



Ministério da Saúde
Instituto Nacional do Câncer
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia

**Mecanismos Moleculares subjacentes à Morte Precoce e à
Resistência ao ATRA na Leucemia Promielocítica Aguda**

DANIELLE TAVARES VIANNA

Orientadoras: Dra. Ilana Zalcborg Renault e Dra. Maria do Socorro Pombo
Co-orientadora: Dra. Bárbara C. R. Monte-Mór

Rio de Janeiro
2015

**Mecanismos Moleculares subjacentes à Morte Precoce e à Resistência ao
ATRA na Leucemia Promielocítica Aguda**

DANIELLE TAVARES VIANNA

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação *Stricto Sensu*
em Oncologia do Instituto
Nacional do Câncer como parte
dos requisitos necessários para
a obtenção do título de Mestre
em Oncologia

Orientadoras: Dra. Ilana Zalcborg Renault e Dra. Maria do Socorro Pombo

Co-orientadora: Dra. Bárbara C. R. Monte-Mór

Rio de Janeiro

2015

ii

FICHA CATALOGRÁFICA

V617m Vianna, Danielle Tavares.
Mecanismos molecular subjacentes à morte precoce e à resistência ao ATRA na leucemia promielócítica aguda/ Danielle Tavares Vianna. – Rio de Janeiro, 2015.
85p.; il.; tab.

Dissertação (Mestrado em Oncologia)– Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2015.

Orientador (as): Dr^a Illana Zalcborg Renault.
Dr^a Maria do Socorro Pombo.

Co-Orientador (a): Bárbara C. R. Monte-Mór.

1. Leucemia Promielocítica Aguda. 2. Mutação. 3. Morte Precoce. 4. ATRA. I. Renault, Illana Zalcborg (Orient.). II. Pombo, Maria do Socorro (Orient.). Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99419

**Mecanismos Moleculares subjacentes à Morte Precoce e à Resistência ao
ATRA na Leucemia Promielocítica Aguda**

DANIELLE TAVARES VIANNA

Orientadoras: Dra. Ilana Zalcborg Renault e Dra. Maria do Socorro Pombo

Co-orientadora: Dra. Bárbara C. R. Monte-Mór

Rio de Janeiro, 26 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Membro: Dra. Eliana Abdelhay
Instituto Nacional do Câncer - RJ

Membro: Dra. Sima Ferman
Instituto Nacional do Câncer - RJ

Membro: Dra. Elaine Sobral da Costa
Universidade Federal do Rio de Janeiro - RJ

Suplente interno: Dr. Martin Bonamino
Instituto Nacional do Câncer - RJ

Suplente externo: Dra. Cristiana Solza
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – RJ

*Aos meus pais: Iara Tavares Vianna
e Dejalmir Vianna*

AGRADECIMENTOS

Ao meu mestre e melhor amigo, Jesus.

Aos meus pais, Iara e Dejalmir, por me amarem tanto e sempre estarem perto.

À Fabiane, minha irmã e amiga fiel.

Ao Alessandro, por me ajudar a manter o foco.

À Dra. Ilana Zalcborg, por acreditar em mim e, principalmente, por ser uma companhia tão agradável.

À Dra. Bárbara Monte-Mór, pelo imenso carinho e pelos incontáveis ensinamentos.

À Dra. Maria do Socorro, pela confiança e respeito.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação, Diego Coutinho, Simone Bonecker, Maíra Carneiro e Suelen Valladares que em tempo e em fora de tempo estavam disponíveis para me socorrer.

Às Dra. Paola Cappelletti e Dra. Luciana Gutiyama, pela amizade e pela disponibilidade incessante em ajudar.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do CEMO, Telma, Jackline, Natália, Andréia, Gustavo, Michele, Marininha, Lili, Victor, Fátima, Luiza e Carol que contribuíram muito para tornar esse projeto real.

Ao Dr. Martin Bonamino, pelo apoio e pelas excelentes discussões científicas.

À Dra. Sima Ferman, pelo carinho e imediato incentivo.

Às Dra. Maria Ourinda e Dra. Soraia Rouxinol, por serem mais do que chefes, grandes amigas e incentivadoras.

Às minhas amigas de trabalho que se esforçaram arduamente para que eu pudesse concretizar esse projeto: Daniela Leite, Amanda Fonte, Bianca Santanna, Simone Maia, Cristina Wiggers, Ana Letícia Shoulders, Ludimilla Coutinho, Rinara Grossi, Ângela Tarnapolsky, Juliana, Patrícia, Ana Paula, Emilly, Mitsue, Fernanda Jordy e Anna Beatriz Willemes,

Às médicas Alice Azevedo, Ana Paula Bueno, Adriana Martins, Elaine Sobral e Renata Pereira por me ensinarem muito mais do que hematologia pediátrica.

Aos meus amados familiares e amigos, em especial ao amigo Carlos e família, pelo apoio constante.

Aos pacientes e seus responsáveis, pela confiança e esperança.

RESUMO

Apesar do sucesso da terapia com Ácido All-*Trans* Retinóico (ATRA) nos pacientes portadores de leucemia promielocítica aguda (LPA), ainda existem questões clínicas relevantes a serem solucionadas. A morte precoce é um evento que acomete até 30% dos pacientes recém-diagnosticados com LPA, assim como a recidiva da doença pode ser vista em cerca de ¼ dos pacientes. Dessa forma, possíveis mecanismos moleculares subjacentes a esses eventos têm sido investigados. A presença da mutação *FLT3-ITD* ao diagnóstico parece estar relacionada à maior incidência de desfechos clínicos desfavoráveis, sobretudo morte precoce. Recentes trabalhos têm associado mutações no gene *FLT3* à coagulopatia – principal causa de morte na indução nos pacientes com LPA. Todavia, a forte associação da mutação *FLT3-ITD* com valores mais altos de leucometria ao diagnóstico ($\geq 10.000 \times 10^3/\text{mm}^3$) – classicamente um marcador de mau prognóstico – tem dificultado a análise precisa do papel preditivo da mutação *FLT3-ITD* nesta população. Adicionalmente, possíveis mecanismos de resistência celular ao processo de diferenciação induzido pelo ATRA poderiam estar relacionados à pior evolução clínica. Escassos estudos têm apontado que mutações pontuais no domínio de ligação do ATRA no gene *RAR α* detectadas no momento de recaída estão relacionadas à resistência secundária ao ATRA. Entretanto, essas mutações não foram amplamente investigadas em casos de pacientes que evoluíram com morte precoce – como possível causa de resistência primária ao ATRA. Além disso, o valor preditivo da carga do transcrito *PML-RAR α* detectada ao diagnóstico e em diferentes fases do tratamento ainda é incerto na evolução clínica desses pacientes, sobretudo na população pediátrica. Sendo assim, o objetivo principal desse trabalho foi avaliar a correlação entre achados laboratoriais e moleculares (carga do transcrito *PML-RAR α* , leucometria, presença de mutações *PR α /LBD+* no gene *RAR α* , presença de mutações no gene *FLT3*) e a resposta do paciente à terapia com ATRA+QT. Foi avaliada a frequência da mutação *FLT3-ITD* que se revelou maior no grupo de pacientes com desfecho clínico desfavorável, sobretudo entre os pacientes com morte precoce. A mediana da leucometria no grupo *FLT3-ITD* positivo foi significativamente maior quando comparado ao grupo de pacientes negativos para mutação, corroborando com os dados da literatura que afirmam a forte associação entre as variáveis. Não foram encontradas mutações no LBD no gene *RAR α* em nenhum dos pacientes com morte precoce, assim como também não foram encontradas mutações nos pacientes recidivados. Isso sugere que outros mecanismos possam estar na base dessa possível resistência ao ATRA. Como demonstrado em outras coortes, a carga do transcrito *PML-RAR α* ao diagnóstico revelou-se maior entre os pacientes com pior evolução clínica, porém também sem força estatística suficiente para associação entre as variáveis. Sendo assim, os resultados encontrados sugerem que novas análises do perfil molecular dos pacientes com leucemia promielocítica aguda, sobretudo em coortes maiores, podem contribuir para que estratégias terapêuticas sejam incorporadas ao tratamento dos pacientes com LPA, reduzindo a incidência dos casos morte precoce e de recaída da doença.

ABSTRACT

Despite the success of therapy with All-Trans Retinoic Acid (ATRA) in patients with acute promyelocytic leukemia (APL), there are still relevant clinical issues to be resolved. Early death is an event that affects up to 30% of newly diagnosed patients with APL, as well as the recurrence of the disease can be seen in about a quarter of patients. Therefore, molecular mechanisms underlying these events have been investigated. The presence of the *FLT3-ITD* mutation at diagnosis appears to be related to a higher incidence of adverse clinical outcomes, especially early death. Recent studies have associated mutations in the *FLT3* gene with coagulopathy - leading cause of death in the induction in patients with APL. However, the strong association of *FLT3-ITD* mutation with higher values of white blood cell count at diagnosis ($\geq 10,000 \times 10^3 / \text{mm}^3$) - classically a worse prognostic marker - has made it difficult to accurately analyze the predictive role of *FLT3-ITD* mutation in this population. In addition, possible mechanisms of resistance to the process of differentiation induced by ATRA could be related to worse clinical outcome. Few studies have shown that mutations in the ATRA-binding domain in the *RAR α* gene detected in relapse time are related to secondary resistance to ATRA. However, these changes have not been widely investigated in cases of patients who developed early death - as a possible cause of primary resistance to ATRA. In addition, the predictive value of the load of *PML-RAR α* transcript detected at diagnosis and at different stages of treatment is uncertain in outcome of these patients, especially in children. Thus, the aim of this study was to evaluate the correlation between laboratory and molecular findings (load *PML-RAR α* transcript, white blood cell count, presence of *PR α* / *LBD* + mutations in the *RAR α* gene, and presence of mutations in the *FLT3* gene) and the patient's response to therapy with ATRA + chemotherapy. In this cohort, the frequency of *FLT3-ITD* mutation was evaluated and it have been wider in patients with unfavorable clinical outcome, particularly among patients with early death. The median white blood cell count in *FLT3-ITD* positive group was significantly higher compared to the group of patients negative for mutation, confirming the data in the literature that affirm the strong association between variables. Mutations were not found in the *LBD* in the *RAR α* gene in the patients with early death, as we did not find mutations in relapsed patients. This suggests that other mechanisms may underlie this possible resistance to ATRA. As demonstrated in other cohorts, the burden of *PML-RAR α* transcript at diagnosis proved to be higher among patients with worse clinical outcome, but also without sufficient statistical power for association between the variables. Thus, the results suggest that further analysis of the molecular profile of patients with acute promyelocytic leukemia, especially in larger cohorts, may contribute to therapeutic strategies are incorporated into the treatment of patients with APL, reducing the incidence of cases of early death and disease relapse.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
ÍNDICE.....	ix
LISTA DE QUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO:.....	18
1.1. Resposta e resistência ao tratamento com ATRA.....	23
1.2. Avaliação de resposta ao ATRA por quantificação de <i>PML-RARα</i>	28
1.3. Associação entre mutações no gene <i>FLT3</i> e morte precoce.....	30
2. OBJETIVOS.....	40
2.1. Objetivo principal.....	40
2.2. Objetivos secundários.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1. Pacientes e amostras.....	41
3.2. Processamento das amostras.....	43
3.2.1. PCR Qualitativo para detecção do gene <i>PML-RARα</i>	455
3.2.2. PCR Quantitativo em Tempo Real (RQ-PCR) dos transcritos <i>PML-RARα</i>	47
3.2.2.1. Padronização do ensaio e Preparação do plasmídeo:.....	47
3.2.2.2. Quantificação Absoluta dos níveis de <i>PML-RARα</i> :.....	522
3.2.3. Identificação de mutações no gene <i>RARα</i>	53
3.2.4. Identificação de mutações no gene <i>FLT3</i>	55
3.2.4.1. Análise quantitativa de <i>FLT3</i> :.....	55

3.2.5. Análise estatística e Avaliação de resposta à quimioterapia e ATRA.....	56
4. RESULTADOS.....	57
4.1. Casuística.....	57
4.2. Correlação entre carga do transcrito <i>PML-RARα</i> , resposta ao tratamento com QT +ATRA e leucometria ao diagnóstico.....	59
4.3. Distribuição da frequência de mutações FLT3-ITD e sua correlação com resposta ao tratamento com QT +ATRA, isoforma e carga do transcrito <i>PML-RARα</i> e leucometria ao diagnóstico.....	61
4.4. Frequência das mutações no domínio de ligação do ATRA no gene <i>RARα</i>	64
5. DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÕES.....	71
7. REFERÊNCIAS.....	72
8. ANEXOS.....	82
8.1 Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INCA, número de protocolo #186.688.....	82
8.2 Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INCA, número de protocolo #939.795.....	83
8.3 Biorrepositório para leucemia mieloide aguda: protocolo de desenvolvimento	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Descrição do perfil dos 2 bancos de dados analisados	41
Quadro 2	<i>Primers</i> utilizados para a amplificação das isoformas bcr1, bcr2 e bcr3 do gene de fusão <i>PML-RARα</i>	45
Quadro 3	Sequências e posições dos <i>primers</i> e da sonda para realização do <i>RQ-PCR</i> do gene de fusão <i>PML-RARα</i>	53
Quadro 4	Descrição do perfil dos 2 bancos de dados analisados Sequências e posições dos <i>primers</i> e da sonda para realização do <i>RQ-PCR</i> do gene de fusão <i>PML-RARα</i>	54
Quadro 5	<i>Primers</i> utilizados para a amplificação dos éxons 14 e 15 do gene <i>FLT3</i> para identificação de mutações <i>ITD</i>	56
Quadro 6	Sumário dos trabalhos realizados para investigação de mutações no LBD do gene <i>RARα</i>	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Representação esquemática da t(15;17)(q22;q21).	19
Figura 1.2	Estrutura química do ATRA (a), 13-cRA (b) e 9-cRA (c)	24
Figura 1.3	Sinalização molecular via ácido retinóico	25
Figura 1.4	Mecanismos potenciais da diferenciação induzida pelo ATRA na LPA	27
Figura 1.5	Esquema ilustrando a estrutura e função do gene <i>FLT3</i> , incluindo os sítios mais comuns das mutações ativadoras	31
Figura 1.6	Estrutura e ativação do receptor <i>FLT3</i> selvagem	33
Figura 1.7	Cascata de Sinalização de <i>FLT3</i>	34
Figura 2.1	Diagrama esquematizado da estrutura exon/intron dos genes <i>PML</i> e <i>RARα</i> ,	46
Figura 2.2	Tamanho dos produtos de PCR em pares de base (pb) obtidos pela combinação dos primers utilizados no RT-PCR do gene de fusão <i>PML-RARα</i>	46
Figura 2.3	Desenho esquemático do plasmídeo vetor pUC57-Simple	47
Figura 2.4	Desenho esquemático dos plasmídeos e das enzimas de restrição	49
Figura 2.5	Linearização do vetor com a enzima de restrição Scal	49
Figura 2.6	Curvas de Padronização dos Plasmídeos	51
Figura 2.7	Diagrama esquematizado da cobertura do transcrito <i>PML-RARα</i> pelo posicionamento dos <i>primers</i> e sonda do RQ-PCR.	53
Figura 2.8	Diagrama esquematizado da cobertura do gene <i>RARα</i> e do domínio de ligação do ATRA (<i>LBD</i>) pelo posicionamento dos <i>primers</i>	55
Figura 3.1	Frequência da distribuição das isoformas do transcrito <i>PML-RARα</i> ao diagnóstico	58
Figura 3.2	Distribuição das isoformas do transcrito de <i>PML-RARα</i> de acordo com o desfecho clínico	59
Figura 3.3	Representação da mediana da carga do transcrito <i>PML-RARα</i> de acordo com a resposta ao tratamento com quimioterapia + ATRA	60
Figura 3.4	Representação gráfica da carga do transcrito <i>PML-RARα</i> e da leucometria por paciente estudado	61
Figura 3.5	Frequência da mutação <i>FLT3/ITD</i> de acordo com a evolução clínica	62
Figura 3.6	Frequência das isoformas do transcrito <i>PML-RARα</i> de acordo com o status mutacional do gene <i>FLT3</i>	63
Figura 3.7	Representação da mediana da leucometria de acordo com status mutacional do gene <i>FLT3</i>	64

LISTA DE ABREVIATURAS

-	Ausência
+	Positividade
μL	Microlitro
μM	Micromolar
4E-BP1	<i>Eukaryotic initiation factor 4E-Binding Protein</i>
9-cRA	Ácido 9-cis-retinóico
13-cRA	Ácido 13-cis-retinóico
AKT ou PKB	<i>Protein kinase B</i>
AR	Ácido Retinóico
ATRA	Ácido All-trans retinóico
BAD	<i>BCL2 Associated Death Promoter</i>
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL2	<i>B-Cell CLL/Lymphoma-2</i>
CBL	<i>Proto-oncogene</i>
CBLB	<i>CBL related protein</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
CEMO	Centro de Transplantes de Medula Óssea
CNV	<i>Copy Number Variation</i>
Ch	Cromossomo
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CP	Fator pró-coagulante do câncer
CRABP	<i>Cellular retinoic acid-binding proteins</i>
CREB	<i>Cyclic adenosine monophosphate-response element binding protein</i>
Ct	<i>Threshold cycle</i>

CYP26	<i>Cytochrome P450RAI</i>
DA	Daunorrubina e Citarabina
Del	Deleção
dL	Decilitro
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA-metiltransferase
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DRM	Doença Residual Mínima
dsDNA	DNA dupla-fita
ERK1/2	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
FAB	<i>French-American-British group</i>
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
FLT3	<i>FMS-like tyrosina kinase 3</i>
FLT3L	<i>FMS-like tyrosina kinase 3 ligand</i>
FT	Fator tecidual
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GAB2	<i>GRB2-associated binder 2</i>
GRB2	<i>Growth Factor Receptor-Bound Protein-2</i>
HDAC	Histonas desacetilases
HL-60	<i>Human promyelocytic leukemia cells</i>
HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen - DR</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ITD	<i>Internal tandem duplications</i>
LBD	Domínio de ligação
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMA M2	Leucemia Mielóide Aguda com diferenciação
LMA M3	Leucemia Promielocítica Aguda
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda

M ₃ R	<i>Variante PLZF/RARα</i>
M ₃ V	Variante microgranular
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MEK	<i>MAPK/ERK Kinases</i>
MG	Miligrama
mL	Mililitro
mm ³	Milímetro
MO	Medula óssea
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
NB4	<i>Human APL cell line</i>
NCOR	<i>Nuclear receptor co-repressor 1</i>
Ng	Nanograma
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Ativador de Plasminogênio
PAI	Inibidor do Ativador de Plasminogênio
PB	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	<i>phosphoinositol-3-Kinase</i>
pM	Picomolar
PML	<i>Promyelocytic Leukemia</i>
PLZF	<i>Promyelocytic leukemia zinc finger</i>
QT	Quimioterapia
q.s.p.	Quantidade suficiente para
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RAR α	Receptor do ácido retinóico alpha
RARE	Elementos responsivos ao ácido retinóico

Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RNA	Ácido ribonucleic
RPM	Rotações por minuto
RQ-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo-real
RSK	<i>Ribosomal protein S6 Kinase</i>
RTK	Receptor tirosina quinase ligado à membrana
RXR	Receptor de retinóides X
SH2	<i>SRC homology 2 domain</i>
SHIP	<i>SH2-domain-containing inositol phosphatase</i>
SHP2	<i>Protein tyrosine phosphatase</i>
SLE	Sobrevida livre de eventos
SP	Sangue periférico
STAT	<i>Signal transducer and activators of transcription</i>
TSC1/TSC2	<i>Tuberous sclerosis 1/ tuberous sclerosis 2</i>
TA	Temperatura ambiente
TAFI	<i>Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor</i>
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
TKD	Domínio tirosina quinase
Wt	<i>Wild type</i>

1. INTRODUÇÃO:

A leucemia mieloide aguda (LMA) é um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas malignas caracterizado pelo bloqueio da diferenciação e proliferação clonal de uma célula mieloide imatura, sendo a forma mais comum de leucemia em adultos e responsável por 20% das leucemias na infância. A Leucemia Promielocítica Aguda (LPA ou LMA-M3) é um subtipo de LMA com características biológicas e evolução clínica distintas de outras formas de LMA, ocupando a 3ª categoria do sistema de classificação FAB (Franco-Americano-Britânico). A LPA corresponde a 8-13% dos casos de LMA em adultos e a cerca de 5 a 15% dos casos de LMA na infância (TESTI, 2014; ZHANG, 2014). Alguns relatos sugerem uma incidência aumentada da doença em populações latino-americanas, com 20% dos casos de LMA no México correspondendo a LPA, 22% no Peru, 27,8% na Venezuela e no Brasil, valores ainda mais altos foram encontrados, variando de 28-37,5% dos casos de LMA (JACOMO, 2007; REGO, 2013; ZHANG, 2014; TESTI, 2014). A incidência da doença parece aumentar na infância, principalmente entre 9-12 anos de idade quando há leve predomínio de casos no sexo feminino, o que não ocorre na fase adulta. Outro achado é a presença de índice de massa corporal (IMC) mais alto em pacientes com LPA quando comparados com outros subtipos de LMA, tanto em crianças quanto em adultos (ESTEY, 1997; BRECCIA, 2012).

A translocação balanceada $t(15;17)(q22;21)$ é a anormalidade cromossômica característica da LPA – identificável citogeneticamente em mais de 95% dos casos. A nível molecular, a translocação justapõe a porção 3' do gene que codifica o receptor do ácido retinóico alpha (*RAR α*) a porção 5' do gene *PML* (ProMyelocytic Leukemia) (MISTRY, 2003; LEAL, 2009) (Fig. 1.1). Os pontos de quebra no gene *RAR α* no cromossomo 17 se concentram em uma pequena área do exon 3, enquanto os pontos de interrupção no gene *PML* no cromossomo 15 estão agrupados em três regiões: uma no exon 3, originando o gene de fusão *PML-RAR α* com a forma curta (bcr3 – isoforma S), e duas no exon 6, originando os genes de fusão com a forma longa (bcr1 – isoforma L) e com a forma variável (bcr2 – isoforma V) (CREUTZIG, 2004; GALE, 2005). Entretanto, em 1-2% dos casos de LPA um gene parceiro diferente do *PML* pode se fundir ao gene *RAR α* no ch17, como os genes: *PLZF*,

NPM1, *STAT5b*, *NuMA*, *FIP1L1* e *BCOR*, dando origem a variantes moleculares de LPA (ZHANG, 2014).

