr. Eliana Abdelhay. This work was supported by the Stefan Morsch Stiftung (Germany); the Monika Kutzner Stiftung (Germany); the German Academic Exchange Service (DAAD) (BRA 07/039); CAPES (project No. 301/08); Pro-Vita nonprofit organization; CNPq and FAPERJ (project No.E-26/110:899/2009); the International Outreach Program and the American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC), St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, Tenn., USA), and a Center of Excellence Grant, State of Tennessee.

References

- 1 Zhang T, Westervelt P, Hess JL: Pathologic, cytogenetic and molecular assessment of acute promyelocytic leukemia patients treated with arsenic trioxide (As₂O₃). *Mod Pathol* 2000;13:954–961.
- 2 Zimonjic DB, Pollock JL, Westervelt P, Popescu NC, Ley JT: Acquired, nonrandom chromosomal abnormalities associated with the development of acute promyelocytic leukemia in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13306–13311.
- 3 Lo-Coco F, Sanz M: Whole-genome sequencing and acute promyelocytic leukemia. *JAMA* 2011;306:610–611.
- 4 Nakase K, Wakita Y, Minamikawa K, Yamaguchi T, Shiku H: Acute promyelocytic leukemia with del(6)(p23). *Leuk Res* 2000;24:79–81.
- 5 Shaffer L, Slovak ML, Campbell LJ: ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, Karger, 2009.
- 6 Weise A, Mrasek K, Fickelscher I, Claussen U, Cheung SW, Cai WW, Liehr T, Kosyakova N: Molecular definition of high-resolution multicolor banding probes: first within the human DNA sequence anchored FISH banding probe set. *J Histochem Cytochem* 2008;56:487–493.
- 7 Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U: Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med* 2002;9:335–339.
- 8 Mitelman F, Heim S: *Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberration of Tumor Cells*, ed 3. Hoboken, Wiley-Blackwell, 2009.
- 9 Zhang L, Zhu X: Epidemiology, diagnosis and treatment of acute promyelocytic leukemia in children: the experience in China. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012;4:e2012012.
- 10 De Figueiredo AF, Vieira TP, Liehr T, Bhatt S, de Souza MT, Binato R, Marques-Salles TJ, Carboni E, Riberiro RC, Silva MLM, Abdelhay E: A rare cryptic and complex rearrangement leading to MLLMLLT10 gene fusion masked by del(10)(p12) in a child with acute monoblastic leukemia (AML-M5). *Leuk Res* 2012;36:e74–e77.



Bethânia de Araújo Silva Amaral

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8758235957720206>

Última atualização do currículo em 16/02/2014

Atua principalmente nos seguintes temas: Citogenética clássica e molecular no estudo da Leucemia Mielóide Aguda (LMA), Leucemia Promielocítica Aguda (LMA-M3) da Infância; Biologia Molecular (marcadores prognósticos); Estudo Citogenético Molecular de alterações complexas em leucemias infantis; Emprego do anticorpo monoclonal PG-M3 no diagnóstico da LPA. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Bethânia de Araújo Silva Amaral 
Nome em citações bibliográficas AMARAL, B. A. S.; de Araújo Silva Amaral, Bethania; AMARAL, B.A.S.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2010

Doutorado em andamento em Genética (Conceito CAPES 3).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
 Título: Leucemia Promielocítica Aguda na infância: estudo cromossômico, molecular, investigação da ocorrência de mutações nos genes FLT3 e NPM1 e sua importância prognóstica,
 Orientador: Neide Santos.
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco.
 Palavras-chave: Leucemia Promielocítica Aguda (LPA); Bandeamento G; Biologia Molecular; Diagnóstico Genético; Mutações FLT3 e NPM1; Prognóstico.
 Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Humana e Médica.
 Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico; Atividades de atenção à saúde humana.

