

## Características genéticas da leucemia promielocítica aguda de novo

### *Genetics characteristics of de novo acute promyelocytic leukemia*

Aline M. Leal<sup>1</sup>

Cristina A. Kumeda<sup>2</sup>

Elvira D. R. P. Velloso<sup>3</sup>

*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 retinoico (RAR $\alpha$ ) localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21), levando à formação de genes quiméricos e oncoproteínas de fusão. Em aproximadamente 98% dos casos, o gene RAR $\alpha$  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 RAR $\alpha$  pode estar fusionado com outros genes que não o PML, levando à formação de proteínas de fusão conhecidas genericamente como X-RAR $\alpha$ . A leucemia promielocítica aguda é um exemplo de malignidade hematológica onde se tem a combinação de alterações genéticas e epigenéticas (acetilação, desacetilação e metilação) no processo de leucemogênese, alterações cromossômicas estruturais influenciando no equilíbrio dinâmico da cromatina na região promotora de alguns genes. A utilização de técnicas moleculares que auxiliam no diagnóstico genético mais preciso e o desenvolvimento de uma terapia alvo molecular permitiram alcançar alta taxa de cura desta doença. Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*

**Palavras-chave:** Leucemia promielocítica aguda; genética; translocação genética.

### Introdução

A leucemia promielocítica aguda é fenotipicamente caracterizada por um acúmulo de promielócitos anormais na medula óssea e/ou sangue periférico, riscos de complicações trombóticas e hemorrágicas. Geneticamente, está associada com alterações cromossômicas estruturais, envolvendo sempre o locus gênico para o receptor alfa do ácido retinoico (RAR $\alpha$ ), localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21), resultando na formação de genes quiméricos e oncoproteínas de fusão.<sup>1,2,3</sup> Corresponde morfológicamente aos subtipos M3 e M3 variante de leucemia mieloide aguda, segundo a Classificação Franco-Américo-Britânica (FAB) e ao subtipo leucemia mieloide aguda associada à translocação recíproca e balanceada entre os cromossomos 15 e 17

[t(15;17)], segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde das Neoplasias Mieloides.<sup>4,5,6,7</sup>

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 mieloide 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* retinoico (ATRA), um derivativo da vitamina A, e o trióxido de arsênio (ATO), passando a ser considerado o primeiro exemplo de sucesso de terapia alvo molecular baseado na indução da diferenciação e apoptose.<sup>8,9,10,11</sup> Estudos têm demonstrado que a oncoproteína de fusão *PML-RAR $\alpha$*  é alvo direto do

<sup>1</sup> Biologista do Laboratório de Citogenética do Serviço de Hematologia da Universidade de São Paulo

<sup>2</sup> Biologista chefe do Laboratório de Citogenética do Serviço de Hematologia da Universidade de São Paulo

<sup>3</sup> Médica da Disciplina e do Serviço de Hematologia da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo-SP

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – São Paulo-SP

**Correspondência:** Elvira Velloso

Laboratório de Citogenética

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 - 1º andar, sala 30 – Cerqueira César

05403-000 – São Paulo, SP – Brasil

Tel: (+ 55 11) 3061-5544 R-312

ATRA; concentrações farmacológicas desse medicamento ( $10^{-6}$ - $10^{-7}$  M) induzem diferenciação do promielócito leucêmico e o destina à morte celular programada. Esta oncoproteína também é alvo do trióxido de arsênico, e pesquisas indicam que a região rica em cisteína do motivo PML da oncoproteína é a principal candidata para interagir com o ATO. A ação desse composto nas células leucêmicas é dose dependente, onde, em baixas concentrações, ocorre a indução da diferenciação parcial dessas células e, em altas concentrações, ocorre a indução de apoptose. Pesquisas têm demonstrado que o ATRA, em combinação com o ATO, atua de forma sinérgica, aumentando a degradação da oncoproteína de fusão e a apoptose, o que representa uma explicação plausível para os bons resultados observados na clínica.<sup>2,8,9,10,11</sup>

Vale salientar que, apesar desses bons resultados, o ATRA não é isento de efeitos colaterais. Talvez o mais digno de nota seja a síndrome do ATRA, também conhecida como síndrome de diferenciação, que acomete aproximadamente 14%-16% dos pacientes tratados com este agente, apresentando letalidade entre 2%-10%. As manifestações clínicas desta síndrome incluem: febre inexplicada, leucocitose, dispneia, edema periférico ou infiltrados pulmonares, insuficiência renal aguda, insuficiência cardíaca congestiva, dentre outras.