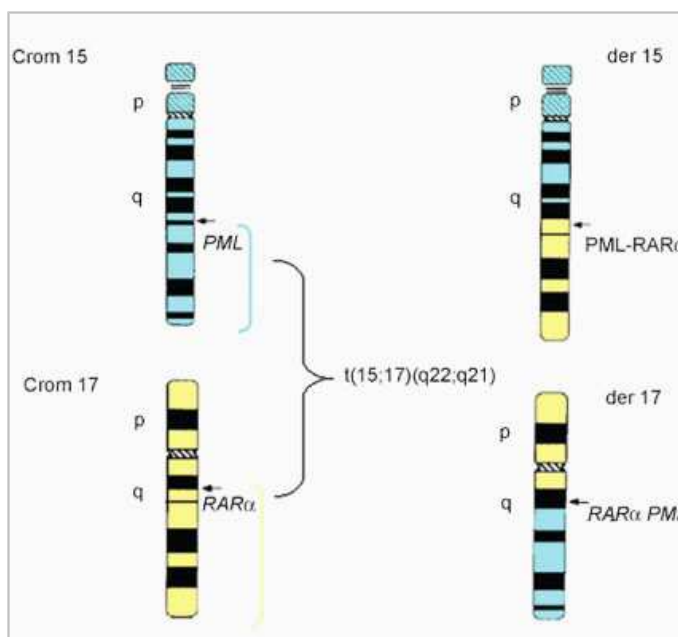


Figura 1.1. Representação esquemática da $t(15;17)(q22;q21)$. Fonte: (LEAL, 2009)

Do ponto de vista morfológico, a LPA pode ser classificada em 4 subtipos. O subtipo *clássico ou hipergranular* é a variante morfológica mais comumente encontrada e se caracteriza pela presença de um aspirado de medula óssea hipercelular composto predominantemente por promielócitos anormais – em geral, com núcleo lobulado, citoplasma com grânulos azurófilos proeminentes, vacúolos e muitos bastonetes de Auer. O número de blastos pode estar aumentado, mas pode não alcançar mais de 20% das células na medula óssea desses pacientes. Sendo assim, os promielócitos malignos precisam ser considerados como parte da contagem total de blastos para o estabelecimento de diagnóstico de LMA de acordo com os critérios da classificação FAB e da OMS. A análise dos antígenos celulares de superfície por meio da citometria de fluxo multiparamétrica permite identificar a expressão intensa de CD33 e expressão variável de CD13. HLA-DR e CD34, geralmente são negativos e, quando positivos, estão presentes somente em parte da população leucêmica; o CD15 é, em geral, fracamente positivo ou então negativo (PAIETTA, 1994; WINTROBE, 2009; TESTI, 2014).

A variante *microgranular* ou M_3V é outro subtipo morfológico de LPA. Esta variante corresponde a 20-30% dos casos de LPA e é caracterizada pela presença

de citoplasma “nebuloso” com granulação fina e núcleo bilobulado ou “dobrado”, além de citometria de fluxo apresentando positividade para CD2 e negatividade para HLA-DR e CD34; o CD56 também pode ser positivo em alguns casos. A variante microgranular também tem sido implicada em pior prognóstico (PAIETTA, 1994; BIONDI, 1995; WINTROBE, 2009).

Os outros dois subtipos morfológicos de LPA são a variante *hiperbasofílica* e a variante *leucemia promielocítica dedo-zinco(PLZF)/receptor de ácido retinóico α (RAR α) ou M₃R*. A primeira variante, hiperbasofílica, é uma forma incomum de LPA e alguns especialistas agrupam-na à categoria M₃V (MCKENNA, 1982; WINTROBE, 2009). Morfológicamente, apresenta poucos grânulos, intensa basofilia e projeções citoplasmáticas (“buds”). O subtipo M₃R tem sido proposto como uma nova categoria morfológica uma vez que nesse grupo não há a presença do núcleo lobulado ou “dobrado”, mas sim um núcleo arredondado ou oval com granulação citoplasmática intermediária entre a LPA e variante LMA M2, além de um número aumentado de células *Pelger-like* como remanescentes daquelas encontradas na síndrome mielodisplásica (SAINTY, 2000; WINTROBE, 2009).

Clinicamente, como qualquer leucemia aguda, a LPA pode se apresentar como um amplo espectro de sinais e sintomas sistêmicos frutos da ocupação da medula óssea por clones leucêmicos que substituem as células hematopoiéticas normais. A invasão de sítios extra-medulares, como pele, sistema nervoso central, gengiva, não costuma ser vista ao diagnóstico, embora possa ocorrer (WINTROBE, 2009; TESTI, 2014).

As anormalidades da homeostasia vistas na LPA são características e contribuem muito para morbidade e mortalidade da doença. Além de plaquetopenia, quase todos os pacientes apresentam ao diagnóstico achados laboratoriais de coagulação intravascular disseminada (CIVD) com fibrinólise aumentada, o que se relaciona clinicamente com alto risco de sangramento e trombose (TESTI, 2014; KWAAN, 2014; BRECCIA, 2014).

A fisiopatologia da coagulopatia associada a LPA é extremamente complexa e o principal mecanismo é mediado por propriedades específicas da própria célula leucêmica que libera vários mediadores capazes de ativar CIVD, fibrinólise ou proteólise de outras proteínas. Os promielócitos malignos expressam dois pró-coagulantes associados a tumores: fator tecidual (FT) e pró-coagulante do câncer

(CP). Depois de sua ativação por fosfolipídeos, o FT forma um complexo com o Fator VII e ativa o fator X. Alternativamente, o CP pode ativar o Fator X diretamente sem o fator VII. Além disso, os promielócitos malignos podem também induzir a atividade procoagulante do FT nas células endoteliais por meio da secreção da interleucina IL-1b. Adicionalmente, existem evidências de que as plaquetas desses pacientes estão ativadas como demonstrado pelo aumento dos níveis plasmáticos de P-selectina. Essa adesividade leucocitária e endotelial aumentada também contribui para o risco protrombótico aumentado (KWAAN, 2014; BRECCIA, 2014).

Em contraste à *up*-regulação dos fatores procoagulantes, agentes fibrinolíticos também se encontram mais expressos em indivíduos com LPA. Os ativadores de Plasminogênio, tPA e uPA, e seu inibidor PAI-1 estão aumentados no plasma desses pacientes. Anexina II, um receptor de membrana celular de Plasminogênio e tPA, também se encontra mais expressa na superfície de promielócitos malignos resultando na amplificação da geração de plasmina. É interessante que a Anexina II também se encontre aumentada na superfície das células endoteliais da microvasculatura cerebral de humanos e roedores podendo justificar porque a incidência de hemorragia na LPA é mais alta no cérebro do que em outras partes do corpo. Da mesma forma, outro receptor de plasminogênio, S100A10, encontra-se *up*-regulado e a atividade de TAFI está reduzida – ambos contribuindo para a fibrinólise aumentada (KWAAN, 2014; BRECCIA, 2014).

Ao diagnóstico, as manifestações hemorrágicas são frequentes e podem ser dramáticas, sendo a principal causa de morte na fase inicial do tratamento dos pacientes com LPA. Cerca de 65-85% dos sangramentos são hemorragias intracranianas, geralmente intraparenquimatosas e fatais. Sítios menos comumente acometidos são o trato gastro-intestinal e os alvéolos pulmonares (LA SERNA, 2008; DI BONA, 2000). Pacientes com leucometria $> 10.000 \times 10^3/\text{mm}^3$, alta contagem de blastos em sangue periférico ($> 30.000 \times 10^3/\text{mm}^3$), idade > 60 anos, insuficiência renal e fibrinólise aumentada refletida por nível sérico de fibrinogênio < 100 mg/dL parecem ter um risco maior de complicações hemorrágicas ao diagnóstico (KWAAN, 2014). Já os eventos tromboembólicos são mais raros sendo mais comumente identificados na era pós-ATRA, como será discutido adiante. A trombose tem sido causa de 0,9-9,6% das mortes ao diagnóstico e de 4-9% das mortes ocorridas durante todo o período de indução de remissão (BRECCIA, 2014; KWAAN, 2014). Um estudo identificou diferenças no perfil molecular de pacientes com LPA com e

sem trombose, identificando a expressão de CD2, CD5, FLT3-ITD e isoforma bcr3 nos pacientes trombosados. Além disso, a variante morfológica microgranular parece estar associada à trombose de veia porta (RICCIO, 1989; BRECCIA, 2007).

A descoberta da sensibilidade dos blastos com a t(15;17) ao Ácido All-Trans Retinóico (ATRA), utilizado em associação ao esquema quimioterápico, revolucionou o tratamento de pacientes com LPA (BREITMAN, 1980; FLYNN, 1983). No passado, a LPA era considerada uma das formas mais graves e letais de LMA, com apenas 65% a 75% dos pacientes alcançando remissão após uma indução padrão com daunorrubicina e citarabina e elevadas taxas de morte precoce (até maiores que 26%), sobretudo decorrente da coagulopatia. A taxa de sobrevida livre de eventos era de apenas 35% (AVVISATI, 2002). Entretanto, com a introdução do ATRA ao esquema quimioterápico, a LPA tornou-se uma das formas de LMA com melhor prognóstico. Atualmente, a remissão completa pode ser vista em até 97% dos pacientes, com uma sobrevida livre de eventos (SLE) de 67 - 76% e uma sobrevida global > 90% . A taxa de recaída em 5 anos ainda encontra-se na faixa de 27% (BOTTON, 2004; MCCLELLAN, 2012; GALLAGHER, 2012), com a leucocitose ao diagnóstico, a ocorrência da forma variante microgranular (M3V) e da isoforma S permanecendo como principais fatores de risco para recidiva da doença (BAI HE, 2013; TESTI, 2014).

Embora nos últimos anos tenha ocorrido um significativo ganho nos índices de sobrevida dos pacientes pediátricos com LPA, algumas questões ainda precisam ser esclarecidas, sobretudo em relação à incidência de morte precoce durante a indução de remissão. A principal causa de morte precoce nos pacientes com LPA são as complicações hemorrágicas e, antes da era ATRA, a taxa de morte precoce relacionada à hemorragia era em torno de 26%. Inicialmente, a associação de ATRA ao tratamento parecia ter reduzido significativamente a taxa de morte precoce para valores em torno de 10%. Porém, análises subseqüentes em pacientes adultos com LPA, revelaram que a incidência de morte na indução ainda permanece alta (19-26%), apesar da introdução do ATRA. A principal justificativa seria o fato de que, nos estudos clínicos realizados logo após a introdução do ATRA, as mortes precoces teriam sido subestimadas. Os pacientes que morriam precocemente, principalmente os casos de morte alguns dias após o diagnóstico, não preenchiam todos os critérios para serem arrolados nos estudos, subestimando os resultados (PARK, 2011; MCCLELLAN, 2012; BAI HE, 2013).

O desenvolvimento de resistência ao ATRA ao longo do tratamento também é uma questão que ainda precisa ser melhor elucidada. Esta tem sido apontada como uma importante causa de falha em alcançar e/ou manter a remissão da doença e tem sido relacionada a mutações no gene *RAR α* (GALLAGHER, 2006; GALLAGHER 2012).

A adição do Trióxido de Arsênio ao esquema quimioterápico da LPA também tem revelado bons resultados. Este agente induz a diferenciação e a apoptose dos blastos da LPA, além de degradar a proteína de fusão *PML-RAR α* , sendo mais utilizado para resgate de pacientes que não alcançaram ou não sustentaram remissão com os esquemas habituais de quimioterapia associados ao ATRA, por provável resistência a esta droga. Estudos recentes utilizando Trióxido de Arsênio como agente único ou combinado com ATRA na fase de indução dos pacientes com LPA têm revelado altos índices de remissão da doença (LO-COCO, 2013; BRECCIA, 2014).

Embora o sucesso terapêutico do tratamento com o ATRA seja inequívoco, a incidência de morte precoce durante a indução de remissão, a resistência primária ou secundária ao ATRA e a recaída ainda são problemas clínicos relevantes (BOTTON, 2004; MCCLELLAN, 2012; GALLAGHER, 2012) e algumas outras anormalidades genéticas podem estar relacionadas com esses desfechos.

1.1. Resposta e resistência ao tratamento com ATRA

O ácido retinóico (AR) é um derivado ativo da vitamina A composto por 3 subunidades: uma região hidrofóbica bulky, uma região de ligação e uma região terminal polar (que é um ácido carboxílico). Modificações em cada uma dessas subunidades geram muitos isômeros do AR com diferentes polaridades, como o ácido all-trans-retinóico (ATRA), o ácido 13-cis-retinóico (13-cRA) e o ácido 9-cis-retinóico (9-cRA) (Fig.1.2) (MOLIN, 2014).

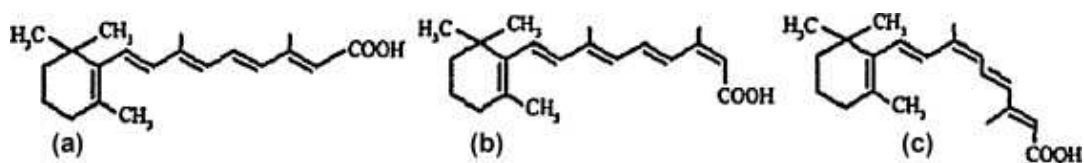


Figura 1.2. Estrutura química do ATRA (a), 13-cRA (b) e 9-cRA (c) . Fonte: (MOLIN, 2014).

A concentração intracelular do AR é finamente ajustada por um balanço entre produção e eliminação. O AR pode ser diretamente captado do meio extracelular onde pode ter sido excretado por outras células ou pode ser obtido a partir de conversões metabólicas de fontes dietéticas. Várias enzimas desidrogenases estão envolvidas na síntese de AR a partir de vitamina A, assim como citocromos da famílias CYP26 são responsáveis pela sua degradação. A disponibilidade do AR intracelular também é modulada por enzimas capazes de ligá-lo ao citosol, como as CRABPs. Como sinalizador, o AR pode atuar por meio da sua via canônica de sinalização através dos seus receptores RAR e RXR ou ainda através das vias não canônicas, pouco caracterizadas, que envolvem a cascata MAP kinase (MAPK), por exemplo (ABLAIN, 2014; MOLIN, 2014; ORFALI, 2014) .

Os receptores do AR são membros da família dos receptores esteroides nucleares que regulam diretamente a transcrição dos seus alvos gênicos no núcleo. Podem ser classificados em RAR (NR1B) e RXR (NR2B; receptor de retinóides X) de acordo com as diferenças existentes entre suas seqüências e estruturas químicas. Os receptores RAR e RXR também podem ser classificados em subtipos α , β e γ e cada subtipo pode possuir diferentes isoformas. As proteínas RAR α , RAR β e RAR γ são codificadas por genes localizados nos cromossomos 17q21, 3p24 e 12q13 respectivamente. No DNA, em regiões promotoras de genes responsivos ao AR, o receptor RAR α associado ao receptor RXR α (heterodímero RAR α /RXR α), reconhece os chamados elementos responsivos ao RA (RARE) compostos por dois (A/G)G(G/T)TCA na mesma orientação separados por 2 ou 5 nucleotídeos. Na ausência do AR, o RAR α reprime a transcrição dos genes alvos por meio do recrutamento de um complexo repressor composto por co-repressores nucleares (Sin3a e Sin3b), histonas desacetilases (HDAC), DNA metiltransferases (DNMT) e SMRT que mantêm a cromatina em um estado inativo (Fig. 1.3). Após a entrada de ácido retinóico (AR) na célula, o mesmo liga-se ao domínio de ligação ao ligante (LBD) do RAR α , promovendo o deslocamento do complexo repressor por meio da

acetilação de sua histona e liberação do co-repressor nuclear. Isso permite o recrutamento de coativadores que promovem o relaxamento da cromatina e atraem a maquinaria de transcrição, resultando na transcrição de genes alvos relacionados à diferenciação celular, como os genes da família Hox, da elastase e da mieloperoxidase (ABLAIN, 2014; MOLIN, 2014; ORFALI, 2014).

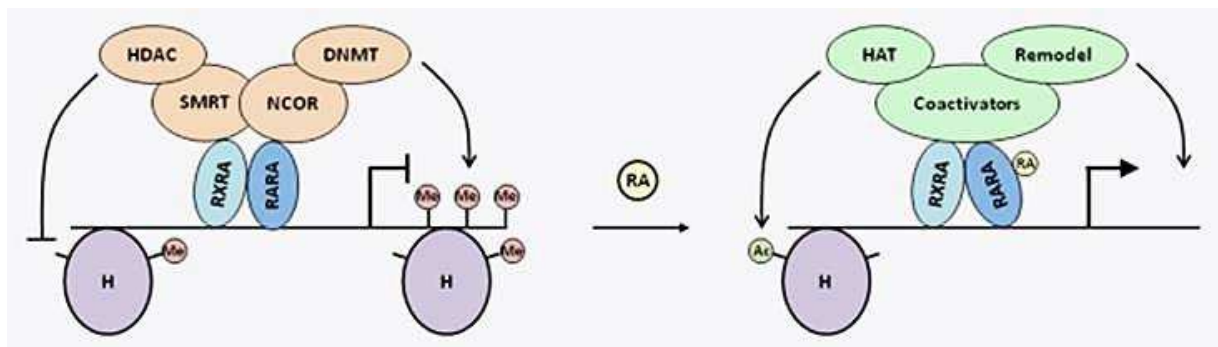


Figura 1.3. Sinalização molecular via ácido retinóico. Fonte: (ABLAIN, 2014).

Na presença do gene de fusão *PML-RARα*, o domínio *PML* passa a ter um papel inibitório dominante sobre a porção *RARα* do receptor e, mesmo em presença de ácido retinóico, o complexo inibitório acoplado a região *RARα* do receptor não consegue ser mais deslocado, impedindo que haja a transcrição dos genes relacionados à diferenciação celular culminando com o bloqueio maturativo da célula na fase de promielócito (ABLAIN, 2014; MOLIN, 2014).

Diante da observação de que camundongos privados de vitamina A desenvolviam alterações epidérmicas pré-malignas reversíveis com a reposição adequada dos níveis de retinóides (WOLBACH, 1925), no fim dos anos 70 e início dos anos 80, alguns grupos de pesquisa conseguiram demonstrar a reversão da transformação do fenótipo maligno de células leucêmicas humanas de linhagem (HL-60) e, posteriormente, de pacientes com LPA, por meio da diferenciação induzida por ácido retinóico (MERRIMAN, 1979; BREITMAN, 1980; BREITMAN, 1981; BREITMAN 1982; HONMA, 1983).

Em 1983, Flynn PJ e col (FLYNN, 1983), além de descreverem estudos *in vitro*, também realizaram o primeiro *trial* terapêutico com ácido retinóico em um homem de 22 anos de idade com leucemia promielocítica aguda refratária. O uso oral do ácido 13-cis-retinóico promoveu o aumento de 1,8 a 8% de células maduras na medula óssea desse paciente, embora o mesmo tenha morrido no décimo terceiro dia de tratamento devido à candidíase disseminada. Entretanto, a

confirmação de que o ácido retinóico induzia a maturação de células promielocíticas *in vitro* e possivelmente *in vivo* e a sugestão da incorporação de ácido retinóico ao esquema terapêutico desses pacientes impulsionaram outros relatos de casos isolados nesta área (NILSSON, 1984; DAENEN, 1986; FONTANA, 1986) e, em 1988, Huang ME e colaboradores (HUANG, 1988), considerando que o ácido cis-retinóico e o ácido all-trans retinóico (ATRA) haviam apresentado efetividade semelhante na indução de diferenciação de células de LPA *in vitro* (KOEFFLER, 1983), realizaram o primeiro uso clínico do ATRA em 24 pacientes com LPA, sendo 8 pacientes com doença resistente ou não responsiva previamente à quimioterapia e 16 casos ainda não tratados. Todos os pacientes alcançaram remissão completa e 16 dos 24 permaneceram em remissão completa pelo período de seguimento do estudo (11 meses). A partir de então, outros ensaios clínicos foram realizados utilizando ATRA para o tratamento desses pacientes com resultados promissores (DEGOS, 1990; CASTAIGNE, 1990; WANELL, 1991; SUN, 1992; OHNO, 1993). Em 1992, um estudo piloto feito com 26 pacientes com LPA sugeriu que o uso de ATRA seguido por quimioterapia intensiva poderia, além de gerar altas taxas de remissão de completa, contribuir para que as remissões alcançadas fossem mais duradouras (FENAUX, 1992).

Molecularmente, a adição de ATRA em doses farmacológicas promove a dissociação entre *PML-RAR α* e seus repressores, o recrutamento de co-ativadores, o remodelamento da cromatina e a ativação da transcrição. Além disso, a degradação do *PML-RAR α* em resposta aos tratamentos sugere modelos alternativos, através dos quais a perda da proteína de fusão abriria caminho para outros fatores de transcrição se vincularem aos promotores de seus genes-alvo e recuperarem o controle sobre sua transcrição (ABLAIN, 2014) (Fig. 1.4).

