Aline de Medeiros Leal

**Avaliação da citogenética convencional e molecular em portadores de
leucemia promielocítica aguda no Serviço de Hematologia do Hospital
das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Hematologia
Orientadora: Dra. Elvira Deolinda Rodrigues
Pereira Velloso

São Paulo
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Leal, Aline de Medeiros

Avaliação da citogenética convencional e molecular em portadores de leucemia promielocítica aguda no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP / Aline de Medeiros Leal. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Hematologia.

Orientadora: Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso.

Descritores: 1.Leucemia promielocítica aguda 2.Análise citogenética
3.Hibridização *in situ* por fluorescência

USP/FM/SBD-367/08

*Dedico este trabalho à toda a
minha família, pelo carinho,
apoio e constante incentivo.*

Agradecimentos

À Dra Elvira D. Rodrigues Pereira Velloso, por quem tenho enorme carinho e admiração, agradeço pela oportunidade e confiança, por tantas lições e contribuições para minha formação profissional e pessoal; pela forma carinhosa, atenciosa e responsável com que me conduziu ao longo deste trabalho.

À Dra Mônica Conchon, por ter me aceito em sua equipe, pela confiança em mim depositada e pelos ensinamentos fornecidos.

Ao Prof. Dr. Dalton de Alencar Fischer Chamone e ao Prof. Dr. Pedro Enrique Dorlhiac-Llacer, pela oportunidade e pelos auxílios prestados para a realização deste projeto de pesquisa.

À Dra. Maria de Lourdes Chauffaile, Dra. Sandra Gualandro e Dr. Vicente Odone, pelas valiosas contribuições durante a minha qualificação.

À Cristina Aiko Kumeda e Patrícia de Barros Ferreira pela forma carinhosa com que me receberam no laboratório, pela amizade, apoio e ensinamentos constantes, fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Biologia Tumoral, pela amizade, incentivo e auxílio prestado a qualquer momento.

Ao Dr. Israel Bendit, pela oportunidade inicial e por todo auxílio prestado ao longo deste trabalho.

A toda a equipe do Laboratório de Imunopatologia do Serviço de Hematologia do HC/FMUSP, em especial a Dra. Beatriz Beltler, a Dra Gracia Martinez, a Graciela Brocardo, a Dra Juliana Pereira e a Lucilla Vianna, por toda atenção e auxílio prestado com os estudos morfológicos e imunofenotípicos, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Luis Fernando Pracchia, pela gentil colaboração na realização de toda análise estatística deste trabalho.

À Dra Sandra Gualandro, pela oportunidade e pelos valiosos auxílios fornecidos no decorrer deste trabalho. E a sua equipe, em especial a Deise Moromizato, Iara Yokomizo e Marisa Simic pela forma carinhosa com que sempre me receberam e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos pesquisadores, que gentilmente auxiliaram no processo de revisão morfológica, em especial a Dra. Gracia Martinez por toda dedicação e ensinamentos fornecidos para a realização deste projeto.

À Terezinha dos Anjos, pela forma carinhosa e atenciosa com que sempre me recebeu e por ter sido sempre tão solícita em suas funções.

À Miriam Nishi, pela atenção, carinho e apoio técnico.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
SUMMARY	

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Características epidemiológicas da leucemia promielocítica aguda.....	3
1.2 Características clínicas da leucemia promielocítica aguda.....	5
1.3 Características morfológicas e imunofenotípicas da leucemia promielocítica aguda.....	8
1.4 Características genéticas da leucemia promielocítica aguda.....	12
1.5 Diagnóstico laboratorial e terapêutica da leucemia promielocítica aguda.....	26
1.6 Importância das técnicas de citogenética convencional e da hibridação <i>in situ</i> por fluorescência (FISH) na leucemia promielocítica aguda.....	32
2 OBJETIVOS.....	37
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	39
3.1 Casuística.....	40
3.2 Métodos.....	41
3.2.1 Fluxograma do trabalho.....	41
3.2.2 Citogenética convencional.....	42
3.2.2.1 <u>Culturas de células</u>	42
3.2.2.2 <u>Preparação citogenética</u>	42
3.2.2.3 <u>Procedimento de bandamento G</u>	44
3.2.2.4 <u>Análise citogenética convencional</u>	45
3.2.3 Citogenética molecular- hibridação <i>in situ</i> por fluorescência.....	45
3.2.3.1 Técnica de FISH-fusão para pesquisa de t(15;17)-rearranjo <i>PML-RARα</i>	46
3.2.3.1.1 <u>Procedimento técnico e leitura do material</u>	46
3.2.3.1.2 <u>Interpretação técnica dos resultados</u>	47
3.2.3.2 Técnica de FISH-ruptura para pesquisa de alterações no gene <i>RARα</i>	49
3.2.4 Análise de prontuário.....	50
3.2.5 Análise estatística.....	52
4. RESULTADOS.....	53
4.1- Estudo citogenético.....	54
4.1.1- Análise citogenética convencional.....	54
4.1.2- Análise citogenética molecular- técnica de FISH.....	60
4.1.2.1- Reprodutibilidade da leitura dos sinais da técnica de FISH entre os dois observadores.....	60
4.1.2.1.1- <u>Para pesquisa de t(15;17)- rearranjo <i>PML-RARα</i></u>	60
4.1.2.1.2- <u>Para pesquisa de ruptura no gene <i>RARα</i></u>	60
4.1.2.2- Análise da técnica de FISH-fusão para pesquisa de t(15;17)- rearranjo <i>PML-RARα</i>	60

4.1.2.3- Análise da técnica de FISH-ruptura para pesquisa de alterações no gene - <i>RARα</i>	62
4.2 - Análise para a população total.....	65
4.3- Concordância entre o estudo morfológico/imunofenotípico e o estudo citogenético.....	69
4.4 - Análise para a população com presença da t(15;17)-rearranjo <i>PML-RARα</i>	71
5 DISCUSSÃO.....	76
6 CONCLUSÕES.....	91
7 ANEXOS.....	94
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

Lista de Figuras

Figura 1: 1 e 4 Demonstram esfregaço de medula óssea de paciente com LMA-M3, com promielócitos hipergranulares e algumas células com bastonetes de Auer (coloração Wright's- Giemsa x 400).

2 e 3 Demonstram esfregaço de sangue de paciente com LMA-M3v com células com núcleo convoluto e citoplasma aparentemente hipogranular, com escassez ou ausência de grânulos (coloração Wright's- Giemsa x 400).

5 e 6 Demonstram esfregaço de sangue e de medula óssea, respectivamente, de paciente com variante basofílica, onde as células leucêmicas apresentam uma alta proporção de núcleo/citoplasma e o citoplasma é fortemente basofílico com nenhum ou poucos grânulos dispersos (coloração Wright's- Giemsa x 400). (McKenna *et al.*, 1982)..... 9

Figura 2: Demonstra padrão imunofenotípico característico de Leucemia Promielocítica Aguda.

- A- Citograma – FSC: tamanho da célula; SSC: granularidade celular R1: região de promielócito.
- B- Citograma demonstrando células negativas para o antígeno de células precursoras CD34.
- C- Citograma controle
- D- Citograma: demonstra a região R1 com células positivas para o antígeno CD45 e negativas para o antígeno de células precursoras CD34.
- E- Citograma: demonstra a região R1 com células negativas para o antígeno CD14 e negativas para o antígeno HLA-DR.
- F- Citograma: demonstra a região R1 com células positivas para o antígeno mielóide CD13 e negativas para o antígeno de células T CD7.
- G- Citograma: demonstra a região R1 com células positivas para o antígeno mielóide CD33 e negativas para o antígeno CD64.
- H- Citograma: demonstra a região R1 com células negativas para molécula de adesão CD56 e negativas para o antígeno CD2..... 11

Figura 3: Representação esquemática da translocação [t(15;17)] e dos genes híbridos *PML-RAR α* e *RAR α -PML*(Wang, Chen.,2008)..... 13

Figura 4: Representação da estrutura do receptor *RAR α* , com seus principais domínios funcionais: domínio aminoterminal; domínio de ligação ao DNA; dobradiça (hinge); domínio de ligação ao ligante e suas respectivas funções..... 15

Figura 5: Representação esquemática da t(15;17), entre o cromossomo 15 e 17 envolvendo os genes *PML* e *RAR α* , levando à formação dos genes híbridos e das respectivas proteínas de fusão que conservam os domínios funcionais das proteínas parentais (Rego, Pandolfi, 2002, modificado)..... 17

Figura 6: Representação esquemática da repressão gênica mediada pela PML-RAR α . A oncoproteína reconhece sequência de DNA específica (elementos responsivos) no gene alvo e recruta enzimas repressoras, tais como as histonas desacetilases (HDAC) e DNA metiltransferases (DNMTs) levando à desacetilação de histonas, metilação do DNA e a repressão da transcrição. A região das ilhas CpG metiladas são demarcadas por sítios de ligação para a proteína MBD (do inglês methyl CpG binding domain proteins), as quais recrutam mais enzimas repressoras (Villa <i>et al.</i> , 2004).....	19
Figura 7: Demonstra de forma esquemática que os domínios funcionais da proteína RAR α se encontram preservados nas respectivas proteínas de fusão (A- domínio de ligação ao DNA; B- Domínio de ligação ao ligante) (Reiter A <i>et al.</i> , 2004).....	25
Figura 8: O ATRA induz à diferenciação do promielócito leucêmico <i>in vivo</i> . No trigésimo dia de tratamento, bastonetes de Auer (indicados na seta) são encontrados em neutrófilos circulantes no sangue periférico, indicando que estas células são derivadas dos promielócitos leucêmicos (Wang, Chen, 2008).....	29
Figura 9: Demonstra o cariótipo com banda G de paciente do sexo masculino com LPA que, além da t(15;17), apresenta trissomia do cromossomo 21(Wan <i>et al.</i> , 2003).....	33
Figura 10: A- Representa o FISH-fusão com duas sondas flanqueando as regiões de quebra dos dois genes envolvidos na translocação e o padrão de hibridação observado em um núcleo interfásico normal e em um núcleo com a translocação, onde observa o sinal de fusão amarelo (sinal vermelho/verde coincidente). B- Representa o FISH-ruptura com duas sondas posicionadas em lados opostos da região de quebra de um dos genes que se encontra envolvido na translocação e o padrão de hibridação observado em um núcleo interfásico normal e em núcleo com a translocação, onde observa-se o sinal vermelho e verde separados, indicando ruptura do gene (Van Dongen <i>et al.</i> , 2005).....	35
Figura 11: A- representação esquemática da sonda para o gene <i>PML</i> ; B- representação esquemática da sonda para o gene <i>RARα</i> ; C- Núcleo interfásico positivo para o rearranjo <i>PML-RARα</i> , com um sinal laranja, um sinal verde e uma fusão amarela (Catálogo Vysis, Inc).....	48
Figura 12: A- representação esquemática da sonda para o gene <i>RARα</i> , marcada com dois fluorocromos; B- Núcleo interfásico positivo para envolvimento do gene <i>RARα</i> , com sinal laranja, um sinal verde e o amarelo. A visualização dos dois sinais laranja e verde, separados indica ruptura no gene, a fusão representa o outro gene normal (Catálogo Vysis, Inc).....	50

Figura 13: Demonstra o cariótipo do paciente 62 com a presença da t(15;17) representada pelas setas.....	57
Figura 14: Demonstra o cariótipo do paciente 43 que, além da t(15;17), apresenta trissomia do cromossomo 8 (alteração citogenética adicional).....	57
Figura 15: Demonstra o cariótipo do paciente 16 que, além da t(15;17), apresenta isoderivativo do cromossomo 17 (alteração citogenética adicional).....	58
Figura 16: Demonstra o cariótipo do paciente 37 com alteração nos cromossomos 15, 17 e 19. (translocação variante complexa).....	58
Figura 17: Demonstra o cariótipo do paciente 41 sem detecção da t(15;17). 46,XX, - 8, t(12;20)(q14;q13),+mar.....	59
Figura 18: Demonstra o cariótipo do paciente 20 sem detecção da t(15;17). 46,XY (cariótipo normal).....	59
Figura 19: A – representa FISH interfásico negativo para o rearranjo <i>PML-RARα</i> , com dois sinais laranjas e dois sinais verdes(amostra controle negativo); B - representa FISH interfásico positivo para o rearranjo <i>PML-RARα</i> , presença do sinal de fusão amarelo (laranja/verde coincidente) (amostra controle positivo); C, D e E representam FISH interfásico positivo para o rearranjo <i>PML-RARα</i> , com um sinal laranja, um sinal verde e uma fusão, nos pacientes 20, 33, 61 respectivamente em que não foi possível observar a presença da t(15;17)(q22;q21) através da citogenética convencional.....	61
Figura 20: A, B, C, D, E, F e G representam FISH interfásico negativo para o rearranjo <i>PML-RARα</i> , com dois sinais laranjas e dois sinais verdes nos pacientes 6, 8, 27, 41, 52, 54 e 55 respectivamente em que não foi possível observar também, a presença da t(15;17)(q22;q21) através da citogenética convencional....	62
Figura 21: A - representa FISH interfásico positivo para ruptura no gene <i>RARα</i> , sinal laranja e verde separados, indicando ruptura e uma fusão representando o outro gene normal (amostra controle positivo); B – representa FISH interfásico negativo para ruptura no gene <i>RARα</i> , dois sinais de fusão amarelos (laranja/verde coincidente); C, D, E, F, G, H e I - representam FISH interfásico negativo para ruptura no gene <i>RARα</i> , com dois sinais de fusão amarelos (laranja/verde coincidente) nos núcleos interfásicos dos pacientes 6, 8, 27, 41, 52, 54 e 55 respectivamente.....	63
Figura 22: Curva de Sobrevida Global – taxa de 51,3% em dois anos.....	66

Figura 23: Curva de Sobrevida Livre de doença – taxa de 65,7% em dois anos....	66
Figura 24: Gráfico representativo da análise citogenética convencional e molecular.....	69
Figura 25: Curva de Sobrevida Global - taxa de 49,28% em dois anos.....	74
Figura 26: Curva de Sobrevida Livre de Doença - taxa de 72,10% em dois anos..	74
Figura 27: A - representa esfregaço de aspirado de medula óssea do paciente 6 com presença de inúmeros promielócitos hipergranulares (coloração Leishman x1000). B - demonstra reação de peroxidase fortemente positiva nas células leucêmicas de aspirado de medula óssea do paciente 6 (coloração Peroxidase x 1000). C - representa FISH interfásico negativo para t(15;17)- rearranjo <i>PML-RARα</i> , com dois sinais laranjas e dois sinais verdes representando os cromossomos 15 e 17, respectivamente, normais para o paciente 6 D - representa FISH interfásico negativo para ruptura no gene <i>RARα</i> , com dois sinais de fusão (laranja/verde coincidente) representando os cromossomos 17 normais para o paciente 6.....	97
Figura 28: A - representa esfregaço de aspirado de medula óssea do paciente 8 com presença de blastos de médio porte com contorno nuclear irregular, grânulos e projeções citoplasmática (coloração Leishman x1000). B - demonstra reação de peroxidase positiva nas células leucêmicas de aspirado de medula óssea do paciente 8 (coloração Peroxidase x 1000). C - representa FISH interfásico negativo para t(15;17)- rearranjo <i>PML-RARα</i> , com dois sinais laranjas e dois sinais verdes representando os cromossomos 15 e 17, respectivamente, normais para paciente 8 D - representa FISH interfásico negativo para ruptura no gene <i>RARα</i> , com dois sinais de fusão (laranja/verde coincidente) representando os cromossomos 17 normais para paciente 8.....	99
Figura 29: A - representa esfregaço de aspirado de medula óssea do paciente 27 com presença de grande quantidade de mieloblastos e alguns promielócitos e mielócitos (coloração Leishman x1000). B - representa esfregaço de aspirado de medula óssea do paciente 27 com presença de blastos positivos, alguns com bastonetes de Auer (coloração Sudan Black x 1000). C - representa FISH interfásico negativo para t(15;17)- rearranjo <i>PML-RARα</i> , com dois sinais laranjas e dois sinais verdes representando os cromossomos 15 e 17, respectivamente, normais para paciente 27 D - representa FISH interfásico negativo para ruptura no gene <i>RARα</i> ,	

com dois sinais de fusão (laranja/verde coincidente) representando os cromossomos 17 normais para paciente 27..... 101

Figura 30: **A** - representa esfregaço de aspirado de medula óssea do paciente 41 com presença de blastos, promielócitos hipergranulares e células mais diferenciadas (coloração Leishman x1000).

B - demonstra reação de peroxidase positiva nas células leucêmicas de aspirado de medula óssea do paciente 41 (coloração Peroxidase x 1000).

C - representa FISH interfásico negativo para t(15;17)- rearranjo *PML-RAR α* , com dois sinais laranjas e dois sinais verdes representando os cromossomos 15 e 17, respectivamente, normais para paciente 41.

D - representa FISH interfásico negativo para ruptura no gene *RAR α* , com dois sinais de fusão (laranja/verde coincidente) representando os cromossomos 17 normais para paciente 41..... 103

Figura 31: **A** - representa esfregaço de aspirado de medula óssea do paciente 52 com presença de células blásticas com mediana relação núcleo/ citoplasma; algumas com muitos grânulos (coloração Leishman x1000).

B - demonstra reação de peroxidase positiva em células leucêmicas com bastonetes de Auer de aspirado de medula óssea do paciente 52 (coloração Peroxidase x 1000).

C - representa FISH interfásico negativo para t(15;17)- rearranjo *PML-RAR α* , com dois sinais laranjas e dois sinais verdes representando os cromossomos 15 e 17, respectivamente, normais para paciente 52.

D - representa FISH interfásico negativo para ruptura no gene *RAR α* , com dois sinais de fusão (laranja/verde coincidente) representando os cromossomos 17 normais para paciente 52..... 105

Figura 32 : **A** - representa esfregaço de aspirado de medula óssea do paciente 55 com presença de células blásticas com mediana relação núcleo/ citoplasma; algumas com núcleo de forma convoluta; presença de algumas células hipergranulares (coloração Leishman x1000).

B - demonstra reação de peroxidase positiva em células leucêmicas de aspirado de medula óssea do paciente 55 (coloração Peroxidase x 1000).

C - representa FISH interfásico negativo para t(15;17)- rearranjo *PML-RAR α* , com dois sinais laranjas e dois sinais verdes representando os cromossomos 15 e 17, respectivamente, normais para paciente 55.

D - representa FISH interfásico negativo para ruptura no gene *RAR α* , com dois sinais de fusão (laranja/verde coincidente) representando os cromossomos 17 normais para paciente 55..... 108

Lista de Tabelas

Tabela 1- Descrição do cariótipo dos sessenta e dois pacientes analisados.....	55
Tabela 2- Análise da citogenética convencional.....	56
Tabela 3- Descrição do cariótipo e do FISH dos vinte e cinco pacientes analisados para presença do rearranjo <i>PML-RARα</i> e dos sete para ruptura no gene <i>RARα</i>	64
Tabela 4 - Características dos Pacientes.....	67
Tabela 5 - Comparação de variáveis segundo óbito durante a indução.....	68
Tabela 6 - Resultado do estudo morfológico inicial e após revisão dos sete casos.....	69
Tabela 7 - Comparação de característica segundo t(15;17)-rearranjo <i>PML-RARα</i>	70
Tabela 8 - Características dos Pacientes.....	72
Tabela 9 - Comparação de variáveis segundo óbito durante a indução.....	73
Tabela 10 - Sobrevida Global segundo variáveis.....	75
Tabela 11 - Vantagens e desvantagens das principais técnicas utilizadas para o diagnóstico genético.....	86
Tabela 12 - Comparação de variáveis segundo alteração citogenética adicional.....	109

Resumo

Leal AM. *Avaliação da citogenética convencional e molecular em portadores de leucemia promielocítica aguda no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;2008.

INTRODUÇÃO: A leucemia promielocítica aguda (LPA) é um subtipo distinto de leucemia mielóide aguda (LMA), caracterizado pela presença de um acúmulo de promielócitos anormais na medula óssea e/ou sangue periférico, riscos de coagulopatias e por alterações cromossômicas estruturais envolvendo sempre o locus gênico para o receptor alfa do ácido retinóico ($RAR\alpha$). Corresponde morfológicamente aos subtipos M3 e M3variante de LMA, segundo a Classificação Franco- Américo- Britânica (FAB) e ao subtipo de LMA associada à translocação recíproca e balanceada entre os cromossomos 15 e 17[t(15;17)] e variantes, segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde. O curso clínico da LPA tem sido modificado, nos últimos anos, de uma leucemia aguda rapidamente fatal para um dos mais curáveis subtipos de LMA. A introdução de agentes terapêuticos que atuam diretamente na lesão molecular, como o ATRA e o Trióxido de Arsênio, teve grande impacto na sobrevida da LPA. A eficácia do tratamento é dependente do rearranjo genético presente nas células leucêmicas, o diagnóstico morfológico é sugestivo da alteração genética, devendo ser rapidamente confirmado por técnicas de citogenética molecular. **MÉTODOS:** Utilizando a citogenética convencional e molecular (FISH) com sondas de fusão para o rearranjo $PML-RAR\alpha$ e de ruptura para o gene $RAR\alpha$, analisou-se 62 pacientes portadores de LPA, diagnosticados por estudo morfológico/imunofetípico no HC-FM/USP entre os anos de 1997 a 2006. **RESULTADOS:** Dos 62 pacientes analisados, 37 (59,7%) apresentaram a t(15;17)(q22;q21) visível no cariótipo; destes, 26 (42,0%) apresentaram a t(15;17) como anormalidade clonal isolada, 10 (16,1%) apresentaram outras alterações cromossômicas clonais em adição a t(15;17) e um paciente (1,6%) apresentou uma variante complexa da t(15;17). Dezoito pacientes (29%) tiveram a confirmação da presença da t(15;17)-rearranjo $PML-RAR\alpha$ através da técnica de FISH-fusão e sete (11,3%) não apresentaram ruptura no $RAR\alpha$. Ausência de sangramento ao diagnóstico ($p<0,02$) e a presença de morfologia M3v ($p<0,01$) se associaram à ausência ruptura no $RAR\alpha$. A taxa de sobrevida global (SG) em dois anos, entre os 55 pacientes que apresentaram a t(15;17)-rearranjo- $PML-RAR\alpha$ ao diagnóstico citogenético, foi de 49,28%. Duas variáveis prognósticas mostraram estar estatisticamente relacionadas à pior taxa de SG nesse estudo: idade acima de 60 anos e presença de morfologia de M3v. A taxa de Sobrevida Livre de Doença em dois anos nesses pacientes foi de 72,10%. **CONCLUSÃO:** Cerca de 11% dos pacientes diagnosticados para LPA, através de estudo morfológico/imunofenotípico, não apresentaram diagnóstico citogenético compatível para esta doença. Na ausência de sangramento ao diagnóstico e na presença de morfologia M3v o teste de FISH deve ser priorizado.