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.<sup>12,13</sup> 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-RARα*, ou, alternativamente, pacientes cujo aspecto morfológico não leva à suspeita de LPA, porém possuem a alteração genética específica, têm sido descritos frequentemente na literatura.<sup>11,14,15,16</sup>

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 à necessidade de um diagnóstico genético rápido e preciso.<sup>11,16,17</sup>

*t(15;17) - rearranjo PML-RARA*

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.<sup>18</sup> Subsequentemente, entre os anos de 1990-1991, alguns pesquisadores clonaram os dois genes envolvidos nessa translocação.<sup>19,20</sup>

A grande maioria dos casos de leucemia promielocítica aguda (LPA/M3/ M3v), aproximadamente 98%, apresenta, durante o diagnóstico, a translocação cromossômica recíproca t(15;17)(q22;q21) (Figura 1), 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 retinoico (*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 2). O transcrito de fusão *PML-RARα* pode ser detectado em 100% dos pacientes com

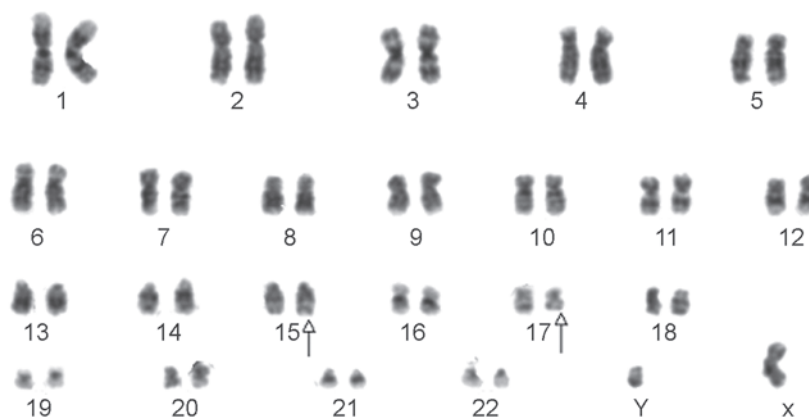


Figura 1. Demonstra o cariótipo de paciente com a presença da t(15;17) representada pelas setas

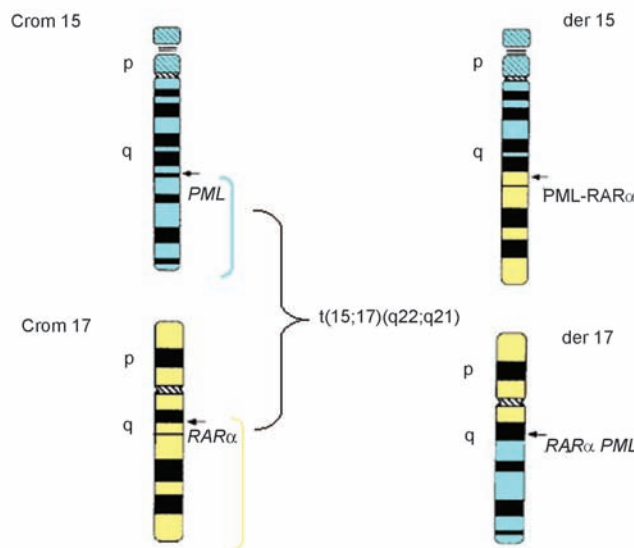


Figura 2. Representação esquemática da t(15;17)(q22;q21).

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.<sup>3,10,21,22</sup> Tanto o gene *PML* quanto o *RARα* têm participação na hematopoese normal.<sup>15</sup>

### Gene *PML*

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, o *PML* é requerido para a repressão da transcrição mediada por outros supressores de tumor, como o *RB* e *Mad*.<sup>23</sup> 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; esta associação de proteínas se encontra relacionada com funções celulares. Estudos sugerem que Daxx atua como repressor transcrricional de p53 e membros da família de p53 e que este efeito repressivo pode ser modulado pelo *PML*.<sup>24,25,26</sup>

Na translocação cromossômica t(15;17), o ponto de quebra no gene *PML* pode ser variável, sendo capaz de gerar produtos de tamanhos diferentes, isoformas do transcrito *PML-RARα*, entre os pacientes. No entanto, no mesmo paciente, o transcrito é invariável, o que demonstra a natureza clonal do fenômeno. 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-RARα*: o longo, o variável e o curto respectivamente.<sup>27,28,29</sup>