2007 - 2009

Mestrado em Genética (Conceito CAPES 3).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
 Título: Leucemia Promielocítica Aguda da Infância: caracterização de alterações por citogenética clássica e molecular, anticorpo monoclonal (PG-M3) e biologia molecular, Ano de Obtenção: 2009.
 Orientador:  Neide Santos.
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
 Palavras-chave: Leucemia Promielocítica Aguda (LPA); Diagnóstico Genético; Bandeamento G; Anticorpo Anti-PML (PG-M3).
 Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Humana e Médica.
 Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico; Atividades de atenção à saúde humana.

2003 - 2007

Graduação em Bacharelado em Biomedicina.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
 Título: Análise das alterações cromossômicas na Leucemia Mielóide Aguda (LMA) em pacientes do Centro de Oncologia Pediátrica do Hospital Oswaldo Cruz

(CEON/HUOC/UPE).

Orientador: Neide Santos.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Formação Complementar

2012 - 2013	Estágio prático de doutorado sanduiche. (Carga horária: 1000h). Friedrich-Schiller-Universität Jena.
2005 - 2005	Extensão universitária em Curso de Citogenética Humana no Diag. do Cancer. (Carga horária: 40h). Universidade de Pernambuco, UPE, Brasil.
2004 - 2004	Extensão universitária em Curso de Extensão em Técnicas de Biologia Molecular. (Carga horária: 30h). Universidade de Pernambuco, UPE, Brasil.
2004 - 2004	Curso de atualização em análise genética humana. (Carga horária: 30h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Humana e Médica/Especialidade: CITOGÊNETICA HUMANA.

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Espanhol	Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

1. ★ MATOS, R.R.C. ; MKRTCHYAN, H. ; **AMARAL, B.A.S.** ; LIEHR, T. ; DE SOUZA, M.T. ; NEY-GARCIA, D.R. ; SANTOS, N. ; MARQUES-SALLES, T.J. ; RIBEIRO, R.C. ; FIGUEIREDO, A.F. ; SILVA, M.L.M. . An Unusual Cytogenetic Rearrangement Originating from Two Different Abnormalities in Chromosome 6 in a Child with Acute Promyelocytic Leukemia. Acta Haematologica **JCR**, v. 130, p. 23-26, 2013.
2. ★ BARROS, J.E.X.S. ; SOARES-VENTURA, E.M. ; SANTOS, N. ; **AMARAL, B.A.S.** ; OLIVEIRA, F.M. ; VERA CRUZ, R.S. ; MORAIS, V.L.L. ; MARQUES-SALLES, T.J. ; MUNIZ, M.T.C. . Case Report New cytogenetic aberrations found in a case of aggressive retinoblastoma. Genetics and Molecular Research **JCR**, v. 11, p. 1666-1670, 2012.
3. ★ Soares-Ventura, Eliane Maria ; Mkrtychyan, Hasmik ; de Jesus Marques-Salles, Terezinha ; Silva, Mariluze ; Santos, Neide ; **AMARAL, B. A. S.** ; Liehr, Thomas ; Abdelhay, Eliana ; Silva, Maria Luiza Macedo ; Muniz, Maria Tereza Cartaxo . Molecular cytogenetics reveals complex karyotype in apparent t(8;13) therapy-related acute myeloid leukemia M2 after fibrosarcoma. Leukemia Research **JCR**, v. 35, p. e27-e29, 2011.
4. MARQUES-SALLES, T. J. ; SOARES, E. M. A. ; SANTOS, N. ; **AMARAL, B. A. S.** ; SILVA, M. L. M. ; LEITE, E. P. ; SILVA, M. O. ; CARTAXO-MUNIZ, M. T. ; RIBEIRO, R. C. ; MORAIS, V. L. L. . Secondary Acute Myeloid Leukemia with

the Translocation (1;11)(q23;p15) in an Adolescent Treated for Testicular Sarcoma, in press. Cancer Genetics and Cytogenetics **JCR**, v. 169, p. 83-85, 2006.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. OLIVEIRA, N. L. ; MARQUES-SALLES, T. J. ; SOARES, E. M. A. ; SANTOS, N. ; **AMARAL, B. A. S.** ; MORAIS, V. L. L. ; LEITE, E. P. ; SILVA, M. ; PUREZA, L. . Estudo Citogenético da Leucemia Mielóide Crônica na Infância em Pacientes Atendidos no CEON/HUOC/UPE. In: XVII Encontro de Genética do Nordeste (ENGENE), 2006, Recife. XVII Encontro de Genética do Nordeste. v. CD-ROM. p. 00-00.