Descritores: Leucemia promielocítica aguda; Análise citogenética; Hibridização *in situ* por fluorescência.

Summary

Leal AM. Conventional and molecular cytogenetics in patients with acute promyelocytic leukemia of the Hematology Service of Clinical Hospital of São Paulo Medical School [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

INTRODUCTION: Acute promyelocytic leukemia (APL) is a distinct subtype of acute myeloid leukemia (AML), characterized by clonal expansion of myeloid precursors blocked at promyelocytic stage, risks of coagulopathy and presence of chromosomal translocations involving $RAR\alpha$ (retinoic acid receptor α) gene. Corresponds to the M3 and M3variant subtypes of AML, according to the French-American-British (FAB) classification and the subtype of AML associated with balanced reciprocal translocation between chromosomes 15 and 17 [t (15; 17)] and variants, according to the World Health Organization classification. The clinical APL course has been changed in late years, from highly fatal to highly curable subtype of AML. The introduction of therapeutic agents that act directly on the molecular lesion, such as ATRA and arsenic trioxide, had a great impact on survival of APL. The efficacy of treatment is dependent on genetic rearrangement present in the leukemia cells, the morphologic diagnosis although predictive of the specific genetic lesion genetic, should be quickly confirmed by molecular techniques. **METHODS:** We analysed cytogenetics findings in 62 patients diagnosed as promyelocytic leukemia by morphological and immunophenotypic studies at the Hematology Service of Clinical Hospital of Sao Paulo Medical School from 1997 to 2006. For this, we used karyotype and FISH with PML-RARA α fusion translocation and RARA α break-apart probes. **RESULTS:** Of the 62 patients studied, 59.7% showed the t(15;17)(q22;q21) visible in the karyotype [42.0% had t(15;17) as the sole clonal abnormality, 16.1% showed other additional abnormalities and 1.6% had a complex variant of t(15;17)], 29% had the confirmation of the rearrangement PML-RARA α through the FISH-fusion technique and 11.3% showed no break in RARA α . No bleeding at diagnosis ($p<0.02$) and the presence of M3v morphology ($p<0.01$) were associated to no RARA α rearrangement. The 24months overall survival of 55 patients with t(15;17) confirmed by cytogenetics was 49.28%. Two parameters were associated to worse rate of overall survival in this study: age > 60 years and M3v morphology . The 24 months disease-free survival was 72.10%. **CONCLUSION:** 11,3% of patients diagnosed as promyelocytic leukemia by morphological and immunophenotypic studies, showed no consistent cytogenetic diagnosis for this disease. In the absence of bleeding at diagnosis and in the presence of the M3v morphology, FISH test should be prioritized.

Descriptors: Leukemia, Promyelocytic, Acute; Cytogenetic Analysis; In Situ Hybridization, Fluorescence.

1 - Introdução

A leucemia representa um grupo de doenças hematológicas malignas caracterizado pela expansão clonal de células hematopoéticas com proliferação descontrolada, diminuição de apoptose e bloqueio na diferenciação. De acordo com a progressão da doença e linhagens hematopoéticas envolvidas, a leucemia pode ser dividida em aguda ou crônica, linfóide ou mielóide, com um número de subtipos adicionais baseados em estágios distintos de bloqueio de diferenciação de cada linhagem celular. É considerada uma das doenças malignas do gênero humano mais extensivamente caracterizada; calcula-se que cerca de 300.000 novos casos e 222.000 mortes a cada ano ocorram no mundo inteiro (Zhou *et al.*, 2007).

Em 1955, Cooperberg e Neiman relataram um caso de leucemia mielóide aguda com púrpura fibrinolítica; paciente similar foi também descrito por Pisciotta e Schultz. Em 1957, Leif Hillestad relatou o caso de três pacientes com leucemia mielóide aguda que morreram em poucas semanas e que apresentavam predomínio de promielócitos nas células brancas do sangue, tendência a hemorragias devido à fibrinólise e trombocitopenia, além de taxa de sedimentação anormal de eritrócito, provavelmente causada pela redução na concentração de fibrinogênio no plasma. O autor mencionou que esses casos eram idênticos aos casos descritos por Cooperberg e Neiman, Pisciotta e Schultz. Hillestad designou esse tipo de leucemia mielóide aguda de leucemia promielocítica aguda e concluiu que esse era o subtipo mais maligno e letal de leucemia aguda.

Em 1959, Bernard e colaboradores descreveram mais detalhes da doença, e, em 1977, Rowley e colaboradores, da Universidade de Chicago, relataram a translocação entre os cromossomos 15 e 17[t(15;17)] como um marcador genético da leucemia

promielocítica aguda. Subseqüentemente, entre os anos de 1990-1991, alguns pesquisadores clonaram os dois genes envolvidos nessa translocação (de Thé *et al.*, 1990; Kakizuka *et al.*, 1991)

A leucemia promielocítica aguda (LPA) é morfológica, clínica e citogeneticamente um subtipo distinto de leucemia mielóide aguda (LMA), caracterizado pela presença de um acúmulo de promielócitos anormais na medula óssea e/ou sangue periférico, riscos de coagulopatias e por presença, na grande maioria dos casos, de específica translocação envolvendo os cromossomos 15 e 17 [t(15;17)]. Corresponde morfológicamente aos subtipos M3 e M3variante de leucemia mielóide aguda, segundo a Classificação Franco-Américo-Britânica (FAB) e ao subtipo leucemia mielóide aguda associada à translocação recíproca e balanceada entre os cromossomos 15 e 17[t(15;17)] e variantes, segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde das Neoplasias Mielóides (Bennett *et al*, 1976; Brunning *et al.*, 2001 Vardiman JW *et al.*, 2002; Jabbour *et al.*, 2006).

1.1 - Características epidemiológicas da leucemia promielocítica aguda

Epidemiologicamente, a leucemia promielocítica aguda (LPA) também difere das outras leucemias mielóides agudas (LMAs), sendo uma das suas características mais marcantes a diferente taxa de incidência em relação à faixa etária. Em geral, a incidência das LMAs aumenta proporcionalmente com o aumento da idade; acima dos 55 anos esse aumento é exponencial. Já a incidência da LPA é muito baixa em crianças até 10 anos de idade, aumenta entre 13 e 19 anos, atinge o platô durante a fase de adultos jovens,

diminuindo depois dos 60 anos. Mais de 90% dos casos são diagnosticados entre os 15 e 60 anos e a proporção entre homens e mulheres é próxima de 1 (Malta Corea *et al.*, 1993; Douer *et al.*, 1996; Mandelli *et al.*, 2002; Ribeiro , Rego., 2006; Deschler, Lubbert., 2006).

Outra notável característica epidemiológica desta doença é sua alta incidência em determinados grupos étnicos. Estudos indicam uma maior prevalência em populações formadas por latinos e hispânicos. Nos Estados Unidos e norte da Europa, a LPA representa cerca de 5% a 10% de todas as LMAs; na parte mediterrânea da Europa, corresponde a 10%-15%; e na América Latina, representa aproximadamente 30% das leucemias mielóides agudas (Douer *et al.*, 1996; Mandelli *et al.* , 2002; Douer., 2003; Deschler , Lubbert., 2006).

No Brasil, onde a população é caracterizada por uma extensiva mistura racial, uma alta proporção de casos de leucemia promielocítica aguda tem sido observada, correspondendo a mais de 20% dos casos de leucemias mielóides agudas (Melo *et al.*, 2006; Ribeiro, Rego., 2006; Jácome *et al.*, 2007). De acordo com Llacer (1995), no período de dezembro de 1977 a dezembro de 1993 foram tratados no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas de São Paulo cerca de 187 pacientes com leucemia mielóide aguda, onde 11,9% eram portadores de LPA.

1.2 - Características clínicas da leucemia promielocítica aguda

A leucemia promielocítica aguda, devido a características próprias, necessita de diagnóstico rápido e acurado. Dentre estas, destaca-se a coagulopatia grave, a qual pode induzir a complicações trombóticas e hemorrágicas (Grimwade, Lo Coco.,2002). Cerca de 80 a 90% dos pacientes apresentam durante o diagnóstico alguma síndrome hemorrágica, sendo fatal em alguns pacientes durante o período de apresentação da doença; aproximadamente 3% morrem em consequência de hemorragia, antes do início do tratamento. A variante hipogranular encontra-se especificamente associada com risco elevado de morte precoce em decorrência de hemorragia (Avvisati *et al.*,2001; Tallman *et al.*,2005; Sanz *et al.*, 2005; Arbuthnot, Wilde *et al.*,2006).

A fisiopatologia dessa coagulopatia é complexa, resultado da ação do fator tecidual e do fator pró-coagulante neoplásico (CP) expressos pelas células leucêmicas, induzindo coagulação intravascular disseminada, exagerada fibrinólise devido predominantemente ao aumento da expressão de Anexina II na membrana das células leucêmicas e produção de citocinas pelos promielócitos leucêmicos (Arbuthnot , Wilde *et al.*,2006; Tallman *et al.*,2007).

A expressão do fator tecidual (TF) pelos promielócitos leucêmicos resulta na ativação do fator VII, levando à formação do complexo inicial (FT/FVIIa) que irá ativar o fator X, resultando no estímulo inicial que contribui para o processo da coagulação intravascular disseminada (Andoh *et al.*,1987; Méis, Levy., 2007). Além disso, a cisteína proteinase, também chamada de fator pró-coagulante neoplásico (CP) é, também, muito expressa nos promielócitos anormais, sendo responsável pelo estado trombofílico da

doença, pois atua ativando diretamente o fator X, levando à geração de trombina, independente da ativação prévia do fator VII (Arbuthnot, Wilde., 2006; Méis, Levy., 2007).

A expressão de citocinas inflamatórias, interleucina 1 β (IL- 1 β) e fator de necrose tecidual (TNF α) pelos promielócitos neoplásicos, irá estimular as células endoteliais dos vasos sanguíneos a expressarem o fator tecidual, bem como a diminuição da regulação da trombomodulina na superfície das células e irá estimular a produção de PAI-I. Como resultado desses eventos combinados, têm-se modificações no endotélio vascular, gerando superfície pró-trombótica, contribuindo para ativação da coagulação intravascular (Arbuthnot, Wilde., 2006).

Em contraste ao que ocorre na coagulação intravascular clássica, a vida média das plaquetas, bem como a concentração dos anticoagulantes naturais (antitrombina e proteína C) no plasma encontram-se normais nos pacientes com LPA (Vellenga , Mulder., 1980; Wilde, Davies., 1990; Jácomo *et al.*, 2008).

Menell e colaboradores (1999), estudando a expressão da anexina II na superfície de células leucêmicas de pacientes com LPA e outras leucemias, verificaram uma hiperexpressão de anexina II nas células de LPA, o que não foi observado nas outras LMAs. A anexina II é um receptor de superfície celular para o plasminogênio, bem como para um dos seus ativadores, o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA). Portanto, expressão aumentada da anexina II leva a aumento na produção de plasmina, principal enzima fibrinolítica; como resultado, o inibidor α_2 da plasmina (α_2 PI) é rapidamente consumido e a plasmina ativa acumula-se no plasma, favorecendo o quadro

hiperfibrinolítico da doença. Além disso, apesar da concentração do inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI) ser normal, sua atividade apresenta-se acentuadamente reduzida (Meijer *et al.*, 2000; Avvisati, *et al.*, 2001; Arbuthnot, Wilde., 2006).

Outros fatores contribuem para essa coagulopatia associada à LPA, tais como: 1-excessiva liberação de proteases pelos grânulos dos promielócitos leucêmicos, o que leva a aumento dos níveis séricos de elastase, que, além de agir diretamente na destruição do coágulo de fibrina, também tem ação inibitória sobre a coagulação mediante a lise de fibrina e geração de seus produtos de degradação, que têm ação inibitória sobre a coagulação; e 2-aumento das concentrações do fator de von Willebrand e dos seus fragmentos em circulação, estes últimos provavelmente com consequência da ação proteolítica da plasmina e também da elastase (Federici *et al.*, 1996; Arbuthnot, Wilde., 2006; Jácomo *et al.*, 2008).

Além desse quadro hemorrágico, os pacientes com LPA costumam apresentar sintomas constitucionais, como febre (observada em 15%-30% dos pacientes), astenia, hiporexia e perda ponderal. Organomegalia, adenomegalia, infiltração leucêmica do sistema nervoso central e da pele são características muito raras no diagnóstico. A contagem do sangue periférico frequentemente revela a presença de anemia, trombocitopenia e leucopenia. No entanto, poucos casos, geralmente aqueles com morfologia de variante hipogranular, podem apresentar hiperleucocitose durante o diagnóstico (Avvisati *et al.*, 2001; Mandelli *et al.*, 2002; Jácomo *et al.*, 2008).

1.3 - Características morfológicas e imunofenotípicas da leucemia promielocítica aguda

Morfolologicamente, a leucemia promielocítica aguda não é uma entidade homogênea; duas variantes citológicas têm sido identificadas na maior parte dos casos: a clássica hipergranular (LMA-M3), representando a maioria das LPAs e a variante hipogranular ou microgranular (LMA-M3v), que representa entre 15% a 20% de todas as LPAs. Uma outra forma mais rara, a variante basofílica, tem sido descrita (Mandelli *et al.*, 2002) (Figura 1).

As células leucêmicas, presentes na clássica hipergranular, são promielócitos anormais, apresentando núcleos com contornos irregulares, com a forma bilobada ou reniforme. O citoplasma dessas células é abundante, com grande quantidade de grânulos azurofílicos, múltiplos bastonetes de Auer, os quais algumas vezes se reagrupam em feixes, dando a essas células a denominação de “faggot cells” (células com maços ou feixes) (Avvisati *et al.*., 2001; Brunning *et al.*, 2001).

A variante hipogranular ou microgranular caracteriza-se pela presença de células leucêmicas com núcleo predominantemente bilobado, convoluto. O citoplasma aparentemente é hipogranular, com escassez ou ausência de grânulos, geralmente minúsculos, não perceptíveis ao microscópio óptico. Já na variante basofílica, as células leucêmicas apresentam uma alta proporção de núcleo/citoplasma e o citoplasma é fortemente basofílico com nenhum ou poucos grânulos dispersos (Avvisati *et al.*., 2001; Brunning *et al.*, 2001; Liso, Bennett., 2003).

Figura 1: 1 e 4 Demonstram esfregaço de medula óssea de paciente com LMA-M3, com promielócitos hipergranulares e algumas células com bastonetes de Auer (coloração Wright's- Giemsa x 400).

2 e 3 Demonstram esfregaço de sangue de paciente com LMA-M3v com células com núcleo convoluto e citoplasma aparentemente hipogranular, com escassez ou ausência de grânulos (coloração Wright's- Giemsa x 400).

5 e 6 Demonstram esfregaço de sangue e de medula óssea, respectivamente, de paciente com variante basofílica, onde as células leucêmicas apresentam uma alta proporção de núcleo/citoplasma e o citoplasma é fortemente basofílico com nenhum ou poucos grânulos dispersos (coloração Wright's- Giemsa x 400). (McKenna *et al.*, 1982).

Citoquimicamente, tanto a forma clássica quanto a forma variante apresentam um padrão fortemente positivo para mieloperoxidase, sudan black e cloroacetato esterase (Tomonaga *et al.*, 1985; Brunning *et al.*, 2001; Mandelli *et al.*, 2002; Liso, Bennett., 2003).

A biopsia de medula óssea é geralmente hiper celular, com promielócitos anormais, os quais possuem o núcleo freqüentemente convoluto, citoplasma relativamente abundante e com numerosos grânulos; os bastonetes de Auer podem ser identificados ocasionalmente em espécie bem preparada (Brunnering *et al.*, 2001).

Estudos de marcadores de superfície mostram que as células leucêmicas da LPA têm um padrão imunofenotípico distinto, quando comparado a outras LMAs. Elas apresentam um padrão positivo para antígenos mielóides CD13 e CD33, freqüentemente ausência de expressão de antígeno HLA-DR e geralmente tem um padrão negativo para CD34, CD7, CD11b e fracamente positivo ou negativo para CD14 e CD15. Em poucos pacientes, a expressão do CD56 tem sido detectada e essa positividade correlacionada ao mau prognóstico, segundo alguns estudos (Orfao *et al.*, 1995; Neame *et al.*, 1997; Orfao *et al.*, 1999; Murray *et al.*, 1999; Ferrara *et al.*, 2000; Avvisati *et al.*, 2001; Di Bona *et al.*, 2002; Mandelli *et al.*, 2002) (Figura 2).

Figura 2: Demonstra padrão imunofenotípico característico de Leucemia Promielocítica Aguda.

- A- Citograma – FSC: tamanho da célula; SSC: granularidade celular R1: região de promielócito.
- B- Citograma demonstrando células negativas para o antígeno de células precursoras CD34.
- C- Citograma controle
- D- Citograma: demonstra a região R1 com células positivas para o antígeno CD45 e negativas para o antígeno de células precursoras CD34.
- E- Citograma: demonstra a região R1 com células negativas para o antígeno CD14 e negativas para o antígeno HLA-DR.
- F- Citograma: demonstra a região R1 com células positivas para o antígeno mielóide CD13 e negativas para o antígeno de células T CD7.
- G- Citograma: demonstra a região R1 com células positivas para o antígeno mielóide CD33 e negativas para o antígeno CD64.
- H- Citograma: demonstra a região R1 com células negativas para molécula de adesão CD56 e negativas para o antígeno CD2.

1.4 - Características genéticas da leucemia promielocítica aguda

A leucemia promielocítica aguda é fenotipicamente, como já foi mencionado, caracterizada pelo acúmulo clonal de precursores hematopoéticos bloqueados no estágio de promielócitos. Geneticamente, ela é consistentemente associada com a presença de alterações cromossômicas estruturais, na grande maioria das vezes translocações, envolvendo sempre o locus gênico para o receptor alfa do ácido retinóico (*RARα*), localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21), resultando na formação de genes quiméricos e oncoproteínas de fusão (Villa *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005; Vitoux *et al.*, 2007).

A grande maioria dos casos de leucemia promielocítica aguda (LPA/M3/ M3v), aproximadamente 98% apresentam, durante o diagnóstico, a translocação cromossômica recíproca t(15;17)(q22;q21) entre o locus gênico para o *PML* (“Promyelocitic Leukemia”), localizado no braço longo do cromossomo 15 (15q22), e o locus gênico para o receptor alfa do ácido retinóico (*RARα*), localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21), levando à formação de dois genes híbridos: *PML-RARα*, localizado no derivativo do cromossomo 15 [der(15)], e o *RARα-PML*, localizado no derivativo do cromossomo 17 [der(17)] (Figura 3). O transcrito de fusão *PML-RARα* pode ser detectado em 100% dos pacientes com a t(15;17), enquanto o recíproco *RARα-PML* é ausente em 10% a 20% desses casos, sugerindo que o *PML-RARα* tem um papel na leucemogênese da LPA (Grimwade, Lo Coco., 2002; Sirulnik *et al.*, 2003; Vitoux *et*

al., 2007; Wang, Chen., 2008). Tanto o gene *PML* quanto o *RAR α* têm participação na hematopoese normal (Grimwade *et al.*.,2000).

O gene *PML* é considerado um gene supressor de tumor implicado no controle da estabilidade genômica. Estudos com células em cultura sugerem que ele controla a indução de apoptose dependente de p53, supressão de crescimento e senescência celular em resposta à radiação ionizante e transformação oncogênica. Além disso, *PML* é requerido para a repressão da transcrição mediada por outros supressores de tumor, como o *RB* e *Mad* (Gurrieri *et al.*, 2004). A proteína PML encontra-se organizada em dímeros; ela é caracterizada por um elemento estrutural conhecido como “motivo tripartido” formado por um anel em dedo de zinco, duas regiões B boxes, ricas em

cisteína e uma região “coiled-coil”. No núcleo, ela é detectada fazendo parte de um complexo de multiproteínas, estruturas nucleares conhecidas como “nuclear bodies” (NBs), juntamente com outras proteínas, tais como p53, pRB, Daxx, CBP, dentre outras (Grimwade., 1999; Zhong *et al.*, 2000; Lo-Coco, Ammatuna.,2006).

Na translocação cromossômica t(15;17), o ponto de quebra no gene *PML* pode ser variável, sendo capaz de gerar produtos de tamanhos diferentes, isoformas do transcrito *PML-RAR α* , entre os pacientes. No entanto, no mesmo paciente o transcrito é invariável, o que demonstra a natureza clonal do fenômeno. A quebra cromossômica do gene *PML* pode ocorrer em três sítios diferentes: íntron 6 (bcr1-“breakpoint cluster region 1”), exon 6 (bcr-2-“breakpoint cluster region 2”) e íntron 3 (bcr-3-“breakpoint cluster region 3”), levando à formação de três subtipos de transcritos do gene híbrido *PML-RAR α* : o longo, o variável e o curto respectivamente. (Gu *et al.*, 2002; Choppa *et al.*, 2003; Ruiz-Arguelles *et al.*, 2004).

Estudos indicam que a variabilidade genética, correlacionada à distribuição geográfica, pode influenciar na frequência de um determinado sítio de quebra do gene *PML*, por exemplo, pacientes oriundos da América Latina apresentam uma alta incidência de transcritos bcr1/2. Contudo, a correlação entre esses subtipos de transcritos e parâmetros clínicos ainda é controversia (Chauffaille *et al.*, 2001; Douer *et al.*, 2003; Ruiz – Arguelles *et al.*, 2004; Melo *et al.*, 2006).

O gene *RAR α* codifica o receptor alfa do ácido retinóico, o qual faz parte da superfamília de receptores nucleares de hormônios que atuam como reguladores da transcrição dependentes do ligante, capazes de se ligarem a segmentos específicos do

DNA, denominados elementos responsivos ao hormônio, e que tem um papel fundamental na diferenciação mielóide (Asou., 2007). Estruturalmente, o receptor $RAR\alpha$ possui seis domínios funcionais, a saber: região aminoterminal (A/B- que contém o domínio de transativação AF-1); o domínio de ligação ao DNA (DBD); o domínio D (região “hinge”- dobradiça); domínio de ligação ao ligante (LBD - que possui na sua região C-terminal o domínio de transativação dependente do ligante AF-2); e região F , que não tem função conhecida (Melnick, Licht., 1999) (Figura 4)

O receptor alfa do ácido retinóico ($RAR\alpha$) se liga a elementos responsivos ao ácido retinóico (RAREs) presentes nas regiões promotoras de seus genes - alvo, os quais estão envolvidos com o processo de diferenciação mielóide. Para isso, é necessária sua heterodimerização com o RXR (receptor nuclear do ácido 9- cis - retinóico) formando o

complexo RAR α /RXR, o qual pode atuar como um complexo de repressão ou como um complexo de ativação da transcrição desses genes- alvo (Kastner, Chan., 2001).