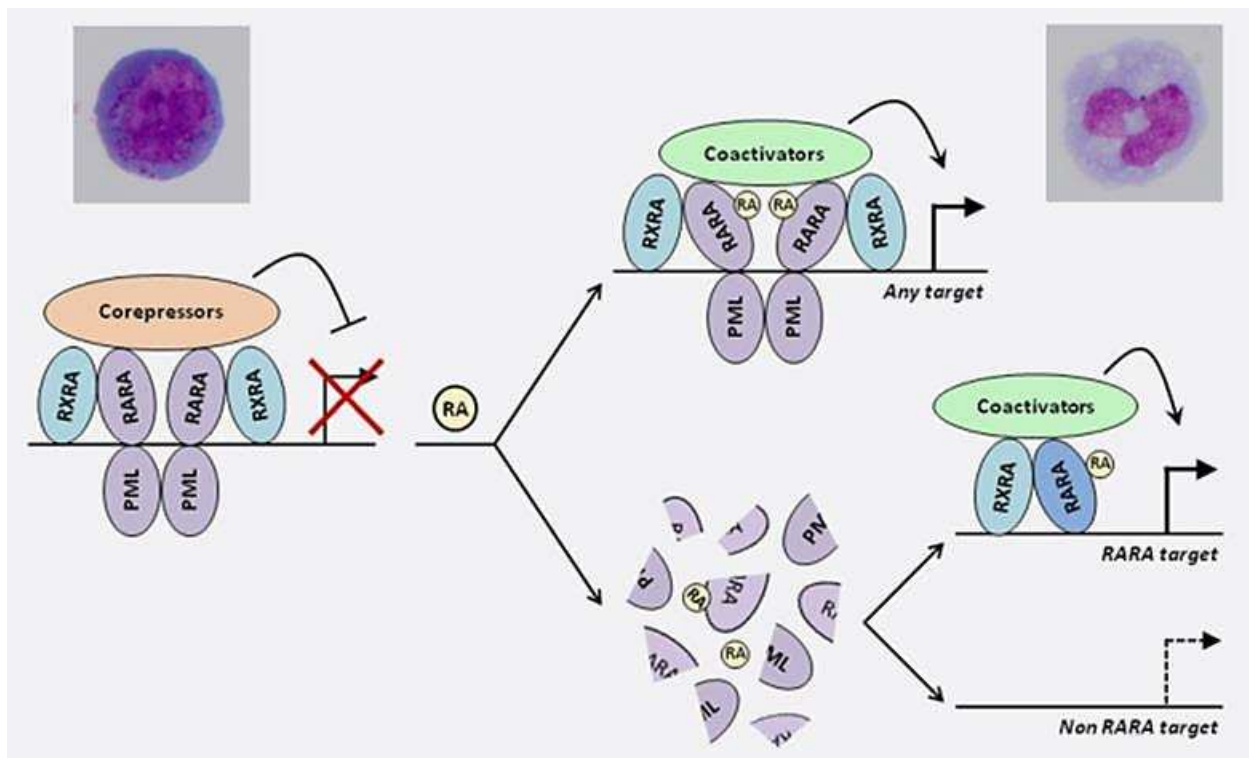


Figura 1.4. Mecanismos potenciais da diferenciação induzida pelo ATRA na LPA. Fonte: (ABLAIN, 2014)

Entretanto, fusões do tipo *PLZF-RARα* t(11;17)(q23;q21) criam dois sítios de ligação com o repressor, uma vez que o domínio *PLZF* pode recrutar por si próprio co-repressores, como SMRT, NCOR e HDACs. Este fato se reflete na resposta terapêutica de pacientes portadores da t(11;17) como uma resistência primária à indução com ATRA (CHEN, 1993; DONG, 1996; HONG, 1997; ABLAIN, 2014).

A presença de mutações no *RARα* foi primeiramente relatada em subclones de linhagem HL60 resistentes ao ATRA (ROBERTSON, 1992). As células HL60 entretanto, não possuíam a t(15;17) – foram originadas de um paciente portador de LMA M2, não M3. Alguns anos depois, Shao et al. demonstraram a presença de uma mutação pontual no domínio de ligação do ATRA (LBD) na proteína *PML-RARα* (*PRα/LBD+*) em um subclone de células da linhagem NB4 (R4) resistentes ao tratamento *in vitro* com ATRA (SHAO, 1997). Em seguida, Imaisumi e col encontraram mutações no LBD do *RARα* em células leucêmicas de pacientes com LPA – 23 pacientes com LPA foram avaliados quanto à presença dessas mutações, sendo 3 deles com resistência clínica ao ATRA. Foram identificadas mutações *missense* nos dois pacientes resistentes ao tratamento com ATRA no momento da recaída (IMAIKUMI 1998). Cerca de dois anos antes, Morosetti et. al. não havia encontrado mutações em 5 pacientes com resistência ao ATRA no momento da recaída e em 1 paciente que era refratário ao ATRA ao diagnóstico (MOROSETTI,

1996). Em 1998, Ding et. al. analisaram a presença de mutações em 12 pacientes recaídos com LPA tratados com ATRA + daunorrubicina e citarabina (DA) e 8 pacientes que receberam apenas DA. 3/12 pacientes que receberam ATRA+DA apresentaram mutações no domínio LBD do *RARα* nas amostras de recaída, sem nenhuma mutação ter sido encontrada entre os 8 pacientes que não receberam ATRA (DING 1998). Em 1999, uma nova coorte também identificou mutações *missense* no momento da recaída em 2 pacientes com LPA resistente ao tratamento com ATRA. (MARASCA 1999). Em 2006, Gallagher e col demonstraram mutações *missense* em 6/18 pacientes recaídos com LPA tratados previamente com ATRA+QT. Em 2012, o mesmo grupo analisou amostras de 45 pacientes com LPA tratados com ATRA+QT (protocolo Intergrupo C9710) no momento da recaída para a presença de mutação *PRα/LBD+* e 40% se mostraram positivas para a mutação. Outro dado relevante é que só em 2 casos avaliados as mutações estavam presentes ao diagnóstico, sob a forma de um subclone com baixo nível, emergindo mais tarde – próximo ao momento da recaída (GALLAGHER, 2006; GALLAGHER, 2012). Este mecanismo de resistência ao ATRA por meio das mutações *PRα/LBD+* tem sido pouco explorado, sobretudo no âmbito de pacientes que evoluíram com morte precoce ou com ausência de remissão.

1.2. Avaliação de resposta ao ATRA por quantificação de *PML-RARα*

Desde o início dos anos 90, a detecção do transcrito *PML-RARα* por RT-PCR convencional com sensibilidade entre 10^{-3} e 10^{-4} tem se revelado uma importante ferramenta na antecipação da recaída hematológica (> 5% de promieloblastos/promielócitos malignos na medula óssea) nos pacientes com LPA. Pacientes com transcritos detectáveis após 3 blocos de quimioterapia – fase de consolidação da terapia (correspondente ao 112º dia de tratamento) revelaram ter um risco de recaída de 57% versus 27% entre os pacientes com RT-PCR negativo ($p=0.006$). (BURNETT, 1999). Em 1998, o grupo de estudo GIMEMA (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell' Adulto) avaliou a DRM em amostras seriadas de 163 pacientes adultos tratados com o protocolo AIDA (ATRA + Idarrubicina) e com RT-PCR negativo no fim da fase de consolidação. Durante o seguimento, demonstrou que 21 dos 163 pacientes apresentaram conversão do RT-PCR (positividade para detecção do transcrito *PML-RARα*), embora ainda na ausência de recaída

hematológica. Entretanto, 20 desses 21 pacientes evoluíram com recaída hematológica em um período médio de 3 meses (1 – 14 meses), comprovando a eficácia da antecipação da análise molecular para a predição da recaída hematológica (DIVERIO, 1998).

Apesar do alto valor preditivo para recaída hematológica pela detecção molecular do transcrito *PML-RAR α* ao final da consolidação e por ocasião da recorrência de positividade após a negatividade, em qualquer momento do tratamento (GAMEIRO 2001), o RT-PCR qualitativo em nested falhou em detectar uma significativa porção dos pacientes que evoluíram com recaída. Esta falha poderia ser atribuída tanto a má qualidade das amostras como a sensibilidade alcançada por esta metodologia. Esforços no desenvolvimento de novas metodologias foram realizados, sendo a quantificação dos transcritos do gene de fusão *PML-RAR α* por meio PCR quantitativo em “tempo-real” (RQ-PCR) um exemplo. Esse último, tem se mostrado mais efetivo na predição da evolução clínica desses pacientes, uma vez que possui a capacidade de distinguir entre valores de quantificação podendo determinar cinéticas crescentes ou decrescentes. Além disso, a avaliação da qualidade das amostras é mais eficiente uma vez que as reações são realizadas em associação a um gene endógeno controle. O estabelecimento da qualidade da reação em função de valores mínimos de amplificação desse gene controle (threshold) e o pareamento dos resultados do gene alvo permitem a quantificação precisa dos transcritos *PML-RAR α* em uma amostra sabidamente de boa qualidade, condição esta estabelecida pelo número de cópias mínimo aceitável do gene de controle endógeno (GRIMWADE 2002; ZHANG 2012; GRIMWADE 2014).

Ao longo dos últimos anos, séries de análises da cinética da DRM por RQ-PCR em adultos com LPA vêm sendo realizadas. A análise dos transcritos *PML-RAR α* por RQ-PCR para antecipação da cinética de recaída em análises seriadas com intervalo de 3 meses em amostras de medula óssea – como recomendado pelo European Leukemia Net (ELN) guideline, tem confirmado o valor preditivo do RQ-PCR para antecipação da cinética de recaída. O valor de corte de aumento de 1 log nos níveis de *PML-RAR α* , em um mês, tem sido utilizado como parâmetro molecular de recaída (ZHANG 2012; GRIMWADE 2014).

Entretanto, ainda existem poucas e controversas avaliações do papel prognóstico do RQ-PCR para a monitorização da DRM em crianças com LPA. Em contraste aos resultados obtidos em pacientes adultos (SANTAMARIA 2007; GRIMWADE 2009), os níveis de transcritos *PML-RAR α* pós-indução demonstraram ter valor preditivo para evolução dos pacientes pediátricos com LPA. Em trabalho recente, Zhang e colaboradores mostraram que após a terapia de indução, 13 de 38 (3,2%) pacientes em remissão hematológica apresentaram RQ-PCR negativo (níveis indetectáveis de transcritos *PML-RAR α*). Esse valor foi correlacionado com uma menor probabilidade de recaída (100 e 55.2% de SLD em 5 anos nos grupos com RQ-PCR negativo e positivo, respectivamente; $p=0.018$) (ZHANG 2012).

1.3. Associação entre mutações no gene *FLT3* e morte precoce

Além da presença do gene de fusão *PML-RAR α* , outra alteração freqüentemente associada à LPA no momento do diagnóstico são as mutações somáticas no gene da tirosina quinase 3-FMS (*FLT3/Mut*). Modelos em camundongos demonstraram que essas mutações cooperam com as translocações *RAR α* , conferindo uma vantagem proliferativa para as células com bloqueio da maturação (KELLY, 2002; LE BEAU, 2003).

FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) é um receptor tirosina quinase ligado à membrana (*RTK*) pertencente ao subtipo III desta família e tem um papel fundamental na hematopoiese normal. Em células humanas normais, a expressão de *FLT3* ocorre principalmente em células tronco hematopoiéticas e progenitores mielóides e linfóides precoces CD34+, assim como em progenitores de células dendríticas. A expressão de *FLT3* não ocorre em células eritróides, megacariócitos ou mastócitos. O RNA mensageiro *FLT3* também foi encontrado em outros órgãos linfo-hematopoiéticos, como fígado, baço, timo e placenta, além de cérebro humano e testículos. Entretanto, a função de *FLT3* nesses órgãos permanece incerta e mesmo a presença do mRNA pode ser atribuída à contaminação a partir de células hematopoiéticas, em vez de expressão real no tecido do órgão (STIREWALT, 2003; ANNESLEY, 2014).

O receptor *FLT3* é codificado pelo gene *FLT3* – também conhecido como *Fik2* (*fetal liver kinase 2*) – localizado no cromossomo 13q12 e tem 85% de homologia com a sequência de aminoácidos do gene *FLT3* em camundongos. O receptor humano é formado por uma cadeia de 993 aminoácidos, sendo composto por cinco domínios de ligação extracelular imunoglobulina-*like* com sítio de ligação para seu ligante extracelular; um único domínio transmembrana hidrofóbico; um domínio justamembrana; e dois domínios intracitoplasmáticos, que incluem a região com a atividade de proteína tirosina quinase (*TKDs*), ligados pela inserção de uma tirosina-quinase (GILLILAND, 2002; STIREWALT, 2003; TAKAHASHI, 2011; ANNESLEY, 2014) (Fig.1.5).

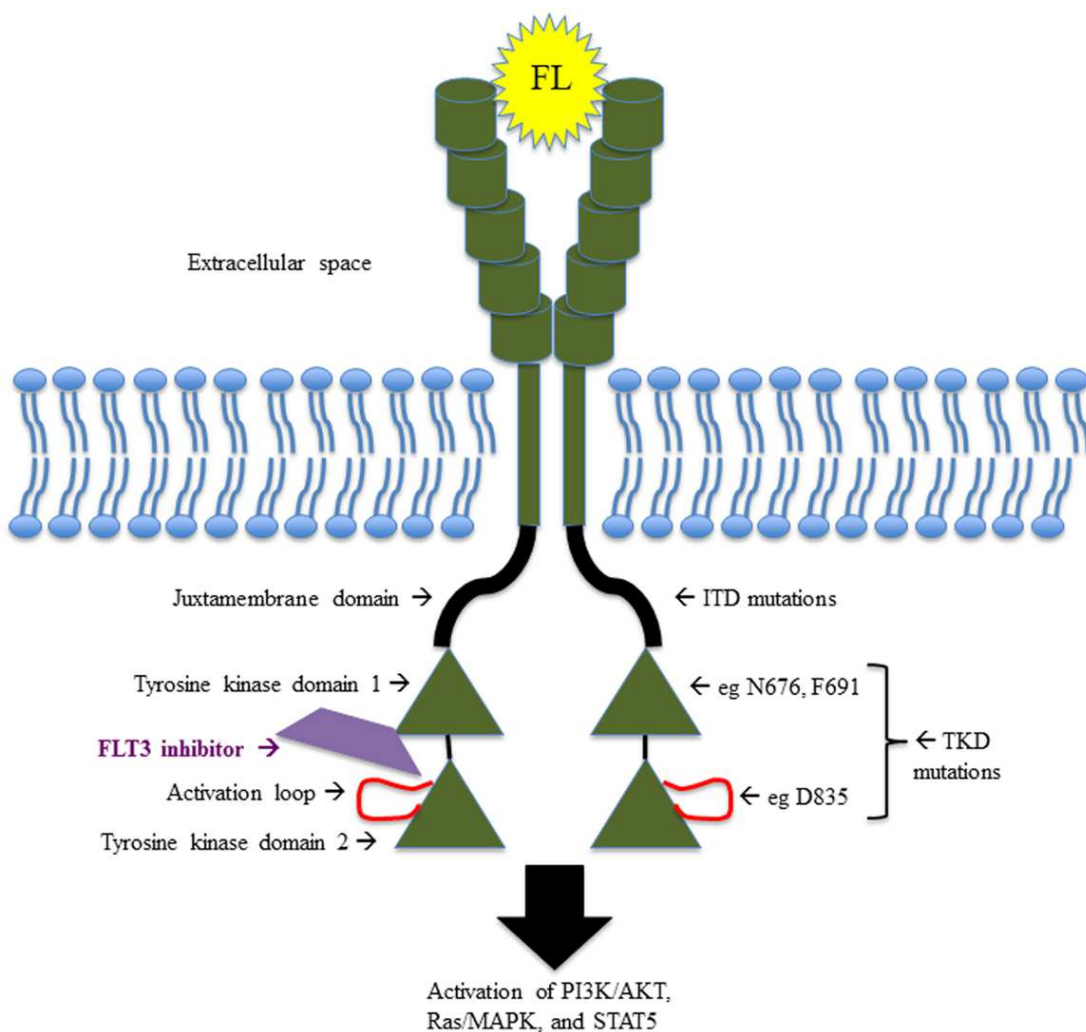


Figura 1.5. Esquema ilustrando a estrutura e função do gene *FLT3*, incluindo os sítios mais comuns das mutações ativadoras. Fonte: (ANNESLEY, 2014).

Os 3 primeiros domínios imunoglobulina-like extracelulares são codificados por 8 éxons do gene *FLT3*. Existem duas isoformas de *FLT3* humano descritas: uma proteína ligada à membrana de 158-160 kDa que é glicosilada nos sítios de

glicosilação N terminal no domínio extracelular e uma proteína não glicosilada de 130-145 kDa que não é ligada à membrana (GILLILAND, 2002; STIREWALT, 2003; TAKAHASHI, 2011).

FLT3L é o ligante do receptor *FLT3* e foi descrito logo após a descoberta do seu receptor. Apesar de ser expresso em muitos tecidos, sua co-expressão com o receptor *FLT3* só ocorre nas gônadas e no tecido hematopoiético, estimulando seletivamente a proliferação e a formação de colônias de células progenitoras CD34+. *FLT3L* também é produzido pelo estroma da medula óssea – fonte conhecida de produção de citocinas e fatores de crescimento (STIREWALT, 2003; ANNESLEY, 2014).

FLT3L pode ser encontrado sob a forma solúvel ou fixado à membrana celular. A isoforma fixada à membrana celular consiste numa proteína transmembrana do tipo 1 com 235 aminoácidos contendo um peptídeo de sinalização amino terminal, quatro domínios extracelulares helicoidais, regiões spacer e tether, um domínio transmembrana e um pequeno domínio citoplasmático. A atividade do *FLT3L* se encontra essencialmente nos domínios extracelulares, com as regiões spacer e tether ligando o componente extracelular ativo ao domínio transmembrana e, deste modo, fazendo a ancoragem do ligante à célula. A função do domínio citoplasmático permanece desconhecida, mas não parece ter um papel crucial na estimulação do *FLT3*. A isoforma solúvel do ligante – fruto de um *spliced* no exon 6 – também apresenta atividade biológica e estudos têm procurado detalhar se isoformas específicas são preferencialmente expressas por subtipos de tecido (STIREWALT, 2003; TAKAHASHI, 2011; ANNESLEY, 2014).

A maioria dos receptores *FLT3* não estimulados reside na membrana plasmática como monômeros. Neste estado inativo, a conformação do receptor pode resultar na inibição estérica da dimerização e evitando a exposição dos sítios aceptores de fosfato (sítios potencialmente alvos de fosforilação) no domínio tirosina quinase através do domínio justamembrana – um mecanismo semelhante de inibição entre os domínios regulatórios e os domínios catalíticos foi encontrado em outras famílias de proteínas tirosina kinases. Depois da estimulação com *FLT3L*, o *FLT3* ligado à membrana rapidamente muda de conformação, formando um homodímero e expõe os sítios passíveis de fosforilação no domínio tirosina quinase (*TKDs*) (STIREWALT, 2003; TAKAHASHI, 2011; ANNESLEY, 2014). (Fig. 1.6)

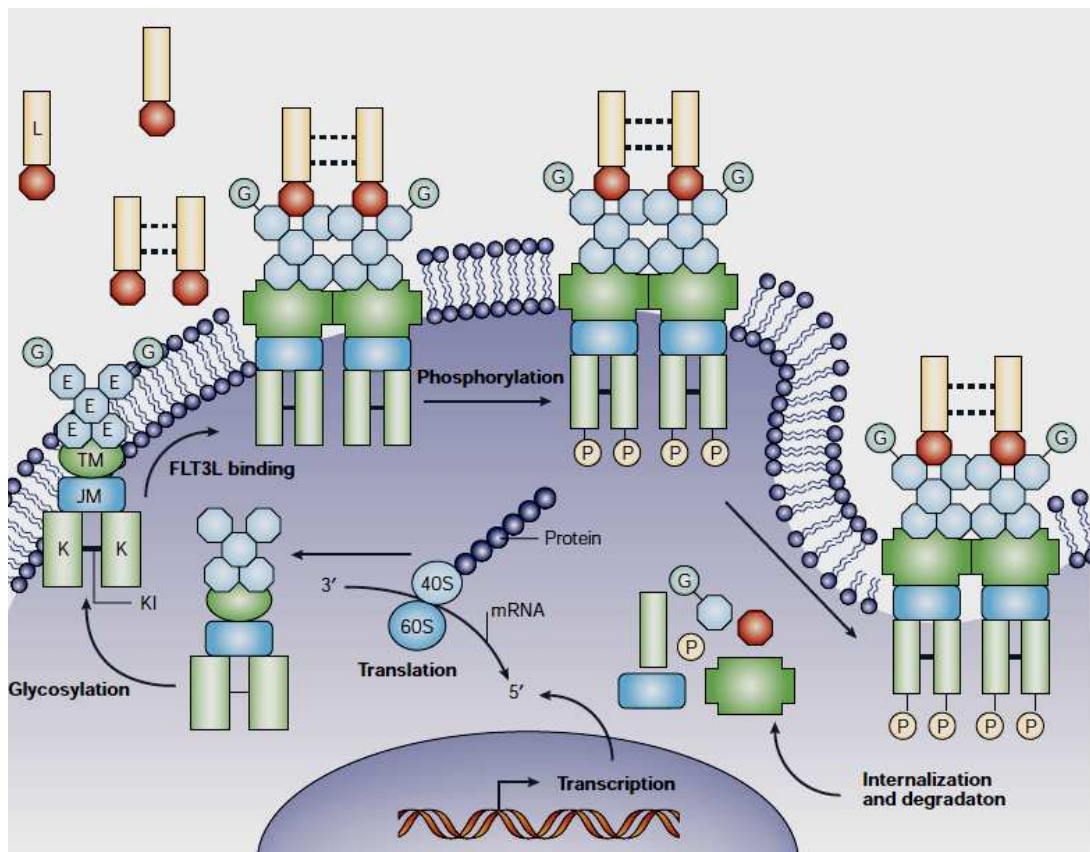


Figura 1.6. Estrutura e ativação do receptor *FLT3* selvagem. Fonte: (STIREWALT, 2003)

A atividade de proteína quinase de cada monômero fosforila um grupo de resíduos de tirosina no domínio citoplasmático do outro receptor em um processo denominado autofosforilação (GONFLONI, 2000; STIREWALT, 2003). A dimerização estabiliza essa mudança conformacional, o que aumenta ainda mais a ativação do receptor. A fosforilação de *FLT3* ocorre dentro de 5-15 minutos após a ligação *FLT3L*. O complexo *FLT3L-FLT3*-fosfato é então rapidamente internalizado, a começar dentro de 5 minutos de estimulação e atingindo um máximo após 15 minutos. Os subprodutos do complexo degradado são vistos nos primeiros 20 minutos depois da estimulação. Assim, todo o processo de ativação, internalização e degradação de *FLT3* nas células ocorre rapidamente, semelhantemente à ativação rápida e alto turnover de outros receptores *RTK* da subclasse III, tais como *KIT* (STIREWALT, 2003).

A autofosforilação do receptor *FLT3* produz tirosinas fosforiladas que têm alta afinidade por proteínas que possuem domínios SH2 (*SRC homology 2 domain*), formando complexos protéicos que levam à estimulação de cascatas efetoras como as cascatas da via *PI3K/proteína kinase B (Akt)* e da via *RAS-RAF-MEK-ERK*, conduzindo a uma proliferação celular aumentada e à inibição da apoptose. O

receptor *FLT3* humano, então, faz associações complexas com muitas proteínas, como *GAB2* (*GRB2-associated binder 2*), *SHIP* (*SH2-domain-containing inositol phosphatase*), *SHP2* (*protein tyrosine phosphatase*), *CBL* (*proto-oncogene*) e *CBLB* (*CBL related protein*) que, então, agem sobre a subunidade p85 de **PI3K** (*phosphoinositol-3-Kinase*) – uma proteína kinase regulatória do metabolismo de lipídeos (GILLILAND, 2002; STIREWALT, 2003; TAKAHASHI, 2011). (Fig. 1.7).