Resumos publicados em anais de congressos

1. SOARES-VENTURA, E. M. ; MRKTCHYAN, H. ; MARQUES-SALLES, T. J. ; BARROS, J. E. X. S. ; NOGUEIRA-CORNÉLIO, M.T.M. ; **AMARAL, B. A. S.** ; HERNANDES, M. A. F. ; LIEHR, T. ; SILVA, M. L. M. ; CARTAXO-MUNIZ, M. T. . Estudo Citogenético e Molecular em Cariótipos Complexos na Leucemia Aguda da Infância. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011, São Paulo. HEMO 2011 - Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011.

2. **AMARAL, B. A. S.** ; SOUZA, M. T. ; BARROS, J. E. X. S. ; SOARES-VENTURA, E. M. ; SILVA, M. O. ; ARAUJO, S. ; NOGUEIRA-CORNÉLIO, M.T.M. ; CARTAXO-MUNIZ, M. T. ; MARQUES-SALLES, T. J. ; SILVA, M. L. M. . Estudo Citogenético das Alterações Secundárias no Linfoma de Burkitt/LLA-L3. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011, São Paulo. HEMO 2011 - Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011.

3. MARQUES-SALLES, T. J. ; SANTOS, N. ; SOARES-VENTURA, E. M. ; **AMARAL, B. A. S.** ; CARTAXO-MUNIZ, M. T. ; SILVA, E. F. ; NOGUEIRA, M. T. M. ; BHATT, S. ; LIEHR, T. ; SILVA, M. L. M. . Down Syndrome AML-M0 with ring chromosome 7 defined by molecular cytogenetics studies. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011, São Paulo. HEMO 2011 - Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011.

4. ★ FIGUEIREDO, A. F. ; SOUZA, M. T. ; MARQUES-SALLES, T. J. ; NEY GARCIA, D. R. ; MRKTCHYAN, H. ; **AMARAL, B. A. S.** ; LIEHR, T. ; BOUZAS, L. F. ; ABDELHAY, E. ; SILVA, M. L. M. . Cytogenetic Profile of Childhood Acute Myeloid in Brazil. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2009, 2009, Florianópolis. Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2009, 2009.

5. HERNANDES, M. A. F. ; SOARES-VENTURA, E. M. ; MARQUES-SALLES, T. J. ; SANTOS, N. ; LEITE, E. P. ; CARTAXO-MUNIZ, M. T. ; BARROS, J. E. X. S. ; **AMARAL, B. A. S.** ; NOGUEIRA-CORNÉLIO, M.T.M. . Estudos Citogenéticos e Moleculares da Fusão ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) na Leucemia Linfóide Aguda da Infância no CEONHPE-HUOC/UPE. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2009, 2009, Florianópolis. Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2009, 2009.

6. ★ SOARES-VENTURA, E. M. ; MARQUES-SALLES, T. J. ; NOGUEIRA-CORNÉLIO, M.T.M. ; BARROS, J. E. X. S. ; **AMARAL, B. A. S.** ; SANTOS, N. ; LEITE, E. P. ; CARTAXO-MUNIZ, M. T. ; SILVA, M. L. M. . Citogenética Molecular na Detecção de rearranjos específicos na leucemia Aguda Pediátrica no CEONHPE-HUOC/UPE. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2009, 2009, Florianópolis. Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2009, 2009.