Na ausência do ligante (ácido retinóico), o RAR α /RXR liga-se a segmentos específicos do DNA na região promotora de seus genes-alvo e se associam com co-repressores transcricionais SMRT ou N-CoR, os quais recrutam as histonas desacetilases (HDAC), formando um complexo repressor. A desacetilação de histonas induz à condensação da cromatina na região promotora e impede a organização dos fatores de transcrição basal, reprimindo assim a transcrição desses genes. Já na presença de concentrações fisiológicas do ácido retinóico (1×10^{-9} M), o RAR α /RXR liga-se ao ácido retinóico. Após a ligação do ácido retinóico ao sítio ativo do receptor RAR α /RXR, que se encontra ligado ao complexo repressor, uma alteração conformacional é desencadeada, provocando a liberação do complexo repressor e a associação do RAR α /RXR com co-ativadores transcricionais, tais como a família p300/CBP de histonas acetiltransferases (HAT), nas regiões promotoras. A acetilação de histonas resulta na expansão local da cromatina e no aumento da acessibilidade de proteínas regulatórias do DNA, permitindo a organização da maquinaria de transcrição basal e a ativação da transcrição (Grimwade, 1999; Kastner, Chan., 2001; Asou., 2007).

Na translocação cromossômica t(15;17), o ponto de quebra no gene *RAR α* é invariável, ocorrendo sempre no segundo íntron. O transcrito de fusão *PML-RAR α* , retém os domínios funcionais tanto do *PML* como do *RAR α* , (figura 5); desta forma, a oncoproteína de fusão mantém a capacidade de ligação à proteína parental, de formar heterodímero com RXR e de se ligar a elementos responsivos ao ácido retinóico

(RAREs), típicos ou variantes, presentes nas regiões promotoras de genes relacionados com a diferenciação granulocítica; desta forma ela, adquire a capacidade de intervir nas funções da via do PML e dos retinóicos. Estudos sugerem, ainda, que a oncoproteína PML-RAR α atua de maneira dominante negativa sobre as proteínas parentais (Grimwade, 1999; Redner., 2002).

A oncoproteína de fusão media a repressão da transcrição de genes-alvo do receptor alfa do ácido retinóico ligando-se aos elementos responsivos desses genes, recrutando o complexo co-repressor, o qual é formado por proteínas co-repressoras e histonas desacetilases, o que leva à compactação da cromatina e repressão da transcrição gênica. Além disso, estudos recentes indicam que a oncoproteína PML-RAR α também é capaz de recrutar histonas metiltransferases e DNA metiltransferases (Dnmt1 e Dmmt3), responsáveis pela metilação e conseqüente inibição da transcrição (figura 6). É importante destacar que essa oncoproteína tem uma habilidade adicional para recrutar proteínas co-repressoras, tendo a capacidade de recrutar tanto no domínio PML como no domínio RAR α . E devido a esse estado de oligomerização, a oncoproteína PML-RAR α forma um complexo estável com o complexo co-repressor. Concentrações fisiológicas do ácido retinóico não são capazes de dissociar esse complexo e o bloqueio da transcrição dos genes envolvidos com o processo de diferenciação mielóide é mantido. A oncoproteína PML-RAR α atua, portanto, interrompendo o processo de diferenciação das células mielóides, bloqueando a maturação mielóide no estágio de promielócitos, o que pode ser um dos primeiros passos no processo de leucemogênese (Villa *et al.*, 2004; Matsushita *et al.*, 2006; Lo- Coco, Ammtuna., 2006; Hormaeche, Licht., 2007; Wang, Chen., 2008).

A oncoproteína PML-RAR α tem como alvo gênico um grupo de genes diversos com críticas funções nos processos celulares. Estudos sugerem, por exemplo, que essa oncoproteína se liga na região promotora do gene *p21*, recrutando histona desacetilase 1 e diminuindo a acetilação da histona H3, levando a uma diminuição da expressão do RNAm de *p21*. A proteína *p21* é considerada um inibidor universal das quinases dependentes de ciclina, que parece atuar no bloqueio do ciclo celular na transição G1/S,

tendo um importante papel na repressão do crescimento descontrolado da célula. Além disso, verificou-se também que ela se associa com o gene *ANKRD2* na sua região promotora, levando a uma diminuição na expressão do RNAm desse gene. *ANKRD2* interage *in vitro e in vivo* com p53, aumentando a indução do promotor de *p21* pelo p53. Diminuição de *ANKRD2* pode reduzir a atividade do promotor de *p21* (Lewin., 2001; Hoemme *et al.*, 2008).

PML-RAR α pode influenciar a transcrição mediada pelo AP1 e fatores responsivos IFN e se associar, também, à proteína PLZF (Promyelocytic leukemia zinc finger), afetando potencialmente suas funções (supressão de crescimento, repressão da transcrição e controle de programas de desenvolvimento e diferenciação) (Melnick, Licht., 1999). Além disso, essa oncoproteína de fusão pode, como citado anteriormente, se ligar à proteína parental PML, levando ao deslocamento do seu sítio subcelular normal, o que pode intervir no processo apoptótico; pode também cooperar com a ativação de mutações em tirosinas quinases, tal como a FLT3, o que confere vantagem proliferativa e sobrevida às células hematopoiéticas. Mutações na FLT3 estão relacionadas à progressão da doença e têm sido detectadas em uma frequência alta, acima de 45%, nos pacientes com LPA (Noguera *et al* 2002; Gale *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005).

Estudos com camundongos transgênicos indicam que, apesar da presença da oncoproteína de fusão PML-RAR α ser essencial para a patogênese da doença, alterações, mutações em outros genes, tal como *FLT-3* e *K-ras*, são necessárias para um fenótipo transformante completo (Kelly *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2006).

Cerca de 30% a 40% dos pacientes com leucemia promielocítica aguda apresentam, durante o diagnóstico, outras alterações cromossômicas em adição a t(15;17); são as chamadas alterações citogenéticas adicionais, sendo as mais frequentes: trissomia do cromossomo 8, anormalidades estruturais no cromossomo 9, trissomia do cromossomo 21, isocromossomo do braço longo do cromossomo 17. O papel dessas alterações citogenéticas adicionais no prognóstico da doença ainda não é claro, com divergência em vários trabalhos (Schoch et al., 1996; Hiorns *et al.*, 1997; De Botton *et al.*, 2000; Pantic *et al.*, 2000; Avvisati *et al.*, 2001; Cassinat, Chomienne, 2001; Hernández *et al.* 2001; Xu *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2003;).

Em alguns casos, ocorrem variantes complexas da translocação envolvendo os cromossomos 15 e 17 [t(15;17)], onde há, além do envolvimento desses cromossomos levando à formação do transcrito PML-RAR α , o envolvimento de um ou mais outros cromossomos. Como exemplo, cita-se a t(6;15;17)(q25;q22;q21), descrita por Eclache e colaboradores em 2005, que leva ao envolvimento dos cromossomos 6, 15 e 17. De acordo com as reportagens prévias na literatura, o curso do prognóstico dos pacientes com LPA que apresentam essas variantes complexas da t(15;17), em que a fusão PML-RAR α permanece intacta no derivativo do cromossomo 15, não difere do curso do prognóstico observado nos pacientes com a típica t(15;17) (Tirado *et al.*, 2005).

Em aproximadamente 2% dos casos, o gene RAR α pode está fusionado com outros genes que não o PML, levando à formação de proteínas de fusão conhecidas genericamente como X-RAR α , resultado de alterações estruturais, em sua grande maioria translocações alternativas, envolvendo o locus gênico para o receptor alfa do

ácido retinóico (*RARα*) localizado no cromossomo 17q21, mas não o locus gênico para o PML (Sainty *et al.*, 2000; Grimwade *et al.*, 2000; Brockman *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2005).

A primeira translocação alternativa, envolvendo o locus gênico para o receptor alfa do ácido retinóico (*RARα*) na LPA, foi descrita por Chen e colaboradores, em 1993, em um paciente com LPA que apresentava o cariótipo incomum: 46,XY, t(11;17)(q23;q21). Essa translocação ocorre entre o locus gênico para o *PLZF* (“Promyelocytic Leukemia Zinc Finger”), localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q23), e o locus gênico para o receptor alfa do ácido retinóico (*RARα*), localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21), levando à formação de dois genes híbridos: *PLZF-RARα* e o *RARα-PLZF* (Redner., 2002). O gene *PLZF*, também denominado de *ZBTB16* (Swerdlow SH *et al.*, 2008), codifica uma proteína que atua como um fator repressor da transcrição gênica que contém, na sua região aminoterminal, o domínio POZ e, na sua região carboxiterminal, um anel em dedo de zinco, domínios estes importantes para interação com outros fatores de transcrição e formação de complexos repressores (Melnick, Licht., 1999; Redner., 2002). Levantamentos epidemiológicos indicam o rearranjo molecular *PLZF-RARα* como o segundo mais comum rearranjo molecular associado com a LPA, sendo atribuído à aproximadamente 0,8% dos casos (Grimwade *et al.*, 2000). A leucemia promielocítica aguda caracterizada geneticamente pela presença da t(11;17)(q23;q21) apresenta algumas características morfológicas e imunofenotípicas que permitem diferenciá-la da LPA com a clássica t(15;17). Estas características incluem: núcleo mais regular, aumento do número de células com

projeções citoplasmáticas, expressão freqüente de CD56 e morfologia intermediária entre LMA-M2 /LMA-M3. Além disso, ao contrário do que ocorre na LPA com a clássica t(15;17), na LPA com a t(11;17)(q23;q21) a expressão da proteína de fusão recíproca *RARα-PLZF* pode influenciar nas características e no curso da doença (Grimwade *et al.*, 2000; Sainty *et al.*, 2000; Redner *et al.*, 2002; Mandelli *et al.*, 2002).

A segunda translocação alternativa a ser descrita foi a translocação entre os cromossomos 5 e 17, t(5;17)(q35;q21), onde temos o envolvimento do locus gênico para o *NPM* (“Nucleophosmin”), localizado no braço longo do cromossomo 5 (5q35) e o locus gênico para o receptor alfa do ácido retinóico (*RARα*) localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21), levando à formação de dois genes híbridos: *NPM-RARα* e o *RARα-NPM* (Redner., 2002). O gene *NPM* codifica uma fosfoproteína nuclear que participa no processamento do RNA ribossômico, tem atividade de chaperona e de nuclease. Estudos indicam que ela se encontra associada com o centrôssomo e possivelmente tem um papel na regulação da duplicação normal do mesmo. O fenótipo da LPA associada com essa translocação é morfologicamente de LMA-M3 (Melnick, Licht., 1999; Redner., 2002).

Outra translocação alternativa descrita na literatura relacionada com a LPA é a t(11;17)(q13;q21), onde ocorre o envolvimento do locus gênico para o gene *NuMA* (“Nuclear Matrix-Mitotic Apparatus”), localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q13), e o locus gênico para o receptor alfa do ácido retinóico (*RARα*), localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21), levando à formação do gene híbrido *NuMA-RARα*; a presença do híbrido *RARα-NuMA* não tem sido descrita. É considerado o

primeiro rearranjo genético em que ocorre o envolvimento de um gene relacionado com o aparato mitótico em neoplasia humana. A proteína NuMA parece ter um papel no núcleo interfásico, como um importante componente da matriz nuclear, auxilia na função do fuso durante a mitose, na reorganização nuclear durante a telófase e no processo de apoptose (Melnick, Licht., 1999; Grimwade *et al.*, 2002; Redner., 2002). Dados da literatura mostram, também, que o gene *RARα* pode estar fusionado com o gene *STAT5b*, como verificado em um paciente portador de LPA com derivativo do cromossomo 17 [der(17)]. Análise cromossômica revelou que o der(17) era resultado da duplicação intersticial da região do cromossomo 17 - 17q21-q23 e estudos moleculares permitiram verificar a inserção do gene *STAT5b* no segundo íntron do gene *RARα*. O gene *STAT5b* faz parte da família de genes que atuam com ativadores da transcrição e de transdução de sinal (Arnould *et al.*, 1999; Kusakabe *et al.*, 2008).

Recentemente foram descritas na literatura duas novas variantes genéticas da LPA; no primeiro caso, o paciente apresentava o cariótipo 47,XY,+22[5]/46,XY[30] e, com a ajuda de técnicas da citogenética molecular e da biologia molecular, foi possível verificar que o gene *PRKARIA* se encontrava fusionado com o gene *RARα*, levando à formação do gene híbrido *PRKARIA-RARα*. O gene *PRKARIA*, localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q24), codifica a subunidade reguladora tipo α I da proteína PKA (Proteína Quinase Dependente de AMPc), a qual atua, por exemplo, como reguladora da expressão gênica (Catalano *et al.*, 2007); no segundo caso, o paciente apresentava o cariótipo 47,XX,t(4;17)(q12;q21),+8 e, também, com a ajuda de técnicas da citogenética molecular e da biologia molecular verificou-se que o gene *RARα* se

encontrava fusionado com o gene *FIP1L1*, levando a formação do gene híbrido *FIP1L1-RAR α* (Kondo *et al.*, 2008).

De modo geral, em comum com a doença associada à clássica t(15;17), em cada um desses casos o *RAR α* foi encontrado rompido no segundo íntron, preservando os domínios funcionais nas respectivas proteínas de fusão. Estas proteínas parecem atuar de maneira dominante negativa sobre a proteína parental *RAR α* (Figura 7)(Grimwade., 1999; Reiter *et al.*, 2004). Além disso, essas proteínas de fusão (X-*RAR α*) possuem, também, uma alta afinidade para o complexo co-repressor, não respondendo a doses fisiológicas do ácido retinóico, levando com isso a uma repressão gênica incessante. Esta repressão gênica contribui para o bloqueio da diferenciação mielóide, desregulação do ciclo celular e vantagem proliferativa, culminando na transformação leucêmica (Melnick, Licht., 1999; Wang, Chen., 2008).

A leucemia promielocítica aguda é, portanto, um exemplo de malignidade hematológica onde se tem a combinação de alterações genéticas e epigenéticas no processo de leucemogênese, alterações cromossômicas estruturais influenciando no equilíbrio dinâmico da cromatina na região promotora de alguns genes (Menditi, Kang., 2007).

1.5 - Diagnóstico laboratorial e terapêutica da leucemia promielocítica aguda

Na leucemia promielocítica aguda o diagnóstico rápido é crítico para a decisão terapêutica (Lock *et al.*, 2004; Rizzatti *et al.*, 2004;). Vários métodos laboratoriais têm sido empregados em conjunto para auxiliar no diagnóstico, tais como: hemograma, mielograma, biopsia de medula óssea, citometria de fluxo, imunofluorescência com anticorpos anti-PML, citogenética convencional e molecular e reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR), os quais irão permitir visualizar as características da doença descritas anteriormente. De modo simplificado, o hemograma geralmente evidencia pancitopenia e quando existe leucocitose, esta costuma ser discreta (Jácomo *et al.*, 2008). Blastos com morfologia de promielócitos podem ser vistos na lâmina de sangue periférico; o mielograma evidencia infiltração maciça por promielócitos neoplásicos que se coram fortemente à reação da mieloperoxidase e ao Sudan Black, os subtipos morfológicos podem ser identificados. A citometria de fluxo permite evidenciar os blastos com elevada autofluorescência com padrão imunofenotípico distinto, como descrito anteriormente. As técnicas de citogenética e biologia molecular permitem visualizar as alterações genéticas características da doença, anteriormente descritas, e a imunofluorescência com anticorpos anti-PML permite observar a redistribuição subcelular da proteína PML, que, nos pacientes portadores do rearranjo PML-RAR α , observa-se, na microscopia, um padrão microparticulado (Lo-Coco, Ammatuna, 2006; Jácomo *et al.*, 2008).

O curso clínico da leucemia promielocítica aguda tem sido modificado, nos últimos anos, de uma leucemia aguda rapidamente fatal para um dos mais curáveis subtipos de leucemia mielóide aguda. Este revolucionário progresso no prognóstico da doença foi atribuído essencialmente aos avanços notáveis em seu tratamento, mais especificamente com a introdução de novos agentes terapêuticos que atuam diretamente na lesão molecular, como: o ácido *all-Trans* – Retinóico (ATRA), um derivativo da vitamina A, e o Trióxido de Arsênico (ATO), passando a ser considerado o primeiro exemplo de sucesso de terapia alvo molecular baseado na indução da diferenciação e apoptose (Avvisati *et al.*, 2001; Reiter *et al.*, 2004; Wang, Chen., 2008).

Atualmente, o tratamento para leucemia promielocítica aguda é dividido em três fases: indução de remissão, consolidação e manutenção, basicamente, incluindo: o uso simultâneo do ATRA e quimioterapia à base de antracíclicos para a indução de remissão e consolidação, seguida de manutenção com ATRA, uso do Trióxido de Arsênico, sobretudo na terapia de recidivas e formas refratárias da doença. A combinação do uso do ATRA/ATO/quimioterápicos no tratamento da LPA tem permitido alcançar remissão molecular em aproximadamente 94% dos pacientes, com sobrevida livre de doença superior a 90% aos cinco anos de diagnóstico. Além dessa terapêutica antileucêmica, medidas de suporte que visam ao desaparecimento dos sinais clínicos e laboratoriais de coagulopatia são críticas para o sucesso do tratamento (Soignet *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000; Fenaux *et al.*, 2001; Mandelli *et al.*, 2002; Sanz *et al.*, 2004; Douer, Tallman, 2005; Sanz, 2006; Wang, Chen., 2008). Acoplado a esse arsenal terapêutico, no combate à doença, a definição de grupos de risco para recaída pode estabelecer estratégias de tratamento diferenciado para pacientes de pior prognóstico. Sanz e colaboradores (2000)

definiram um perfil basal de risco que leva em conta duas variáveis: contagem de leucócitos e contagem de plaquetas, permitindo agrupar os pacientes em três grupos de risco: baixo risco (leucócitos $\leq 10 \times 10^9/L$ e plaqueta $> 40 \times 10^9/L$); risco intermediário (leucócitos $\leq 10 \times 10^9/L$ e plaqueta $\leq 40 \times 10^9/L$); e alto risco (leucócitos $> 10 \times 10^9/L$).

Os benefícios clínicos, notáveis, atribuídos ao uso do ATRA no tratamento da LPA têm aumentado o interesse no esclarecimento dos seus mecanismos de ação. O ATRA atua diminuindo as propriedades pró-coagulantes e fibrinolíticas dos promielócitos leucêmicos, ajudando no combate à coagulopatia (Arbuthnot, Wilde., 2006).

Estudos têm demonstrado que a oncoproteína de fusão PML-RAR α é alvo direto do ATRA, concentrações farmacológicas desse medicamento (10^{-6} - 10^{-7} M) levam à mudança conformacional na oncoproteína de fusão, ocasionando a dissociação do complexo repressor e a associação de ativadores transcricionais, como as histonas acetiltransferases (HAT), levando ao desbloqueio da transcrição nos genes alvo (Chen *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2005;). O ATRA também promove a degradação da oncoproteína de fusão PML-RAR α via caminhos diferentes, sendo reportado que ele pode provocar a clivagem mediada por caspases da oncoproteína de fusão na região da proteína PML (Nervi *et al.*, 1998). Estudos verificaram, também, que a degradação tanto da proteína RAR α , quanto da PML-RAR α (via domínio RAR α) pode ser mediada pelo sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma e que, de fato, o número de componentes do sistema proteolítico necessário para a degradação da oncoproteína PML-RAR α pode ser significativamente aumentado em presença do ATRA (vom Baur *et al.*, 1996; Wang, Chen., 2008). A degradação da PML-RAR α

contribui para restauração da sinalização normal dos retinóides e das funções normais do complexo de multiproteínas do qual a PML faz parte (PML-NB); contudo, este evento é considerado tardio se comparado com a modulação da atividade trans-regulatória da proteína de fusão (Zhou *et al.*, 2007). O ATRA também induz à AMPc, aumentando a diferenciação, e altera o ciclo celular levando a uma parada na fase G1, em decorrência do acúmulo da proteína RB na forma hipofosforilada e indução da expressão da proteína p21 (Melnick, Licht., 1999; Kamashev *et al.*, 2004;).

A análise de dados de transcriptoma e proteoma de células de LPA em diferenciação, em decorrência do tratamento com ATRA, revelou a indução de um conjunto de co-fatores e de fatores de transcrição, ativação da sinalização pelo cálcio, estimulação da via do IFN, ativação do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma necessário para a degradação da oncoproteína PML-RAR α e restauração do PML-NB, parada no ciclo celular, inibição da angiogênese, diminuição da expressão do fator tecidual e aumento do potencial apoptótico. Conseqüentemente, o ATRA induz à diferenciação do promielócito leucêmico e o destina à morte celular programada (Zhou *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007) (Figura 8).

Apesar da excelente resposta ao ATRA em pacientes com a LPA associada à t(15;17) e, portanto, à proteína PML-RAR α , os portadores de outras translocações envolvendo o RAR α apresentam sensibilidade variável a este medicamento. Pacientes portadores do rearranjo PLZF-RAR α não respondem ao ATRA, já que doses farmacológicas maiores desse medicamento não conseguem liberar o complexo repressor associado à porção aminoterminal do motivo PLZF, mantendo, com isso, a repressão da transcrição de genes necessários para a diferenciação mielóide. Contudo, o uso do ATRA, combinado com inibidores de histonas desacetilases, pode não somente reverter a repressão da transcrição, como também permitir a diferenciação da célula nesses pacientes (Zhou *et al.*, 2005). Casos de LPA associados com rearranjos envolvendo NPM, NuMA, PRKAI1 e FIP1L1 parecem responder ao ATRA (Redner *et al.*, 1997; Melnick, Licht., 1999; Catalano *et al.*, 2007; Kondo *et al.*, 2008). A administração do ATRA em paciente com o rearranjo envolvendo STAT5B melhorou a coagulação intravascular disseminada sem diminuição das células leucêmicas (Kusakabe *et al.*, 2008).

A oncoproteína de fusão PML-RAR α também é alvo direto do Trióxido de Arsênio (As₂O₃ - ATO); pesquisas indicam que a região rica em cisteína do motivo PML da oncoproteína de fusão é a principal candidata para interagir com o ATO (Chen *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2007). A ação desse agente terapêutico nas células leucêmicas é dose dependente, onde, em baixas concentrações (0.25-0.5 x 10⁻⁶M), ocorre indução da diferenciação parcial dessas células e, em altas concentrações (1-2 x10⁻⁶M), ocorre indução de apoptose (Zhang T *et al* 2000; Lo-Coco, Ammatuna, 2006; Wang, Chen.,

2008). Estudos com cultura de células sugerem que baixas concentrações do ATO causam aumento de acetilação de histonas H3 e H4, um processo a favor da ativação da transcrição gênica (Chen *et al.*, 2001). O ATO tem três mecanismos de ação principais: produção de produtos reativos do oxigênio que induzem à fosforilação e ativação da via da Jun N-terminal Kinase (JNK), desencadeando apoptose; a fosforilação e sumolização da PML-RAR α , levando à sua degradação; e inibição da transcrição do gene *hTERT* e conseqüente diminuição da telomerase, levando à fusão cromossômica e apoptose (Chen *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2002 ; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008; Wang, Chen., 2008).