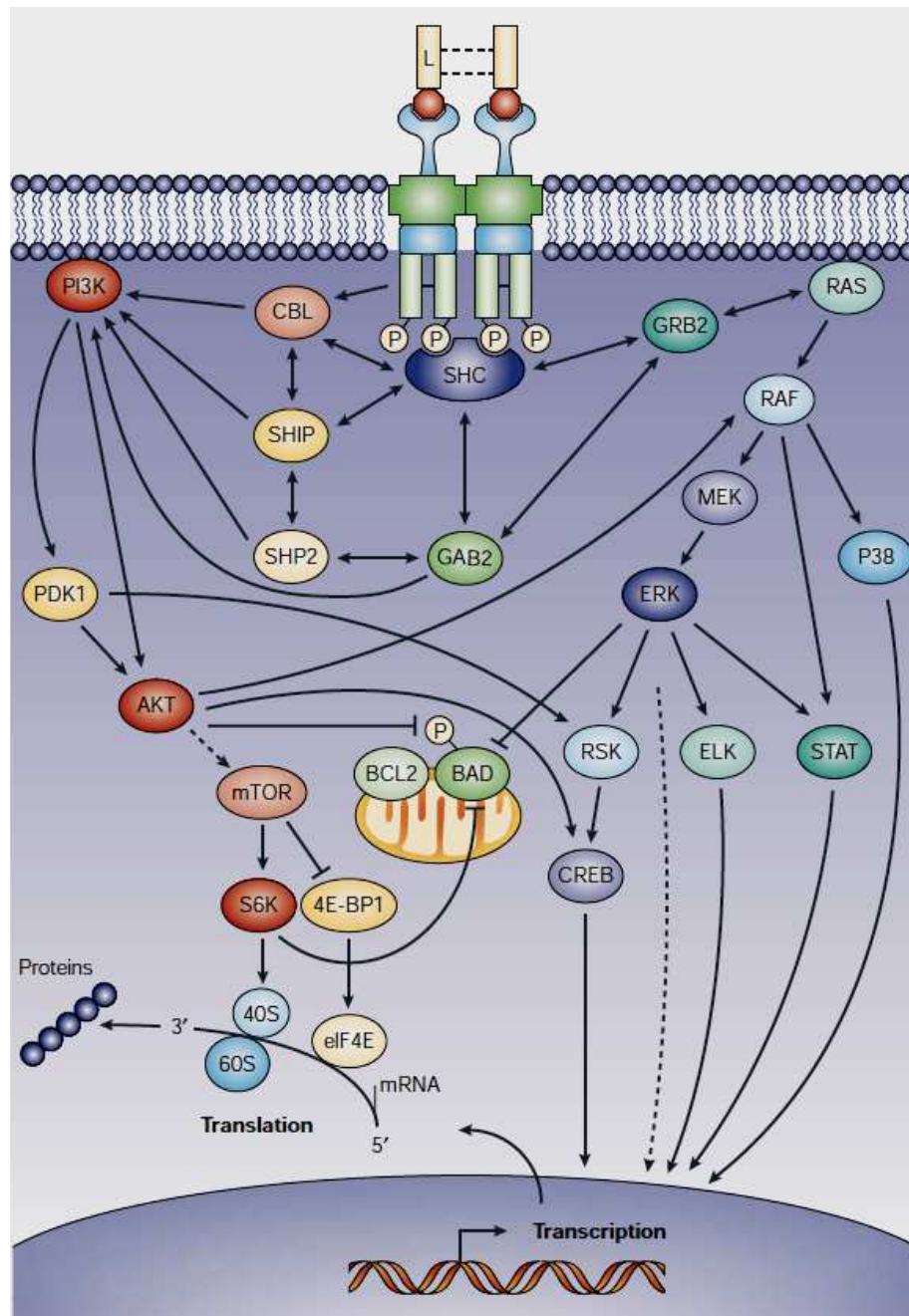


Figura 1.7. Cascata de Sinalização de FLT3. Fonte: (STIREWALT, 2003).

A *PI3K* ativada fosforila *PtdIns(4,5)P2/PIP2* produzindo a *PtdIns(3,4,5)P3/PIP3* (*phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphates*). Estes lipídios servem como sítios de ancoragem na membrana plasmática para proteínas que possuem domínios PH (*pleckstrin-homology*), incluindo Akt1/PKB (*Protein Kinase-B*) e seu principal ativador, PDK1 (*3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1*). O supressor de tumor PTEN, uma fosfatase de lipídeos que remove o fosfato D3 da PIP3, é reconhecido como um importante inibidor da Akt e é frequentemente encontrado em estado inativo em tumores humanos (STIREWALT, 2003; TAKAHASHI, 2011).

AKT ativada inativa TSC1/TSC2 (*tuberous sclerosis 1/ tuberous sclerosis 2*) que, quando ativos, formam um complexo e inibem a ativação de Rheb (uma GTPase da superfamília Ras), atuando como uma GAP (*GTPase activating protein*) – aumentam a hidrólise de GTP em GDP na Rheb, inibindo sua ativação. Então, quando AKT inibe TSC1/TSC2, Rheb é ativada e ativa mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), que inicia a transcrição e a tradução de genes regulatórios importantes através da ativação de S6K (p70 S6 kinase) e da inibição de 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E-Binding Protein*), levando a progressão do ciclo celular e inibição da apoptose. Outra via regulatória da ativação de PI3K é por meio da fosforilação da proteína pró-apoptótica BAD (*BCL2 Associated Death Promoter*) da família BCL2 (*B-Cell CLL/Lymphoma-2*) que leva ao bloqueio da apoptose (SATO, 2008; NIE, 2010; CHEN, 2010).

O domínio citoplasmático do FLT3 também se associa fisicamente com uma proteína adaptadora chamada GRB2 (*Growth Factor Receptor-Bound Protein-2*) levando a ativação de RAS. Ativação de RAS estimula uma cascata efetora contendo RAF, MEK (*MAPK/ERK Kinases*), p38, ERK1/2 (*Extracellular-signal Regulated Kinase*), e a 90-kDa RSK (*Ribosomal protein S6 Kinase*). Estes efetores ativam as proteínas CREB (*cyclic adenosine monophosphate-response element binding protein*), ELK e STATS (*signal transducer and activators of transcription*) que levam à transcrição de genes envolvidos na proliferação (TAKAHASHI, 2011; ANNESLEY, 2014).

Tanto a via de PI3K quanto a via de RAS, provavelmente, também interagem com muitas outras proteínas anti-apoptóticas e do ciclo celular, tais como WAF1, KIP1 e BRCA1. Da mesma forma, a associação física do domínio citoplasmático do

FLT3 também se estende a outros efetores de proliferação e metabolismo de fosfolípidos, incluindo Plc γ 1 (fosfolipase C γ 1- uma proteína reguladora do metabolismo do fosfoinositol), SHC (proteínas contendo a sequência SH2 – proteínas de acoplamento que estão envolvidas em inúmeras vias proliferativas e de fosfolípidos) e Gap (proteína de ativação de GTPase – uma importante proteína reguladora da via proliferativa Ras-Raf-Mek-Erk). Estas interações ainda levam à fosforilação de proteínas associadas e à ativação de cascata de outros efetores, como Vav (que é envolvida na hematopoiese) (MISUKI, 2000; STIREWALT, 2003; TAKAHASHI, 2011; ANNESLEY, 2014).

A regulação das cascatas de sinalização intracelular desencadeada pela ativação de FLT3 ocorre por diversas interações entre FLT3 e proteínas já citadas anteriormente, como SHCs, SHIP, SHP2, CBL e GAB2 que são importantes para regulação da atividade da PI3K. Além disso, embora a proteína SHIP esteja envolvida no metabolismo de fosfolípidos, essa fosfatase também pode atuar como um regulador negativo da proliferação por meio da ligação competitiva de proteínas SHC fosforiladas que poderiam ativar a via Ras-Raf-MEK-Erk. A ativação de FLT3 também modula cascatas cruciais de transdução de sinais e ativadores de transcrição, tais como STAT5A, e impede a regulação positiva da expressão de genes que podem induzir apoptose, tais como BAX (proteína X associada a BCL2) (MISUKI, 2000; ANNESLEY, 2014).

FLT3 pode ser expresso de forma aberrante em quase todas as amostras de LMA primária, mas também pode ser expresso na maioria das células leucêmicas de todas as linhagens celulares. Foi demonstrado que FLT3 selvagem está constitutivamente ativo em 2/3 das amostras de pacientes com LMA e essas células co-expressavam FLT3 e FLT3L, sugerindo um possível papel para sinalização autócrina (ANNESLEY, 2014).

As mutações ativadoras de *FLT3* foram primeiramente descritas em 1992 em células de linhagem humana de leucemias agudas, posteriormente, em 1996, em células de pacientes com LMA (BIRG, 1992; CAROW, 1996; ROSNET, 1996). As mutações no gene *FLT3* (*FLT3/Mut*) podem ser de 2 tipos: duplicação interna em tandem (*FLT3-ITD*) e uma mutação pontual (*FLT3-D835* ou *FLT3/TKD*). *FLT3-ITD* ocorre entre o exon 14-15 e envolve o domínio justamembranar do receptor. As *ITDs* variam em comprimento e localização, mas tendem a ocorrer em replicatas de três

nucleotídeos, mantendo o frame de leitura intacto e não afetando outras regiões do gene, como o domínio tirosina-kinase. As mutações *FLT3/TKD* foram descritas posteriormente em 2001 e são mutações pontuais que ocorrem no exon 20 envolvendo o domínio carboxiterminal de ativação tirosina kinase. As primeiras mutações descritas envolveram o resíduo D835 do ácido aspártico – equivalente a mutações D816 em KIT – e menos comumente a isoleucina I836. A mutação *missense* D835 produz uma mudança do aminoácido ácido aspártico para tirosina, histidina, valina, ácido glutâmico ou asparagina (TAKAHASHI, 2011; ANNESLEY, 2014).

Ambas as mutações *FLT3-ITD* e *FLT3/TKD* resultam na fosforilação autônoma e conseqüente ativação constitutiva do receptor FLT3, com subseqüente ativação constitutiva da sua cascata de sinalização proliferativa, incluindo a Ras / MEK (MAPK kinase) / ERK (extracellular signal-regulated kinase) e via PI3K/Akt (TAKAHASHI, 2011; BALGOLBIND, 2011; ANNESLEY, 2014). Além disso, em contraste com o tipo de sinalização pelo FLT3 selvagem, FLT3-ITD potencialmente ativa a via STAT5 que ativa seus genes-alvo, tais como ciclina D1, c-myc e o gene anti-apoptótico p21, Pim-2 e Pim-1, que são importantes para o crescimento celular. Estes efeitos podem indicar um papel de FLT3-ITD no crescimento celular aberrante de células leucêmicas que iniciam um ciclo de instabilidade genômica em que ocorre aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), provavelmente por meio da sinalização de STAT5 e da ativação de RAC1 (um componente essencial das ROS-producing NADPH-oxidases), levando ao aumento de quebras na dupla fita de DNA e erros de reparo (SALLMYR, 2008; TAKAHASHI, 2011)

Sendo assim, a ativação constitutiva do receptor FLT3 e o conseqüente desbalanço entre a proliferação celular aumentada e a diminuição dos mecanismos apoptóticos apresentam papel relevante na patogênese de neoplasias hematológicas. A identificação da mutação do tipo ITD, inclusive, na maioria das vezes aloca o paciente acometido para o grupo de alto risco, sendo o mesmo submetido a um tratamento quimioterápico mais agressivo (CREUTZIG, 2004; MESHINCHI, 2006; LEVIS, 2013).

Algumas séries para avaliação da prevalência das mutações de *FLT3* na população com LMA foram realizadas, com cerca de ¼ dos adultos apresentando mutações do tipo *FLT3/ITD* e aproximadamente 7% deles apresentando *FLT3/TKD*.

Estudos em adultos com LPA têm mostrado que 20-30% das células leucêmicas desses pacientes abrigam a mutação *FLT3/ITD* e cerca 10-20% apresentam a *FLT3/TKD* (KUTNY, 2012; LEVIS, 2013). Em pacientes pediátricos com LMA foi encontrada positividade para *FLT3/ITD* na faixa de 7,5-18% e de 3-11% para *FLT3/TKD*, sendo mais prevalentes nas LMAs de cariótipo normal e na LPA. Neste último grupo, análises semelhantes mostraram uma prevalência maior da *FLT3/ITD* e de *FLT/TKD*, de 27-64% e 9-14% respectivamente (ARRIGONI, 2003; GALE, 2005; KUTNY, 2012; SCHNITTGER, 2011; STAFFAS, 2011).

A maioria dos estudos em LMA de novo em crianças e adultos jovens demonstra que somente a mutação *FLT3/ITD* está associada com pior prognóstico. Entretanto, alguns poucos estudos associam a presença da mutação no domínio quinase de FLT3 (*FLT3/TKD*) a um prognóstico adverso. A presença da mutação *FLT3/ITD* está associada à leucocitose e pior resposta terapêutica (ARRIGONI, 2003; STAFFAS, 2011) e já foi incorporada na estratificação de risco inicial dos pacientes pediátricos com LMA, agrupando-os na categoria de alto risco de recaída – exceto para aqueles portadores de Síndrome de Down e com o subtipo LPA (GALE, 2005; KUTNY, 2012).

De fato, na LPA pediátrica, as avaliações da significância prognóstica de *FLT3/Mut* ainda são controversas. Em 2006, foi demonstrado que a razão alélica >0.4 entre a forma mutante e a forma selvagem pode estar associada a uma pior evolução clínica (MESHINCHI, 2006). Além disso, dois trabalhos recentes ressaltam o valor prognóstico adverso de mutações em *FLT3* na LPA. No primeiro, com 203 pacientes adultos e pediátricos, uma maior taxa de morte na indução foi observada em pacientes com *FLT3/Mut* (*FLT3/ITD* e *FLT3/TKD*) quando comparados a pacientes negativos para *FLT3/Mut*; nesta análise, os pacientes adultos não foram avaliados separados dos pediátricos (GALE, 2005). Um segundo estudo mais recente e exclusivo de pacientes pediátricos, mostrou, com 104 pacientes, uma associação entre mutações em *FLT3* e leucometria alta, neste trabalho não se pôde discriminar se o valor adverso isolado para morte precoce na indução era conferido por uma alta leucometria ou pela presença de mutação em *FLT3*. A discriminação entre estes dois parâmetros será importante para a individualização terapêutica, já que pacientes portadores de *FLT3-Mut* poderiam ser tratados com inibidores tirosina quinase específicos em contraste àqueles com alta carga tumoral e *FLT3-Mut* negativos, que se beneficiariam mais do uso de esquemas quimioterápicos mais

agressivos. Além disso, mutações no gene FLT3 poderiam estar relacionadas à ausência de remissão, à recaída e à sobrevida global (KUTNY, 2012).

Sendo assim, apesar do significativo ganho na sobrevida global e na sobrevida livre de doença dos pacientes portadores de LPA nos últimos anos – sobretudo devido às modificações no esquema quimioterápico (principalmente a adição de ATRA ao tratamento), ainda existem questões relevantes que precisam ser melhor elucidadas, como a elevada taxa de mortalidade no período de indução e a alta taxa de recaída que ainda atinge até ¼ desses pacientes.

Dessa forma, a identificação de mecanismos moleculares subjacentes, como a presença de mutações no *LBD* do ATRA no gene *RARα* e da mutação *FLT3/ITD*, assim como a presença de leucocitose ao diagnóstico é de grande importância clínica, podendo contribuir para que esse subgrupo de pacientes com maior risco de evolução para um desfecho clínico desfavorável possa ser melhor identificado e abordado de maneira mais eficaz.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Avaliar a correlação entre achados laboratoriais e moleculares (carga do transcrito *PML-RAR α* , leucometria, presença de mutações *PR α /LBD+* no gene *RAR α* , presença de mutações no gene *FLT3*) e a resposta do paciente à terapia com ATRA+QT (morte precoce, ausência de remissão e recaída).

2.2. Objetivos secundários

- i) Implementar RQ-PCR para o gene de fusão *PML-RAR α* ;
- ii) Correlacionar carga de *PML-RAR α* e leucometria ao diagnóstico;
- iii) Correlacionar carga de *PML-RAR α* ao diagnóstico e ausência de remissão, morte precoce e recaída;
- iv) Implementar metodologia para pesquisa das mutações *PR α /LBD+*;
- v) Pesquisar as mutações *PR α /LBD+* ao diagnóstico em pacientes com morte precoce ou ausência de remissão e no momento de recaída em paciente recidivados;
- vi) Correlacionar presença de mutações no gene *FLT3 (ITD)* ao diagnóstico com carga de *PML-RAR α* e leucometria;
- vii) Correlacionar presença de mutações no gene *FLT3 (ITD)* ao diagnóstico com morte precoce, ausência de remissão e recaída;
- viii) Correlacionar leucometria ao diagnóstico com morte precoce, ausência de remissão e recaída.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Pacientes e amostras

O estudo foi realizado utilizando-se amostras de medula óssea (MO) e/ou sangue periférico referidas ao Laboratório de Biologia Molecular do CEMO-INCa e ao PHOP-INCa para confirmação do diagnóstico clínico de LPA entre os anos de 1997 e 2014.

Os bancos de dados dos dois laboratórios supracitados foram analisados, sendo selecionados os pacientes adultos e pediátricos com diagnóstico confirmado de LPA (Quadro 1). Foram considerados casos confirmados de LPA, os casos nos quais a presença da translocação t(15;17) pôde ser identificada previamente por meio da análise citogenética convencional e/ou FISH ou pela identificação do gene de fusão *PML-RAR α* através da análise molecular.

Quadro 1 – Descrição do perfil dos dois bancos de dados analisados

1351 pacientes com leucemia aguda	
671 pacientes com LMA	
129 pacientes LPA (ATRA + QT)	
46 pacientes \geq 18 anos*	60 pacientes < 18 anos
6 recaídas / 5 mortes precoces/ 1 ausência de remissão	5 recaídas / 6 mortes precoces
6/4/1 = 11 pacientes analisados	4/4 = 8 pacientes analisados**

*Informações sobre idade foram indisponíveis em 23 pacientes

** 3 pacientes possuíam amostras não localizadas e/ou inadequadas para análise

†3 pacientes apresentaram morte antes do início da terapia (1 adulto e 2 crianças) – não representados na tabela

Os pacientes incluídos neste estudo possuíam diagnóstico de LPA de acordo com os critérios morfológicos, imunofenotípicos e cito-moleculares estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde; foram submetidos a tratamento padrão baseado em uso de ATRA e poliquimioterapia com antraciclínicos e análogos de nucleosídeos (Protocolo AML-BFM 2004 INTERIM e AIDA-GIMEMA); e possuíam

amostras de MO e/ou SP suficientes e em boas condições para análise. Foram excluídos pacientes com Síndrome de Down e/ou outras síndromes genéticas identificáveis.

Após a análise da evolução clínica dos 129 pacientes com LPA selecionados, 22 deles apresentaram desfechos clínicos considerados desfavoráveis – ausência de remissão, morte precoce ou recidiva da doença. *Ausência de remissão* foi definida pela presença de > 5% de blastos na medula óssea e/ou pela identificação dessas células no sangue periférico dos pacientes após a fase de intensificação da terapia padrão; morte precoce foi definida como morte ocorrida até 42 dias do início da quimioterapia e *recaída* pela detecção de sinais clínicos de retorno da doença após a remissão completa associada à identificação de células malignas na medula óssea e/ou sangue periférico. *Remissão completa* foi o termo empregado para designar os casos nos quais a quantificação morfológica de células malignas alcançou valores $\leq 5\%$ das células na medula óssea em vigência de sinais de maturação normal dos outros elementos hematopoiéticos, associado à ausência de células malignas circulantes.

As amostras de MO ou SP ao diagnóstico dos pacientes com evolução clínica desfavorável foram investigadas para pesquisa de mutações *PR α /LBD+* através da amplificação do fragmento de interesse mediante uma reação de PCR em duas etapas (*nested*), purificação e sequenciamento direto.

Foi definido um grupo controle pareado por idade e sexo para análise comparativa com o grupo de pacientes com desfecho clínico desfavorável. A análise das variáveis foi realizada de forma comparativa entre os dois grupos em amostras do diagnóstico para: I) detecção das diferentes isoformas do *PML-RAR α* ; II) quantificação absoluta do transcrito do *PML-RAR α* ; III) valor da leucometria; IV) e status mutacional do gene *FLT3*.

A quantificação absoluta dos transcritos *PML-RAR α* foi feita por PCR quantitativo em tempo real (RQ-PCR) e a identificação de mutações no gene *FLT3* por PCR qualitativo alelo específico para a identificação de ampliações em tandem (ITD) em amostras de todos os pacientes ao diagnóstico.

A obtenção dos dados clínicos foi realizada pelos profissionais médicos colaboradores do estudo em seus respectivos centros de atuação e revisada centralmente neste trabalho. Um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi assinado pelo responsável legal do paciente. Este estudo faz parte do projeto intitulado “Alterações imuno-moleculares nas leucemias mieloides agudas pediátricas: interação entre mutações somáticas e fatores de risco etiopatológicos” aprovado pelo Comitê De Ética Em Pesquisa do INCA (CEP #186.688) (Anexo 8.1) e do “Biorrepositório para leucemia mieloide aguda: protocolo de desenvolvimento” (acoplado ao projeto "Registro de pacientes com leucemia mieloide aguda em instituições do Estado do Rio de Janeiro" – CEP #939.795) (Anexos 8.2 e 8.3). A Dra Ilana Zalcberg uma das proponentes deste projeto é responsável pelo Sub-Projeto "Mecanismos Moleculares, Morte Precoce e Resistência na Leucemia Promielocítica Pediátrica", no qual esta tese se insere.

3.2. Processamento das amostras

As amostras de medula óssea e/ou sangue periférico foram submetidas à extração de DNA e RNA a partir dos leucócitos totais, de acordo com os seguintes procedimentos abaixo relacionados:

- 1) Isolamento de células mononucleares de medula óssea ou de sangue periférico por centrifugação em gradiente de Ficoll-Histopaque (Sigma).
- 2) Extração de DNA a partir de células mononucleares.