7. SOARES-VENTURA, E. M. ; MARQUES-SALLES, T. J. ; BARROS, J. E. X. S. ; **AMARAL, B. A. S.** ; CARTAXO-MUNIZ, M. T. ; SILVA, M. L. M. . Hibridização in situ Fluorescente Detectou a Fusão ETO/AML1 na t(8;15)(q22;q15) em um caso de Leucemia Mielóide Aguda (LMA-M2) da Infância. In: Citogenética Molecular na Detecção de rearranjos específicos na leucemia Aguda Pediátrica no CEONHPE-HUOC/UPE, 2009, Florianópolis. Citogenética Molecular na Detecção de rearranjos específicos na leucemia Aguda Pediátrica no CEONHPE-HUOC/UPE, 2009.

8. **AMARAL, B. A. S.** ; MARQUES-SALLES, T. J. ; SOARES-VENTURA, E. M. ; NOGUEIRA-CORNÉLIO, M.T.M. ; SILVA, M. L. M. ; CARTAXO-MUNIZ, M. T. ; SILVA, M. ; MAFRA, M. F. ; SILVA, E. F. ; LEITE, E. P. . Estudo Citogenético Convencional e Molecular na Leucemia Promielocítica Aguda na Infância. In: XI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, 2008, Gramado. XI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, 2008.

9. **AMARAL, B. A. S.** ; SOARES-VENTURA, E. M. ; MARQUES-SALLES, T. J. ; SILVA, M. L. M. ; CARTAXO-MUNIZ, M. T. ; MAFRA, M. F. ; SANTOS, N. . Leucemia Promielocítica Aguda: Caracterização de Alterações por Citogenética Clássica e Molecular, Anticorpo Monoclonal (PG-M3) e Biologia Molecular. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador. 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