O ATRA e o Trióxido de Arsênico são, portanto, dois agentes terapêuticos que atuam na degradação da oncoproteína de fusão PML-RAR α através de mecanismos distintos. Pesquisas têm demonstrado que o ATRA, em combinação com Trióxido de Arsênico, atua de forma sinérgica, aumentando a degradação da oncoproteína de fusão PML-RAR α e a apoptose, o que representa uma explicação plausível para os bons resultados observados na clínica com o uso da terapêutica baseada na combinação do ATRA/ATO/quimeoterápicos (Zhou *et al.*, 2005; Jabbour *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Wang, Chen., 2008).

1.6 - Importância das técnicas de citogenética convencional e da hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) na leucemia promielocítica aguda.

A Organização Mundial de Saúde, com base na classificação de tumores dos tecidos hematopoético e linfóide, ressalta a importância das anormalidades cromossômicas para o diagnóstico correto, direcionamento do tratamento apropriado e monitoramento da resposta terapêutica das neoplasias hematológicas (Jaffe *et al.*, 2001; Swerdlow *et al.*, 2008). Na leucemia promielocítica aguda o diagnóstico morfológico, embora seja altamente sugestivo da lesão genética específica nos casos da morfologia hipergranular (típica), é considerado insuficiente. Pacientes com características morfológicas sugestivas de LPA que não apresentam o rearranjo *PML-RAR α* , ou alternativamente, pacientes cujo aspecto morfológico não leva à suspeita de LPA, porém possuem a alteração genética específica, têm sido descritos frequentemente na literatura (Lo Coco *et al.*, 1999; Grimwade *et al.*, 2000; Lock *et al.*, 2004). Por causa da diferença na eficácia do tratamento baseado no ATRA ser estritamente dependente do rearranjo genético presente nas células leucêmicas, a confirmação do mesmo é obrigatória durante o diagnóstico na LPA, levando a necessidade de um diagnóstico genético rápido e preciso (Lock *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2005).

A análise citogenética convencional, baseada no cariótipo, é fundamental na caracterização da alteração cromossômica presente, durante o diagnóstico, em pacientes com suspeita de LPA, pois, além de permitir identificar a presença ou ausência da clássica t(15;17), permite observar outras alterações cromossômicas numéricas e

estruturais que, por ventura, possam estar presentes nas células leucêmicas em conjunto com a $t(15;17)$ (Figura 9). Contudo, como em toda técnica laboratorial, na análise citogenética convencional também podem ocorrer resultados “falsos-negativos”. Segundo a literatura, em cerca de 10% dos casos de LPA não se detecta a presença da $t(15;17)$ no cariótipo, porém o rearranjo *PML-RAR α* se encontra presente e isso pode ser decorrente da análise citogenética de células que não pertencem ao clone neoplásico, da dificuldade em obtenção de metáfases em número e qualidade necessários para a visualização da alteração ou, em alguns casos, em decorrência da presença de rearranjos crípticos, caracterizados pela inserção submicroscópica do *RAR α* no *PML*, que mascaram a translocação. E em decorrência disto, técnicas adicionais podem ser necessárias para complementar a citogenética convencional na confirmação do diagnóstico genético da LPA (Grimwade, Lo Coco.,2002; Schoch *et al.*, 2002; Zaccaria *et al.*, 2002; Owatari *et al.*, 2007).

A técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) representa uma ferramenta complementar a citogenética convencional de grande importância no auxílio do diagnóstico da LPA, principalmente nos casos em que a análise citogenética não revelou a presença da t(15;17). Nessa técnica, sondas de ácidos nucléicos, complementares ao que se pretende estudar, marcadas com fluorocromos são utilizadas para localizar seqüências específicas de ácido nucléico no cromossomo, no caso, os genes *PML* e *RAR α* (Brockman *et al.*, 2003; Wolff *et al.*, 2007). A grande vantagem dessa técnica é que, além da sua especificidade, sensibilidade aumentada e rapidez, pode ser utilizada tanto em cromossomo metafásico quanto interfásico, permitindo, com isso, a obtenção de resultados não só nos casos em que existe dificuldade em obter metáfases em número e qualidade necessários para análise, como também em um número variável de tipos de amostras (Grimwade, Lo Coco., 2002; Sanz *et al.*, 2005).

Atualmente, existem dois tipos de construção de sondas que permitem a identificação de genes envolvidos em translocações: são as chamadas sondas de fusão (FISH –fusão) e as sondas de ruptura (FISH-ruptura), as quais podem ser utilizadas na detecção da fusão *PML-RAR α* , como também das várias alterações em que ocorre o envolvimento do gene *RAR α* . O FISH - fusão utiliza duas sondas diferencialmente marcadas, uma com fluorocromo vermelho e outra com verde, as quais flanqueiam as regiões de quebra dos dois genes envolvidos na translocação. Em uma célula normal, dois sinais vermelhos e dois sinais verdes são observados; em caso de translocação, observa-se um sinal de fusão amarelo (sinal vermelho/verde coincidente), além de um sinal vermelho e um verde representando os outros cromossomos homólogos que não se

envolveram na translocação (Figura 10 A). Já o FISH – ruptura utiliza dois tipos de sondas que também são diferencialmente marcadas, porém se localizam em apenas um dos cromossomos envolvidos na translocação, se posicionando em lados opostos da região de quebra. Em uma célula normal, dois sinais amarelos são observados (sinal vermelho/verde coincidente); na presença da translocação observa-se um sinal vermelho e um verde, decorrentes da ruptura do cromossomo, levando à separação dos sinais coincidentes e uma fusão amarela representando o outro homólogo normal (Figura 10B) (Van Dongen *et al.*, 2005).

O FISH-ruptura apresenta algumas vantagens em relação ao FISH-fusão, como por exemplo: permite identificar o envolvimento do gene-alvo na translocação independente do outro gene envolvido; se existir metáfases, permite identificar as translocações variantes envolvendo o gene-alvo; reduz a porcentagem de sinais falsos-positivos, como observado no FISH –fusão em torno de 10%, decorrente de sinais normais separados no núcleo tridimensional que podem ser visualizados de forma coincidente (Lee *et al.*, 2002; Van Dongen *et al.*, 2005).

De uma maneira geral, a combinação dessas duas técnicas de FISH com a citogenética convencional no estudo das alterações cromossômicas nas células neoplásicas da LPA representa uma ferramenta de grande importância não só para o auxílio no diagnóstico, prognóstico, escolha da opção terapêutica, como também para o melhor entendimento da biologia dessa doença (Xu *et al.*, 2001; Grimwade, Lo Coco; 2002; Mrózek *et al.*, 2004).

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo primário

Fazer um levantamento das alterações citogenéticas presentes durante o período de diagnóstico dos pacientes do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas de São Paulo (SH-HC/FMUSP), portadores de leucemia promielocítica aguda *de novo*, segundo estudos morfológicos e imunofenotípicos da medula óssea, entre os anos de 1997 a 2006, procurando observar com o auxílio das técnicas de citogenética convencional e FISH:

- 1- A prevalência da $t(15;17)(q22;q21)$, das translocações variantes complexas, alternativas, além das alterações citogenéticas adicionais;
- 2- Concordância entre o diagnóstico morfológico/imunofenotípico e o diagnóstico citogenético da LPA.

2.2 - Objetivo Secundário

Observar a incidência de óbito precoce, morte na indução, a sobrevida global e sobrevida livre de doença nesses pacientes, com auxílio de dados clínicos e laboratoriais obtidos através da análise dos seus prontuários.

3 - Casuística e Métodos

3.1 – Casuística

Composta inicialmente por 69 pacientes do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas de São Paulo (SH-HC-FM/USP), diagnosticados entre os anos de 1997 a 2006, como sendo portadores da leucemia promielocítica aguda (LPA) *de novo* por estudo morfológico e imunofenotípico da medula óssea. Esses pacientes deviam ter no diagnóstico, previamente a terapêutica, amostras de aspirado de medula óssea encaminhadas ao Laboratório de Citogenética do mesmo serviço para estudo do cariótipo. No decorrer do trabalho, sete desses pacientes foram excluídos por falta de material suficiente para a realização da técnica de FISH, complementar a citogenética convencional, passando a casuística final a ser composta por 62 pacientes.

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob Protocolo de pesquisa nº 935/05 (anexo I).

3.2 - Métodos

3.2.1- Fluxograma do trabalho

3.2.2- Citogenética convencional

3.2.2.1 - Cultura de células

Para cada amostra de aspirado de medula óssea do paciente, procurou-se realizar duas culturas de células, uma com duração de 24h e outra de 48h, com a finalidade de se obter maior número de células leucêmicas em divisão. Células de aspirado de medula óssea, aproximadamente 20×10^6 de leucócitos, foram semeadas em garrafas para cultura de células de 70mL, contendo um volume final de 10mL de meio de cultura apropriado (RPMI 1640 suplementado com 30% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 0,5% de penicilina-estreptomicina), sem agentes estimulantes e incubadas por 24h e 48h em estufa de CO₂ a temperatura de 37°C.

3.2.2.2 - Preparação citogenética

Após o término do período de incubação proposto, deu início o processamento das culturas para obtenção das células em metáfases. O material cultivado em cada uma das garrafas de cultura foi transferido para tubos cônicos de centrífuga de 15mL, devidamente identificados com o número do caso e tipo de cultura relacionada. Acrescentou-se, em seguida, em cada um dos tubos, 0,2mL de colchicina (4×10^{-5} M) para interromper o processo de divisão celular. Cada material foi então incubado em banho-maria, a temperatura de 37°C, por período de 2 horas, o material da cultura de 24h; e por 1 hora, o material proveniente da cultura de 48h. Ao término do período de incubação

sob ação da colchicina, cada material foi centrifugado a 1900 rpm por 10 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos ressuspensos em 1mL de solução hipotônica de KCL (0,075M de cloreto de potássio). Posteriormente, acrescentou-se solução hipotônica em cada tubo até completar o volume de 14mL; homogeneizou-se e incubou-se novamente em banho-maria a 37°C por 20 minutos. Após este período, acrescentou-se algumas gotas de solução fixadora de Carnoy gelada (metanol/ácido acético, na proporção de 3:1) em cada um dos tubos para interromper o processo de hipotonização; homogeneizou-se e submeteu-se à centrifugação a 1900 rpm por 10 minutos. Ao final da centrifugação, retirou-se os sobrenadantes e foi acrescentado em cada um dos tubos um pouco de fixador gelado, suficiente para ressuspender os sedimentos. Em seguida, completou-se com fixador gelado até o volume de 10mL, homogeneizou-se e submeteu-se novamente à centrifugação a 1900 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o processo de fixação foi repetido por mais duas vezes. Ao término do processo de fixação, os sobrenadantes foram desprezados e os precipitados foram ressuspensos em solução fixadora, em concentração adequada para uma boa dispersão e visualização dos cromossomos na lâmina. Com auxílio de pipeta Pasteur, 1 gota de cada material procedente de cada cultura foi pingada em aproximadamente 5 lâminas limpas, previamente identificadas com o número correspondente a cada paciente e tipo de cultura. O material presente nas lâminas secou a temperatura ambiente e posteriormente as lâminas foram acondicionadas em jaras de vidro próprio em estufa a 37°C, por pelo menos 1 dia, para o envelhecimento. O restante do material fixado de cada cultura, aproximadamente 1 a 2mL foi acondicionado em tubos previamente

identificados e estocados no freezer a temperatura de -20°C para eventual exame citogenético complementar e necessário ao diagnóstico.

3.2.2.3- Procedimento de bandamento G

Após o período de envelhecimento, as lâminas representativas das duas culturas foram submetidas à técnica de bandamento G, segundo Yunis e colaboradores (1978), modificado. Esta técnica produz um padrão de bandas claras e escuras ao longo da extensão de cada cromossomo, que permite identificar cada par cromossômico, bem como possíveis alterações numéricas e estruturais envolvendo cada um dos 46 cromossomos humanos. Para isso, as lâminas foram colocadas em jaras de plástico contendo uma solução de 2XSSC (solução de cloreto de sódio e citrato de sódio) e incubadas em banho-maria a 45°C , por um período de 20 minutos. Ao término desse período, as lâminas foram retiradas da solução, lavadas com água destilada e coradas, formando sobre elas um filme de solução de tampão fosfato, pH 6,8 (solução de Sorensen) com corante Wright, na proporção de 2:1, por aproximadamente 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas com água destilada, secas a temperatura ambiente e encaminhadas para análise citogenética.

3.2.2.4- Análise citogenética convencional

Para a análise citogenética convencional, sempre que possível, foram analisadas 20 metáfases de cada caso, dando-se preferência, para a leitura, de lâminas provenientes da cultura de 48h, pela maior probabilidade da detecção do clone leucêmico (Haferlach *et al.*, 2007). As metáfases foram visualizadas em microscópio óptico (Olympus BX60) acoplado a um sistema de captura e digitalização de imagem (IRIS- PSI Genetics Systems) que permite organizar os cromossomos em forma de cariógrama, possibilitando a visualização de alguma alteração estrutural ou numérica, envolvendo cada um dos 46 cromossomos. A análise do cariótipo foi descrita de acordo com as normas do Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN-2005).

3.2.3 - Citogenética molecular - hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)

Nos casos em que o cariótipo não pode ser realizado por ausência de metáfases ou que o resultado se mostrou discrepante com o diagnóstico genético para a LPA, parte do material estocado da preparação citogenética convencional foi submetido à técnica de FISH, inicialmente para se tentar localizar a presença da fusão *PML-RAR α* . Na ausência deste achado, complementou-se o estudo com a procura de alteração no gene *RAR α* . Em apenas um paciente, o estudo de FISH foi realizado em amostra citogenética de recaída.

3.2.3.1 - Técnica de FISH-fusão para pesquisa de t (15;17)- rearranjo *PML-RAR α* .

3.2.3.1.1- Procedimento técnico e leitura do material

O procedimento técnico foi realizado com a sonda “LSI PML/RAR α Dual Color Translocation Probe-Vysis, Inc”, seguindo as recomendações do fabricante. Vinte e quatro horas antes do início do procedimento, com auxílio de pipeta Pasteur, 1 gota do material procedente da preparação citogenética foi pingado em lâmina de vidro limpa e previamente identificada com o número correspondente ao paciente. A região que contém o material foi demarcada e a lâmina foi acondicionada em jarra de vidro mantida a temperatura ambiente. No dia seguinte, iniciou-se o processo de denaturação: a lâmina foi colocada em jarra de plástico contendo solução de 70% de formamida com 2 X SSC (cloreto de sódio e citrato de sódio) a 73°C e incubada em banho-maria a 73°C por 5 minutos. Após este período, o material foi desidratado em uma bateria de álcoois a 70%, 85% e 100%, ficando imerso em jarras plásticas contendo o álcool etílico nas respectivas concentrações por 1 minuto, à temperatura ambiente. O “mix” da sonda (7 μ L de tampão Vysis, 1 μ L da sonda e 2 μ L de água MiliQ) que também foi denaturado em banho-maria a 73°C por 5 minutos, foi aplicado, ao término do período de desidratação, sobre o material presente na lâmina. Em seguida, foi coberto com lamínula e colocado em câmara úmida e no escuro, em estufa a 37°C por 12 a 16h. Após este período de hibridação, retirou-se a lamínula e o material foi submetido a uma seqüência de lavagens para retirada dos sinais inespecíficos, colocando-se primeiro a lâmina em jarra de plástico contendo solução de lavagem 1 (0,4XSSC / 0,3% NP-40) a 73°C por 2 minutos

e a seguir em outra jarra de plástico contendo solução de lavagem 2 (2XSSC/ 0,1% NP-40) por aproximadamente 40 segundos a temperatura ambiente. Ao término desse procedimento, o excesso de solução de lavagem foi retirado e o material foi corado com 10µL do corante fluorogênico DAPI II (Vysis, Inc.) e coberto com lamínula para então poder ser analisado.

A análise foi feita em microscópio de fluorescência (Olympus BX60), com objetiva de imersão (100X), equipado com filtros de banda simples de espectros: verde, vermelho e azul, e filtro de banda tripla (filtro triplo, contendo os três espectros em um só). Foram analisados, por dois observadores, sempre que possível, 300 núcleos interfásicos por paciente e os resultados foram descritos de acordo com as normas do Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN-2005).

3.2.3.1.2- Interpretação técnica dos resultados

A sonda LSI PML (15q22) é específica para a região do cromossomo 15q22, locus gênico para o *PML*, com aproximadamente 180Kb, marcada com fluorocromo laranja (Spectrum OrangeTM); já sonda LSI RARα(17q12-21) é específica para a região do cromossomo 17q12-21 com 400Kb, marcada com fluorocromo verde (Spectrum GreenTM), sendo específica para o gene *RARα* (Figura 11). O padrão de hibridação obtido com essa sonda em uma célula normal é de dois sinais laranjas e de dois sinais verdes, representativos dos genes *PML* e *RARα* intactos em ambos os cromossomos 15 e 17 respectivamente. Já o padrão indicativo do rearranjo *PML-RARα* é um sinal laranja,

um sinal verde e uma fusão amarela (sinal laranja/verde coincidente), representando, respectivamente, os genes: *PML* intacto em um cromossomo 15, o *RAR α* intacto em um cromossomo 17 e o rearranjo *PML-RAR α* presente no derivativo do cromossomo 15. Para estabelecer o valor de corte da sonda “LSI PML/RAR α Dual Color Translocation Probe-Vysis, Inc” foram realizados cinco testes, com amostras de medula óssea de pacientes sabidamente não portadores de doenças onco-hematológicas. Analisou-se 300 núcleos de cada amostra e os número de sinais de fusão observados (15,11,12,13 e 2) foram submetidos ao teste estatístico de função β inversa usando o Microsoft Excel, segundo recomendação de Wolff e colaboradores (2007) para validação da sonda. O valor de corte obtido foi de 7,2%. Portanto, considerou-se como positivo neste trabalho, isto é, com o rearranjo *PML-RAR α* , o caso que apresentava mais de 7,2% dos núcleos interfásicos com um sinal laranja, um sinal verde e uma fusão amarela (Figura 11C .)

3.2.3.2 - Técnica de FISH-ruptura para pesquisa de alterações no gene *-RARα*.

Os casos considerados negativos para a presença do rearranjo *PML-RARα*, na técnica anterior, foram submetidos à técnica de FISH-ruptura com a sonda “LSI *RARα* Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe - Vysis, Inc” que permite a detecção de outros rearranjos com envolvimento do *RARα*. Esta sonda é específica para a região 17q12-21, sendo marcada com dois fluorocromos: o laranja (Spectrum OrangeTM), que hibridiza uma região que se estende a 130-Kb da região de quebra ao centrômero, e o verde (Spectrum GreenTM) que hibridiza uma região que se estende a 400 –Kb a partir do exon 6 em direção ao telômero (Figura 12 A). O padrão de hibridação obtido com essa sonda em uma célula normal é de dois sinais de fusão amarelos, representando o gene *RARα* intacto em ambos os cromossomos 17. Já o padrão indicativo do envolvimento do *RARα* em um rearranjo é um sinal laranja, um sinal verde e uma fusão. A visualização dos dois sinais laranja e verde, separados, indica ruptura no gene, a fusão representa o outro gene normal, sendo esse considerado, portanto, o padrão positivo para o envolvimento do gene *RARα* (Figura 12 B).

O procedimento técnico foi realizado seguindo-se as recomendações do fabricante e não diferiu em nada do anterior, assim como os procedimentos de análise e descrição dos resultados. Para estabelecer o valor de corte desta sonda, foram realizados também, cinco testes, com amostras de medula óssea de pacientes sabidamente não portadores de doenças onco-hematológicas. Analisou-se 300 núcleos de cada amostras e os números de sinais de ruptura observados (4,2,5,4,2) foram submetidos ao teste estatístico de

função β inversa usando o Microsoft Excel, segundo recomendação de Wolff e colaboradores (2007) para validação da sonda. O valor de corte obtido foi de 3,4%. Portanto, considerou-se como positivo, casos que apresentassem mais 3,4% dos núcleos com sinais indicativos de ruptura no gene $RAR\alpha$.

3.2.4- Análise de prontuário

Realizou-se a coleta de dados do prontuário médico dos 62 pacientes, enfatizando-se:

- 1- Idade e sexo;
- 2- Classificação do grupo de risco: alto, intermediário e baixo risco, de acordo com Sanz e colaboradores, em 2000;
- 3- Sintomatologia inicial: típica ^a, compatível ^b e atípica ^c, de acordo com critérios internos do serviço;

Nota - Sintomatologia inicial : a - típica: até 1 mês de sintomas, incluindo sangramento; b- compatível: até 2 meses de sintomas, incluindo sangramento; c- atípica: sintomas por mais de 2 meses.

- 4- Presença de quadro hemorrágico no diagnóstico: sangramento cutaneomucoso, parenquimatoso ou AVCH;
- 5- Tempo de início dos sintomas até o diagnóstico;
- 6- Tempo do diagnóstico até início do tratamento;
- 7- Uso do ATRA na indução;
- 8- Data do último seguimento;
- 9- Óbito;
- 10- Hemograma do diagnóstico: hemoglobina(g/dl), leucócito($\times 10^3/\text{mm}^3$) neutrófilo ($\times 10^3/\text{mm}^3$), plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$) e porcentagem de blastos, promielócitos;
- 11- Morfologia: LMA-M3 e LMA-M3v;
- 12- Presença de CD34+ e CD56+ a citometria de fluxo

Procurou-se observar: porcentagem de óbito precoce (óbito antes de qualquer tratamento); porcentagem de óbito na indução (qualquer evento de óbito por qualquer causa ocorrido do início do tratamento até o D60); sobrevida global (tempo decorrido desde o início do tratamento até a ocorrência de óbito em qualquer tempo e por qualquer causa) e sobrevida livre de doença (tempo decorrido desde o diagnóstico de remissão completa até a ocorrência de recidiva da doença). Na ausência de óbito ou recidiva, os pacientes foram censurados na data do último registro em prontuário.

3.2.5 - Análise estatística

A reprodutibilidade da leitura dos sinais de FISH para o rearranjo *PML-RAR α* e ruptura do *RAR α* pelos dois observadores foi avaliada através do teste não – paramétrico pareado de Wilcoxon.

Para a análise das variáveis contínuas, utilizou-se o teste não- paramétrico de Mann-Whitney. Para as variáveis categóricas, foi utilizado o teste do Qui-quadrado.

A sobrevida global e a sobrevida livre de doença foram analisadas empregando-se o estimador produto - limite de Kaplan-Meier. A comparação univariada das curvas de sobrevida foi realizada através do teste log-rank.

Todos os testes foram bicaudais, com nível de significância definido em 5%. Para a análise dos dados, foi utilizado o programa SPSS para “Windows” versão 10.0.