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 controversa.<sup>29,30,31,32</sup>

### Gene *RARα*

O gene *RARα* codifica o receptor alfa do ácido retinoico, 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 têm um papel fundamental na diferenciação mieloide.<sup>33</sup> Estruturalmente, o receptor *RARα* 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.<sup>34</sup>

O receptor alfa do ácido retinoico (*RARα*) se liga a elementos responsivos ao ácido retinoico (RAREs) presentes nas regiões promotoras de seus genes-alvo, os quais estão envolvidos com o processo de diferenciação mieloide. Para isso, é necessária sua heterodimerização com o RXR (receptor nuclear do ácido 9- cis - retinoico) formando o complexo *RARα/RXR*, o qual pode atuar como um complexo de repressão ou como um complexo de ativação da transcrição desses genes-alvo.<sup>35</sup>

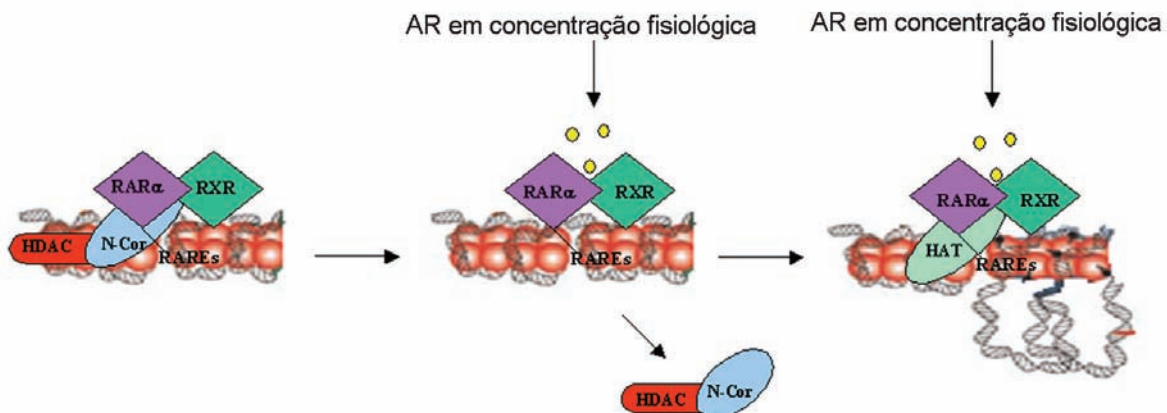


Figura 3. Representação esquemática da ação do receptor alfa do ácido retinoico (*RARα*) na região promotora de seus genes-alvo. (RXR- receptor nuclear do ácido 9- cis- retinoico; RAREs - elementos responsivos ao ácido retinoico; N-Cor - correpressor transcrricional; HDAC - histonas desacetilases; AR- ácido retinoico; HAT- histonas acetiltransferases)

Na ausência do ligante (ácido retinoico), o *RAR $\alpha$ /RXR* liga-se a segmentos específicos do DNA na região promotora de seus genes-alvo e se associam com correpressores transcricionais SMRT ou N-CoR, os quais recrutam as histonas desacetilases (HDAC), formando um complexo repressor (Figura 3). 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 retinoico ( $1 \times 10^{-9}$ M), o *RAR $\alpha$ /RXR* liga-se ao ácido retinoico. Após a ligação do ácido retinoico ao sítio ativo do receptor *RAR $\alpha$ /RXR*, que se encontra ligado ao complexo repressor, uma alteração conformacional é desencadeada, provocando a liberação do complexo repressor e a associação do *RAR $\alpha$ /RXR* com coativadores transcricionais, tais como a família p300/CBP de histonas acetiltransferases (HAT), nas regiões promotoras (Figura 3). A acetilação de histonas resulta na descompactação da cromatina, permitindo a organização da maquinaria de transcrição basal e a ativação da transcrição.<sup>24,33,35</sup>

Na translocação cromossômica t(15;17), o ponto de quebra no gene *RAR $\alpha$*  é invariável, ocorrendo sempre no segundo íntron.<sup>24</sup>

#### Rearranjo- *PML-RAR $\alpha$*

O transcrito de fusão *PML-RAR $\alpha$*  retém os domínios funcionais tanto do *PML* como do *RAR $\alpha$* ; 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 retinoico (RAREs), típicos ou variantes, presentes nas regiões promotoras de genes relacionados com a diferenciação granulocítica; com isso, ela adquire a capacidade de intervir nas funções da via do *PML* e dos retinoicos (Figura 4). Estudos sugerem, ainda, que a oncoproteína *PML-RAR $\alpha$*  atua de maneira dominante negativa sobre as proteínas parentais.<sup>24,36</sup>