- 10. AMARAL, B. A. S. ;** MARQUES-SALLES, T. J. ; SOARES, E. M. A. ; SANTOS, N. ; OLIVEIRA, N. L. ; MORAIS, V. L. L. ; LEITE, E. P. ; SILVA, M. ; PUREZA, L. . Perfil Citogenético dos Pacientes com LMA Infantil, Atendidos no Centro de Oncologia do Hospital Oswaldo Cruz (CEON/HUOC/UPE) de Janeiro de 2004 a Dezembro de 2005.. In: XVII Encontro de Genética do Nordeste, 2006, Recife-PE. XVII Encontro de Genética do Nordeste, 2006. v. CD-Rom. p. 00-00.
- 11. SOARES-VENTURA, E. M. A. ;** MARQUES-SALLES, T. J. ; VENTURA, F. L. ; CAMPOS, G. ; **AMARAL, B. A. S. ;** SANTOS, N. ; NOGUEIRA, M. T. M. . Investigação das Alterações Cromossômicas em Pacientes Atendidos no Laboratório de Citogenética da Clínica de Genética Humana - Recife/PE. In: XVII Encontro de Genética do Nordeste, 2006, Recife-PE. XVII Encontro de Genética do Nordeste, 2006. v. CD-Rom. p. 00-00.
- 12. Marília B. do Nascimento ;** Rodrigo P. de Lima ; **AMARAL, B. A. S. ;** Romero H. T. Vasconcelos ; Mônica W. P. de Carvalho . Esclerose tuberosa ou Síndrome de Bourneville-Pringle. In: VI Congresso de Ensino e Extensão (CEPE) da UFPE, 2006, Recife. VI Congresso de Ensino e Extensão (CEPE) da UFPE, 2006.
- 13. AMARAL, B. A. S. ;** SANTOS, N. . Análise das alterações cromossômicas na leucemia mielóide aguda (LMA) em pacientes do centro de oncologia do hospital oswaldo cruz (CEON/HUOC/UPE). In: XIV Congresso de Iniciação Científica da UFPE, 2006, Recife. XIV Congresso de Iniciação Científica da UFPE, 2006.
- 14. OLIVEIRA, N. L. ;** SOARES, E. M. A. ; SANTOS, N. ; **AMARAL, B. A. S. ;** MORAIS, V. L. L. ; LEITE, E. P. ; SILVA, M. ; PUREZA, L. ; CARTAXO-MUNIZ, M. T. ; MELLO, G.S.V. ; MARQUES-SALLES, T. J. . Perfil Citogenético e Molecular da Leucemia Mielóide Crônica na Infância em Pacientes Atendidos no CEON/HUOC/UPE. In: 52º Congresso Brasileiro de Genética, 2006, Foz do Iguaçu. 52º Congresso Brasileiro de Genética, 2006.
- 15. OLIVEIRA, N. L. ;** SOARES-VENTURA, E. M. ; **AMARAL, B. A. S. ;** SANTOS, N. ; MORAIS, V. L. L. ; LEITE, E. P. ; CARTAXO-MUNIZ, M. T. ; SILVA, M. ; MARQUES-SALLES, T. J. . Características Clínicas e Biológicas de Crianças com Doença Mieloproliferativa Crônica Atendidos no CEONHPE. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2006, 2006, Recife. Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2006, 2006.
- 16. SOARES-VENTURA, E. M. ;** SANTOS, N. ; SILVA, M. L. M. ; **AMARAL, B. A. S. ;** OLIVEIRA, N. L. ; LEITE, E. P. ; SILVA, M. ; FERREIRA, E. ; MORAIS, V. L. L. ; MARQUES-SALLES, T. J. . Estudo das Alterações Cromossômicas nas Leucemias Agudas em Pacientes Atendidos no Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2006, 2006, Recife. Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2006, 2006.
- 17. SOARES-VENTURA, E. M. ;** SANTOS, N. ; **AMARAL, B. A. S. ;** MARQUES-SALLES, T. J. . ISO 6p Confere Diagnóstico e Prognóstico ao Retinoblastoma. In: X Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, 2006, Salvador. X Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, 2006.
- 18. AMARAL, B. A. S. ;** SANTOS, N. ; SOARES, E. M. A. ; MARQUES-SALLES, T. J. ; CARTAXO-MUNIZ, M. T. ; MORAIS, V. L. L. ; LEITE, E. P. ; SILVA, M. ; PUREZA, L. . Estudo Citogenético da Leucemia Mielóide Aguda (LMA) da infância (CEON/HUOC/UPE).. In: 51 Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia - SP. 51 Congresso Brasileiro de Genética, 2005. v. CD Rom. p. 00-00.
- 19. SOARES, E. M. A. ;** MARQUES-SALLES, T. J. ; SANTOS, N. ; **AMARAL, B. A. S. ;** PUREZA, L. ; CARTAXO-MUNIZ, M. T. ; RAMOS, F. J. C. ; MORAIS, V. L. L. ; SILVA, M. ; FERREIRA, E. . Citogenética, Biologia Molecular e Imunofenotipagem Aplicados ao Estudo da Leucemia Mielóide Aguda (LMA) da Infância em Pacientes do CEON/HUOC. In: 28 Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2005, Rio de Janeiro-RJ. 28 Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2005. v. v. 27. p. 78-79.
- 20. SOARES, E. M. A. ;** SANTOS, N. ; SILVA, M. L. M. ; MARQUES-SALLES, T. J. ; **AMARAL, B. A. S. ;** LEITE, E. P. ; SILVA, M. ; DAGDAN, E. ; CARTAXO-MUNIZ, M. T. ; MORAIS, V. L. L. . Estudo Citogenético Consecutivo de Crianças portadoras de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) do Centro de Oncologia Pediátrica/HUOC. In: 28 Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2005, Rio de Janeiro-RJ. 28 Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2005. v. 27. p. 81-82.
- 21. SILVA, M. ;** SOARES, E. M. A. ; MARQUES-SALLES, T. J. ; PUREZA, L. ; SANTOS, N. ; RAMOS, F. J. C. ; LEITE, E. P. ; **AMARAL, B. A. S. ;** ARAUJO, S. ; MORAIS, V. L. L. . Alterações Citogenéticas em Leucemia Mielóide Aguda Secundária ao Tratamento de Tumores Sólidos - Relato de 03 Casos. In: 28 Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2005, Rio de Janeiro-RJ. 28 Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2005. v. 27. p. 72-73.
- 22. SOARES, E. M. A. ;** SANTOS, N. ; SILVA, M. L. M. ; LEITE, E. P. ; SILVA, M. ; **AMARAL, B. A. S. ;** DAGDAN, E. ; CARTAXO-MUNIZ, M. T. ; MORAIS, V. L. L. ; MARQUES-SALLES, T. J. . Estudo citogenético consecutivo de crianças