4 – Resultados

4.1 - Estudo citogenético

4.1.1 - Análise citogenética convencional

A análise citogenética convencional foi realizada em amostra de aspirado de medula óssea dos 62 pacientes que tiveram inicialmente o diagnóstico de leucemia promielocítica aguda confirmado por estudos morfológicos e de imunofenotipagem (Tabela 1). Vinte e seis pacientes apresentaram a $t(15;17)(q22;q21)$ como anormalidade clonal isolada (Figura 13); dez apresentaram outras alterações cromossômicas clonais em adição a $t(15;17)$, as chamadas alterações citogenéticas adicionais, onde a mais freqüente foi a trissomia do cromossomo 8, (Figura 14), seguida do isoderivativo do cromossomo 17 (Figura 15) e trissomia do cromossomo 9; um paciente apresentou uma variante complexa da $t(15;17)$, onde existe, além do envolvimento dos cromossomos 15 e 17, o envolvimento do cromossomo 19 (Figura 16). Além disso, quatro pacientes apresentaram alterações cromossômicas diferentes da $t(15;17)$ (Figura 17); dez mostraram cariótipo normal (Figura 18); e em 11 pacientes não foi possível a descrição do cariótipo por falta de metáfases de boa qualidade. Portanto, dos 62 pacientes analisados, 37, ou seja, 59,7% apresentaram a $t(15;17)(q22;q21)$ visível no cariótipo (Tabela 2).

Tabela 1 - Descrição do cariótipo dos 62 pacientes analisados

Paciente	Análise citogenética convencional/ cariótipo
1	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[10]
2	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[16]
3	Ausência de Metáfases
4	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[13]/46,XX[4]
5	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[6]/46,XX[5]
6	Ausência de metáfases
7	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[5]
8	46,XY[20]
9	46,XY,t(15;17)(q22;21),ider(17)t(15;17)(q22;q21)[10]
10	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[15]
11	46,XY[11]
12	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[13]
13	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[9]/ 46,XX[3]
14	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[20]
15	Ausência de metáfases
16	46,XX,t(15;17)(q22;q21),ider(17)t(15;17)(q22;q21)[6]/46,XY[1]
17	46,XY,der(17)t(15;17)(q22;q21)[1]/48,XY,idem,mar1,mar2[3]/46,XY[3]
18	46,XY,t(15;17)(q22;q21),ider(17)t(15;17)(q22;q21)[6]/46,XY[10]
19	Ausência de metáfases
20	46,XY[13]
21	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[10]
22	46,XY[5]
23	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[5]
24	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[10]/46,XY[5]
25	46,XY[14]
26	46,XY,der(17)t(?;17)(?;q21)add(17)(p12)[20]
27	46,XY[20]
28	46,XY,+8,t(15;17)(q22;q21)[15]
29	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[11]/46,XX[1]
30	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[8]/46,XX[6]
31	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[4]/46,XX[4]
32	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[12]/46,XY[3]
33	46,XY[15]
34	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[2]/48,XY,+8,+9,t(15;17)(q22;q21)[7]
35	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[12]
36	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[2]/47,XY,+8,t(15;17)(q22;q21)[6]/46,XY[2]
37	46,XY,t(15;17;19)(q22;q21;q13)[12]/46,XY[4]
38	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[7]/46,XY[8]
39	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[12]
40	Ausência de metáfases
41	46,XX,-8,t(12;20)(q14;q13),+mar[9]/46,XX[13]
42	Ausência de metáfases
43	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[12]/47,XY,+8,t(15;17)[2]/46,XY[1]
44	Ausência de metáfases
45	46,XX[12]
46	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[7]/46,XX[1]
47	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[4]/46,XX[1]
48	Ausência de metáfases

49	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[5]/46,XX,t(1;6)(p12;q26),t(15;17)(q22;q21)[8]/47,XX,t(1;6)(p12;q26),+9,t(15;17)(q22;q21)[3]/46,XX[4]
50	47,XX,add(2)(q36),t(?;17)(q?;q12),+8[7]/46XX[13]
51	Ausência de metáfases
52	46,XX[6]
53	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[3]
54	Ausência de metáfases
55	46,XY[10]
56	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[10]
57	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[2]
58	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[2]/47,XY,+8,t(15;17)[2]/46,XY[2]
59	46,XY,add(9)(p23),t(?;17)(q?;q21)[7]/46,XY[6]
60	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[10]
61	Ausência de metáfases
62	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[9]/46,XY[2]

Tabela 2 - Análise da citogenética convencional

	Nº de Pacientes	% de Pacientes
t(15;17) isolada	26	42,0
t(15;17) + anormalidades adicionais	10	16,1
Variante complexa da t(15;17)	1	1,6
Alterações cromossômicas diferentes da t(15;17)	4	6,5
Cariótipo normal	10	16,1
Ausência de metáfases	11	17,7
Total	62	100

4.1.2 - Análise citogenética molecular- técnica de FISH

4.1.2.1 - Reprodutibilidade da leitura dos sinais da técnica de FISH entre os dois observadores

4.1.2.1.1 - Para pesquisa de t(15;17)- rearranjo *PML-RAR α*

A mediana de porcentagem de células positivas para o 1º observador foi de 57,3% e para o 2º observador foi de 53,5% com $p = 0,248$. Como $p > 0,05$, pode-se dizer que o teste foi reproduzível com mais de 95% de certeza.

4.1.2.1.2 - Para pesquisa de ruptura no gene *RAR α*

A mediana de porcentagem de células positivas para o 1º observador foi de 2,7% e para o 2º observador foi de 1,7% com $p = 0,345$. Como $p > 0,05$, pode-se dizer que o teste foi reproduzível com mais de 95% de certeza.

4.1.2.2 - Análise da técnica de FISH-fusão para pesquisa de t(15;17) - rearranjo *PML-RAR α*

A análise por FISH para pesquisa do rearranjo *PML-RAR α* foi realizada nas 25 amostras em que não foi visualizada a presença da t(15;17)(q22;q21) através da citogenética convencional (Tabela 3). Em dez, desses pacientes, em que o cariótipo foi normal, a análise por FISH confirmou a ausência do rearranjo em quatro e presença em

seis. Nos 11 casos em que ocorreu ausência de metáfases, nove apresentaram sinais compatíveis com a presença do rearranjo *PML-RAR α* e dois foram negativos. E nos quatro casos que apresentaram alterações cromossômicas diferentes da t(15;17), em apenas um caso não foi confirmada a presença do rearranjo pela técnica de FISH. Portanto, dos 25 pacientes que tiveram amostras submetidas à técnica de FISH para pesquisa da t(15;17) - rearranjo *PML-RAR α* , em 18, a presença do rearranjo foi confirmada (Figura 19), sendo seis considerados negativos e um duvidoso (Figura 20). Nos casos positivos, o sinal de fusão variou entre 16% a 99,6%, sendo inferior a 37% apenas no caso em que foi utilizada amostra de recaída. Nos casos negativos, o sinal de fusão variou de 0,7% a 5,3%. No paciente de nº 55 o sinal de fusão foi encontrado em 10% dos núcleos, muito próximo do valor de corte (7,2%), por ser diagnóstico submetemos a técnica de FISH-ruptura para confirmação.

Figura 19: **A** – representa FISH interfásico negativo para o rearranjo *PML-RAR α* , com dois sinais laranjas e dois sinais verdes (amostra controle negativo); **B**- representa FISH interfásico positivo para o rearranjo *PML-RAR α* , presença do sinal de fusão amarelo (laranja/verde coincidente) (amostra controle positivo); **C**, **D** e **E** representam FISH interfásico positivo para o rearranjo *PML-RAR α* , com um sinal laranja, um sinal verde e uma fusão, nos pacientes 20, 33, 61, respectivamente, em que não foi possível observar a presença da t(15;17)(q22;q21) através da citogenética convencional.

4.1.2.3 - Análise da técnica de FISH-ruptura para pesquisa de alterações no gene *-RARα*.

As amostras dos sete pacientes que foram negativas para presença do rearranjo *PML-RARα* foram submetidas à técnica de FISH com a sonda “LSI *RARα* Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe - Vysis, Inc” que permite a detecção de ruptura no

gene *RAR α* , portanto, de outros rearranjos com envolvimento do *RAR α* (Figura 21). Os resultados obtidos com esta técnica, descritos na tabela 3, mostram que a porcentagem de células com sinal de ruptura no gene *RAR α* , nesses sete pacientes, é inferior ou igual a 3%.

Tabela 3 - Descrição do cariótipo e do FISH dos 25 pacientes analisados para presença do rearranjo *PML-RAR α* e dos sete para ruptura no gene *RAR α* .

Paciente	Análise citogenética convencional/ cariótipo	FISH- <i>t(15;17)- PML-RARα</i>	FISH - <i>RARα</i>
3	Ausência de Metáfases	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[32/200]*	
6	Ausência de metáfases	nuc ish(PML,RAR α) x 2 [586/600]	nuc ish(RAR α x 2) [224/229]
8	46,XY[20]	nuc ish(PML,RAR α) x 2 [596/600]	nuc ish(RAR α x 2) [590/600]
11	46,XY[11]	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[150/200]	
15	Ausência de metáfases	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[598/600]	
19	Ausência de metáfases	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[582/600]	
20	46,XY[13]	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[481/600]	
22	46,XY[5]	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[110/200]	
25	46,XY[14]	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[84/200]	
26	46,XY,der(17)t(?;17)(?;q21) add(17)(p12)[20]	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[409/444]	
27	46,XY[20]	nuc ish(PML,RAR α) x 2 [576/600]	nuc ish(RAR α x2)[592/600]
33	46,XY[15]	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[74/200]	
40	Ausência de metáfases	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[240/261]	
41	46,XX,-8,t(12;20)(q14;q13),+mar[9]/46,XX[13]	nuc ish(PML,RAR α) x 2 [583/600]	nuc ish(RAR α x2)[328/338]
42	Ausência de metáfases	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[585/600]	
44	Ausência de metáfases	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[575/600]	
45	46,XX[12]	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[390/600]	
48	Ausência de metáfases	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PM con RAR α x1)[593/600]	
50	47,XX,t(2;17)(q36;q12),+8[7]/46XX[13]	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[401/592]	
51	Ausência de metáfases	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[565/600]	
52	46,XX[6]	nuc ish(PML,RAR α) x 2 [592/600]	nuc ish(RAR α x2)[585/600]
54	Ausência de metáfases	nuc ish(PML,RAR α) x 2 [268/283]	nuc ish(RAR α x2)[306/315]
55	46,XY[10]	nuc ish(PML,RAR α) x 2 [540/600]	nuc ish(RAR α x2)[591/600]
59	46,XY,add(9)(p23),t(?;17)(q?;q21)[7]/46,XY[6]	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[164/200]	
61	Ausência de metáfases	nuc ish(PMLx2),(RAR α x2), (PML con RAR α x1)[485/600]	

Nota Tabela 3 : *- Estudo de FISH realizado em amostra citogenética de recaída

4.2 - Análise para a população total

Dos 62 pacientes diagnosticados como sendo portadores de leucemia promielocítica aguda por estudos morfológicos e imunofenotípicos de medula óssea, 32 eram do sexo masculino e 30 do sexo feminino, com mediana de idade de 30 anos, sendo 11 pacientes com idade inferior/igual a 16 anos. A tabela 4 representa as características clínicas e laboratoriais obtidas através da análise dos prontuários desses pacientes e os resultados citogenéticos (englobando o convencional e o FISH).

Sete pacientes (11,3%) evoluíram a óbito antes de qualquer tratamento e, portanto, foram excluídos de todas as análises de sobrevida. Dos 55 pacientes restantes, 46 foram tratados no serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas- FMUSP e nove foram tratados no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas- FMUSP, utilizando-se dos protocolos vigentes nas instituições durante os nove anos de inclusão de pacientes, com mediana de seguimento de 26 meses (IC95%= 6-39 meses).

A taxa de óbito durante a indução foi de 36, 4%, ou seja, do início do tratamento até o D60 morreram 20 pacientes. Três fatores prognósticos mostraram estar estatisticamente relacionados a esses óbitos: a idade avançada, elevada contagem de leucócitos, além da elevada porcentagem de blastos e promielócitos no sangue (Tabela 5).

A taxa de sobrevida global e de sobrevida livre de doença em dois anos foi de 51,3% e de 65,7%, respectivamente (Figuras 22 e 23).

Tabela 4 - Características dos Pacientes

Variável	n = 62 (%)
Idade	
Mediana (variação)	30 (2 - 76)
Idade	
Até 60 anos	55 (88,7)
Acima de 60 anos	7 (11,3)
Sexo	
Masculino	32 (51,6)
Feminino	30 (48,4)
Sintomatologia ¹	
Típica	43 (71,7)
Atípica	13 (21,7)
Compatível	4 (6,7)
Tempo de início dos sintomas ¹	
Mediana (variação)	15 (2 - 240)
Hemorragia ¹	
Sim	50 (83,3)
Não	10 (16,7)
Tempo até início do tratamento ¹	
Mediana (variação)	2 (0 - 7)
Morfologia	
M3	49 (79,0)
M3v	13 (21,0)
Translocação (15;17)	
Presente	55 (88,7)
Ausente	7 (11,3)
CD56 ²	
Ausente	18 (75,0)
Presente	6 (25,0)
CD34 ³	
Ausente	46 (86,8)
Presente	7 (13,2)
Hemoglobina ⁴	
Mediana (variação)	8,7 (4,4 - 13,4)
Hemoglobina ⁴	
≥ 10,0	14 (23,0)
< 10,0	47 (77,0)
Leucócitos ⁴	
Mediana (variação)	3,7 (0,6 – 154,0)
Leucócitos ⁴	
≤ 10.000/mm3	38 (62,3)
> 10.000/mm3	23 (37,7)
Plaquetas ⁴	
Mediana (variação)	24 (3 – 131)
Plaquetas ⁴	
> 40.000/mm3	16 (26,2)
≤ 40.000/mm3	45 (73,8)
Porcentagem blastos e promielócitos	
Mediana (variação)	48 (0 - 97)
Uso de ATRA ⁵	
Sim	52 (94,5)
Não	3 (5,5)
Grupo de risco ⁴	
Baixo	9 (14,8)
Intermediário	29 (47,5)
Alto	23 (37,7)

Nota Tabela 4: 1 – Dado ignorado em 2 pacientes; 2 – dado ignorado em 38 pacientes; 3 – dado ignorado em 9 pacientes; 4 – dado ignorado em 1 paciente; 5 – sete pacientes evoluíram a óbito antes do tratamento

Tabela 5 - Comparação de variáveis segundo óbito durante a indução

Variável	Óbito indução	Sem óbito indução	p
	n = 20 (%)	n = 35 (%)	
Idade			
Até 60 anos	16 (80,0)	35 (100,0)	< 0,01
Acima de 60 anos	4 (20,0)	0 (0)	
Sexo			
Masculino	9 (45,0)	20 (57,1)	0,38
Feminino	11 (55,0)	15 (42,9)	
Sintomatologia ¹			
Típica	17 (85,0)	22 (66,7)	0,33
Atípica	2 (10,0)	8 (24,2)	
Compatível	1 (5,0)	3 (9,1)	
Tempo de início dos sintomas			
Mediana (variação)	15 (4 - 60)	30 (2 - 150)	0,07
Hemorragia ¹			
Sim	18 (90,0)	28 (84,8)	0,59
Não	2 (10,0)	5 (15,2)	
Tempo até início do tratamento			
Mediana (variação)	2 (0 - 7)	2 (0 - 6)	0,78
Morfologia			
M3	15 (75,0)	30 (85,7)	0,32
M3v	5 (25,0)	5 (14,3)	
Translocação (15;17)			
Presente	17 (85,0)	31 (88,6)	0,70
Ausente	3 (25,0)	4 (11,4)	
CD56 ²			
Ausente	8 (80,0)	9 (75,0)	0,78
Presente	2 (20,0)	3 (25,0)	
CD34 ³			
Ausente	15 (88,2)	26 (86,7)	0,87
Presente	2 (11,8)	4 (13,3)	
Hemoglobina ⁴			
≥ 10,0	5 (25,0)	9 (26,5)	0,90
< 10,0	15 (75,0)	25 (73,5)	
Leucócitos ⁴			
≤ 10.000/mm3	10 (50,0)	27 (79,4)	0,02
> 10.000/mm3	10 (50,0)	7 (20,6)	
Plaquetas ⁴			
> 40.000/mm3	3 (15,0)	11 (32,4)	0,16
≤ 40.000/mm3	17 (85,0)	23 (67,6)	
Porcentagem blastos e promielócitos			
Mediana (variação)	72 (0 - 97)	24 (0 - 96)	< 0,01
Grupo de risco ⁴			
Baixo	1 (5,0)	7 (20,6)	0,05
Intermediário	9 (45,0)	20 (58,8)	
Alto	10 (50,0)	7 (20,6)	

Nota Tabela 5: 1 – Dado ignorado em 2 pacientes; 2 – dado ignorado em 33 pacientes; 3 – dado ignorado em 8 pacientes; 4 – dado ignorado em 1 paciente.

4.3 - Concordância entre o estudo morfológico/imunofenotípico e o estudo citogenético

Dos 62 pacientes diagnosticados, como sendo portadores de leucemia promielocítica aguda por estudo morfológico/imunofenotípico, sete não apresentaram alterações citogenéticas compatíveis com a LPA, de acordo com os resultados da citogenética convencional e molecular (Figura 24). A ausência de sangramento durante o diagnóstico e a presença de morfologia M3v se associaram estatisticamente à ausência de rearranjo PML-RAR α no estudo citogenético (Tabela 7). Em consequência deste resultado, realizou-se revisão morfológica em seis dos sete casos (lâmina do paciente 54 não se encontrava disponível para revisão) por três observadores diferentes, sendo um da nossa instituição e os outros dois de fora (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultado do estudo morfológico inicial e após revisão dos sete casos

Paciente	Morfologia inicial	Revisão observador 1	Revisão observador 2	Revisão observador 3
6	LMA-M3	LMA-M3	LMA-M3	LMA-M3
8	LMA-M3v	LMA-M3v	LMA-M2	LMA-M3
27	LMA-M3v	LMA-M2	LMA-M2	não realizada
41	LMA-M3	LMA-M2	LMA-M2	LMA-M3
52	LMA-M3v	LMA-M1	LMA-M1	LMA-M5
54	LMA-M3v	não realizada	não realizada	não realizada
55	LMA-M3v	LMA-M2	LMA-M1	LMA-M5

No anexo II, encontram-se dados clínicos e laboratoriais obtidos através da análise dos prontuários dos sete pacientes que não apresentaram a t(15;17) -rearranjo PML-RAR α .

Tabela 7 - Comparação de característica segundo t(15;17) - rearranjo PML-RAR α

Variável	Com t(15;17) n = 55 (%)	Sem t(15;17) n = 7 (%)	p
Idade			
Até 60 anos	49 (89,1)	6 (85,7)	0,79
Acima de 60 anos	6 (10,9)	1 (14,3)	
Sexo			
Masculino	27 (49,1)	5 (71,4)	0,26
Feminino	28 (50,9)	2 (28,6)	
Sintomatologia¹			
Típica	40 (74,1)	3 (50,0)	0,18
Atípica	10 (18,5)	3 (50,0)	
Compatível	4 (7,4)	0 (0)	
Tempo de início dos sintomas¹			
Mediana (variação)	15 (2 – 150)	30 (7 – 60)	0,19
Hemorragia¹			
Sim	47 (87,0)	3 (50,0)	0,02
Não	7 (13,0)	3 (50,0)	
Tempo até início do tratamento¹			
Mediana (variação)	2 (0 – 5)	3 (1 – 7)	0,38
Morfologia			
M3	47 (85,5)	2 (28,6)	< 0,01
M3v	8 (14,5)	5 (71,4)	
CD56²			
Ausente	16 (72,7)	2 (100,0)	0,39
Presente	6 (27,3)	0 (0)	
CD34³			
Ausente	40 (87,0)	6 (85,7)	0,92
Presente	6 (13,0)	1 (14,3)	
Hemoglobina⁴			
≥ 10,0	13 (24,1)	1 (14,3)	0,56
< 10,0	41 (75,9)	6 (85,7)	
Leucócitos⁴			
≤10.000/mm3	35 (64,8)	3 (42,9)	0,26
> 10.000/mm3	19 (35,2)	4 (57,1)	
Plaquetas⁴			
> 40.000/mm3	13 (24,1)	3 (42,9)	0,28
≤ 40.000/mm3	41 (75,9)	4 (57,1)	
Porcentagem blastos e promielócitos			
Mediana (variação)	36 (0 – 97)	54 (15 – 96)	0,30
Uso de ATRA⁵			
Sim	46 (95,8)	6 (85,7)	0,27
Não	2 (4,2)	1 (14,3)	
Grupo de risco⁴			
Baixo	9 (16,7)	0 (0)	0,36
Intermediário	26 (48,1)	3 (42,9)	
Alto	19 (35,2)	4 (57,1)	

Nota Tabela 7: 1 – Dado ignorado em 2 pacientes; 2 – dado ignorado em 38 pacientes; 3 – dado ignorado em 9 pacientes; 4 – dado ignorado em 1 paciente; 5 – sete pacientes evoluíram a óbito antes do tratamento

4.4 - Análise para a população com presença da t(15;17) -rearranjo *PML-RAR α*

Dos 62 pacientes diagnosticados, como sendo portadores de leucemia promielocítica aguda por estudos morfológicos e imunofenotípicos de medula óssea, 55 apresentaram a t(15;17)-rearranjo *PML-RAR α* confirmados pelo estudo citogenético. Destes, 27 eram do sexo masculino e 28 do sexo feminino, com idade variando de dois a 76 anos, sendo nove com idade inferior a 16 anos. A tabela 8 representa as características clínicas e laboratoriais obtidas através da análise dos prontuários desses pacientes e os resultados citogenéticos (englobando o convencional e o FISH).

Sete pacientes evoluíram a óbito antes de qualquer tratamento e, portanto, foram excluídos de todas as análises de sobrevida. Dos 48 pacientes restantes, 41 foram tratados no serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas - FMUSP e sete foram tratados no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas - FMUSP, utilizando-se dos protocolos vigentes nas instituições durante os nove anos de inclusão de pacientes, com mediana de seguimento de 26 meses (IC95%= 6-39 meses).

A taxa de óbito durante a indução foi de 35, 4%, ou seja, do início do tratamento até o D60 morreram 17 pacientes. Três fatores prognósticos mostraram estar estatisticamente relacionados a esses óbitos: a idade avançada, elevada contagem de leucócitos, além da elevada porcentagem de blastos e promielócitos no sangue. (Tabela 9).