A oncoproteína de fusão media a repressão da transcrição de genes-alvo do receptor alfa do ácido retinoico ligando-se aos elementos responsivos desses genes, recrutando o complexo correpressor, o qual é formado por proteínas correpressoras 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 $\alpha$*  também é capaz de recrutar histonas metiltransferases e DNA metiltransferases (Dnmt1 e Dnmt3), responsáveis pela metilação e consequente inibição da transcrição. É importante destacar que essa oncoproteína tem uma habilidade adicional para recrutar proteínas correpressoras, tendo a capacidade de recrutar tanto no domínio *PML* como no domínio *RAR $\alpha$* . E devido a esse estado de oligomerização, a oncoproteína *PML-RAR $\alpha$*  forma um complexo estável com o complexo correpressor. Concentrações fisiológicas do ácido retinoico não são capazes de dissociar esse complexo, e o

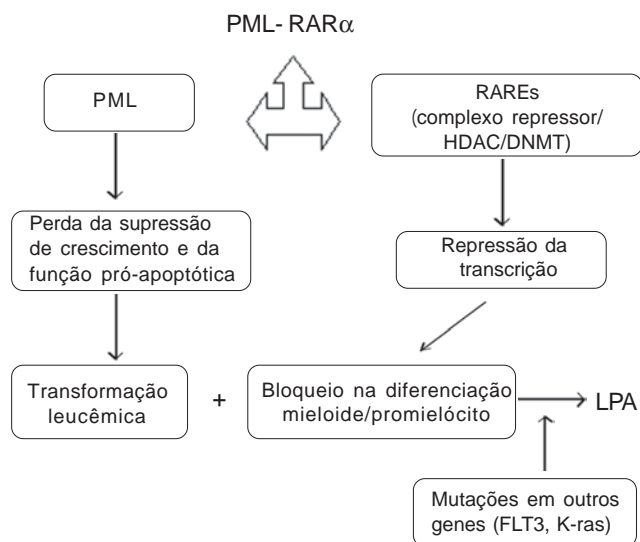


Figura 4. Representação esquemática da ação da oncoproteína *PML-RAR $\alpha$*  na LPA

bloqueio da transcrição dos genes envolvidos com o processo de diferenciação mielóide é mantido. A oncoproteína *PML-RAR $\alpha$*  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.<sup>1,10,26,37,38</sup>

A oncoproteína *PML-RAR $\alpha$*  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. *O 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*.<sup>39,40</sup>

A *PML-RAR $\alpha$*  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).<sup>34</sup> Pesquisas destacam também que a oncoproteína de fusão atua como um regulador dominante negativo da acetilação de *p73*, o que sugere que a estabilidade e a atividade de *p73* pode estar comprometida nas células leucêmicas da LPA. Além disso, essa oncoproteína de fusão pode, como citado anteriormente, se ligar à proteína parental *PML*, levando ao deslocamento do seu sítio sub-

celular normal, o que pode intervir no processo apoptótico. Este evento pode ser rapidamente visualizado com auxílio da técnica de imunofluorescência com anticorpos anti-*PML* que permite observar um padrão microparticulado nos portadores do rearranjo *PML-RAR $\alpha$* . A oncoproteína pode também cooperar com a ativação de mutações em tirosinas quinases, tal como a *FLT3*, o que confere vantagem proliferativa e sobrevivência às células hematopoéticas. Mutações na *FLT3* estão relacionadas à progressão da doença e têm sido detectadas em uma frequência alta, acima de 45%, nos pacientes com LPA.<sup>2,41,42</sup>

Estudos com camundongos transgênicos indicam que, apesar da presença da oncoproteína de fusão *PML-RAR $\alpha$*  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.<sup>43,44</sup>

#### Alterações adicionais e variantes complexas

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 (Figura 5), onde as mais frequentes 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 tratamento utilizados.<sup>8,13,45-53</sup>

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 $\alpha$* , 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 $\alpha$*  se encontra intacta, parece não ser diferente do curso do prognóstico observado nos pacientes com a típica t(15;17).<sup>54,55</sup>