portadoras de leucemia linfoblástica aguda (LLA) do centro de oncologia pediátrica - HUOC. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2005, 2005, Rio de Janeiro. Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2005, 2005.

Bancas

Participação em bancas de trabalhos de conclusão

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. **AMARAL, B. A. S.**. Participação em banca de Camila Buarque Cavalcanti. Perfil clínico-citogenético das crianças com leucemia mielóide aguda atendidas no CEONHPE-HUOC/UPE. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade de Pernambuco.
2. **AMARAL, B. A. S.**; CALIXTO, M.; SOARES-VENTURA, E. M.. Participação em banca de Cristiane Vasconcelos Chaves. Investigação genotóxica do fármaco antiparasitário Praziquantel utilizado no tratamento da esquistossomose. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.
3. HERNANDES, MAF; **AMARAL, B. A. S.**. Participação em banca de Marina Araújo Fonzar Hernandez. ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR DA FUSÃO GÊNICA ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) NA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA DA INFÂNCIA NO CEONHPE/HUOC-UPE. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade de Pernambuco.
4. LOURENÇO, SFG; **AMARAL, B. A. S.**. Participação em banca de Suellen Fernanda Gomes Lourenço. ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO CROMOSSOMO 9 E ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS EM PACIENTES COM SUSPEITA DE SÍNDROME DE TURNER. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco.
5. SANTOS, N.; **AMARAL, B. A. S.**. Participação em banca de Kleison da Costa Merlo. Avaliação Genotóxica do Fármaco Antiparasitário Albendazol (Zentel) Através do Teste de Micronúcleo. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 54º Congresso Brasileiro de Genética. Leucemia Promielocítica Aguda: Caracterização de Alterações por Citogenética Clássica e Molecular, Anticorpo Monoclonal (PG-M3) e Biologia Molecular. 2008. (Congresso).
2. 54º Congresso Brasileiro de Genética. Leucemia Promielocítica Aguda: Caracterização de Alterações por Citogenética Clássica e Molecular, Anticorpo Monoclonal (PG-M3) e Biologia Molecular. 2008. (Congresso).
3. XVII Encontro de Genética do Nordeste (ENGINE). Perfil Citogenético dos Pacientes com LMA Infantil, Atendidos no Centro de Oncologia do Hospital Oswaldo Cruz (CEON/HUOC/UPE) de Janeiro de 2004 a Dezembro de 2005. 2006. (Congresso).
4. XIV Congresso de Iniciação Científica da UFPE. Análise das alterações cromossômicas na leucemia mielóide aguda (LMA) em pacientes do centro de oncologia do hospital oswaldo cruz (CEON/HUOC/UPE). 2006. (Congresso).
5. I Congresso Regional de Microbiologia Clínica. 2005. (Congresso).

6. 51º Congresso Brasileiro de Genética. 51º Congresso Brasileiro de Genética. 2005. (Congresso).
7. XXXI Congresso Brasileiro de Análises Clínicas. 2004. (Congresso).
8. IV Congresso Brasileiro de Citologia Clínica. 2004. (Congresso).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 16/02/2014 às 23:12:35

[Imprimir currículo](#)