As amostras de SP e/ou MO, ao diagnóstico e pós-tratamento (acompanhamento), foram processadas para obtenção de DNA total. A extração de DNA foi realizada por método automatizado no equipamento Maxwell® 16 (Promega), que utiliza como princípio a recuperação do DNA por microesferas ferromagnéticas. Para a quantificação e avaliação do grau de pureza do DNA, 1 ul do material extraído foi mensurado por leitura espectrofotométrica (NanoDrop®), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Uma amostra foi considerada adequada sempre que a razão DNA/proteína: 260/280 foi maior que 1,8.

- 3) Extração de RNA.

Uma quantidade de $5-8 \times 10^6$ de células da fração mononuclear foi ressuspensa em 1 ml de Trizol®, de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as

células em Trizol® foram agitadas mecanicamente (tipo vórtex) e incubadas por 3-5 minutos à temperatura ambiente (TA) e após, foram adicionados 200 µl de clorofórmio absoluto. A solução foi centrifugada a 12.000 rotações/minuto (RPM) por 10 minutos à 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. Sobre a fase aquosa recuperada foi adicionado 500µL de isopropanol e o material foi incubado a -20°C por 1 hora. Após a incubação, o material foi centrifugado a 12000 RPM por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado por inversão. O *pellet* (RNA) foi lavado com 900µL de etanol 75% e centrifugado a 10000 RPM por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão, os tubos foram incubados com a tampa aberta a 65°C por 30 segundos e o *pellet* (RNA) foi ressuspensão em 12µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), inibidor de RNase. A solução final foi incubada a 65°C por 40 segundos e mantida a -20°C. A quantificação e o grau de pureza do RNA foram obtidos por espectrofotometria como acima descrito. A integridade do RNA foi avaliada a partir de eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão fosfato (Na₂HPO₄ 0,1M) seguido de coloração com brometo de etídio (3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinium 0,5 µg/mL). Para controle da qualidade do procedimento de extração de RNA foi utilizado o gene constitutivo BCR.

4) Síntese de DNA complementar (cDNA):

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total em uma reação contendo iniciadores randômicos e a enzima Transcriptase Reversa (SuperScript™). Resumidamente, as reações de retro-transcrição foram realizadas em volumes de 20-40 µl. 1 µg de RNA total foi incubado com iniciadores randômicos hexaméricos [5 µM] por 10 minutos à 65°C. Adicionou-se então uma mistura contendo tampão [20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl], MgCl₂ [2,5mM], DTT [10mM], dNTPs [1mM], a enzima transcriptase reversa Superscript™ (10U/ml) (Invitrogen), o inibidor de RNase RNAGuard (1U/ml) (Invitrogen) e H₂O DEPC até completar o volume. A incubação foi realizada por 50 minutos a 42°C. Após o término da retro-transcrição, os tubos foram incubados a 65°C, por 5 minutos, para inativação da atividade transcriptase reversa. O cDNA foi então armazenado a -20°C

3.2.1. PCR Qualitativo para detecção do gene PML-RAR α

A presença do gene de fusão PML-RAR α foi verificada mediante a realização de um RT-PCR Multiplex em 2 etapas, a primeira com os primers A e B e a segunda com os primers C e D (Quadro 2) a fim de detectar as isoformas longa, variante e curta (bcr1, bcr2 e bcr3, respectivamente).

Quadro 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação das isoformas bcr1, bcr2 e bcr3 do gene de fusão PML-RAR α

Oligonucleotídeo específico (Primer)	Posição 5' (tamanho)	Sequência (5' – 3')
PML-A1	1438 (21)	CAGTGTACGCCTTCTCCATCA
PML-A2	969 (18)	CTGCTGGAGGCTGTGGAC
RARA-B	485 (20)	GCTTGTAGATGCGGGGTAGA
PML-C1	1546 (21)	TCAAGATGGAGTCTGAGGAGG
PML-C2	997 (19)	AGCGCGACTACGAGGAGAT
RARA-D	426 (20)	CTGCTGCTCTGGGTCTCAAT

Fonte: VAN DONGEN, 1999.

Na 1ª etapa do PCR foram utilizados: 2-3 μ L de cDNA, 20 pmol (0.8 μ M c/u) de cada iniciador, 250 μ M de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 1,0 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen), 1X de Buffer Invitrogen para PCR e 2,5 mM de MgCl₂ além de água ultrapura q.s.p. 50 μ L de reação. Uma segunda etapa contendo o mesmo volume final, os mesmos reagentes e as mesmas condições de ciclagem foi realizada, utilizando 1 μ L do produto da primeira etapa do RT-PCR, além de primers internos (C1, C2 e D) com o objetivo de conferir uma sensibilidade maior à técnica (Nested-PCR). (Figuras 2.1 e 2.2). Ambas as etapas foram realizadas no termociclador Veriti® 96-well (Applied Biosystems) sob as seguintes condições de ciclagem térmica: (I) 94°C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 67°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto; (III) 72°C por 5 minutos; e (IV) 4°C overnight.

Para determinação do sucesso da amplificação, os produtos da 2ª etapa da PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% (2,25g de agarose em 150 mL de TAE 1X) previamente corado com 10 μ L de GelRed™ 10.000X (Uniscience -

Biotium). Foram aplicados 4 μ L da reação de PCR no gel de agarose distribuído em cuba de eletroforese horizontal e submetido a 100 V e 60 mA por 1 hora.

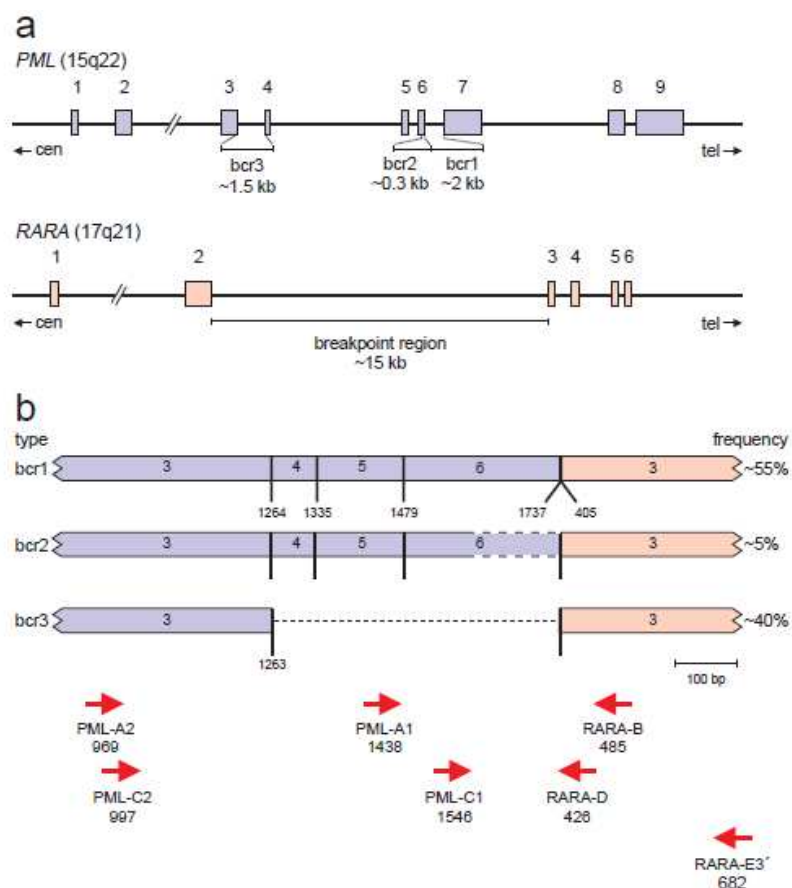


Figura 2.1: Diagrama esquematizado da estrutura exon/intron dos genes *PML* e *RARα*. (a) Diagrama esquematizado da estrutura exon/intron dos genes *PML* e *RARα*, envolvidos na *t(15;17)(q22;q21)*. (b) Diagrama esquematizado dos 3 tipos de transcritos *PML-RARα*, relacionados às diferentes regiões de quebra no gene *PML*. As regiões de quebra de bcr1 e bcr 2 são justapostas ao intron 6 e ao exon 6, respectivamente. O tamanho do transcrito bcr 2 é dependente da posição de quebra no exon 6 do *PML*. A região de quebra de bcr3 ocorre no exon 3. Fonte: (VAN DONGEN,1999)

	Oligonucleotídeos específicos (<i>Primers</i>)							
	A1 \leftrightarrow B (pb)	A2 \leftrightarrow B (pb)	C1 \leftrightarrow D (pb)	C2 \leftrightarrow D (pb)	A1 \leftrightarrow B + C1 \leftrightarrow D (pb)	A2 \leftrightarrow B + C2 \leftrightarrow D (pb)	C1 \leftrightarrow E3' (pb)	C2 \leftrightarrow E3' (pb)
bcr1	381	(1329)	214	688	214	688	470	(944)
bcr2	345	(819)	178	652	178	652	434	(908)
bcr3	-	376	-	289	-	289	-	545

Figura 2.2. Tamanho dos produtos do RT-PCR do gene de fusão *PML-RARα*. Tamanho dos produtos de PCR em pares de base (pb) obtidos pela combinação dos *primers* utilizados no RT-PCR do gene de fusão *PML-RARα* (Modificado de VAN DONGEN,1999)

3.2.2. PCR Quantitativo em Tempo Real (RQ-PCR) dos transcritos PML-RAR α

3.2.2.1. Padronização do ensaio e Preparação do plasmídeo:

As sequências desenhadas e sintetizadas comercialmente pela GenScript foram recebidas clonadas no vetor comercial pUC57.

A ligação de um fragmento de DNA contendo parte do exon3, e os exons 4, 5, 6 e 7 do gene *PML* além dos exons 2 e 3 do gene *RAR α* ao plasmídeo pUC57- foi realizada especialmente para este trabalho. A Figura 2.3 mostra o mapa do vetor utilizado contendo o sítio múltiplo de clonagem (MCS), os gene para resistência a ampicilina e o gene *lacZ*, que codifica a enzima β -galactosidase, responsável pela clivagem da galactose.

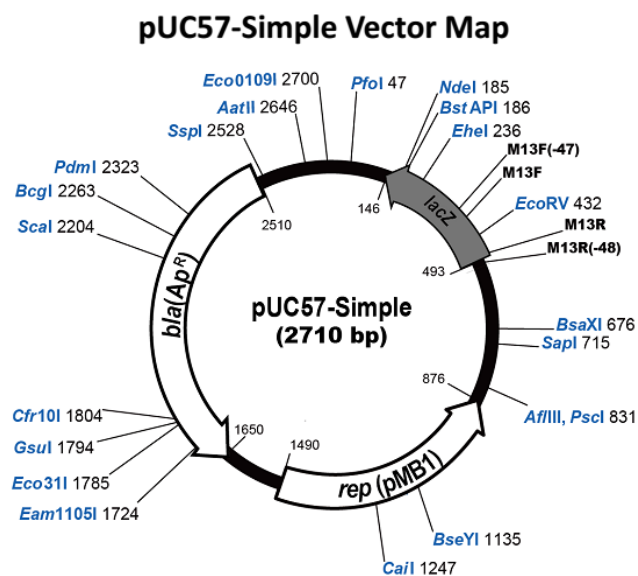


Figura 2.3: Desenho esquemático do plasmídeo vetor pUC57-Simple. Fonte: GenScript.

Em uma primeira etapa, a ligação do inserto, contendo a sequência referente ao gene de fusão *PML-RAR α* , transcritos bcr1 (isoforma curta) e bcr2 (isoforma longa) do *PML-RAR α* , foi realizada no sítio múltiplo de clonagem. Esta construção foi realizada com o intuito de facilitar a padronização do protocolo de RQ-PCR (quantificação absoluta dos transcritos). Os plasmídeos foram expandidos em

bactérias e utilizados para padronizar o RQ-PCR para as isoformas curta, longa e variante. A seguir, são detalhados os passos seguidos para a construção e utilização do plasmídeo para a quantificação do número de cópias de uma amostra primária. Ao final do processo uma preparação contendo 10^{11} moléculas foi obtida e ajustada para a obtenção de diferentes pontos utilizados para a construção de uma curva padrão com o plasmídeo pUC57:

- a) O plasmídeo pUC57 foi utilizado para transformar bactéria (TOP5, *E. coli*) tornando-a competente através de choque térmico;
- b) As bactérias foram plaqueadas em meio LB-Agar suplementado com Ampicilina (100mg/mL); Após crescimento durante 12hs/37°C, foram selecionadas cerca de 5 a 10 colônias, com o objetivo de isolar o DNA plasmidial por meio de miniprep, utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, seguindo as instruções do fabricante;
- c) A confirmação da presença do inserto (segmento alvo) nas colônias selecionadas foi verificada por digestão teste usando enzimas de restrição (*Pst*I – com sítio de ligação no inserto do plasmídeo com a isoforma curta; *Sac*I – com sítio de ligação no inserto do plasmídeo com a isoforma longa – vide fig. 2.4 e 2.5), seguido por análise dos fragmentos em gel de agarose;
- d) O plasmídeo foi linearizado por meio de digestão com enzima de restrição *Scal*I (fig. 2.4 e 2.5);
- e) O fragmento linearizado foi purificado a partir de gel de agarose 0,8% utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System e quantificado por espectrofotometria (nanodrop A_{260nm});
- f) Para converter a concentração obtida em ng/uL para n° moléculas/uL foram utilizados os seguintes parâmetros: PM médio de 1 pb de DNA = 649 g/mol; 1 mol = $6,02 \times 10^{23}$ moléculas, tamanho em pb do plasmídeo (fragmento da isoforma curta = 3210 pb; + fragmento da isoforma longa = 3238 pb; + 2710 pb pUC57 usando a formula:

$$M=[\text{tamanho plasmídeo em pb}] \times 1.096 \times 10^{-21} \text{ g/pb}$$

onde, M= massa de 1 única molécula de plasmídeo, pb= pares de base e g=grama.

g) Em seguida, foi calculada a concentração necessária de plasmídeo/estoque preparado para obtenção do número de cópias de interesse;

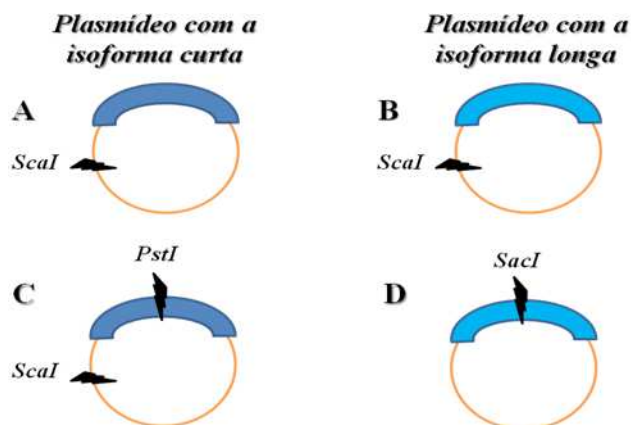


Figura 2.4. Desenho esquemático dos plasmídeos e das enzimas de restrição. **Figuras A e B:** esquema de linearização dos plasmídeos com isoforma curta e longa feito com a enzima de restrição *ScaI*. Na figura A, o produto linearizado originado apresentou tamanho de 3210 pb e, na figura B, 3238 pb. **Figura C:** digestão dupla do plasmídeo curta pelas enzimas de restrição *ScaI* e *PstI* (sítio de restrição no inserto) dando origem a dois produtos com tamanhos diferentes (1955 pb e 1255 pb). **Figura D:** digestão única do plasmídeo longa pela enzima de restrição *SacI* (sítio de restrição no inserto). pb: pares de base.

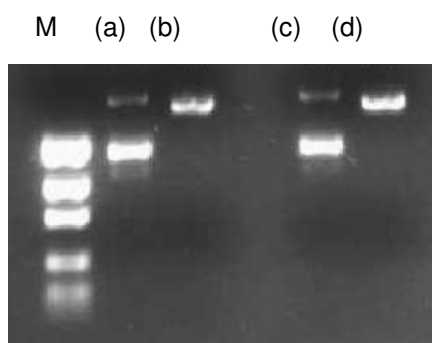
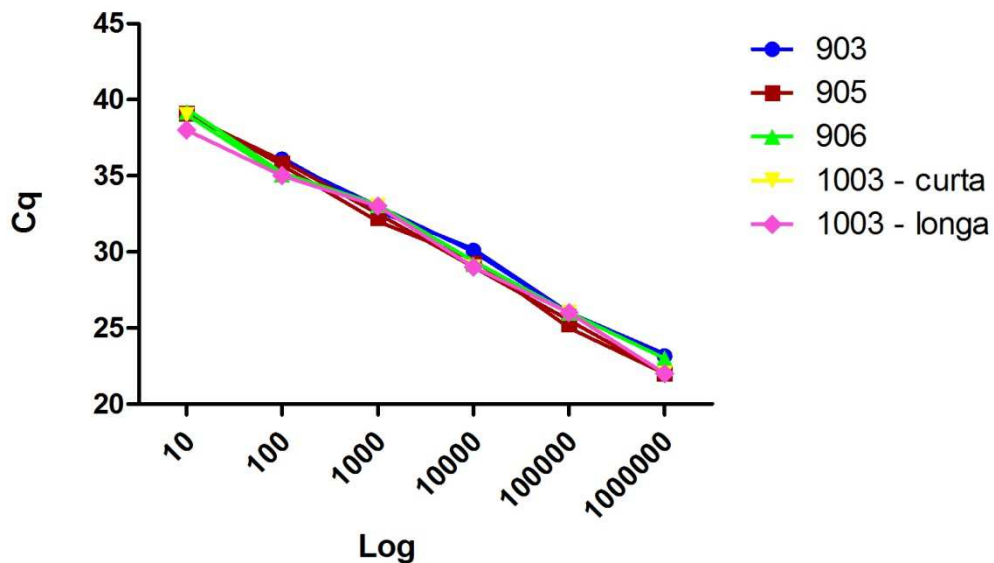


Figura 2.5. Linearização do vetor com a enzima de restrição *ScaI*. Figura (a): plasmídeo curta circularizado; (b): plasmídeo curta linearizado; (c): plasmídeo longa circularizado; (d): plasmídeo longa linearizado. M: marcador de peso molecular.

Foram realizadas diluições seriadas de 10^1 - 10^6 cópias de plasmídeo, utilizando como diluente concentrações definidas do carreador Yeast tRNA 100 ng/uL (Ambion P/N AM7119). As diluições seriadas foram preparadas a partir de uma

solução estoque contendo 10^9 moléculas. As diluições seriadas para a curva de calibração foram armazenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Uma vez descongelados os diferentes pontos da curva estes foram mantidos à 4°C por um período máximo de uma semana. Estas diluições seriadas de DNA plasmidial foram utilizadas como padrões do número de cópias mediante construção de uma curva padrão, para o gene alvo (*PML-RAR α*). A padronização e o controle do ensaio de quantificação absoluta seguiram as recomendações propostas pelas MIQEs (do inglês *Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments* – informações mínimas para publicação de experimentos com PCR quantitativo em tempo real) (BUSTIN, 2009). Para cada um dos primers e plasmídeos utilizados, foi realizada uma curva padrão a fim de avaliar: eficiência da reação; sensibilidade; *slope* (inclinação da reta); *intercept* (o ponto em que cruza o eixo y) e R^2 (Fig. 2.6). Todas tiveram uma eficiência $>97\%$ (98-99%); *slope*= -3,21 (3,1 – 3,5); *intercept* = 38 (37-40); $R^2= 0,998$ (0,997 – 0,999).