#### Translocações alternativas

Em aproximadamente 2% dos casos, o gene *RAR $\alpha$*  pode estar fusionado com outros genes que não o *PML*, levando à formação de proteínas de fusão conhecidas genericamente como *X-RAR $\alpha$* , resultado de alterações estruturais, em sua grande maioria translocações alternativas, envolvendo o locus gênico para o receptor alfa do ácido retinoico (*RAR $\alpha$* ) localizado no cromossomo 17q21, mas não o locus gênico para o *PML*. Na nova classificação de tumores dos tecidos hematopoéticos e linfóide, da Organização Mundial de Saúde, a presença dessas translocações alternativas envolvendo o receptor alfa do ácido retinoico é citada como fazendo parte de leucemia aguda com translocação variante do *RAR $\alpha$* .<sup>2,13,15,56,57</sup>

A primeira translocação alternativa, envolvendo o locus gênico para o receptor alfa do ácido retinoico (*RAR $\alpha$* ) 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).<sup>58</sup> 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 retinoico (*RAR*), localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21), levando à formação de dois genes híbridos: *PLZF-RAR $\alpha$*  e o *RAR $\alpha$ -PLZF*.<sup>36</sup> O gene *PLZF*, também denominado de *ZBTB16*,<sup>13</sup> 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.<sup>34,36</sup> Levantamentos epidemiológicos indicam o rearranjo molecular *PLZF-RAR $\alpha$*  como o segundo mais comum rearranjo molecular associado com a LPA, sendo atribuído a aproximadamente 0,8% dos casos.<sup>15</sup> 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,

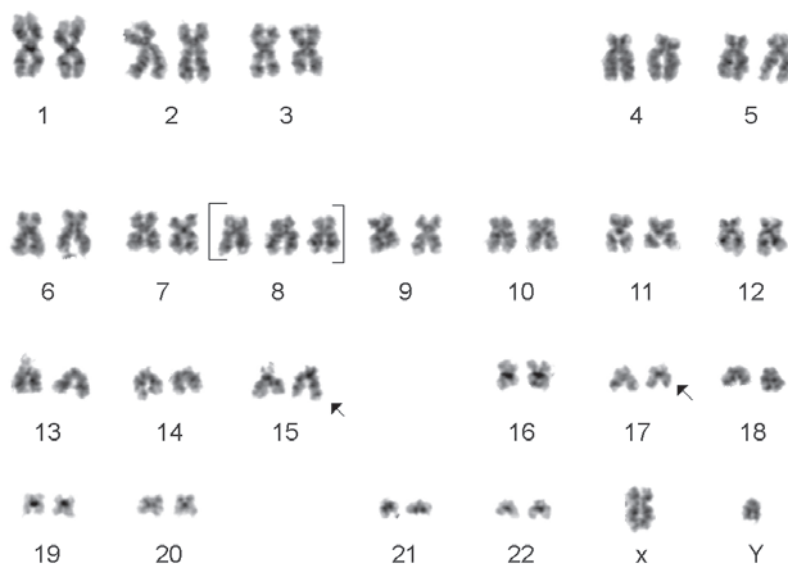


Figura 5. Demonstra o cariótipo de paciente que, além da t(15;17), apresenta trissomia do cromossomo 8 (alteração citogenética adicional)

aumento do número de células com projeções citoplasmáticas, expressão frequente 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.<sup>15,36,57,59</sup>

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 retinoico (*RARα*) localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21), levando à formação de dois genes híbridos: *NPM-RARα* e *RARα-NPM*.<sup>36</sup> 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 associado com essa translocação é morfologicamente de LMA-M3.<sup>34,36</sup>

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 retinoico (*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.<sup>21,34,36</sup> 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.<sup>60,61</sup>

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  $\alpha$  I da proteína PKA (Proteína Quinase Dependente de AMPc), a qual atua, por exemplo, como reguladora da expressão gênica;<sup>62</sup> 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 *FIPILI*, levando à formação do gene híbrido *FIPILI-RARα*.<sup>63</sup>

De modo geral, em comum com a doença associada à clássica t(15;17), em cada um desses casos o *RARα* 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 *RARα*.<sup>9,24</sup> Além disso, essas proteínas de fusão (*X-RARα*) possuem, também, uma alta afinidade para o complexo corepressor, não respondendo a doses fisiológicas do ácido retinoico, 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.<sup>10,34</sup>

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.<sup>64</sup> Ao contrário das alterações genéticas, as modificações epigenéticas são potencialmente reversíveis com a utilização de inibidores farmacológicos da metilação do DNA e desacetilação das histonas tais como: 5-azacitidina, decitabina, ácido butírico, ácido valpróico, tricostantina A dentre outros. A utilização dessas drogas vem sendo testada como um tratamento adicional à clássica combinação do ATRA/ATO/quimioterapia na LPA.