Tabela 8 - Características dos Pacientes

Variável	Com t(15;17)
	n = 55 (%)
Idade	
Mediana (variação)	31 (2 – 76)
Idade	
Até 60 anos	49 (89,1)
Acima de 60 anos	6 (10,9)
Sexo	
Masculino	27 (49,1)
Feminino	28 (50,9)
Sintomatologia¹	
Típica	40 (74,1)
Atípica	10 (18,5)
Compatível	4 (7,4)
Tempo de início dos sintomas¹	
Mediana (variação)	15 (2 – 150)
Hemorragia¹	
Sim	47 (87,0)
Não	7 (13,0)
Tempo até início do tratamento¹	
Mediana (variação)	2 (0 – 5)
Morfologia	
M3	47 (85,5)
M3v	8 (14,5)
Alteração citogenética adicional²	
Ausente	24 (63,2)
Presente	14 (36,8)
CD56³	
Ausente	16 (72,7)
Presente	6 (27,3)
CD34⁴	
Ausente	40 (87,0)
Presente	6 (13,0)
Hemoglobina⁵	
≥ 10,0	13 (24,1)
< 10,0	41 (75,9)
Leucócitos⁵	
≤ 10.000/mm ³	35 (64,8)
> 10.000/mm ³	19 (35,2)
Plaquetas⁵	
> 40.000/mm ³	13 (24,1)
≤ 40.000/mm ³	41 (75,9)
Porcentagem blastos e promielócitos	
Mediana (variação)	36 (0 – 97)
Uso de ATRA⁶	
Sim	46 (95,8)
Não	2 (4,2)
Grupo de risco⁵	
Baixo	9 (16,7)
Intermediário	26 (48,1)
Alto	19 (35,2)

Nota Tabela 8: 1 – Dado ignorado em 1 pacientes; 2 – dado ignorado em 17 pacientes, 3 – dado ignorado em 33 pacientes; 4 – dado ignorado em 9 pacientes; 5 – dado ignorado em 1 paciente; 6 – sete pacientes evoluíram a óbito antes do tratamento.

Tabela 9 - Comparação de variáveis segundo óbito durante a indução

Variável Prognóstica	Óbito indução	Sem óbito indução	p
	n = 17 (%)	n = 31 (%)	
Idade			
Até 60 anos	14 (82,4)	31 (100,0)	0,01
Acima de 60 anos	3 (17,6)	0 (0)	
Sexo			
Masculino	6 (35,3)	18 (58,1)	0,13
Feminino	11 (64,7)	13 (41,9)	
Sintomatologia ¹			
Típica	14 (82,3)	21 (70,0)	0,34
Atípica	2 (11,8)	6 (20,0)	
Compatível	1 (5,9)	3 (10,0)	
Tempo de início dos sintomas			
Mediana (variação)	15 (4 - 60)	20 (2 - 150)	0,14
Hemorragia ¹			
Sim	16 (94,1)	27 (90,0)	0,62
Não	1 (5,9)	3 (10,0)	
Tempo até início do tratamento			
Mediana (variação)	2 (0 - 5)	2 (0 - 5)	0,80
Morfologia			
M3	14 (82,4)	29 (93,5)	0,22
M3v	3 (17,6)	2 (6,5)	
Alteração citogenética adicional ²			
Ausente	10 (83,3)	12 (54,5)	0,09
Presente	2 (16,7)	10 (45,5)	
CD56 ³			
Ausente	7 (77,8)	8 (72,7)	0,79
Presente	2 (22,2)	3 (27,3)	
CD34 ⁴			
Ausente	12 (85,7)	23 (88,5)	0,80
Presente	2 (14,3)	3 (11,5)	
Hemoglobina ⁵			
≥ 10,0	4 (23,5)	9 (30,0)	0,63
< 10,0	13 (76,5)	21 (70,0)	
Leucócitos ⁵			
≤10.000/mm3	9 (53,0)	25 (83,3)	0,02
> 10.000/mm3	8 (47,0)	5 (16,7)	
Plaquetas ⁵			
> 40.000/mm3	2 (11,8)	9 (30,0)	0,15
≤40.000/mm3	15 (98,2)	21 (70,0)	
Porcentagem blastos e promielócitos			
Mediana (variação)	73 (0 - 97)	23 (0 - 96)	0,03
Uso de ATRA			
Sim	16 (94,1)	30 (96,8)	0,66
Não	1 (5,9)	1 (3,2)	
Grupo de risco ⁵			
Baixo	1 (6,0)	7 (23,3)	0,05
Intermediário	8 (47,0)	18 (60,0)	
Alto	8 (47,0)	5 (16,7)	

Nota Tabela 9: 1 – Dado ignorado em 1 paciente; 2 – dado ignorado em 14 pacientes; 3 – dado ignorado em 28 pacientes; 4 – dado ignorado em 8 pacientes; 5 – dado ignorado em 1 paciente.

A sobrevida global em dois anos foi de 49,28% (Figura 25). Duas variáveis prognósticas mostraram estar estatisticamente relacionadas à pior taxa de sobrevida global neste estudo: a idade acima dos 60 anos e a presença da morfologia M3v (Tabela 10). A taxa de sobrevida livre de doença, em dois anos, foi de 72,10% (Figura 26).

Tabela 10 – Sobrevida Global segundo variáveis

Variável	Mediana de Sobrevida Global - meses	p
Mediana (variação)		
Idade		
Até 60 anos	35 (14 – 56)	< 0,01
Acima de 60 anos	2 (0 – 2)	
Sexo		
Masculino	33 (17 – 52)	0,92
Feminino	40 (13 – 65)	
Sintomatologia ¹		
Típica	40 (28 - 50)	0,09
Atípica	23 (21 - 28)	
Compatível	43 (40 - 48)	
Hemorragia ¹		
Sim	41 (39 - 49)	0,29
Não	22 (21 - 26)	
Morfologia		
M3	40 (31 - 49)	< 0,01
M3v	16 (1 - 22)	
Alteração citogenética adicional ²		
Ausente	41 (17 - 63)	0,97
Presente	39 (30 - 48)	
CD56 ³		
Ausente	32 (21 - 46)	0,09
Presente	19 (17 - 87)	
CD34 ⁴		
Ausente	40 (37 - 43)	0,34
Presente	22 (14 - 38)	
Hemoglobina ⁵		
≥ 10,0	54 (10 - 102)	0,49
< 10,0	43 (3 - 49)	
Leucócitos ⁵		
< 10.000/mm3	39 (20 - 62)	0,58
> 10.000/mm3	41 (17 - 64)	
Plaquetas ⁵		
> 40.000/mm3	40 (14 - 69)	0,51
< 40.000/mm3	36 (19 - 53)	
Uso de ATRA		
Sim	35 (15 - 56)	0,07
Não	76 (21 – 119)	
Grupo de risco ⁵		
Baixo	39 (10 - 67)	0,85
Intermediário	37 (15 - 59)	
Alto	40 (9 - 62)	

Nota Tabela 10: 1 – Dado ignorado em 1 paciente; 2 – dado ignorado em 14 pacientes; 3 – dado ignorado em 28 pacientes; 4 – dado ignorado em 8 pacientes; 5 – dado ignorado em 1 paciente.

5 – Discussão

O câncer tem sido caracterizado como uma doença genética decorrente da ação de fatores endógenos e exógenos sobre a célula, os quais induzem a uma série de alterações no genoma, resultando em um desequilíbrio entre os processos de proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. Muitas dessas alterações são decorrentes de rearranjos cromossômicos, tais como translocações, inversões e inserções (Frohling, Dohner., 2008).

Recentemente, rearranjos cromossômicos têm sido relacionados a muitas doenças hematológicas malignas. Translocações cromossômicas recorrentes passaram a ser identificadas com o uso das técnicas de citogenética, como marcadores de leucemias e linfomas, estando diretamente associadas com certos tipos de entidades clínicas e subtipos morfológicos e histopatológicos. As técnicas de citogenética convencional e molecular passaram a ter um papel crucial no diagnóstico e manejo clínico dos pacientes com tais doenças, além de permitir uma melhor compreensão da base genética da patogênese da doença, uma vez que possibilita a detecção de alterações no genoma, envolvendo tanto ganho como perda de segmentos, bem como dos rearranjos cromossômicos presentes (Zhang, Rowley., 2006; Sreekantaiah., 2007; Nambiar *et al.*, 2008).

Geneticamente a leucemia promielocítica aguda (LPA) caracteriza-se por alterações cromossômicas estruturais recorrentes, na grande maioria das vezes translocações, envolvendo sempre o locus gênico para o receptor alfa do ácido retinóico (*RAR α*) localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21), levando à formação de genes quiméricos e oncoproteínas de fusão (Villa *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005; Vitoux *et al.*,

2007). Em aproximadamente 98% dos casos, o gene *RARα* se encontra fusionado com o gene *PML* resultante da translocação cromossômica recíproca t(15;17)(q22;q21) e, em cerca de 2% dos casos, o gene *RARα* pode está fusionado com outros genes que não o *PML*, levando à formação de proteínas de fusão conhecidas genericamente como X - *RARα* (Sainty *et al.*, 2000, Grimwade *et al.*, 2000; Brockman *et al.*, 2003; Tirado *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005).

A citogenética convencional juntamente com as técnicas de FISH são consideradas métodos laboratoriais indispensáveis para o diagnóstico de pacientes com LPA. O estudo das alterações cromossômicas, presentes nas células neoplásicas desses pacientes, é de grande importância não só para o diagnóstico, como também para o prognóstico e escolha da opção terapêutica, onde já se sabe que a eficácia do tratamento baseado no uso do ATRA é estritamente dependente do rearranjo genético presente nas células leucêmicas (Sanz *et al.*, 2005; Sreekantaiah., 2007).

Neste trabalho, com auxílio inicial da técnica de citogenética convencional, observou-se que dos 62 pacientes analisados previamente a terapêutica, os quais tiveram o diagnóstico de LPA *de novo* inicialmente confirmado por estudos morfológicos/imunofenotípicos da medula óssea, 37 (59,7%) apresentaram a t(15;17)(q22;q21) visível no cariótipo. Destes, 26 (42%) apresentaram a t(15;17) como anormalidade clonal isolada; dez (16,1%) mostraram outras alterações cromossômicas clonais em adição a t(15;17), as chamadas alterações citogenéticas adicionais, onde a mais freqüente foi a trissomia do cromossomo 8, seguida do isoderivativo do cromossomo 17 e trissomia do cromossomo 9; e um paciente apresentou uma variante

complexa da t(15;17), onde existe, além do envolvimento dos cromossomos 15 e 17, o envolvimento do cromossomo 19. Em 14 pacientes, a t(15;17) não foi visualizada no cariótipo [dez pacientes apresentaram cariótipo normal e quatro pacientes apresentaram alterações cromossômicas diferentes da t(15;17)] e em 11 pacientes não foi possível a descrição do cariótipo por falta de metáfases de boa qualidade. Portanto, em 25 pacientes (40,3%) a t(15;17) não foi detectada na análise citogenética convencional.

Como consequência da não visualização da t(15;17) no cariótipo destes 25 pacientes, lançou-se mão do emprego da técnica de FISH para tentar verificar a presença do rearranjo *PML-RAR α* . Dados de literatura mostram que cerca de 10% dos casos de LPA em que não foi visualizada a t(15;17) no cariótipo, o rearranjo *PML-RAR α* se encontra presente. Isso pode decorrer da análise citogenética de células que não pertencem ao clone neoplásico, da dificuldade em obtenção de metáfases em número e qualidade necessários para a visualização da alteração ou, em alguns casos, em decorrência da presença de rearranjos crípticos, caracterizados pela inserção submicroscópica do *RAR α* no *PML*, que mascaram a translocação (Grimwade, Lo Coco., 2002; Schoch *et al.*, 2002; Zaccaria *et al.*, 2002; Owatari *et al.*, 2007). Nestas situações, a análise por FISH é considerada um método rápido e confiável, complementar à citogenética convencional para detecção do rearranjo *PML-RAR α* no diagnóstico, já que pode ser utilizado tanto em cromossomos metafásicos quanto interfásicos, permitindo a análise de um número maior de células (Sreekantaiah., 2007).

Inicialmente foi empregada a técnica de FISH-fusão com utilização da sonda “LSI *PML/RAR α* Dual Color Translocation Probe-Vysis, Inc”, que permite a detecção da

presença da t(15;17)- rearranjo *PML-RAR α* . Apesar de o número de falsos - positivos ser considerado alto com essa sonda, variando entre 5% a 10% de acordo com a literatura (Lee *et al.*, 2002) e neste trabalho ter ficado em torno de 7,2%, ela pode ser prontamente utilizada durante o diagnóstico, já que nesse período o número de células leucêmicas circulantes é superior a 25% (Van Dogen *et al.*, 2005). Observou-se que dos 25 pacientes em que a t(15;17) não foi visível no cariótipo, o rearranjo *PML-RAR α* se mostrou presente em 18 destes pacientes com a utilização desta sonda, estando presente em seis pacientes em que o cariótipo foi normal, em três casos onde o cariótipo mostrou outras alterações cromossômicas diferentes da t(15;17) e em nove casos, em que não foi possível a análise do cariótipo por falta de metáfases em número e qualidade necessários para análise do cariótipo. Verificou-se que, neste trabalho, o número dos casos em que não se detectou a presença da t(15;17) no cariótipo e o rearranjo *PML-RAR α* se encontrou presente — cerca de 29% — foi superior aos 10% descritos na literatura. Isso pode ser decorrente do número de casos em que a análise do cariótipo não foi possível em decorrência da quantidade e da qualidade de metáfases disponíveis para análise. Além disso, alguns autores relatam que a morfologia dos cromossomos dos pacientes com LPA é ruim, dificultando a visualização da alteração (Mancini *et al.*, 1995; Sucic *et al.*, 2002).

Em decorrência da confirmação da presença do rearranjo *PML-RAR α* , através da técnica do FISH-fusão em três pacientes (26, 50, 59) que apresentaram outras alterações cromossômicas diferentes da t(15;17) na citogenética convencional, passou-se a incluí-los no grupo de pacientes com alterações citogenéticas adicionais a t(15;17); com isso,

aproximadamente 23,6% dos 55 pacientes com a t(15;17), detectada no cariótipo ou no FISH, apresentaram outras alterações citogenéticas em adição a t(15;17).

De acordo com a literatura, aproximadamente 30% a 40% dos pacientes apresentam no período do diagnóstico outras alterações cromossômicas além da t(15;17); são as chamadas alterações citogenéticas adicionais, onde as mais freqüentes são a trissomia do cromossomo 8, anormalidades estruturais no cromossomo 9, trissomia do cromossomo 21 e isocromossomo do braço longo do cromossomo 17. O impacto dessas alterações citogenéticas adicionais no prognóstico da doença não está definido, com divergência em vários trabalhos. Os resultados conflitantes podem ser decorrentes da variedade dos protocolos de tratamentos utilizados (Schoch et al., 1996; Hiorns *et al.*, 1997; De Botton *et al.*, 2000; Pantic *et al.*, 2000; Avvisati *et al.*, 2001; Cassinat, Chomienne, 2001; Hernández *et al.* 2001; Xu *et al.*, 2001; Spell *et al.*, 2002; Luatti *et al.*, 2008; Swerdlow *et al.*, 2008).

Hiorns e colaboradores avaliaram 54 pacientes com LPA, tratados apenas com quimioterapia entre os anos de 1979-1996, em relação à presença de alterações citogenéticas adicionais. Observaram que 39% deles apresentaram alterações citogenéticas adicionais e que estas se correlacionaram a pior prognóstico. Pantic e colaboradores, em 2000, estudaram 43 pacientes com LPA que foram tratados com ATRA, de acordo com as recomendações do grupo Europeu, e verificaram que 33% dos pacientes apresentaram alterações citogenéticas adicionais e que estas se correlacionaram com uma natureza mais agressiva das células leucêmicas. Xu e colaboradores, em um estudo com 284 pacientes portadores de LPA tratados com ATRA e quimioterapia entre os anos 1988 a 1999, concluíram que nesses pacientes a presença

de alterações citogenéticas adicionais se encontram relacionadas a um prognóstico ruim. Em contrapartida, outros estudos indicam que a presença de alterações citogenéticas adicionais não têm nenhuma influência no prognóstico da leucemia promielocítica aguda. De Botton e colaboradores (2000), procurando avaliar a influência das alterações citogenéticas adicionais no prognóstico da doença, estudaram 293 pacientes com LPA tratados com ATRA e quimioterapia e verificaram que as alterações citogenéticas adicionais não tiveram nenhum impacto no prognóstico da doença, onde nenhuma diferença significativa foi observada entre os pacientes que apresentaram somente a t(15;17) e os pacientes com a t(15;17) e outras alterações citogenéticas com relação à sobrevida global e sobrevida livre de doença em dois anos. Hernández e colaboradores (2001), em estudo com 113 pacientes portadores de LPA tratados com ATRA e quimioterapia, observaram que 30% dos pacientes apresentaram alterações citogenéticas em adição a t(15;17), os quais não apresentaram nenhuma diferença clínica, biológica e morfológica em relação aos pacientes que possuíam apenas a t(15;17) como anormalidade clonal isolada. Além disso, o prognóstico foi similar entre os dois grupos.

Xu e colaboradores (2001) sugerem que o papel das alterações citogenéticas adicionais no prognóstico da LPA é de valor limitado, já que seu impacto pode depender em grande parte do tipo de tratamento utilizado, levando em consideração não só os tipos de agentes terapêuticos utilizados como também das intensidades de aplicações na indução/consolidação/manutenção.

Neste estudo, o número de pacientes encontrados com alterações citogenéticas adicionais (23,6%) foi considerado um pouco inferior à média descrita pela literatura, o que pode ser decorrente do baixo índice mitótico observado nas amostras. Contudo, os

tipos de alterações mais frequentes encontradas, como a trissomia do cromossomo 8, estão de acordo com a literatura (Sessarego *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001; Luatti *et al.*, 2008; Swerdlow *et al.*, 2008). Assim como na maioria dos trabalhos, procurou-se avaliar o valor destas alterações no prognóstico da doença, fazendo uma comparação entre os grupos de pacientes com alteração adicional e sem alteração adicional, com pelo menos 10 metáfases analisadas, não levando em consideração o tipo específico de alteração citogenética encontrada. Verificou-se que, neste estudo, a presença de alteração citogenética adicional não teve nenhuma influência estatisticamente significativa na taxa de sobrevida global da população estudada em dois anos, bem como nenhuma diferença foi encontrada entre os dois grupos quando, comparadas algumas características, tais como idade, tipo de morfologia, porcentagem de blastos circulantes, contagem de leucócitos e plaquetas (Anexo III). Os resultados deste trabalho estão de acordo com os descritos por De Botton e colaboradores (2000) e Hernández e colaboradores (2001).

Em alguns casos, podem ocorrer variantes complexas da translocação envolvendo os cromossomos 15 e 17 [t(15;17)], onde existe, além do envolvimento desses cromossomos levando à formação do transcrito PML-RAR α , o envolvimento de um ou mais outros cromossomos. O curso do prognóstico dos pacientes com LPA, que apresentam essas variantes complexas da t(15;17), onde a fusão PML-RAR α se encontra intacta, parece não ser diferente do curso do prognóstico observado nos pacientes com a típica t(15;17) (Tirado *et al.*, 2005; Abe *et al.*, 2008). Neste estudo foi detectada a presença de uma translocação variante complexa no paciente do nº 37, onde verificou-se,

na citogenética convencional, o seguinte cariótipo: 46,XY,t(15;17;19)(q22;q21;q13) e no FISH-fusão a presença do rearranjo *PML-RAR α* . Esse paciente apresentou características imunofenótípicas e morfológicas de LMA – M3, considerada de baixo risco, de acordo com os critérios descritos por Sanz e colaboradores (2000), sendo tratado com o esquema clássico envolvendo o uso do ATRA e D₃A₇ (daunorrubicina + citarabina), evoluindo a óbito devido a um quadro de CIVD, após segunda recaída medular tratada com arsênico e transplante autólogo de medula óssea.

Com o emprego da técnica de FISH-fusão com utilização da sonda “LSI *PML/RAR α* Dual Color Translocation Probe-Vysis, Inc”, pôde-se constatar, também, que sete dos 62 pacientes estudados não apresentavam a t(15;17)- rearranjo *PML-RAR α* .

Em decorrência do resultado, descrito acima, e como a literatura descreve que em aproximadamente 2% dos casos o gene *RAR α* pode estar fusionado com outros genes que não o *PML*, resultado em sua grande maioria de translocações alternativas (Sainty *et al.*, 2000, Grimwade *et al.*, 2000; Brockman *et al.*, 2003; Tirado *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005), submeteu-se as amostras desses sete pacientes à técnica de FISH-ruptura com sonda “LSI *RAR α* Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe-Vysis, Inc” específica para a região 17q12-21. Esta sonda permite identificar o envolvimento do gene *RAR α* independente do outro gene envolvido e apresenta uma taxa bem menor de falsos-positivos em torno de 1,5%, de acordo com dados da literatura (Lee *et al.*, 2002; Kearney, Horsley, 2005; Van Dongen *et al.*, 2005) e de 3,4% em nosso trabalho. Verificou-se que estes sete pacientes não apresentaram ruptura no gene *RAR α* e que, portanto, dos 62 pacientes diagnosticados por estudo morfológico/imunofenotípico,

como sendo portadores de leucemia promielocítica aguda, apenas 55 apresentaram alterações citogenéticas compatíveis com a doença.

De acordo com dados da literatura, casos semelhantes têm sido descritos, em que pacientes com características morfológicas de LPA não apresentam o rearranjo *PML-RAR α* ou, de forma contrária, pacientes, cujo aspecto morfológico não leva suspeita de LPA, apresentam a alteração genética específica (Lo Coco *et al.*, 1999; Lock *et al.*, 2004). Grimwade e colaboradores (2000), ao realizarem um estudo de revisão das características morfológicas, citogenéticas e moleculares de 60 pacientes portadores de LPA que não apresentavam a t(15;17) clássica, observaram que cinco pacientes não apresentaram alterações envolvendo o gene *RAR α* , apesar de apresentarem aspectos morfológicos de LPA.

Na leucemia promielocítica aguda, o diagnóstico laboratorial preciso e rápido é crítico para definir a conduta ideal para cada paciente, de forma rápida, decorrente de suas implicações prognósticas e terapêuticas (Grimwade, Lo Coco., 2002; Rizzatti *et al.*, 2004). Vários métodos laboratoriais têm sido empregados em conjunto para auxiliar nesse diagnóstico. O estudo morfológico/imunofenotípico é utilizado como procedimento inicial de triagem que reforça a suspeita diagnóstica de LPA e ajuda na indicação terapêutica precoce, devendo o diagnóstico definitivo ser confirmado por técnicas capazes de detectar a t(15;17)- rearranjo *PML-RAR α* ou alterações envolvendo o gene *RAR α* . A citogenética convencional, hibridação in situ por fluorescência (FISH), reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR) e a imunofluorescência com anticorpos anti-PML são opções disponíveis, cada uma com

suas vantagens e desvantagens, que se complementam para definição do diagnóstico genético (Tabela 11) (Grimwade, Lo Coco., 2002; Lock *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2004).

Tabela 11 - Vantagens e desvantagens das principais técnicas utilizadas para o diagnóstico genético.