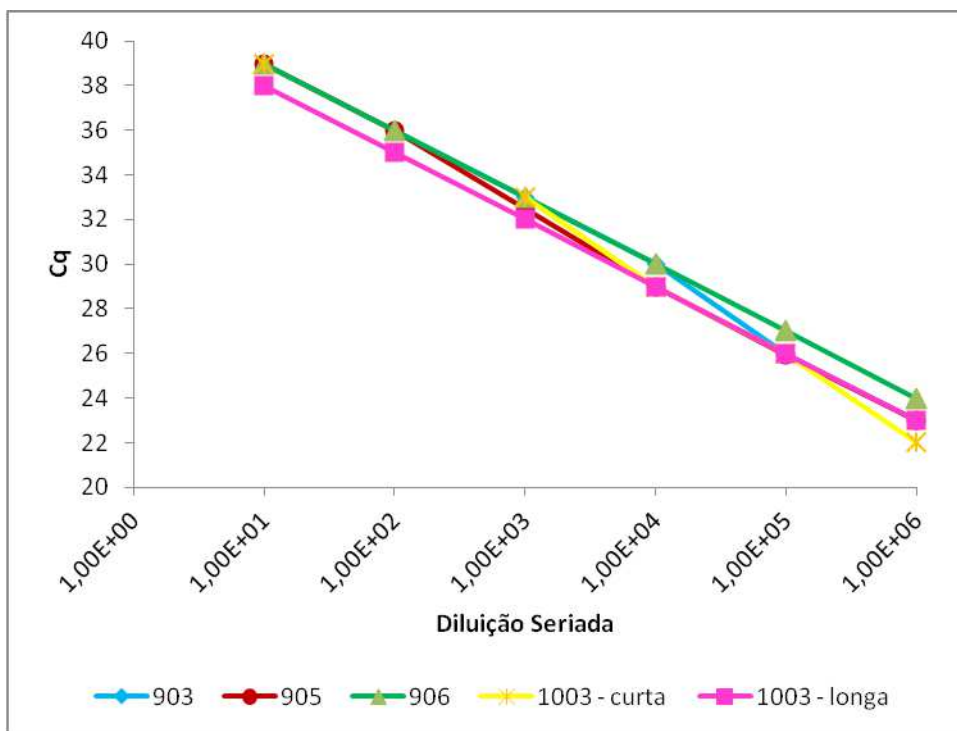
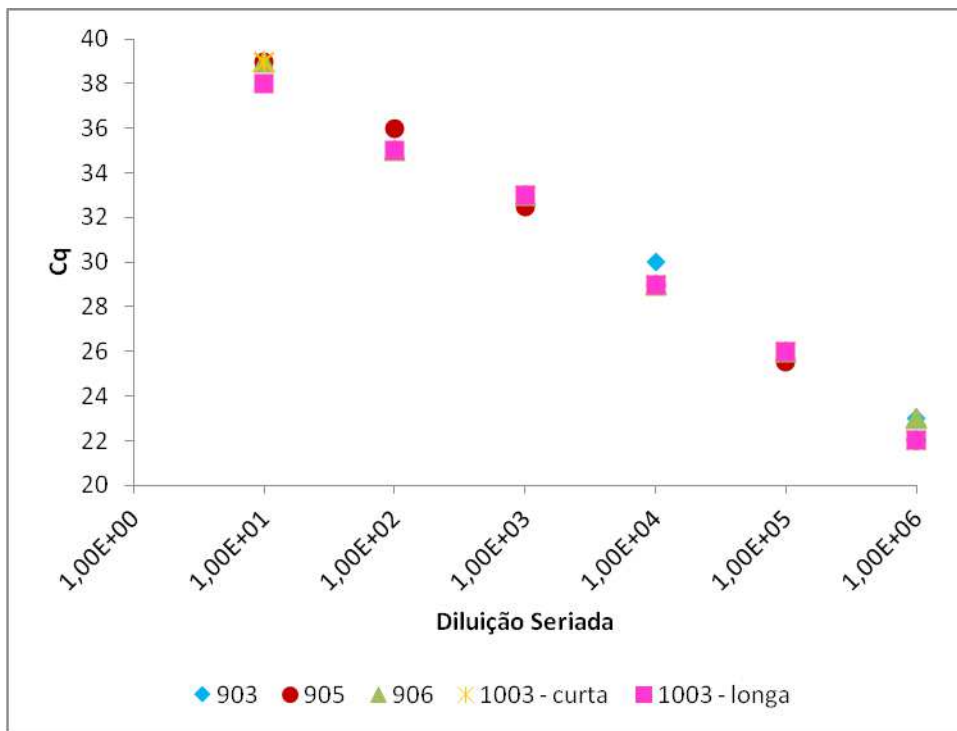


Figura 2.6. Curvas de Padronização dos Plasmídeos. 903: plasmídeo para a quantificação da isoforma longa; 905: plasmídeo para a quantificação da isoforma longa; 906: isoforma variante; 1003: gene alvo ABL da isoforma curta; 1003: gene alvo ABL da isoforma longa

3.2.2.2 Quantificação Absoluta dos níveis de PML-RAR α :

A quantificação absoluta dos transcritos *PML-RAR α* utilizando-se o sistema TaqMan, foi realizada em termociclador Applied Biosystems® ViiA7 (LifeTechnologies), incluindo sonda específica marcada 5'FAM-3'TAMRA e *primers* para isoformas bcr1, bcr2 e bcr3 (Fig. 2.7). O gene ABL foi utilizado como controle endógeno. Diluições seriadas de DNA plasmidial, desenhado especificamente para este fim (ver seção 4.2.2.1), foram realizadas e utilizadas como padrões do número de cópias para a construção de uma curva padrão na proporção de 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹. As reações de PCR foram realizadas de acordo com o seguinte protocolo: A 5 μ l de cDNA (equivalente a 100ng de RNA) foram misturados: (I) 300 nM de cada *Primer* e 200 nM Sonda por reação (Quadro 3), (II) 12,5 μ l de 2x TaqMan Universal PCR master Mix [1x] e (III) água ultrapura q.s.p. 25 μ L de reação. As seguintes condições de ciclagem térmica: (I) 50°C por 2 minutos, (II) 95°C por 10 minutos, (III) 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto foram utilizadas. A cada reação foram incluídos controles de qualidade contendo uma amostra com um alto número de cópias *PML-RAR α* (amostra da linhagem celular NB4) para avaliar a reação no ponto inicial da curva padrão. A utilização destas amostras permite monitorar a variabilidade interensaio. Além destas, três tipos diferentes de controles negativos para avaliação da qualidade da reação foram utilizados: NTC (*No Template Control*), amostra de c-DNA de linhagem celular negativa para *PML-RAR α* (amostra da linhagem celular Kasumi) para avaliação da especificidade do ensaio; NAC (*No Amplification Control*) amostra contendo DNA de linhagem positiva para *PML-RAR α* ; Branco contendo todos os reagentes presentes na reação e água purificada em lugar da amostra. Como controle endógeno da reação foi utilizado o gene *ABL*. Os resultados obtidos por RQ-PCR foram considerados representativos quando o número de cópias do gene *ABL* detectado foi ≥ 10.000 . Um resultado de RQ-PCR foi avaliado como molecularmente indetectável quando não foram detectados transcritos *PML-RAR α* em uma amostra com um número de cópias do *ABL* considerado representativo. Os parâmetros utilizados para

a análise dos dados foram *thresfold* de 0,1 e *baseline* entre ciclos 3 e 15. Os níveis de *PML-RAR α* foram calculados pela relação *PML-RAR α /ABL*.

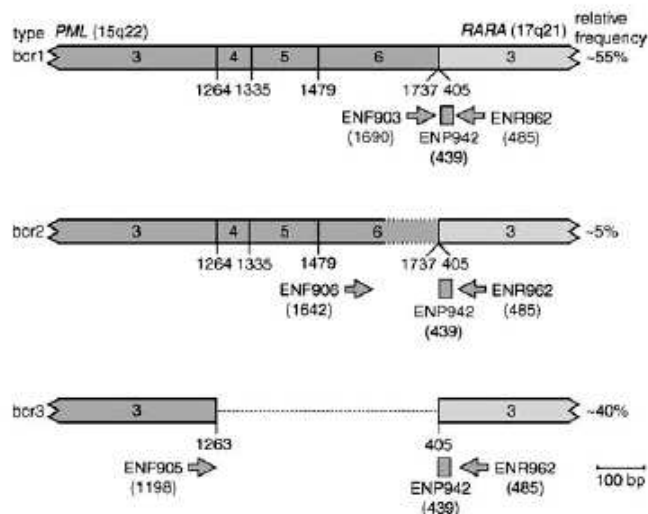


Figura 2.7. Diagrama esquematizado da cobertura do transcrito *PML-RAR α* pelo posicionamento dos primers e sonda do RQ-PCR. Fonte: (GABERT, 2003)

Quadro 3 – Sequências e posições dos primers e da sonda para realização do RQ-PCR do gene de fusão *PML-RAR α*

Oligonucleotídeo específico (Primer) e sonda	Localização e	
	Posição 5' (tamanho)	Sequência (5' – 3')
ENF-903	<i>PML</i> , 1690-1708 (19)	TCTTCCTGCCCAACAGCAA
ENF-906	<i>PML</i> , 1642-1660 (19)	ACCTGGATGGACCGCCTAG
ENF-905	<i>PML</i> , 1198-1216 (19)	CCGATGGCTTCGACGAGTT
ENP-942	<i>RARα</i> , 439-458 (20)	AGTGCCAGCCCTCCCTCGC
ENR-962	<i>RARα</i> , 485-465 (21)	GCTTGATAGATGCGGGGTAGAG

ENF: primer forward, ENP: Sonda TaqMan, ENR: primer reverse. Fonte: (GABERT, 2003)

3.2.3. Identificação de mutações no gene *RAR α*

A identificação de mutações no domínio de ligação do ATRA (LBP) do gene *RAR α* foi realizada segundo protocolo descrito por Gallagher et al, com a amplificação do fragmento de interesse mediante uma reação semi-nested PCR (Fig. 2.8). Para primeira etapa da reação, foi utilizada uma alíquota de 3 μ l do cDNA,

1,0 µl de cada iniciador (0.4 µM c/u, R – sense – e R/X – antisense – vide Quadro 4), 2 µl (200µM) de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 0,2 µl de Taq HiFi (5U/µl) (Invitrogen), 5 µl (1X Buffer para PCR HiFi) e 1,5 µl (2.5 mM) de MgSO₄ além de água ultrapura q.s.p. 50µL de reação. As condições de ciclagem térmica foram: (I) 94°C por 1 minuto, (II) 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto; (III) 68°C por 8 minutos e (IV) 10°C infinito. A segunda etapa consistiu de duas reações em tubos separados (Fase A e Fase B), uma usando os iniciadores IX sense e antisense (fase A) e outra usando os iniciadores X sense e antisense (fase B), com os demais reagentes na mesma proporção que foram utilizados na primeira etapa. A seguir, foram submetidos à ciclagem térmica de acordo com as seguintes condições: fase A: (I) 94°C por 1 minuto, (II) 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto; (III) 68°C por 8 minutos e (IV) 10°C infinito; fase B: (I) 94°C por 1 minuto, (II) 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto; (III) 68°C por 8 minutos e (IV) 10°C infinito. Após verificação da amplificação em gel de agarose 3%, os produtos foram purificados por colunas GFX (GE®), segundo especificações do fabricante e quantificados em aparelho Nanodrop. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se Big Dye V3.1, segundo especificações do fabricante e a corrida eletroforética capilar foi realizada em aparelho 3130xl (Applied Biosystems). Os eletroferogramas foram analisados por meio dos softwares Chromas V2.32 (Technelysium Pty Ltd) e Mutation Surveyor V3.3 (SoftGenetics LLC).

Quadro 4 – Sequências e posições dos primers e da sonda para realização do RQ-PCR do gene de fusão PML-RAR α

Oligonucleotídeo específico (Primer) e sonda	Sentido	Sequência (5' – 3')
IX	Sense	CCCCCTCTACCCCGCATCTACAAG
IX	Antisense	CGGGATCTCCATCTTCAGCGTGAT
X	Sense	TGATGCGGAGACGGGGCTGCTCAG
R/X	Antisense	GGGGCGGAGGGCGAGGGCTGTGTC
R	Sense	GCGCACCGATGGCTTCGACGAGTTC

Primers = oligonucleotídeos iniciadores específicos. Fonte: (GALLAGHER 1998; GALLAGHER 2012).

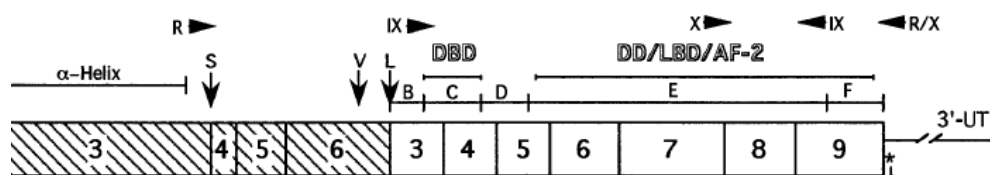


Figura 2.8. Diagrama esquematizado da cobertura do gene *RARα* e do domínio de ligação do ATRA (LBD) pelo posicionamento dos primers. Fonte: (GALLAGHER, 1998).

3.2.4. Identificação de mutações no gene *FLT3*

A duplicação em tandem do gene *FLT3* foi detectada por Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) convencional por meio de amplificação dos exons 14 e 15. Foram utilizados cerca de 100ng do DNA genômico foram misturados a: (I) Tampão comercial para PCR [1X], (II) MgCl₂ [1,5mM], (III) dNTP [200μM], (IV) *Primers* [0,5μM/cada] (Quadro 5), (V) *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) [1U] e (VI) água ultrapura q.s.p. 50μL de reação. As reações foram realizadas no termociclador Veriti® 96-well (Applied Biosystems) sob as seguintes condições de ciclagem térmica: (I) 94°C por 3 minutos; (II) 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 65°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos; (III) 72°C por 10 minutos; e (IV) 4°C *overnight*.

Os resultados foram avaliados em gel de agarose 3%, contendo 0.5 μg/mL de brometo de etídeo (Gibco) e visualizados sob luz ultravioleta. Para o fragmento selvagem (*wild type* – wt) foi esperado como produto de amplificação um fragmento de 332pb. Fragmentos acima de 332pb foram considerados sequências mutadas por ITD.

3.2.4.1. Análise quantitativa de *FLT3*:

As amostras positivas para a mutação *FLT3-ITD* foram quantificadas pelo método de análise de fragmentos utilizando-se uma PCR multiplex alelo específica e a plataforma 3130xl (Applied Biosystems®) para corrida de eletroforese capilar. A reação de PCR foi realizada segundo Noguera et al e os resultados analisados no software Peak Scanner V1.0® (Applied Biosystems®). A quantificação foi determinada através da seguinte equação: % alelo mutado = (mt/(wt+mt)). Nesta

reação foi utilizado o oligonucleotídeo iniciador não marcado (2pmol/μL) 5'GGTGTGCGAGCAGTACTCTAACAGGTGTC 3' e o iniciador marcado com FAM (2pmol/μL) 5'GATCCTAGTACCTTCCCAAACCTC3'. O produto observado é um fragmento de 366 - 369 pb correspondente ao alelo selvagem além de possíveis bandas adicionais de até aproximadamente 450pb (*FLT3-ITD*)

O perfil térmico consistiu em desnaturação inicial de 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30s, temperatura de anelamento de 53°C durante 30s e temperatura de extensão de 72°C durante 45s e extensão final de 20 min.

Quadro 5 – Primers utilizados para a amplificação dos éxons 14 e 15 do gene *FLT3* para identificação de mutações *ITD*

Éxon	Sentido	Sequência (5' – 3')
14	<i>Forward</i>	CAATTTAGGTATGAAAGCC
15	<i>Reverse</i>	GTACCTTTCAGCATTTTGAC

Fonte: (THIEDE, 2002)

3.2.5. Análise estatística e Avaliação de resposta à quimioterapia e ATRA

Além da análise de frequência, sempre que foram comparadas médias de variáveis quantitativas, como carga do transcrito PML-RARα com variáveis qualitativas, como resposta ao tratamento com QT +ATRA, foi realizado o teste t-Student bicaudal. Este teste foi utilizado tanto para variáveis não pareadas como para variáveis pareadas por sexo e idade. Utilizou-se o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, para comparar entre si, os grupos de variáveis categóricas ou qualitativas. O teste de Fisher é indicado quando o tamanho de duas amostras independentes é pequeno e consiste em determinar a probabilidade exata de ocorrência de uma frequência observada. Para amostras com um n amostral maior foi realizado o teste do qui-quadrado. A associação será considerada estatisticamente significativa sempre que o $p < 0,05$. Todas as análises e gráficos foram realizados no Excel® (v2010) e Graphpad Prism® v6.0.

4. RESULTADOS

4.1. Casuística

Foram analisadas amostras de MO e/ou SP de 42 pacientes oriundos de 7 instituições diferentes: 17 casos do Serviço de Hematologia do INCA (40,4%), 6 casos do Setor de Hematologia Pediátrica do Hospital Federal da Lagoa (14,3%), 3 casos do Serviço de Hematologia do HUCFF (UFRJ) (7%), 3 casos do Serviço de Hematologia do HUWC (7%), 3 casos do Serviço de Hematologia do Hospital Santa Rita (7%), 2 casos do Serviço de Hematologia do IPPMG (UFRJ) (4,7%), 1 caso do HEMORIO (2,4 %), 1 caso do Serviço de Hematologia do HUPE (UERJ) (2,4%), 1 caso do Serviço de Hematologia do HSE (2,4%), 1 caso do Serviço de Hematologia do HEMOES (2,4%), 1 caso do Serviço de Hematologia do Hospital Onco-Bahia (2,4%), além de 2 casos do Programa de Oncologia e Hematologia Pediátrica e 1 caso cujo origem da amostra não pôde ser identificada.

Dos 42 pacientes analisados, 18 pacientes apresentavam idade < 18 anos e 24 pacientes eram \geq 18 anos de idade. Em conformidade com os critérios de pareamento utilizados para definição do grupo controle, as variáveis idade e sexo apresentaram valores de distribuição semelhantes nos dois grupos estudados. No grupo classificado como desfecho clínico desfavorável, a idade mediana da coorte de investigação foi de 23 anos (3 – 77 anos), com uma prevalência discreta do gênero feminino (relação entre sexo feminino e masculino de 1,2:1,0). No grupo controle, a idade mediana também foi de 23 anos (3 – 42 anos) assim como também houve um predomínio do sexo feminino (1,85: 1,0). _

Foram estudados 22 pacientes com evolução clínica desfavorável (10 com recidiva da doença, 11 com morte precoce e 1 com ausência de remissão). Três dos 10 pacientes com morte precoce evoluíram para óbito muito precocemente, antes do início do tratamento quimioterápico e/ou ATRA. Os 19 pacientes que receberam tratamento e apresentaram desfecho clínico desfavorável foram classificados como não respondedores ao tratamento com ATRA + QT – sendo que 10 deles apresentaram recidiva da doença, 1 ausência de remissão e 8 morte precoce. Um

desses 8 casos de morte precoce evoluiu para óbito no 63º dia do início do tratamento, ou seja, além do prazo de 42 dias utilizado para definição de morte precoce. Entretanto, esse caso foi analisado dentro do subgrupo de pacientes com morte precoce pois o óbito ocorreu ainda no período de indução de remissão.

Como anteriormente apresentado, o PCR multiplex define o tipo de isoforma do transcrito *PML-RAR α* . A distribuição das isoformas encontradas ao diagnóstico foi estudada. O resultado desta avaliação mostrou que a isoforma bcr 1 (longa) foi a mais frequente (57%), sendo encontrada em 24 dos 42 pacientes analisados, seguida da isoforma bcr 3 (curta) presente em 13 dos 43 pacientes (31%), enquanto que 2 (5%) pacientes apresentaram ambas as isoformas. Não foi detectado nenhum paciente portador da isoforma variável (bcr2) (Fig. 3.1).

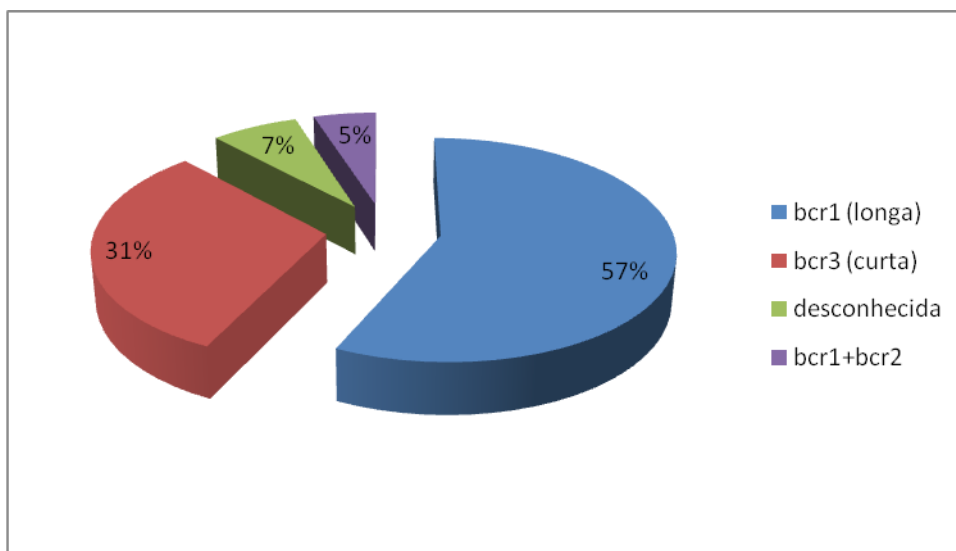


Figura 3.1. *Frequência da distribuição das isoformas do transcrito PML-RAR α ao diagnóstico.*

A isoforma bcr1 foi encontrada em 77,7% dos pacientes com bom desfecho clínico (14/18) e em 47,6% (10/21) dos pacientes com desfecho clínico desfavorável. Já a isoforma bcr3 foi mais prevalente entre os pacientes com pior evolução clínica quando comparada ao grupo de casos controle (42,8% versus 22,2%, $p= 0,11$ pelo teste qui-quadrado) (Fig. 3.2).

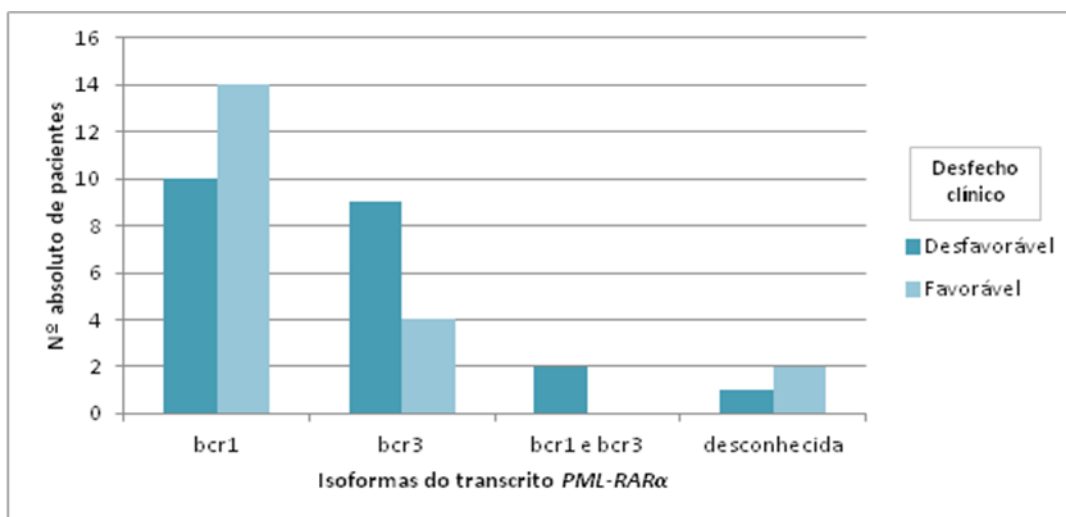


Figura 3.2. Distribuição das isoformas do transcrito de *PML-RARα* de acordo com o desfecho clínico.

4.2. Correlação entre carga do transcrito *PML-RARα*, resposta ao tratamento com QT +ATRA e leucometria ao diagnóstico

A análise comparativa da quantificação absoluta dos transcritos *PML-RARα* ao diagnóstico entre o grupo mau respondedor e bom respondedor (grupo controle) ao tratamento com ATRA evidenciou um maior valor da mediana da carga tumoral entre os pacientes mau respondedores quando comparados ao do grupo controle, 85,94 e 60,26, respectivamente – embora não tenha sido observada diferença estatística entre os dois grupos ($p=0,725$) (Fig 3.3). Devido à ausência de amostra suficiente, não foi possível a realização da quantificação da carga do *PML-RARα* em 7 dos 19 pacientes mau respondedores.