## Diagnóstico genético da leucemia promielocítica aguda

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,<sup>21,65</sup> onde já se sabe que, pacientes portadores da t(15;17) respondem muito bem à terapia atual com uso do ATRA e quimioterápicos e que portadores de outras alterações cromossômicas envolvendo o *RARα* apresentam sensibilidade variável a esta terapêutica (Tabela 1).

Vários métodos laboratoriais têm sido empregados em conjunto para auxiliar no 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-RARα* ou alterações envolvendo o

Tabela 1. Rearranjos cromossômicos e sensibilidade ao ATRA

Rearranjo cromossômico	Sensibilidade ao ATRA
<i>PML-RAR<math>\alpha</math></i>	Sensível ao ATRA
<i>PLZF-RAR<math>\alpha</math></i>	Insensível ao ATRA como agente único, responde em combinação com inibidores de histonas desacetilases
<i>NPM-RAR<math>\alpha</math></i>	Sensível ao ATRA
<i>NuMA-RAR<math>\alpha</math></i>	Sensível ao ATRA
<i>STAT5b-RAR<math>\alpha</math></i>	Sensibilidade parcial (melhora da coagulopatia sem diminuição das células leucêmicas)
<i>PRKAR1A-RAR<math>\alpha</math></i>	Sensível ao ATRA
<i>FIP1L1-RAR<math>\alpha</math></i>	Sensível ao ATRA

Tabela 2. 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 metafases de boa qualidade
FISH	Altamente específico; não necessita de metafases; sondas comerciais para o rearranjo <i>PML-RAR<math>\alpha</math></i> e para ruptura do <i>RAR<math>\alpha</math></i>	Não fornece informação sobre os subtipos de transcritos do <i>PML-RAR<math>\alpha</math></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

gene *RAR $\alpha$* . 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<sup>16,21,66</sup> (Tabela 2). Na LPA, a técnica de RT-PCR, por ser altamente sensível e permitir identificar o ponto de quebra do gene *PML* e as isoformas do transcrito *PML-RAR $\alpha$* , é utilizada não só para confirmação do diagnóstico genético como também para avaliação da resposta terapêutica e monitoramento da doença. Ensaios clínicos sugerem que se ao término da consolidação o transcrito *PML-RAR $\alpha$*  persiste esse paciente passa a ser considerado de pior prognóstico com alto risco de recaída hematológica.<sup>26,59</sup>

#### Abstract

*Acute promyelocytic leukemia (APL) is characterized by structural chromosomal abnormalities involving the RAR $\alpha$  (retinoic acid receptor  $\alpha$ ) gene located on the long arm of chromosome 17 (17q21) that lead to the formation of chimeric genes and fusion oncoproteins. In about 98% of cases, the RAR $\alpha$  gene is fused to the PML gene, the result of a reciprocal chromosomal translocation t(15;17)(q22;q21) and in the other 2% of cases the RAR $\alpha$  gene may be fused to other genes, leading to the formation of fusion proteins known generically*

*as X-RAR $\alpha$ . Acute promyelocytic leukemia is an example of a hematologic malignancy where there is a combination of genetic and epigenetic (acetylation, deacetylation and methylation) changes in the leukemogenesis process, chromosome structural changes that affect the dynamic equilibrium of chromatin in the promoter region of some genes. The use of molecular techniques that improve genetic diagnosis and the development of targeted molecular therapy have provided a high cure rate of this disorder. Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*

**Key words:** *Leukemia, promyelocytic acute; genetics; translocation, genetic.*

#### Referências Bibliográficas

- Villa R, De Santis F, Gutierrez A, Minucci S, Pelicci PG, Di Croce L. Epigenetic gene silencing in acute promyelocytic leukemia. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(6):1247-54.
- Zhou GB, Chen SJ, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: a model of molecular target based therapy. *Hematology.* 2005;10 Suppl 1:270-80.
- Vitoux D, Nasr R, de The H. Acute promyelocytic leukemia: new issues on pathogenesis and treatment response. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(6):1063-70.
- 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(4):451-8.