Técnicas	Vantagens	Desvantagens
Citogenética Convencional	Permite o diagnóstico de alterações citogenéticas adicionais, além da t(15;17)	Necessita de culturas por até 48 horas, não detecta fusões crípticas (falsos negativos), necessidade de metáfases de boa qualidade
FISH	Altamente específico, não necessita de metáfases	Não fornece informação sobre os subtipos de transcritos do <i>PML-RARα</i>
RT-PCR	Rápido, altamente sensível, detecta doença residual mínima	Contaminação e artefatos (falsos-positivos)
Imunofluorescência anti-PML	Rápido, simples, baixo custo	Artefatos da degradação celular, não informa o tipo de fusão

Neste estudo, procurou-se apenas com a utilização das técnicas de citogenética convencional e FISH fazer um levantamento das alterações citogenéticas encontradas durante o diagnóstico de portadores de LPA *de novo* que tiveram a suspeita da doença confirmada inicialmente por estudo morfológico/imunofenotípico da medula óssea e verificar a concordância entre o diagnóstico morfológico/imunofenotípico e o diagnóstico citogenético da LPA. Em decorrência de sete pacientes não terem apresentado alterações citogenéticas compatíveis com a doença, procurou-se

correlacionar esses dados com resultados de outras técnicas que permitem detectar o rearranjo *PML-RAR α* , como por, exemplo RT-PCR, porém não foi possível pela não disponibilidade de amostra. A técnica de anti-PML seria uma outra alternativa, contudo ela ainda está em fase de implantação nesse serviço. Entretanto, conseguiu-se realizar uma revisão morfológica em seis dos sete casos (lâmina do paciente 54 não se encontrava disponível para revisão) com a ajuda de três observadores, sendo um desta instituição e os outros dois, de fora. Foi observada que a morfologia inicial só foi confirmada em apenas um caso, com divergência nos outros cinco, não só com relação à morfologia inicial bem como entre os observadores, o que reforça a importância da confirmação da alteração genética. Além disso, verificou-se, com ajuda de dados clínicos e laboratoriais, que a ausência de sangramento no período do diagnóstico e a presença de morfologia M3v se associaram estatisticamente à ausência de ruptura no gene *RAR α* nesses sete pacientes. Desta forma, sugere-se que em uma dessas circunstâncias, durante o processo de investigação diagnóstica de LPA, o médico já priorize o teste de FISH .

Este trabalho vem corroborar a idéia de que as técnicas de citogenética clássica e molecular utilizadas em conjunto auxiliam na obtenção de um diagnóstico mais preciso na LPA e sugere o fluxograma, a seguir, como uma opção de algoritmo diagnóstico a ser utilizado.

Algoritmo diagnóstico proposto:

* Não disponibilidade de métodos moleculares - utiliza-se a imunofluorescência com anticorpos anti-PML.

** Em casos de ausência de sangramento e/ou presença de morfologia M3v – realiza-se a técnica de FISH-fusão em conjunto com a citogenética convencional.

De forma complementar, procurou-se observar a incidência de óbito precoce, morte na indução, sobrevida global e sobrevida livre de doença na população com t(15;17) – rearranjo *PML-RAR α* , com auxílio de dados clínicos e laboratoriais obtidos através da análise dos prontuários. Verificou-se que sete pacientes (12,72%) evoluíram a óbito antes de qualquer tratamento e que a taxa de óbito durante a indução foi de 35,42%. Três fatores prognósticos mostraram estar estatisticamente relacionados a esses óbitos na indução: idade avançada, elevada contagem de leucócitos e alta porcentagem de blastos e promielócitos circulantes no sangue. A sobrevida global em dois anos foi de 49,28%, com sobrevida livre de doença de 72,10%, onde foram observadas que duas variáveis prognósticas: idade acima dos 60 anos e a presença de morfologia M3v se encontram estatisticamente relacionadas à pior taxa de sobrevida global. Os resultados são considerados ruins quando comparados com dados apresentados por grupos estrangeiros, apesar da utilização de esquemas terapêuticos semelhantes.

Em poucas décadas, o prognóstico da LPA tem sido drasticamente modificado, de um dos subtipos mais malignos de leucemia aguda para uma dos mais curáveis. Este revolucionário progresso é em grande parte decorrente dos avanços notáveis em seu tratamento baseado no direcionamento ao alvo molecular e na baixa toxicidade, o qual tem permitido alcançar remissão molecular em aproximadamente 94% dos pacientes, com sobrevida livre de doença superior a 90% aos cinco anos de diagnóstico (Wang, Chen., 2008). Contudo, contrastando com os excelentes resultados observados em países desenvolvidos, a mortalidade por LPA, no Brasil, ainda é alta, apesar da ampla disponibilidade das medicações no país, segundo Jácomo e colaboradores (2008).

Um recente levantamento realizado por pesquisadores brasileiros, em 12 centros que tratam de neoplasias hematológicas, contabilizou 157 pacientes, correspondendo a 28% dos casos de LMAs que foram tratados no período de janeiro de 2003 a março de 2006; destes, 134 foram tratados com ATRA mais quimioterapia. A taxa de morte na indução entre esses 134 pacientes foi de 32%, com sobrevida global em três anos de 56,3% (Jácomo et al.,2007).

Pesquisadores brasileiros acreditam que o correto diagnóstico, associado à pronta instituição de tratamento, assim como a detecção precoce das complicações são essenciais para que se possa alcançar níveis de resposta semelhantes aos obtidos por grupos estrangeiros, com redução acentuada da mortalidade (Jácomo et al.,2008).

Neste trabalho verificou-se que o uso da técnica de citogenética convencional em conjunto com a técnica de FISH é extremamente importante para a obtenção do correto diagnóstico de LPA. Apesar de a técnica de FISH ter custo um pouco elevado e necessitar de profissionais bem treinados para a análise, é um método quantitativo altamente específico e que pode ser utilizado em diferentes tipos de amostras, devendo-se com isso se tornar rotina na prática clínica, principalmente nos casos de LPA em que a análise clássica não apresenta resultados satisfatórios e em que o paciente apresenta, no período do diagnóstico, ausência de sangramento e/ou presença de morfologia M3v.

6 – Conclusões

- 1.a - Detectou-se a presença da t(15;17) – rearranjo - *PML-RAR α* em 88,7% dos pacientes estudados; sendo em 59,7% visualizada no cariótipo, e em 29% detectada na técnica de FISH.
- 1.b - Não foram detectadas translocações alternativas; apenas um paciente apresentou translocação variante complexa e 23,6% apresentaram alterações citogenéticas adicionais.
- 1.c - Não houve diferença estatisticamente significante, entre os grupos com e sem alteração citogenética adicional, em relação a dados clínicos (idade, taxa de sobrevida global) e laboratoriais (morfologia M3/M3v, contagem de leucócitos, plaquetas, e porcentagem de blastos circulantes).
- 2 - 11,3% dos casos diagnosticados por estudo morfológico/imunofenotípico de medula óssea, não apresentaram alterações citogenéticas compatíveis para a leucemia promielocítica aguda. A ausência de sangramento no diagnóstico e a presença de morfologia M3v podem ser indicativos da ausência do rearranjo *PML-RAR α* , devendo o teste de FISH ser priorizado.

- 3 - A taxa de morte precoce (12,7%), de sobrevida global (49,28%) e de sobrevida livre de doença (72,10%), observadas neste trabalho, são ruins quando comparadas a estatísticas internacionais, contudo não diferiram muito de dados relatados em outros estudos brasileiros retrospectivos.

Anexo I

APROVAÇÃO

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 01.12.05, **APROVOU**, *ad referendum*, o Protocolo de Pesquisa nº 935/05, intitulado "Avaliação da citogenética convencional e molecular em portadores de leucemia promielocítica aguda no serviço de hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP", apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Dra. Elvira D. Rodrigues Pereira Velloso

Pesquisador(a) Executante: Aline de Medeiros Leal

CAPPesq, 01 de Novembro de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax: 011 - 3069 6492 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

A Hematologia
02.12.05
ANDRÉA RIBEIRO DOS SANTOS
Secretária de Planejamento e PP

Anexo II - Características clínicas e laboratoriais dos sete pacientes que não apresentaram a t(15;17) - rearranjo *PML-RAR α* no diagnóstico.

II.1 - Paciente 6

- Idade e sexo : 18 anos, masculino
- Data do diagnóstico: 04/10/2003
- História: 1mês de sangramento oral
- Evolução: submetido à quimioterapia de indução com ATRA e daunorribicina no dia 6/10/2003; tendo como complicações síndrome do ATRA, colecistite aguda e choque séptico; óbito em 22/10/03 por choque séptico .
- Hemograma do diagnóstico: - Hemoglobina: 10.6g/dl ;
 - Leucócito: $3.6 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Neutrófilo: $1 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Plaquetas: $17 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Porcentagem de blastos e promielócito: 15%
- Grupo de Risco: Intermediário.
- Morfologia: LMA-M3. (diagnóstico); LMA- M3 (revisão – observador 1); LMA-M3 (revisão – observador 2); LMA-M5 (revisão – observador 3).
- Imunofenotipagem: CD13+, CD33+, MPO +, CD34-, CD56-, HLA-DR-.
- Citogenética Convencional: Ausência de metáfases
- FISH *PML-RAR α* : nuc ish(*PML*, *RAR α*) x 2[586/600]
- FISH *RAR α* : nuc ish(*RAR α* x 2)[224/229]

Figura 27 : **A** - representa esfregaço de aspirado de medula óssea do paciente 6 com presença de inúmeros promielócitos hipergranulares (coloração Leishman x1000).

B - demonstra reação de peroxidase fortemente positiva nas células leucêmicas de aspirado de medula óssea do paciente 6 (coloração Peroxidase x 1000).

C - representa FISH interfásico negativo para t(15;17)- rearranjo *PML-RAR α* , com dois sinais laranjas e dois sinais verdes representando os cromossomos 15 e 17, respectivamente, normais para o paciente 6

D - representa FISH interfásico negativo para ruptura no gene *RAR α* , com dois sinais de fusão (laranja/verde coincidente) representando os cromossomos 17 normais para o paciente 6

II.2 - Paciente 8

- Idade e sexo : 21 anos, masculino
- Data do diagnóstico: 17/9/2002
- História: não disponível
- Evolução: submetido à quimioterapia de indução com D₃A₇ (daunorrubicina + citarabina) no dia 18/09/2002, tendo obtido remissão completa; consolidação realizada com altas doses de ARA-C (citarabina); recaída medular em novembro de 2003, resgate realizado com FLAG e com transplante de medula óssea alogênico relacionado, realizado em fevereiro de 2004; 2º recaída medular em agosto de 2005, submetido a 2º transplante em setembro de 2005. Paciente vivo em seguimento.
- Hemograma do diagnóstico: - Hemoglobina: 7.7g/dl ;
 - Leucócito: $151 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Neutrófilo: $16.6 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Plaquetas: $77 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Porcentagem de blastos e promielócito: 59%
- Grupo de Risco: Alto.
- Morfologia: LMA-M3v. (diagnóstico); LMA- M3v (revisão – observador 1); LMA- M2 (revisão – observador 2); LMA-M3 (revisão – observador 3).
- Imunofenotipagem: CD45 +, CD13+, CD33+, MPO +, CD34-, HLA-DR-.
- Citogenética Convencional: 46,XY[20]
- FISH PML-RAR α : nuc ish(PML, RAR α) x 2[596/600]

- FISH $RAR\alpha$: nuc ish($RAR\alpha$ x 2)[590/600]

II.3 - Paciente 27

- Idade e sexo : 43 anos, masculino
- Data do diagnóstico: 28/04/2001
- História: 1 mês de palidez
- Evolução: submetido à quimioterapia de indução com ATRA e D₃A₇ (daunorrubicina + citarabina) em 04/05/2001, tendo como complicações neutropenia febril e síndrome do ATRA. Obteve remissão completa após 2º ciclo. Recaída medular em 25/10/01; submetido a transplante de medula óssea alogênico relacionado, realizado em novembro de 2001; óbito em 25/11/01 por choque séptico.
- Hemograma do diagnóstico: - Hemoglobina: 7.2g/dl ;
 - Leucócito: $99 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Neutrófilo: $0.2 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Plaquetas: $79 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Porcentagem de blastos e promielócito: 92%
- Grupo de Risco: Alto.
- Morfologia: LMA-M3v. (diagnóstico); LMA- M2 (revisão – observador 1); LMA- M2 (revisão – observador 2).
- Imunofenotipagem: CD13+, CD33+, MPO +, CD34-, HLA-DR-.
- Citogenética Convencional: 46,XY[20]
- FISH PML-RAR α : nuc ish(PML, RAR α) x 2[576/600]
- FISH RAR α : nuc ish(RAR α x 2)[592/600]

Figura 29 : **A** - representa esfregaço de aspirado de medula óssea do paciente 27 com presença de grande quantidade de mieloblastos e alguns promielócitos e mielócitos (coloração Leishman x1000).

B - representa esfregaço de aspirado de medula óssea do paciente 27 com presença de blastos positivos, alguns com bastonetes de Auer (coloração Sudan Black x 1000).

C - representa FISH interfásico negativo para t(15;17)- rearranjo *PML-RAR α* , com dois sinais laranjas e dois sinais verdes representando os cromossomos 15 e 17, respectivamente, normais para paciente 27

D - representa FISH interfásico negativo para ruptura no gene *RAR α* , com dois sinais de fusão (laranja/verde coincidente) representando os cromossomos 17 normais para paciente 27.

II.4 - Paciente 41

- Idade e sexo : 7 anos, feminino
- Data do diagnóstico: 27/09/2004
- História: hematomas há 1 mês e 4 dias de febre
- Evolução: submetido à quimioterapia de indução com ATRA e daunorrubicina em 29/09/2004, tendo como complicações CIVD e síndrome do ATRA. Obteve remissão completa ; consolidação realizada segundo o protocolo AIDA. Evoluiu em 1º remissão completa, sem quimioterapia desde abril de 2007.
- Hemograma do diagnóstico: - Hemoglobina: 6.7g/dl ;
 - Leucócito: $2.4 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Neutrófilo: $0.192 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Plaquetas: $22 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Porcentagem de blastos e promielócito: 24%
- Grupo de Risco: intermediário.
- Morfologia: LMA-M3 (diagnóstico); LMA-M2 (revisão – observador 1); LMA-M2 (revisão – observador 2); LMA-M3 (revisão – observador 3).
- Imunofenotipagem: CD13+, CD33+, MPO +, CD34-, CD56-, HLA-DR-.
- Citogenética Convencional: 46,XX, -8, t(12;20)(q14;q13), + mar[9]/46,XX[13]
- FISH PML-RAR α : nuc ish(PML, RAR α) x 2[583/600]
- FISH RAR α : nuc ish(RAR α x 2)[328/338]

A **B** **C** **D**

Figura 30 : **A** - representa esfregaço de aspirado de medula óssea do paciente 41 com presença de blastos, promielócitos hipergranulares e células mais diferenciadas (coloração Leishman x1000).

B - demonstra reação de peroxidase positiva nas células leucêmicas de aspirado de medula óssea do paciente 41 (coloração Peroxidase x 1000).

C - representa FISH interfásico negativo para t(15;17)- rearranjo *PML-RARα*, com dois sinais laranjas e dois sinais verdes representando os cromossomos 15 e 17, respectivamente, normais para paciente 41.

D - representa FISH interfásico negativo para ruptura no gene *RARα*, com dois sinais de fusão (laranja/verde coincidente) representando os cromossomos 17 normais para paciente 41.

II.5 - Paciente 52

- Idade e sexo : 16 anos, feminino
- Data do diagnóstico: 15/09/2003
- História: 2 meses de amigdalite de repetição e 1 semana de palidez
- Evolução: submetido à indução com ATRA em 19/09/2003 e posteriormente ATRA e daunorrubicina em 04/11/2003. Consolidação realizada segundo o protocolo AIDA. Recaída em janeiro de 2005 como Leucemia indiferenciada. Último seguimento em agosto de 2005.
- Hemograma do diagnóstico: - Hemoglobina: 7.2g/dl ;
 - Leucócito: $1.9 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Neutrófilo: $0.076 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Plaquetas: $27 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Porcentagem de blastos e promielócito: 52%
- Grupo de Risco: intermediário.
- Morfologia: LMA-M3v (diagnóstico); LMA- M1 (revisão – observador 1); LMA- M1 (revisão – observador 2); LMA-M5 (revisão – observador 3).
- Imunofenotipagem: CD13+, CD33+, MPO +, CD34+, HLA-DR-.
- Citogenética Convencional: 46,XX,[6]
- FISH PML-RAR α : nuc ish(PML, RAR α) x 2[592/600]
- FISH RAR α : nuc ish(RAR α x 2)[585/600]

A **B** **C** **D**

Figura 31 : **A** - representa esfregaço de aspirado de medula óssea do paciente 52 com presença de células blásticas com mediana relação núcleo/ citoplasma; algumas com muitos grânulos (coloração Leishman x1000).

B - demonstra reação de peroxidase positiva em células leucêmicas com bastonetes de Auer de aspirado de medula óssea do paciente 52 (coloração Peroxidase x 1000).

C - representa FISH interfásico negativo para t(15;17)- rearranjo *PML-RARα*, com dois sinais laranjas e dois sinais verdes representando os cromossomos 15 e 17, respectivamente, normais para paciente 52.

D - representa FISH interfásico negativo para ruptura no gene *RARα*, com dois sinais de fusão (laranja/verde coincidente) representando os cromossomos 17 normais para paciente 52.

II.6 - Paciente 54

- Idade e sexo : 48 anos, masculino
- Data do diagnóstico: 01/03/2002
- História: 20 dias de astenia e de palidez, 1 semana de gengivorragia e petéquia
- Evolução: submetido à quimioterapia de indução com ATRA e D₃A₇ (daunorrubicina + citarabina) em 02/03/2002 ; óbito em 7/03/02 por AVCH.
- Hemograma do diagnóstico: - Hemoglobina: 6.7g/dl ;
 - Leucócito: $94.1 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Neutrófilo: $0.941 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Plaquetas: $20 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Porcentagem de blastos e promielócito: 96%
- Grupo de Risco: alto.
- Morfologia: LMA-M3v (Lâmina não disponível para revisão).
- Imunofenotipagem: CD13-, CD33+, MPO +, CD34-, HLA-DR-.
- Citogenética Convencional: ausência de metáfases.
- FISH PML-RAR α : nuc ish(PML, RAR α) x 2[268/283]
- FISH RAR α : nuc ish(RAR α x 2)[306/315]

II.7- Paciente 55

- Idade e sexo : 69 anos, masculino
- Data do diagnóstico: 03/03/2000
- História: 1 semana de dispnéia e cansaço.
- Evolução: no 1º dia de internação evoluiu com AVCH; infiltração do SNC por células leucêmicas. Submetido à quimioterapia de indução com ATRA e daunorrubicina em 10/03/2000; evoluiu com choque séptico e óbito em 2/04/2000.
- Hemograma do diagnóstico: - Hemoglobina: 9.8g/dl ;
 - Leucócito: $48 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Neutrófilo: $2.4 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Plaquetas: $74 \times 10^3/\text{mm}^3$;
 - Porcentagem de blastos e promielócito: 57%
- Grupo de Risco: alto.
- Morfologia: LMA-M3v (diagnóstico); LMA-M2 (revisão - observador 1); LMA-M1 (revisão - observador 2); LMA-M5 (revisão - observador 3).
- Imunofenotipagem: CD13+, CD33+, MPO +, CD34-, HLA-DR-.
- Citogenética Convencional: 46,XY[10].
- FISH PML-RAR α : nuc ish(PML, RAR α) x 2[540/600]
- FISH RAR α : nuc ish(RAR α x 2)[591/600]

A **B** **C** **D**

Figura 32 : **A** - representa esfregaço de aspirado de medula óssea do paciente 55 com presença de células blásticas com mediana relação núcleo/ citoplasma; algumas com núcleo de forma convoluta; presença de algumas células hipergranulares (coloração Leishman x1000).

B - demonstra reação de peroxidase positiva em células leucêmicas de aspirado de medula óssea do paciente 55 (coloração Peroxidase x 1000).

C - representa FISH interfásico negativo para t(15;17)- rearranjo *PML-RARα*, com dois sinais laranjas e dois sinais verdes representando os cromossomos 15 e 17, respectivamente, normais para paciente 55.

D - representa FISH interfásico negativo para ruptura no gene *RARα*, com dois sinais de fusão (laranja/verde coincidente) representando os cromossomos 17 normais para paciente 55.

Anexo III

Tabela 12 – Comparação de variáveis segundo alteração citogenética adicional

Variável Prognóstica	Sem alt adicional	Com alt adicional	p
	n = 24 (%)	n = 14 (%)	
Idade			
Até 60 anos	21 (87,5)	14 (100,0)	0,16
Acima de 60 anos	3 (12,5)	0 (0)	
Sexo			
Masculino	11 (45,8)	11 (78,6)	0,05
Feminino	13 (54,2)	3 (21,4)	
Morfologia			
M3	19 (79,2)	12 (85,7)	0,61
M3v	5 (20,2)	2 (14,3)	
CD56¹			
Ausente	7 (70,0)	4 (80)	0,68
Presente	3 (30,0)	1 (20)	
CD34²			
Ausente	16 (76,2)	12 (100,0)	0,06
Presente	5 (23,8)	0 (0)	
Hemoglobina			
≥ 10,0	6 (25,0)	5 (35,7)	0,48
< 10,0	18 (75,0)	9 (64,3)	
Leucócitos			
< 10.000/mm3	14 (58,3)	8 (57,1)	0,82
> 10.000/mm3	10 (41,7)	6 (42,9)	
Plaquetas			
> 40.000/mm3	6 (25,0)	5 (35,7)	0,48
< 40.000/mm3	18 (75,0)	9 (64,3)	
Porcentagem blastos e promielócitos³			
Mediana (variação)	46,5 (0 – 97)	59 (0 – 96)	0,42
Grupo de risco			
Baixo	3 (12,5)	4 (28,6)	0,38
Intermediário	11 (45,8)	4 (28,6)	
Alto	10 (41,7)	6 (42,8)	

Nota Tabela 11: 1 – Dado ignorado em 23 pacientes; 2 – dado ignorado em 5 pacientes, 3 – teste Mann-Whitney.

8 – Referências Bibliográficas

Abe S, Ishikawa I, Harigae H, Sugawara T. A new complex translocation t(5;17;15)(q11;q21;q22) in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.*2008;184:44-7.

Andoh K, Kubota T, Takada M, Tanaka H, Kobayashi N, Maekawa T. Tissue factor activity in leukemia cells. Special reference to disseminated intravascular coagulation. *Cancer.*1987;59:748-54.

Arbuthnot C, Wilde JT. Haemostatic problems in acute promyelocytic leukaemia. *Blood.*2006;20:289-97

Arnould C, Philippe C, Bourdon V, Gregoire MJ, Berger R, Jonveaux P. The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia. *Hum Mol Genet.*1999;8:1741-49

Asou N. All-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Intern Med.*2007;46: 91-3.

Avvisati G, Lo Coco F, Mandelli F. Acute Promyelocytic Leukemia: Clinical and Morphologic Features and Prognostic Factors. *Semin Hematol.*2001;38:4-12

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, *et al.*

Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976; 33: 451-8.