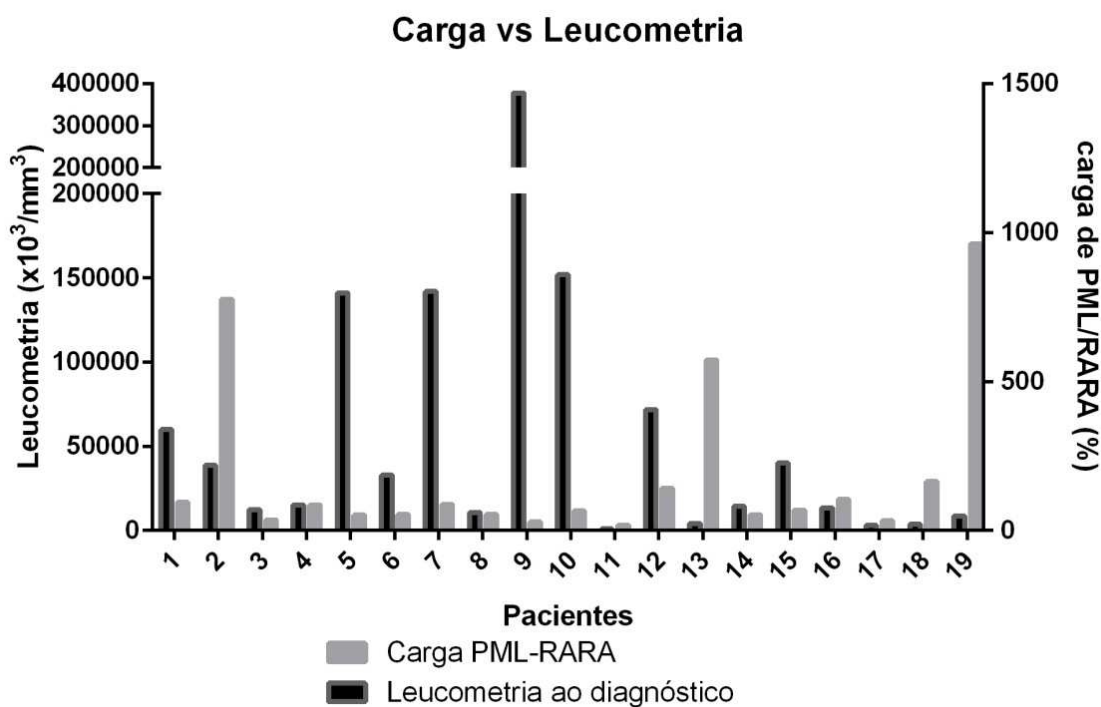


Figura 3.4. Representação gráfica da carga do transcrito PML-RAR α e da leucometria por paciente estudado.

O valor da leucometria inicial como ferramenta prognóstica também foi investigado nesta coorte. O grupo de pacientes com desfecho clínico desfavorável apresentou um valor mais alto da mediana da referida variável quando comparado ao grupo controle (mediana: 28.435 x 10³/mm³ vs 8.590 x 10³/mm³, respectivamente; $p=0,16$ pelo Teste de Fisher bicaudal).

4.3. Distribuição da frequência de mutações FLT3-ITD e sua correlação com resposta ao tratamento com QT +ATRA, isoforma e carga do transcrito PML-RAR α e leucometria ao diagnóstico

A pesquisa de mutações no gene *FLT3* (*FLT3/ITD*) foi realizada em todos os pacientes da nossa coorte e em 39 deles foi possível realizar uma semi-quantificação utilizando-se PCR seguido de análise dos fragmentos para definição da razão entre o alelo selvagem e o alelo mutado (*FLT3selvagem/FLT3mutado*). A prevalência global da mutação *FLT3/ITD* foi de 30,7% (12/39), sendo maior no grupo

de pacientes com idade < 18 anos quando comparado aos ≥ 18 anos (47% vs 18,2%, $p=0,08$ pelo Teste de Fisher bicaudal).

20 dos 39 pacientes analisados foram pertencentes ao grupo de desfecho clínico desfavorável (17 do grupo mau respondedor ao tratamento e 3 que faleceram antes do início da terapia) e 19 pertencentes ao grupo controle. Foi observada uma maior proporção de pacientes positivos para a mutação *FLT3/ITD* no grupo de pior desfecho clínico quando comparado ao grupo controle (35% vs 26,3%, respectivamente; $p=0,73$ pelo teste Fisher bicaudal), sobretudo entre os pacientes que evoluíram com morte precoce (54,5%; 6/11). Não foi observada diferença significativa entre esses grupos ($p=0,12$). (Fig 3.5)

Dentre os pacientes < 18 anos que apresentaram morte precoce, a proporção de pacientes com *FLT3/ITD* foi ainda maior 80% (4/5) quando comparado aos pacientes ≥ 18 anos e morte precoce (2/6, 33,4% dos casos), com $p=0,24$ pelo Teste de Fisher bicaudal).

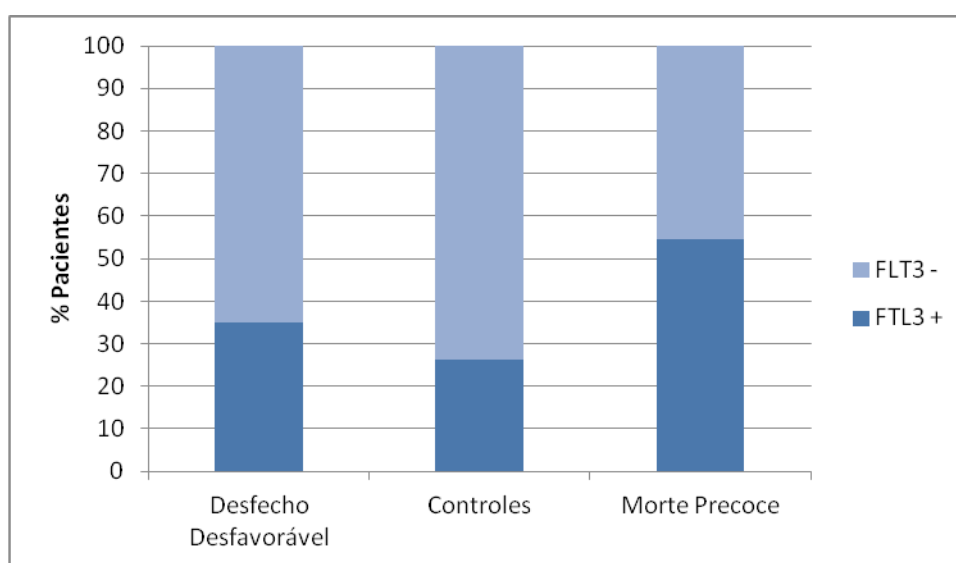


Figura 3.5. Frequência da mutação *FLT3/ITD* de acordo com a evolução clínica.

A isoforma *bcr3* revelou-se mais prevalente no grupo de pacientes positivos para a mutação *FLT3-ITD* quando comparado ao grupo de pacientes com a forma selvagem do gene (50% vs 19%, respectivamente; $p=0,11$ pelo Teste Qui-Quadrado). Neste último grupo, a isoforma *bcr1* como a mais frequente (74%). (Fig 3.6).

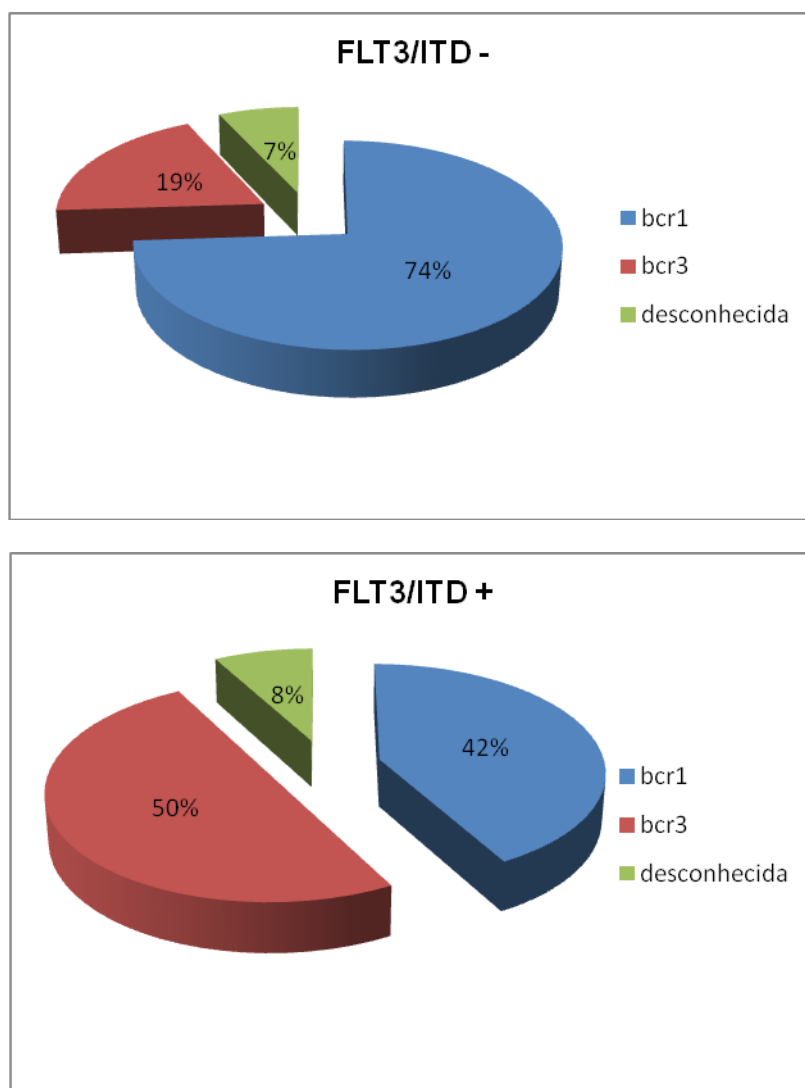


Figura 3.6. Frequência das isoformas do transcrito PML-RAR α de acordo com o status mutacional do gene FLT3.

A mediana da carga do transcrito *PML-RAR α* para os pacientes com *FLT3-ITD* positivo foi de 67,97 enquanto no grupo de pacientes negativos para *FLT3-ITD* foi de 54,22 ($p=0,7656$). Ao compararmos a mediana da leucometria ao diagnóstico, esta foi significativamente maior no grupo mutado para *FLT3-ITD* ($77.500 \times 10^3/\text{mm}^3$) quando comparado ao grupo negativo ($6370 \times 10^3/\text{mm}^3$), $p=0,0002$ (Fig 3.7).

Ao avaliarmos a leucometria entre os pacientes positivos para a mutação em *FLT3-ITD*, que foram classificados de acordo com a sua resposta ao ATRA como maus respondedores ou bons respondedores, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos $141.000 \times 10^3/\text{mm}^3$ vs $74.650 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($p=0,7879$, respectivamente).

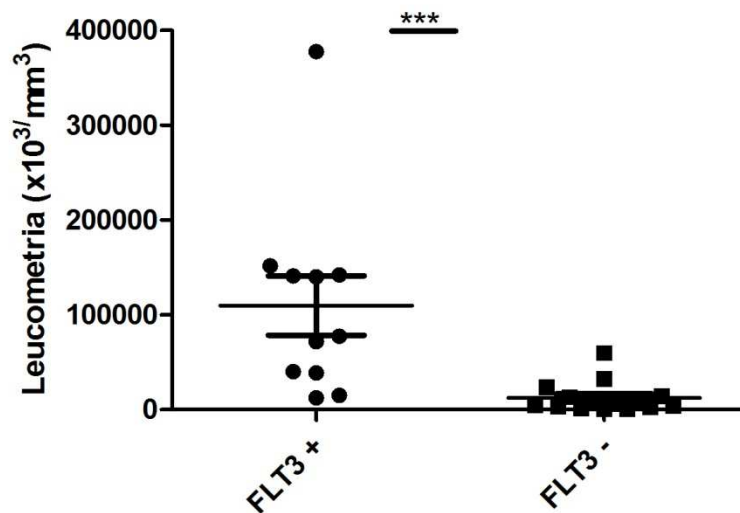


Figura 3.7. Representação da mediana da leucometria de acordo com status mutacional do gene FLT3. $p = 0,0002$.

4.4. Frequência das mutações no domínio de ligação do ATRA no gene *RARα*

A pesquisa de mutação no LBD do gene *RARα* foi realizada nos 19 pacientes mau respondedores ao tratamento com QT +ATRA. Em 9 pacientes (8 com morte precoce e 1 com ausência de remissão) a pesquisa foi feita nas amostras do diagnóstico da doença e 10 nas amostras do recaída. Em nenhum desses pacientes foi possível a detecção de mutações no LBD no *RARα*.

5. DISCUSSÃO

Apesar do significativo avanço no conhecimento da biologia das leucemias nas últimas décadas e do imenso impacto na sobrevida dos pacientes acometidos pela leucemia promielocítica aguda causado pela adição do ATRA ao esquema poliquimioterápico, ainda existem questões relevantes a serem desvendadas no âmbito da LPA.

Como discutido anteriormente, a morte precoce ainda é um evento que acomete até 30% dos pacientes recém-diagnosticados com LPA e é causada majoritariamente por complicações hemorrágicas graves. A esmagadora presença de sangramentos nos casos de óbito precoce leva-nos a crer na existência de mecanismos até então desconhecidos responsáveis por conferir resistência celular ao processo de diferenciação induzido pelo ATRA. Sendo assim, torna-se fundamental o desenvolvimento de pesquisas científicas objetivando aprofundar o conhecimento das bases genéticas e moleculares dessa provável resistência primária ao ATRA.

Escassos estudos têm apontado que mutações pontuais no domínio de ligação do ATRA no gene *RAR α* detectadas no momento de recaída estão relacionadas à resistência secundária ao ATRA. Entretanto, essas mutações não foram amplamente investigadas em casos de pacientes que evoluíram com morte precoce – como possível causa de resistência primária ao ATRA.

Após a descoberta das mutações no LBD do *RAR α* em 1992, apenas dois pacientes adultos classificados como portadores de doença refratária ao diagnóstico foram investigados para a presença dessas mutações sem que essas alterações tenham sido encontradas nesses doentes. Na nossa coorte, investigamos essas mutações em 19 pacientes, 8 deles com morte precoce, 1 paciente que não alcançou remissão após a fase de intensificação da quimioterapia e 10 pacientes recidivados. Não foram encontradas alterações no LBD no *RAR α* em nenhum dos pacientes com morte precoce e ausência de remissão, em comum acordo com o descrito pelas duas investigações anteriores, sugerindo que outros mecanismos possam estar na base dessa resistência – discutidos a frente. Da mesma forma,

também não foram encontradas mutações nos pacientes recidivados. Entretanto, esse último resultado difere do relatado em coortes mais recentes, onde a frequência de mutações no LBD no *RAR α* variou de 25 a 62,5% dos casos de recaída.

Considerando que a existência de uma pressão seletiva sobre os promielócitos malignos possa resultar no aparecimento de clones resistentes ao ATRA no momento de recaída, essa discrepância de resultados pode ser justificada por possível má adesão dos pacientes ao tratamento, uma vez que o ATRA é administrado via oral em domicílio. Dessa forma, o uso inadequado do medicamento não teria possibilitado a seleção de clones resistentes ao ATRA, mas sim clones resistentes ao esquema poliquimioterápico empregado. Coortes mais antigas, entretanto, também não encontraram a presença de mutações no LBD do *RAR α* em séries de pacientes recaídos. Ao longo dos últimos 19 anos, apenas 92 pacientes com LPA recidivada tratados inicialmente com ATRA foram investigados para mutações no *RAR α* , sendo a maior de todas as coortes realizada por Gallagher e colaboradores em 2012 com 45 pacientes. Isso pode sugerir que coortes maiores sejam necessárias para definir qual a real frequência das mutações no LBD do *RAR α* entre os pacientes com doença recidivada (Quadro 6).

Quadro 6 – Sumário dos trabalhos realizados para investigação de mutações no LBD do gene *RAR α*

Autor Principal e Ano de publicação	Origem das células analisadas	Resultados
ROBERTSON, 1992	Células da linhagem HL60	Descrição das mutações
SHAO, 1997	Células da linhagem NB4	Descrição das mutações
MOROSSETTI, 1996	Células de 6 pacientes com LPA – 5 recaídos e 1 refratário ao diagnóstico	Ausência de mutações
IMAIKUMI, 1998	Células de 23 pacientes com LPA – 20 com boa resposta ao tratamento, 2 recaídos e 1 refratário ao diagnóstico	Presença de mutação em 1 paciente recaído
DING, 1998	Células de 20 pacientes recaídos com LPA – 12 tratados com ATRA e 8 não tratados com ATRA	Presença de mutações em 3 pacientes recaídos tratados com ATRA
MARASCA, 1999	Células de 2 pacientes recaídos com LPA	Presença de mutações nos 2 pacientes (2 relatos de caso)
ZHOU, 2002	Células de 8 pacientes com LPA com 2 ou mais recaídas	Presença de mutações em 2 pacientes
GALLAGHER, 2006	Células de 18 pacientes recaídos com LPA	Presença de mutações em 6 pacientes
GALLAGHER, 2012	Células de 45 pacientes recaídos com LPA	Presença de mutações em 18 pacientes

Diante dos resultados citados, outros mecanismos podem ser considerados na fisiopatologia da resistência primária ou secundária ao ATRA. Aberrações na metabolização do ATRA, como nos casos de aumento no catabolismo oxidativo da droga pela atividade aumentada da enzima citocromo P-450, reduzindo os níveis plasmáticos de ATRA e consequentemente alterando sua disponibilidade à célula leucêmica; o aumento da concentração citoplasmática da proteína ligadora de ácido retinóico (CRABP) reduzindo a disponibilidade do ATRA no núcleo ou ainda produtos gênicos definidos como de resistência a multidrogas (MDR) têm sido descritos como possíveis causas da resistência adquirida ao ATRA. (WARRELL 1993; SHAO 1997; IMAIZUMI 1998; ZHAO 2002). Também há relatos de hipercatabolismo da proteína *PML-RAR α* em sublinhagens de NB4 intensamente selecionadas com uso de ATRA e ATO *in vitro*, sugerindo que o uso contínuo da droga *in vivo* também poderia gerar os mesmos efeitos, induzindo à resistência. (ZHOU 2002). Adicionalmente, foi observado que pacientes com LPA recaídos não respondedores ao ATRA

apresentaram mutações no gene supressor tumoral *PML* resultando numa forma truncada da proteína. Dessa forma, esses pacientes apresentariam um fenótipo de inativação completa do *PML* – visto que o alelo não envolvido na t(15;17) também estaria comprometido. Esse mecanismo poderia, além de favorecer a leucemogênese da LPA, tornar os promielócitos malignos menos responsivos a estímulos de diferenciação, tais como os induzidos pelo ATRA. (GURRIERI 2004).

Outras alterações moleculares têm sido apontadas como possíveis fatores de mau prognóstico para o pacientes portador de LPA. A presença da mutação no gene *FLT3* do tipo duplicação interna em tandem (*FLT3-ITD*) parece estar relacionada à maior incidência de desfechos clínicos desfavoráveis, sobretudo morte precoce. Recentes trabalhos têm associado mutações no gene *FLT3* à coagulopatia – principal causa de morte na indução nos pacientes com LPA. Todavia, a forte associação da mutação *FLT3-ITD* com valores mais altos de leucometria ao diagnóstico ($\geq 10.000 \times 10^3/\text{mm}^3$) – classicamente um marcador de mau prognóstico – tem dificultado a análise precisa do papel preditivo da mutação nesta população (GALE, 2005; BEITINJANEH, 2010; GALLAGHER, 2012). Na nossa coorte, a mediana da leucometria no grupo *FLT3-ITD* positivo foi significativamente maior quando comparado ao grupo de pacientes negativos para mutação, corroborando com os dados da literatura que afirmam a forte associação entre as variáveis. Da mesma forma, os pacientes com *FLT3-ITD* positivo e pior evolução clínica também apresentaram a mediana da leucometria mais alta versus o grupo de pacientes com *FLT3-ITD* positivo e boa evolução. Por outro lado, a prevalência da mutação *FLT3-ITD* foi maior no grupo com desfecho clínico desfavorável, sobretudo no subgrupo com morte precoce, e ainda mais prevalente no grupo de pacientes com morte precoce e idade < 18 anos. Embora sem significado estatístico, esses achados também seguem em acordo com os relatados por outros grupos de estudo e demonstram que realmente são necessárias coortes com um número maior de pacientes para que possa ser melhor avaliado o impacto isolado que cada uma dessas variáveis – leucometria e *FLT3-ITD* – exerce na evolução clínica dos pacientes com LPA. Adicionalmente, a prevalência da mutação na nossa coorte também foi semelhante à encontrada em outras coortes, com 30% dos nossos pacientes apresentando a mutação (KUTNY, 2012; GALE, 2005). Semelhantemente, pudemos observar uma maior prevalência da mutação entre os pacientes mais jovens (< 18 anos) assim como a maior prevalência da isoforma bcr3 (curta) no

grupo de pacientes mutados – o que também é descrito em outras séries de casos (BEITINJANEH, 2010). Assim, embora com um pequeno número de pacientes, esse estudo demonstrou concordância global com os dados que vem sendo gerados nos últimos anos pelo estudo do papel da mutação *FLT3-ITD* na LPA tornando-se animador que se prossigam análises com coortes maiores a fim de – em um futuro bem próximo – contribuir para que novas estratégias terapêuticas sejam incorporadas ao tratamento desses pacientes. O uso precoce de inibidores da via de sinalização *FLT3*, por exemplo, talvez pudesse beneficiar os pacientes com LPA pela redução da incidência de coagulopatia grave e, mesmo, contribuindo para reduzir os altos índices de morte precoce nesta população.

Outra variável estudada foi a carga do transcrito *PML-RAR α* ao diagnóstico e sua possível correlação com a evolução clínica dos pacientes com LPA. Em conformidade com resultados prévios, a carga do transcrito não apresentou correlação com o valor da leucometria ao diagnóstico, impossibilitando até o momento que a leucometria possa ser utilizada para inferir a quantidade de transcrito de um determinado paciente. Entretanto, a carga de *PML-RAR α* ao diagnóstico foi maior no grupo com pior evolução clínica, como é demonstrado em outras coortes, porém também sem força estatística suficiente. A quantificação da carga do transcrito pós a fase de indução foi apontada nos últimos anos como fator prognóstico na evolução dos pacientes com LPA. Entretanto, não pôde ser realizada nesta coorte devido à dificuldade em obtenção de amostras na fase pós-indução, já que trata-se de um trabalho composto principalmente pela análise retrospectiva. Por fim, outras variáveis classicamente associadas ao mau prognóstico também apresentaram comportamento nessa coorte semelhante ao descrito na literatura. A isoforma *bcr3* foi mais prevalente no grupo com pior desfecho clínico assim como a mediana da leucometria também foi maior neste grupo quando comparado aos pacientes com boa evolução clínica.

Considerando os resultados e comentários realizados acima, acreditamos que o referente estudo possa fomentar o desenvolvimento de novas pesquisas científicas na área da leucemia promielocítica aguda, sobretudo objetivando reduzir a incidência dos casos morte precoce e de recaída da doença. Além disso, trata-se da primeira análise do perfil molecular e da pesquisa de mutações no LBD do gene *RAR α* realizada na população brasileira.