5. 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
6. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood. 2002;100(7):2292-302.
7. Jabbour EJ, Estey E, Kantarjian HM. Adult acute myeloid leukemia. Mayo Clin Proc. 2006;81(2):247-60.
8. Avvisati G, Lo Coco F, Mandelli F. Acute promyelocytic leukemia: clinical and morphologic features and prognostic factors. Semin Hematol. 2001;38(1):4-12.
9. Reiter A, Lengfelder E, Grimwade D. Pathogenesis, diagnosis and monitoring of residual disease in acute promyelocytic leukaemia. Acta Haematol. 2004;112(1-2):55-67.
10. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. Blood. 2008;111(5):2505-15.
11. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, Nao T, *et al.* Guidelines on the management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. (Prepublished online sep 23, 2008).
12. 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.
13. 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.
14. Lo Coco F, Diverio D, Falini B, Biondi A, Nervi C, Pelicci PG. Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. Blood. 1999;94(1):12-22.
15. Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, Hagemeijer A, Berger R, Neat M, *et al.* Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Français de Cytogénétique Hématologique, Groupe de Français d'Hématologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies". Blood. 2000;96(4):1297-308.
16. Lock RJ, Virgo PF, Kitchen C, Evelyn RS. Rapid diagnosis and characterization of acute promyelocytic leukaemia in routine laboratory practice. Clin Lab Haematol. 2004;26(2):101-6.
17. Sanz MA, Tallman MS, Lo-Coco F. Tricks of the trade for the appropriate management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Blood. 2005;105(8):3019-25.
18. Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. Lancet. 1977;1(8010):549-50.
19. 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(6293):558-61.
20. Kakizuka A, Miller WH Jr, Umesono K, Warrell RP Jr, Frankel SR, Murty VV, *et al.* Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. Cell. 1991;66(4):663-74.
21. 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(10):1959-73.
22. Sirulnik A, Melnick A, Zelent A, Licht JD. Molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia and APL variants. Best Pract Res Clin Haematol. 2003;16(3):387-408.
23. Gurrieri C, Capodiceci P, Bernardi R, Scaglioni PP, Nafa K, Rush LJ, *et al.* Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. J Natl Cancer Inst. 2004; 96(4):269-79.
24. 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(3):591-613.
25. Zhong S, Salomoni P, Pandolfi PP. The transcriptional role of PML and the nuclear body. Nat Cell Biol. 2000;2(5):E85-90.
26. Lo-Coco F, Ammatuna E. The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2006:156-61, 514.
27. Gu BW, Xiong H, Zhou Y, Chen B, Wang L, Dong S, *et al.* Variant-type PML-RAR(alpha) fusion transcript in acute promyelocytic leukemia: use of a cryptic 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 U S A. 2002;99(11):7640-5.
28. Choppa PC, Gomez J, Vall HG, Owens M, Rappaport H, Lopategui JR. A novel method for the 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(1):137-44.
29. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Reyes-Núñez V, Gómez-Rangel JD, Ruiz-Delgado GJ. More on geographic hematology: the breakpoint cluster regions of the PML/RARalpha fusion gene in Mexican Mestizo patients with promyelocytic leukemia are different from those in Caucasians. Leuk Lymphoma. 2004; 45(7):1365-8.
30. Chaffaille ML, Figueiredo MS, Beltrani R, Antunes SV, Yamamoto M, Kerbauy J. Acute promyelocytic leukemia: the study of t(15;17) translocation by fluorescent in situ hybridization, reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytogenetic techniques. Braz J Med Biol Res. 2001;34(6):735-43.
31. Douer D. The epidemiology of acute promyelocytic leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol. 2003;16(3):357-67.
32. Melo RA, de Vasconcellos JF, Melo FC, Machado CG, Lacerda TM, Souto FR. PML-RARalpha fusion gene transcripts and biological features in acute promyelocytic leukemia patients. Clin Lab Haematol. 2006;28(2):126-9.
33. Asou N. All-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Intern Med. 2007;46(2):91-3.
34. Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. Blood. 1999;93(10):3167-215.
35. Kastner P, Chan S. Function of RARalpha during the maturation of neutrophils. Oncogene. 2001;20(49):7178-85.
36. Redner RL. Variations on a theme: the alternate translocations in APL. Leukemia. 2002;16(10):1927-32.
37. 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 alpha blockade in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. J Exp Med. 2006;203(4):821-8.
38. Hormaeche I, Licht JD. Chromatin modulation by oncogenic transcription factors: new complexity, new therapeutic targets. Cancer Cell. 2007;11(6):475-8.
39. Lewin B. Genes VII. Porto Alegre, Artmed,2001.955p
40. Hoemme C, Peerzada A, Behre G, Wang Y, McClelland M, Nieselt K, *et al.* Chromatin modifications induced by PML-RARalpha