Bernard J, Mathe G, Boulay J, Ceoard B, Chome J. Acute promyelocytic leukemia: a study mode on 20 cases. *Schw Med Woch.* 1959; 89: 604-08.

Brockman SR, Paternoster SF, Ketterling RP, Dewald GW. New highly sensitive fluorescence in situ hybridization method to detect PML/RARA fusion in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003;145:144-51.

Brunning RD, Matutes E, Flandrin G, Vardiman J, Bennett J, Head D, *et al.* Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC press; 2001. p. 81-7

Cassinat B, Chomienne C. Biological features of primary APL blasts: their relevance to the understanding of granulopoiesis, leukemogenesis and patient management. *Oncogene.* 2001;20:7154-60.

Catalano A, Dawson MA, Somana K, Opat Stephen, Schawarer A, Campbell LJ. The PRKAR1A gene is fused to RARA in a new variant acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 2007;110:4073-6.

Chan IT, Kutok JL, Williams IR, Cohen S, Moore S, Shigematsu H *et al.* Oncogenic K-ras cooperates with PML-RAR alpha to induce an acute promyelocytic leukemia-like disease. *Blood*. 2006; 108:1708-15.

Chauffaille MLLF, Figueiredo MS, Beltrani R, Antunes SV, Yamamoto M, Kerbay J. Acute promyelocytic leukemia: the study of t(15;17) translocation by fluorescent in situ hybridization, reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytogenetics techniques. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34:735-43.

Chen SJ, Zelent A, Tong JH, Yu HQ, Wang ZY, Derré J *et al.* Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t(11;17)(q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest*. 1993;91:2260-7.

Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY *et al.* In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia : As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of BCL-2 expression and modulation of PML-RARalphaPML proteins. *Blood*. 1996;88:1052-61.

Chen Z, Tong JH, Dong S, Zhu J, Wang ZY, Chen SJ *et al.* Retinoic acid regulatory pathways, chromosomal translocations, and acute promyelocytic leukemia. *Genes*

Chromosomes Cancer.1996;15: 147-56

Chen Z, Chen GQ, Shen ZX, Chen SJ, Wang ZY. Treatment of acute promyelocytic leukemia with Arsenic compounds: in vitro and in vivo studies. *Semin Hematol*. 2001; 38:26-36.

Choppa PC, Gomez J; Vall HG, Owens M, Rappaport H, Lopategui JR. A novel method for detection, quantitation, and breakpoint cluster region determination of t(15;17) fusion transcripts using a one- step real-time multiplex RT-PCR. *Am J Clin Pathol*.2003; 119:137-144.

Cooperberg AA, Neiman GMA. Fibrinogenopenia and fibrinolysis in acute myelogenous leukemia. *Ann Intern Med*. 1955;42: 707-11.

De Botton S, Chevret S, Sanz M, Dombret H, Thomas X, Guerci A *et al*. Additional chromosomal abnormalities in patients with acute promyelocytic leukaemia (APL) do not confer poor prognosis: results of APL 93 trial. *Br J Haematol*. 2000;111:801-6

Deschler B, Lubbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*.2006;107:2099-107.

de Thé H, Chomienne C; Lanotte M; Degos L; Dejean A . The t(15;17) translocation of

acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature*. 1990;347: 558-61.

Di Bona E, Sartori R, Zambello R, Guercini N, Madeo D, Rodeghiero F. Prognostic significance of CD56 antigen expression in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2002; 87:250-6.

Douer D, Preston-Martins S, Chang E, Nichols PW, Watkins KJ, Levine AM. High frequency of acute promyelocytic leukemia among latinos with acute myeloid leukemia. *Blood*. 1996;87:308-13.

Douer D. The epidemiology of acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2003;16:357-67

Douer D, Tallman MS. Arsenic trioxide: new clinical experience with an old medication in hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 2005; 23:2396-2410.

Eclache V, Viguie F, Frocrain C, Cassinat B, Chomienne C, Cymbalista F *et al*. A new variant t (6;15;17)(q25;q22;q21) in acute promyelocytic leukemia: fluorescence in situ hybridization confirmation. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;159:69-73

Federici AB, Falanga A, Lattuada A, Di Rocco N, Barbui PM, Mannucci PM.

Proteolysis of von Willenbrand factor is decreased in acute promyelocytic leukemia by treatment with all-trans-retinoic acid. *Br J Haematol.* 1996;92:733-9.

Fenaux P, Chomienne C, Degos L. All-trans Retinoic Acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol.* 2001; 38:13-25.

Ferrara F, Morabito F, Martino B, Specchia G, Liso V, Nobile F *et al.* Cd56 expression is an indicator of poor clinical outcome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with simultaneous ATRA and chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2000;18:1295-1300.

Frohling F, Dohner H. Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med.* 2008;359: 722-34.

Gale RE, Hills R, Pizzey AR, Kottaridis PD, Swirsky D, Gilkes AF *et al.* Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 2005;106: 3768-76.

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

Grimwade D, Biond A, Mozziconacci MJ, Hagemeijer A, Berger Roland, Neat M *et al*

.Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. *Blood*.2000; 96: 1297-1308.

Grimwade D, Lo-Coco F. Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. *Leukemia*.2002;16:1959-73.

Gu BW, Xiong H, Zhou Y, Chen B, Wang L, Dong S *et al*. Variant-type PML-RAR(alpha) fusion transcript in acute promyelocitic leukemia: use of acryptic coding sequence from intron 2 of the RAR(alpha) gene and identification of a new clinical subtype resistant to retinoic acid therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*.2002;99:7640-45.

Gurrieri C; Capodienci P, Bernardi R, Scaglioni PP, Nafa K, Rush LJ. Loss of the tumor supresor PML in human cancer of multiple histologic origins. *J Natl Cancer Inst*.2004; 96:269-79.

Haferlach C, Rieder H, Lillington DM, Dastugue N, Hagemeijer A, Harbott J *et al*. Proposal for standardized protocols for cytogenetics analyses of acute leukemias, chronic lymphocytic leukemia, chronic myeloid leukemia, chronic myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Genes Chromosomes Cancer*.2007;46:494-499.

Hernández JM, Martín G, Gutiérrez CG, Cervera J, Ferro MT, Calasanz MJ *et al.* Additional cytogenetic change do not influence the outcome of patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia treated with an ATRA plus anthracyclin based protocol. A report of the Spanish group Pethema. *Haematologica*.2001;86:807-13.

Hillestad LK. Acute promyelocytic leukemia. *Acta Med Scand*. 1957; 159:189-94.

Hiorns LR, Swansbury GL, Mehta J, Min T, Dainton MG, Treleaven J *et al.* Additional chromosome abnormalities confer worse prognosis in acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol*.1997;96:314-21.

Hölzer D, Schelegelberger B. Cryptic t(15;17) in patient with AML M3 and a complex karyotype. *Cancer Genet Cytogenet*.2007;175: 77-80.

Hoemme C, Peerzada A, Behre G, Wang Y, McClelland M, Nieselt K. Chromatin modifications induced by PML-RAR α repress critical targets in leukemogenesis as analyzed by ChiP-Chip. *Blood*.2008;111:2887-95

Hormaeche I, Licht J. Chromatin modulation by oncogenic transcription factors: new complexity, new therapeutic targets. *Cancer Cell*.2007;11:475-78.

Jabbour EJ, Estey E, Kantajian HM. Adult acute myeloid leukemia: diagnosis and

treatment. *Mayo Clin Proc.*2006;81:247-60.

Jácome RH, Melo R, Souto FR, Mattos ER, Oliveira CT, Fagundes EM *et al.* Clinical features na outcomes of 134 Brazilians with acute promyelocytic leukemias who received ATRA and antracyclines. *Haematologica* .2007;92:1431-2.

Jácomo RH, Figueredo-Pontes L, Rego EM. Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. *Ver Assoc Méd Brás* .2008;54:82-9.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW(Eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of tumours of Haematopoietic and lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press,2001.

Kakizuka A, Miller WH Jr, Umesono K, Warrell RP Jr, frankel SR, Murty VV *et al.* Cromossomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell.*1991; 66:663-74.

Kamashev D, Vitoux D, de The H. PML-RARalpha – RXR oligomers mediate retinoid and rexinoid/ cAMP cross- talk in acute promyelocytic leukemia cell differentiation. *J Exp Med.*2004; 199:1163-74.

Kastner P, Chan S. Function of RAR α during the maturation of neutrophils. *Oncogene*. 2001; 20: 7178-85.

Kearney L, Horsley SW. Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. *Chromosoma*. 2005; 114: 286-294.

Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, Bouton CL, Amaral SM, Curley DP *et al*. PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL- like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:8283-88.

Kondo T, Mori A, Darmanin S, Hashino S, Tanaka J, Asaka M. The seventh pathogenic fusion gene *FIP1L1-RARA* was isolated from a t(4;17)-positive acute promyelocytic leukemia. *Haematologica*. 2008;93:1414-16.

Kusakabe M, Suzukawa K, Nanmoku T, Obara N, Okashi Y, Nukai HY *et al*. Detection of the STAT5B-RARA fusion transcript in acute promyelocytic leukemia with the normal chromosome 17 on G- banding. *Eur J Haematol*. 2008;80: 44-7.

Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, Peres L *et al*. Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol*. 2008;10:547-55.

Lee DS, Lee YS, Kim YR, Han KS, Park KU, She CJ *et al.* RARA fluorescence in situ hybridization overcomes the drawback of PML/RARA fluorescence in situ hybridization in follow-up of acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002; 139: 104-08.

Lewin B. Genes VII. Porto Alegre, Artmed,2001.955p

Liso V, Bennet J. Morphological and cytochemical characteristics of leukaemic promyelocytes. *Best Practic & Research.* 2003; 16:349-55.

Llacer PED. *Tratamento quimioterápico da leucemia mielóide aguda: experiência de 16 anos da disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo* [tese].São Paulo(SP): Universidade de São Paulo(USP); 1995.

Lock RJ, Virgo PF, Kitchen C, Evely RS. Rapid diagnosis and characterization of acute promyelocytic leukaemia in routine laboratory practice. *Clin lab Haem.*2004; 26: 101-06.

Lo-Coco F, Diverio D, Falini B, Biond A, Nervi C, Pelicci PG. Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. *Blood.*1999;97:12-22.

Lo-Coco F, Ammatuna E. The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology*.2006: 156-161.

Luatti S, Marzocchi G, Ottaviani E, Baldazzi C, Stacchini M, Gamberini C *et al.* Acute promyelocytic leukemia with amplification of PML-RAR α rearrangement: clinical implications. *Leuk Res*.2008: 32: 1941-3.

Malta Corea A, Pacheco EC, Cantú RA, Conter V, Lietti G, Masera G *et al.*, Childhood acute promyelocytic leukemia in Nicaragua. *Ann Oncol*. 1993;1:892-94.

Mancini M, Nanni M, Cedrone M, Diverio D, Avvisati G, Riccioni R, De Cuia MR, Fenu S, Alimena G. Combined cytogenetic, FISH and molecular analysis in acute promyelocytic leukaemia at diagnosis and in complete remission. *Br J Haematol*. 1995;91: 878-84.

Mandelli F, Avvisati G, Lo Coco F. Advances in the understanding and management of acute promyelocytic leukemia. *Clin Exp Hematol*.2002; 6:60-71.

Matsushita H, Scaglioni PP, Bhaumik M, Rego EM, Cai LF, Majid SM *et al.* In vivo analysis of the role of aberrant histone deacetylase recruitment and RAR blockade in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med*.2006;203:821-28

McKenna RW, Parkin J, Bloomfield CD, SundBerg R D, Brunning RD. Acute promyelocytic leukaemia: a study of 39 cases with identification of hyperbasophilic microgranular variant. *Br J Haematol.* 1982;50:201-14.

Meijers JC, Oudijk EJ, Mosnier LO, Bos R, Bouma BN, Nieuwenhuis HK, *et al.* Reduced activity of TAFI (thrombin-activable fibrinolysis inhibitor) in acute promyelocytic leukemia. *Br J Haematol.* 2000;108:515-23.

Méis E, Levy RA. Câncer e trombose: uma revisão da literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2007;53:183-193.

Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RAR α , its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 1999;93:3167-3215.

Melo RAM, Vasconcellos JF, Melo FCB, Machado CGF, Lacerda TMS, Souto FR. PML-RAR α fusion gene transcripts and biological features in acute promyelocytic leukemia. *Clin Lab Haem.* 2006;28:126-29.

Menditi KBC, Kang HC. O papel das proteínas histonas nas neoplasias hematológicas. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2007;53:453-460.

Menell JS, Cesarman GM, Jacovina AT, McLaughlin Ma, Lev KA, Hajjar KA. Annexi

II and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med.* 1999;340:994-1004.

Miller WH, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxmans S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res.* 2002; 62:3893-3903.

Muller S, Matunis MJ, Dejean A. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-I regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J.* 1998;17: 61-70.

Mrózek K, Heerema N, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood.* 2004;18:115-36.

Murray CK, Estey E, Paietta E, Howard RS, Edenfield WJ, Pierce S *et al.* CD56 expression in acute promyelocytic leukemia: a possible indicator of poor treatment outcome? *J Clin Oncol.* 1999;17:293-97.

Nambiar M, Kari V, Raghavan S. Chromosomal translocations in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008;1786: 139-152.

Neame PB, Soamboonsrup P, Leber B, Carter RF, Sunisloe L, Patterson W *et al.* morphology of acute promyelocytic leukemias with cytogenetic or molecular evidence for the diagnosis: characterization of additional microgranular variants. *Am J Hematol.* 1997;56:131-42.

Nervi C, Ferrara FF, Fanelli M, Rippo MR, Tomassini B, Ferrucci PF *et al.* Caspases mediate retinoic acid-induced degradation of the acute promyelocytic leukemia PML/RARalpha fusion protein. *Blood*.1998;92: 2244-51

Noguera NI, Breccia M, Divona M, Diverio D, Costa V, De Santis S *et al.* Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol. *Leukemia*.2002; 16:2185-89.

Orfao A, Ciudad J, Gonzalez M, Lopez A, Del Mar Abad M, Paz Bousza JI *et al.* Flow cytometry in the diagnosis of cancer. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*.1995;221:145-52

Orfao A, Chillon Mc, Bortoluci AM, Lopez-Berges MC, Garcia-SAZ R, Gonzales M *et al.* The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-Ralphi gene rearrangements. *Haematologica*.1999;84:405-12.

Owatari S, Uozumi K, haraguchi K, Ohno N, Tokunaga M, Tokunaga M *et al.* A new cytogenetic abnormality , t(2;7)(q33;q36) in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*.2007;173 :1-4.

Pantic M, Novak A, Marisavljevic D, Djordjevic V, Elezovic I, Vidovic A *et al.*

Additional chromosome aberrations in acute promyelocit leukemia: characteristics and prognostic influence. *Med Oncol.*2000; 17:307-13.

Pisciotta AV, Schultz JE. Fibrinolytic púrpura in acute leukemia. *Am J Med.* 1955; 19: 824-28.

Redner RL. Variations on theme: the alternate translocations in APL. *Leukemia.* 2002; 16:1927-32.

Rego EM, Pandolfi PP. Reciprocal products of chromosomal translocations in human cancer pathogenesis: key players or innocent bystanders? *TRENDS in Molecular Medice.*2002; 8:396-405.

Reiter A, Lengfelder E, Grimwade D. Pathogenesis, diagnosis and monitoring of residual disease in acute promyelocytic leukaemia. *Acta Haematol.* 2004; 112:55-67.

Ribeiro RC, Rego E. Management of APL in developing countries: epidemiology, challenges and opportunities for international collaboration. *Am Soc Hematol Educ Program.*2006: 162-68.

Rizzati EG, Portieres FL, Martins SLR, Rego EM, Zago MA, Falcão RP. Microgranular and t(11;17)/ PLZF-RAR α variantes of acute promyelocytic leukemia also presente the

flow cytometric pattern of CD13, CD34 and CD15 expression characteristic of PML-RAR α gene rearrangement. *Am J Hematol.* 2004; 76: 44-51.

Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet.* 1977;1:549-50.

Ruiz-Arguelles GJ, Graces-Eisele J, Reyes-Nunes V, Gomez- Rangel JD, Ruiz-Delgado GJ. More on geographic hematology: the breakpoint cluster regions of the PML/RAR α fusion gene in Mexican Mestizo patients with promyelocytic leukemia are different from those in Caucasians. *Leuk Lymphoma.* 2004;45:1365-68.

Sainty D, Liso V, Cantu-Rajnoldi A, Head D, Mozziconacci MJ, Arnoulet C *et al.* A new morphological classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLZF-RARA rearrangements. *Blood.* 2000; 96:1287-96.

Sanz MA, Lo-Coco F, Martin G, Avvisati G, Rayón C, Barbui T *et al.* Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMENA cooperative groups. *Blood.* 2000;96:1247-53.

Sanz MA, Vellenga E, Rayón C, Diaz – Mediavella J, Rivas C, Amutio E *et al.* All-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy for treatment of elderly patients with

acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2004;104:3490-3.

Sanz MA, Tallman MS, Lo-Coco F. Tricks of the trade for the appropriate management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2005; 105: 3019-025.

Sanz MA. Treatment of acute promyelocytic leukemia. *Am Soc Educ Program*. 2006:147-55.

Schoch C, Haase D, Haferlach T, Freund M, Link H, Lengfelder E *et al*. Incidence and implicate on of additional chromosome aberrations in acute promyelocytic leukaemia with translocation t(15;17)(q22;q21): a report on 50 patients. *Br J Haematol*. 1996; 94: 493-50.

Schoch C, Schinittger S, Ker W, Lengfelder E, Löffler H, Hiddemann *et al*. Rapid diagnostic approach to PML-RARalpha – positive acute promyelocytic leukemia. *Hematology J*. 2002;3:259-63

Sessarego M, Fugazza G, Balleari E, Bruzzzone R, Ballestrero, Patrone F. High frequency of trisomy 8 in acute promyelocytic leukemia: a fluorescence in situ hybridization study. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;97: 161-64.

Sirulnik A, Melnick A, Zelent A, Licht JD. Molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia and APL variants. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2003; 16:387-408.

Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ *et al.* Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med.*1998;339:1341-8.

Spell D W, Velagaleti GVN, Jones DV, Velasquez WS. Translocation (15;17) and trisomy 21 in the microgranular variant of acute promyelocytic leukemia. *Cancer Gent Cytogenet.*2002;132: 74-6

Sreekantaiah C. FISH panel for hematologic malignancies. *Cytogenet Genome Res.*2007;118: 284-96.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds). Who Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, IARC Press,2008.

Sucić M, Zadro R, Burazer B, Labar B, Nemet D, Mrsić M *et al.* Acute promyelocytic leukemia M3: cytomorphologic, immunophenotypic, cytogenetic and molecular variants. *J Hematother Stem Cell Res.*2002;11:941-50.

Tallman MS, Brenner B, Serna J de L, Dombret H, Falanga A, Kwaan HC *et al.* Meeting report acute promyelocytic leukemic-associated coagulopathy , 21 january 2004, London, United Kingdom. *Leuk Res.*2005;29: 347-51.

Tallman MS, Abutalib SA, Altman JK. The double hazard of trombophilia and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *Semin Thromb Hemost.*2007;33:330-8.

Tirado CA, Jahn JA, Scheerle J, Eid M, Meister RJ, Christie RJ. Variant acute promyelocytic leukemia translocation (15;17) originating from two subsequent balanced translocations involving the same chromosomes 15 and 17 while preserving the *PML/RARA* fusion. *Cancer Gent Cytogenet.*2005;161:70-3.0

Tomonaga M, Yoshida Y, Tagawa M, Jinnai I, Kuriyama K, Amenomori T *et al.* Cytochemistry of Acute Promyelocytic Leukemia (M3): Leukemic Promyelocytes Exhibit Heterogeneous Patterns in Cellular Differentiation. *Blood.*1985; 66:350-57.

Van Dongen JJM, Van Der Burg M, Langerak AW. Split-signal FISH for detection of chromosome aberrations. *Hematology.*2005;10: 66-72.

Vardirman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood.*2002; 100:2292-302.

Vellenga E, Mulder NH. Normal levevel of antithrobin III in acute leukemia complicated by coagulopathy. *Acta Haematologica.*1980;63:336-8

Villa R, De Santis F, Gutierrez A, Minucci S, Pelicci PG, Croce LD. Epigenetic gene

silencing in acute promyelocytic leukemia. *Biochemical Pharmacology*.2004;68:1247-54.

Vitoux D, Nars R, de The H. Acute promyelocytic leukemia: New issues on pathogenesis and treatment response. *Int J Biochem Cell Biol*.2007;39:1063-70.

vom Baur F, Zechel C, Heery D, Heine MJ, garnier JM, Vivat V *et al*. Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J*.1996;15:110-24.

Wan TSK, Ma SK, Au WY, Liu HSY, Chan JCW, Chan LC. Trisomy 21 and other chromosomal abnormalities in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* .2003;140: 170-3.

Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia; from highly fatal to highly curable. *Blood*.2008; 111:2505-15.

Wilde JT, Davies JM. Haemostatic problems in Acute Leukaemia. *Blood*.1990; 4:245-51

Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA, Jacky PB *et al*. Guidance for fluorescence *in situ* hybridization testing in hematologic disorders. *J Mol Diagn*.2007;

9:134-43.

Xu L, Zhao WL, Xiong SM, Su XY, Zhao M, Wang C. molecular cytogenetic characterization and clinical relevance of additional, complex and/or variant chromosome abnormalities in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*.2001;15:1359-68.

Yunis JJ, Sawyer JR, Ball DW. The characterization of high-resolution G-banded chromosomes of man. *Chromosoma*.1978;67:293-307.

Zaccaria A, Valenti A, Toschi M, Salvucci M, Cipriani R, Ottaviani E, Martinelli G. Cryptic translocation of PML/RARA on 17q. A rare event in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*.2002;138:169-73.

Zhang JW, Wang JY, Chen SJ, Chen Z. Mechanisms of all-trans retinoic acid- induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *J Biosci*. 2000;25:275-84.

Zhang T, Westervelt P, Hess JL. Pathologic, cytogenetic and molecular assessment of acute promyelocytic leukemia patients treated with arsenic trioxide (As₂O₃) .*Mod Pathol*.2000;13:954-61.

Zang Y, Rowley JD. Chromatin structural elements and chromosomal translocations in

leukemia. *DNA Repair*. 2006;1282-97.

Zhong S, Salomoni P, Pandolfi PP. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol*.2000;2: 85-90.

Zhou GB, Chen SJ, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia:A model of molecular target based therapy.*Hematology*.2005;10:270-80.

Zhou GB, Li G, Chen SJ, Chen Z. From dissection of disease pathogenesis to elucidation of mechanisms of targeted therapies: leukemia research in the genomic era. *Acta Pharmacol Sin*. 2007; 9:1434-49.