6. CONCLUSÕES

Nesta população de pacientes com LPA...

- Aparentemente, as mutações *PRα/LBD+* não parecem estar implicadas no mecanismo molecular de refratariedade primária ao tratamento com o ATRA;
- A prevalência das mutações *PRα/LBD+* entre os pacientes recaídos parece diferir de outras populações previamente estudadas;
- Mutações *FTL3/ITD* estão correlacionadas a valores mais altos de leucometria ao diagnóstico;
- A presença da mutação *FLT3/ITD* ao diagnóstico parece estar associada a uma evolução clínica desfavorável, sobretudo para o desfecho morte precoce;
- A carga do transcrito *PML-RARα* ao diagnóstico não parece se correlacionar com os valores de leucometria ao diagnóstico.

7. REFERÊNCIAS

ABLAIN J. et al. *Retinoic acid signaling in cancer: The parable of acute promyelocytic leukemia*. Int. J. Cancer, v. 135, p. 2262–2272, 2014.

ANNESLEY C. E. et al. *The biology and targeting of FLT3 in pediatric leukemia*. Frontiers in Oncology, v. 4, n. 263, p. 1-18, 2014..

ARRIGONI P. et al. *FLT3 internal tandem duplication in childhood acute myeloid leukaemia: Association with hyperleucocytosis in acute promyelocytic*. Br J Haematol, v. 120, n. 1, p. 89-92, 2003.

AVVISATI G. et al. *Induction therapy with idarubicin alone significantly influences event-free survival duration in patients with newly diagnosed hypergranular acute promyelocytic leukemia: final results of the GIMEMA randomized study LAP 0389 with 7 years of minimal follow-up*. Blood, v. 100, p. 3141-3146, 2002.

BAI HE, et al. *Clinical characteristics of acute promyelocytic leukemia manifesting as early death*. Molecular and Clinical Oncology, v. 1, p. 908-910, 2013.

BALGOBIND B. V. et al. *Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia*. Haematologica, v. 96, n. 10, p. 1478-1487, 2011.

BEITINJANEH A. et al. *Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations in acute promyelocytic leukemia: a systematic review*. Leuk Res, v. 34, n. 7, p. 831-836, 2010.

BIONDI A. et al. *CD2 expression in acute promyelocytic leukemia is associated with microgranular morphology (FAB M3v) but not with any PML breakpoint*. Leukemia, v.9, p. 1461-1466, 1995.

BIRG F. et al. *Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages*. Blood, v. 80, n. 10, p. 2584–2593, 1992.

BOTTON S. V. et al. *Outcome of childhood acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and chemotherapy*. J Clin Oncol, v. 22, p. 1404-1412, 2004.

- BRECCIA M. et al. *Increased BMI correlates with higher risk of disease relapse and differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with the AIDA protocols.* Blood, v. 119, p. 49-54, 2012.
- BRECCIA M. et al. *ATRA + ATO: has a new standard of care been established in low-risk acute promyelocytic leukaemia?* Curr Opin Hematol, v. 21, p. 95-101, 2014.
- BRECCIA M. et al. *Occurrence of thrombotic events in acute promyelocytic leukemia correlates with consistent immunophenotypic and molecular features.* Leukemia, v. 21, p. 79-83, 2007.
- BRECCIA M., LO COCO F. et al. *Thrombo-hemorrhagic deaths in acute promyelocytic leukemia.* Thrombosis Research, v. 133, p. S112–S116 (S2), 2014.
- BREEN K. A., GRIMWADE D. et al. *The pathogenesis and management of the coagulopathy of acute promyelocytic leukaemia.* Br J Haematol, v. 156, p. 24-36, 2012.
- BREITMAN T. R. et al. *Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid.* Proc Natl Acad Sci, v. 77, p. 2936, 1980.
- BREITMAN T. R. et al. *Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid.* Blood, v. 57, p. 1000, 1981.
- BREITMAN T. R. *Induction of terminal differentiation of I-IL-60 and fresh leukemic cells by retinoic acid, in Revoltella RF (ed): Expression of Differentiated Functions in Cancer Cells.* New York, Raven, p 257, 1982.
- BURNETT A. K. GRIMWADE D. et al. *Presenting White Blood Cell Count and Kinetics of Molecular Remission Predict Prognosis in Acute Promyelocytic Leukemia Treated With All-TransRetinoic Acid: Result of the Randomized MRC Trial.* Blood, v. 93, n. 12, p. 5131-4143, 1999.
- CAROW C.E. et al. *Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/FIk2) in human leukemias.* Blood, v. 87, n. 3, p. 1089-1096, 1996.
- CASTAIGNE S. et al. *All trans retinoic acid as a differentiating therapy for acute promyelocytic leukemias. I. Clinical results.* Blood, v. 76, p. 1704, 1990.

CHEN W. et al. *mTOR signaling is activated by FLT3 kinase and promotes survival of FLT3-mutated acute myeloid leukemia cells.* Molecular Cancer, v. 9, p. 292, 2010.

CHEN Z. et al. *Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor- α locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia.* The EMBO Journal, v. 12, n.3, p. 1161 - 1167, 1993.

CREUTZIG U. et al. *Prognostic relevance of risk groups in the pediatric AML-BFM trials 93 and 98.* Ann Hematol, v. 83, s. 1, p. S112-116, 2004.

DAENEN et. al. *Retinoic acid as antileukemic therapy in a patient with acute promyelocytic leukemia and Aspergillus pneumonia.* Blood, v. 67, p. 559, 1986.

DEGOS L. et al. *Treatment of first relapse in acute promyelocytic leukemia with all trans retinoic acid.* Lancet, v. 2, p. 1440, 1990.

DI BONA E. et al. *Early haemorrhagic morbidity and mortality during remission induction with or without all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukaemia.* Br J Haematol , v. 108, p. 689-695, 2000.

DING W. et al. *Leukemic Cellular Retinoic Acid Resistance and Missense Mutations in the PML-RAR α Fusion Gene After Relapse of Acute Promyelocytic Leukemia From Treatment With All-trans Retinoic Acid and Intensive Chemotherapy.* Blood, v. 92, n. 4, p. 1172-1183, 1998.

DIVERIO D. et al. *Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the PML/RAR α fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter AIDA trial.* GIMEMA-AIEOP Multicenter AIDA Trial. Blood, v.92, p. 784–789, 1998.

DONG S. et al. *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 U S A, v. 93, n. 8, p. 3624–3629, 1996.

ESTEY E. et al. *Association between increased body mass index and a diagnosis of acute promyelocytic leukemia in patients with acute myeloid leukemia.* Leukemia, v. 11, n. 10, p. 1661-1664, 1997.

FENAUX P. et al. *All trans retinoic acid followed by intensive chemotherapy gives a high complete remission rate and may prolong remissions in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: A pilot study on 26 cases.* Blood, v. 80, p. 2176, 1992.

FENAUX P. et al. *Effect of all transretinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Results of a multicenter randomized trial. European APL 91 Group.* Blood, v. 82, n. 11, p. 3241-3249, 2003.

FLYNN P. M. W. et al. *Retinoic acid treatment of acute promyelocytic leukemia: In vitro and in vivo observations.* Blood, v. 62, n. 1, p. 121, 1983.

FONTANA A. et al. *The role of 13-cis retinoic acid in the remission induction of a patient with acute promyelocytic leukemia.* Cancer, v. 57, p. 209, 1986.

GABERT J. et al. *Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program.* Leukemia, v. 17, p.2318-2357, 2003.

GALE R. et al. *Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia.* Blood, v. 106, p. 3768–3776, 2005.

GALLAGHER R. E. et al. *Relapse of acute promyelocytic leukemia with PML-RARa mutant subclones independent of proximate all-transretinoic acid selection pressure.* Leukemia, v. 20, p. 556-562, 2006.

- GALLAGHER R. E. et al. *Treatment-influenced associations of PML-RARA mutations, FLT3 mutations, and additional chromosome abnormalities in relapsed acute promyelocytic leukemia*. Blood, v. 120, n. 10, p. 2098-2108, 2012
- GAMEIRO P. et al. *The PML-RARα transcript in long-term follow-up of acute promyelocytic leukemia patients*. Haematologica, v. 86, p. 577-585, 2001.
- GILLILAND D. G. et al. *The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia*. Blood, v. 100, p. 1532-1542, 2002.
- GONFIONI S. et al. *Crosstalk between the catalytic and regulatory domains allows bidirectional regulation of Src*. Nature Struct. Biol, v. 7, p. 281–286, 2000.
- GRIMWADE D. *The significance of minimal residual disease in patients with t(15;17)*. Best Pract Res Clin Haematol, V.15, P. 137-158, 2002.
- GRINWADE D. et al. *Can we say farewell to monitoring minimal residual disease in acute promyelocytic leukaemia?* Best Practice & Research Clinical Haematology, v. 27, p. 53–61, 2014.
- GRINWADE D. et al. *Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for “prime time”?* ASH Education Book, Blood, v. 124, p. 222-233, 2014.
- GRINWADE D. et al. *Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy*. J Clin Oncol, v. 27, n. 22, p.3650-3658, 2009.
- GURRIERI C. et al. *Mutations of the PML tumor suppressor gene in acute promyelocytic leukemia*. Blood, v. 103, p. 2358-2362, 2004.
- HONG S. H. et al. *SMRT corepressor interacts with PLZF and with the PML-retinoic acid receptor alpha (RARα) and PLZF-RARα oncoproteins associated with acute promyelocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci USA, v. 94, p. 9028-9033, 1997.
- HONMA Y. et al. *Induction of differentiation of human acute non-lymphocytic leukemia cells in primary culture by inducers of differentiation of human myeloid leukemia cell line HL-60*. Eur J Cancer Clin Oncol, v. 19, p. 251, 1983.

- HUANG M. E. et al. *Use of all trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia*. Blood, v. 72, p. 567, 1988.
- IMASUMI, *Mutations in the E-Domain of RAR α Portion of the PML/RAR α Chimeric Gene May Confer Clinical Resistance to All-transRetinoic Acid in Acute Promyelocytic Leukemia*. Blood, v. 92, p. 374-382, 1998.
- JACOMO R. H. et al. *Clinical features and outcome of 143 Brazilians with acute promyelocytic leukemia who received ATRA and anthracyclines*. Haematologica, v. 92, n. 10, p. 1431-1432, 2007.
- KELLY L. et al. *PML/RAR α and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model*. Proc Natl Acad Sci USA, v. 99, p. 8283–8288, 2002.
- KOEFLER H. P. *Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: Therapeutic implications*. Blood, v. 62, p. 709, 1983.
- KUTNY M. A. et al. *FLT3 Mutation Status Is a Predictor of Early Death in Pediatric Acute Promyelocytic Leukemia: A Report From the Children's Oncology Group Pediatric*. Blood Cancer, v. 59, p. 662–667, 2012.
- KWAAN H. C. et al. *The coagulopathy in acute promyelocytic leukaemia –What have we learned in the past twenty years*. Best Practice & Research Clinical Haematology, v. 27, p. 11-18, 2014.
- KWAAN H. C. et al. *The unique hemostatic dysfunction in acute promyelocytic leukemia*. Semin Thromb Hemost, v. 40, n. 3, p. 332-6, 2014.
- LA SERNA J. et al. *Causes and prognostic factors of remission induction failure in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and idarubicin*. Blood, V. 111, P.3395–3402, 2008.
- LE BEAU et al. *Recurring chromosomal abnormalities in leukemia in PMLRARA transgenic mice identify cooperating events and genetic pathways to acute promyelocytic leukemia*. Blood, v. 102, p. 1072–1074, 2003.
- LEAL. A. M. et al. *Características genéticas da leucemia promielocítica aguda de novo*. Rev. Bras. Hematol. Hemoterapia, v. 31, n. 6, p. 454-462, 2009.

LEVIS M. *FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013?* ASH Education Book, Blood, v. 2013, n. 1, p. 220-226, 2013.

LO-COCO F. et al. *ATRA and Arsenic Trioxide (ATO) Versus ATRA and Idarubicin (AIDA) for Newly Diagnosed, Non High-Risk Acute Promyelocytic Leukemia (APL): Results of the Phase III, Prospective, Randomized, Intergroup APL0406 Study by the Italian-German Cooperative Groups Gimema-SAL-AML SG.* Asco Annual Meeting, 2013.

MARASCA R. et al. *Missense mutations in the PML/RARligand binding domain in ATRA-resistant As2O3 sensitive relapsed acute promyelocytic leukemia.* Haematologica, v. 84, p. 963-968, 1999.

MCCLELLAN J. S. et al. *Treatment advances have not improved the early death rate in acute promyelocytic leukemia.* Haematologica, v. 97, n. 1, p. 133-136, 2012.

MCKENNA R. W. et al. *Acute promyelocytic leukemia: a study of 39 cases with identification of a hyperbasophilic microgranular variant.* Br J Haematol, v. 50, p. 201-21, 1982.

MERRIMAN R. L. et al. *Reversible inhibition by retinoids of 3-methylcholanthrene-induced neoplastic transformation in C3 HI OT'/_ clone 8 cells.* Cancer Res, v. 39, n. 1, p. 166, 1979.

MESHINCHI S. et al. *Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML.* Blood, v.108, n.1, p. 3654-3661, 2006.

MISTRY A. R. et al. *The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease.* Blood Rev, v. 17, n. 2, p. 71-97, 2003.

MIZUKI M. et al. *Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways.* Blood, v. 96, n. 12, p. 3907–3914, 2000.

MOLIN L. et al. *Advanced progress on the relationship between RA and its receptors.* Crit Rev Oncol Hematol, v. 91, n. 3, p. 271-282, 2014.

- MOROSETTI R. et al. *Infrequent alterations of the RAR alpha gene in acute myelogenous leukemias, retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemias, myelodysplastic syndromes, and cell lines.* Blood, v. 87, p. 4399-4403, 1996.
- NIE D., NARDO A. et al. *Tsc2-Rheb signaling regulates EphA-mediated axon guidance.* Nat Neurosci, v. 13, n. 2, p. 163-172, 2010.
- NILSSON B. et al. *Probable in vivo induction of differentiation by retinoic acid of promyelocytes in acute promyelocytic leukemia.* Br J Haematol, v. 57, p. 365, 1984.
- OHNO R. et al. *Multi-institutional study of all-trans-retinoic acid as a differentiation therapy of refractory acute promyelocytic leukemia.* Leukemia, v. 7, p. 1722, 1993.
- ORFALI N. et al. *Retinoid receptor signaling and autophagy in acute promyelocytic leukemia.* Exp Cell Research, v. 324, p. 1-12, 2014.
- PAIETTA E. et al. *The immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL): an ECOG.* Leukemia, v.8, p. 1108-112, 1994.
- PARK J. H. et al. *Early death rate in acute promyelocytic leukemia remains high despite all-trans retinoic acid.* Blood, v. 118, p. 1248-1254, 2011.
- REGO E. M. et al. *Improving acute promyelocytic leukemia (APL) outcome in developing countries through networking, results of the International Consortium on APL.* Blood, v. 121, p. 1935-1943, 2013.
- RICCIO J. A. et al. *Hepatic vein thrombosis (Budd-Chiari syndrome) in the microgranular variant of acute promyelocytic leukemia.* Am J Clin Pathol, v. 92, p. 366-371, 1989.
- RIZZARI C., BIONDI A. et al. *Tailoring treatment strategy for acute promyelocytic leukemia in low-income countries.* Pediatr Blood Cancer, v. 53, p. 303-5, 2009.
- ROBERTSON K. A. et al. *Retinoic acid-resistant HL60R cells harbor a point mutation in the retinoic acid receptor ligand-binding domain that confers dominant negative activity.* Blood, v. 80, p. 1885, 1992.

- ROSNET O. et al. *Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells.* Leukemia, v. 19, n. 2, p. 238–248, 1996.
- SAINTY D. et al. *A new morphological classification system for acute promyelocytic distinguishes cases with underlying PLZF-RARA rearrangements.* Blood, v. 96, p. 1287-1296, 2000.
- SALLMYR A. et al. *Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML.* Blood, v. 111, p. 3173-3182, 2008.
- SANTAMARIA C. et al. *Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia.* Haematologica, v. 92, p. 315-322, 2007.
- SATO T. et al. *Characterization of the Rheb-mTOR Signaling Pathway in Mammalian Cells: Constitutive Active Mutants of Rheb and mTOR.* Methods Enzymol, v. 438, p.307–320, 2008.
- SCHNITTGER S. et al. *Clinical impact of FLT3 mutation load in acute promyelocytic leukemia with t(15;17)/PML-RARA.* Haematologica, v. 96, n. 12, p. 1799-807, 2011.
- SHAO W. et al. *A Retinoid-Resistant Acute Promyelocytic Leukemia Subclone Expresses a Dominant Negative PML-RARa Mutation.* Blood, v. 89, p. 4282-4289, 1997.
- STAFFAS A. et al. *Presence of FLT3-ITD and high BAALC expression are independent prognostic markers in childhood acute myeloid leukemia.* Blood, v. 118, n. 22, p. 5905-13, 2011.
- STIREWALT D. L. et al. *Molecular targets in acute myelogenous leukemia.* Blood Reviews, v. 17, p. 15-23, 2003.
- SUN G. L. et al. *Clinical study on all trans retinoic acid in treatment of 544 cases of acute promyelocytic leukemia treated.* Chin J Hematol, v. 13, p.135, 1992.

- TAKAHASHI S. *Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications.* Journal of Hematology & Oncology, v. 4, n. 13, 2011.
- TESTI A. M. et al. *Acute Promyelocytic Leukemia (APL): Comparison Between Children and Adults.* Mediterr J Hematol Infect Dis, v. 6, p. 1-11, 2014.
- VAN DONGEN J. J. M. et al. *Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease.* Leukemia, v. 13, p. 1901-1928, 2003.
- WANELL R. P. et al. *Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all trans retinoic acid).* N Engl J Med, v. 324, p. 1385, 1991.
- WARRELL R. P. J. et al. *Acute promyelocytic leukemia.* N Engl J Med, v. 329, p. 177, 1993.
- WINTROBE, *Wintrobe's Clinical Hematology.* 12. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2009.
- WOLBACH S. B. et al. *Tissue changes following deprivation of fat soluble A vitamin.* J Exp Med 42:753, 1925.
- ZHANG L., SAMAD A., POMBO-DE-OLIVEIRA M. S., et al. *Global characteristics of childhood acute promyelocytic leukemia.* Blood Reviews, p. 1-25, 2014.
- ZHANG L. et al. *Quantification of PML/RAR α transcript after induction predicts outcome in children with acute promyelocytic leukemia.* Int J Hematol, v. 95, p. 500–508, 2012.
- ZHOU D. C. et al. *Frequent mutations in the ligand-binding domain of PML-RAR α after multiple relapses of acute promyelocytic leukemia: analysis for functional relationship to response to all-transretinoic acid and histone deacetylase inhibitors in vitro and in vivo.* Blood, v. 99, p. 1356-1363, 2002.

8. ANEXOS

8.1 Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INCA, número de protocolo #186.688



INSTITUTO NACIONAL DE
CÂNCER/ INCA/ RJ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ALTERAÇÕES IMUNO-MOLECULARES NAS LEUCEMIAS MIELÓIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS: INTERAÇÃO ENTRE MUTAÇÕES SOMÁTICAS E FATORES DE RISCOS ETIOPATOLÓGICOS.

Pesquisador: Maria da Socorro Pombo de Oliveira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 05241112.5.1001.5274

Instituição Proponente: Coordenação de Pesquisa

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 186.688

Data da Relatoria: 18/02/2013

Apresentação do Projeto:

O presente Projeto de Pesquisa já recebeu os Pareceres Consubstanciados números 145.293, de 12/11/2012 e 181.940, de 20/01/2013.

Objetivo da Pesquisa:

O presente Projeto de Pesquisa já recebeu os Pareceres Consubstanciados números 145.293, de 12/11/2012 e 181.940, de 20/01/2013.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O presente Projeto de Pesquisa já recebeu os Pareceres Consubstanciados números 145.293, de 12/11/2012 e 181.940, de 20/01/2013.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente Projeto de Pesquisa já recebeu os Pareceres Consubstanciados números 145.293, de 12/11/2012 e 181.940, de 20/01/2013.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Foram apresentados os documentos adequadamente. Em relação aos TCLE, todos foram dirigidos adequadamente aos pais como responsáveis pelos menores de 12 anos e aos adolescentes, assim como estão redigidos em forma de convite e com linguagem adequada.
- Foram apresentadas as garantias de sigilo e confidencialidade pelo uso das informações.

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-002
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br

8.2 Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INCA, número de protocolo #939.795



INSTITUTO NACIONAL DE
CÂNCER/ INCA/ RJ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Registro Prospectivo de Pacientes com Leucemia Mielóide Aguda em Instituições de Saúde do Estado do Rio de Janeiro.

Pesquisador: Reinaldo Dal Bello Figueiras Junior

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 32965314.8.1001.5274

Instituição Proponente: Coordenação de Pesquisa Clínica e Incorporação Tecnológica

Patrocinador Principal: Hospital do Câncer I

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 939.795

Data da Relatoria: 08/02/2015

Apresentação do Projeto:

- Projeto de Pesquisa Aprovado pelo Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 935.946. datado de 21 de Janeiro de 2015.
- A presente Emenda trata da atualização da data do início do projeto para o dia 23 de fevereiro de 2015.

Objetivo da Pesquisa:

- A presente Emenda trata da atualização da data do início do projeto para o dia 23 de fevereiro de 2015.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- A presente Emenda trata da atualização da data do início do projeto para o dia 23 de fevereiro de 2015.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- A presente Emenda trata da atualização da data do início do projeto para o dia 23 de fevereiro de 2015.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- A presente Emenda trata da atualização da data do início do projeto para o dia 23 de fevereiro de 2015.

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO **CEP:** 20.231-092
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 **Fax:** (21)3207-4556 **E-mail:** cep@inca.gov.br

Página 01 de 02

8.3 Biorrepositório para leucemia mieloide aguda: protocolo de desenvolvimento

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**BIORREPOSITÓRIO PARA LEUCEMIA MIELÓIDE
AGUDA: PROTOCOLO DE DESENVOLVIMENTO**

(acoplado ao projeto "Registro prospectivo de pacientes com Leucemia
Mielóide Aguda em Instituições de Saúde do Estado do Rio de Janeiro")

PESQUISADOR PRINCIPAL: ILANA ZALCBERG

2014