- repress critical targets in leukemogenesis as analyzed by ChIP-Chip. *Blood*. 2008;111(5):2887-95.
41. 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(11):2185-9.
  42. 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(12):3768-76.
  43. Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Amaral SM, Curley DP, *et al*. PML/RAR $\alpha$  and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(12): 8283-8.
  44. 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(5):1708-15.
  45. Schoch C, Haase D, Haferlach T, Freund M, Link H, Lengfelder E, *et al*. Incidence and implication 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(3):493-500.
  46. Hiorns LR, Swansbury GJ, 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(2):314-21.
  47. 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(3):801-6.
  48. Pantic M, Novak A, Marisavljevic D, Djordjevic V, Elezovic I, Vidovic A, *et al*. Additional chromosome aberrations in acute promyelocytic leukemia: characteristics and prognostic influence. *Med Oncol*. 2000;17(4):307-13.
  49. Cassinat B, Chomienne C. Biological features of primary APL blasts: their relevance to the understanding of granulopoiesis, leukemogenesis and patient management. *Oncogene*. 2001;20(49):7154-60.
  50. Hernández JM, Martín G, Gutiérrez NC, Cervera J, Ferro MT, Calasanz MJ, *et al*. Additional cytogenetic changes 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(8):807-13.
  51. Xu L, Zhao WL, Xiong SM, Su XY, Zhao M, Wang C, *et al*. Molecular cytogenetic characterization and clinical relevance of additional, complex and/or variant chromosome abnormalities in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 2001;15(9):1359-68.
  52. Spell DW, Velagaleti GV, Jones DV, Velasquez WS. Translocation (15;17) and trisomy 21 in the microgranular variant of acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002;132(1):74-6.
  53. Luatti S, Marzocchi G, Ottaviani E, Baldazzi C, Stacchini M, Gamberini C, *et al*. Acute promyelocytic leukemia with amplification of PML-RARalpha rearrangement: clinical implications. *Leuk Res*. 2008;32(12):1941-3.
  54. Tirado CA, Jahn JA, Scheerle J, Eid M, Meister RJ, Christie RJ, *et al*. 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. PML/RARA fusion. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;161(1):70-3.
  55. 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(1):44-7.
  56. 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(2):144-51.
  57. Sainy D, Liso V, Cantù-Rajoldi A, Head D, Mozziconacci MJ, Arnoulet C, *et al*. A new morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLZF/RARA gene rearrangements. Group Français de Cytogénétique Hématologique, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Coomunity-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies. *Blood*. 2000;96(4):1287-96.
  58. 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(5):2260-7.
  59. Mandelli F, Avvisati G, Lo Coco F. Advances in the understanding and management of acute promyelocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*. 2002;6(1):60-71.
  60. Arnould C, Philippe C, Bourdon V, Gr goire 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(9):1741-9.
  61. Kusakabe M, Suzukawa K, Nanmoku T, Obara N, Okoshi Y, Mukai 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(5):444-7.
  62. Catalano A, Dawson MA, Somana K, Opat S, Schwarzer A, Campbell LJ, *et al*. The PRKAR1A gene is fused to RARA in a new variant acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2007;110(12):4073-6.
  63. 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(9):1414-6.
  64. Menditi KBC, Kang HC. O papel das proteínas histonas nas neoplasias hematológicas. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007;53:453-460.
  65. Rizzatti EG, Portieres FL, Martins SL, Rego EM, Zago MA, Falcão RP. Microgranular and t(11;17)/PLZF-RARalpha variants of acute promyelocytic leukemia also present the flow cytometric pattern of CD13, CD34, and CD15 expression characteristic of PML-RAR $\alpha$  gene rearrangement. *Am J Hematol*. 2004;76(1):44-51.
  66. Sanz MA, Vellenga E, Rayón C, Díaz-Mediavilla J, Rivas C, Amutio E, *et al*. All-trans retinoic acid and anthracycline monotherapy for the treatment of elderly patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2004;104(12):3490-3.
- Avaliação: Editor e dois revisores externos  
 Conflito de interesse: sem conflito de interesse
- Recebido: 12/12/2008  
 Aceito após modificações: 16/04/2009