



Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto

Curso de pós-graduação em Hematologia Clínica e Laboratorial

Artigo/Article

Análise Citogenética na Leucemia Promielocítica Aguda

Cytogenetic Analysis in Acute Promyelocytic Leukemia

Nathália da Silva Salgado

RESUMO: Este artigo visa investigar através da revisão bibliográfica, as técnicas citogenéticas aplicáveis na detecção da Leucemia Promielocítica Aguda (LPC), que é um subtipo da leucemia mielóide aguda (LMA) com translocação do cromossomo t(15;17) ou rearranjo PML/RAR α . Tem por objetivo rever as alterações cromossômicas em LPC através das técnicas de hibridização por sondas de fluorescência *in situ* (FISH), técnica de cariotipagem espectral (SKY) e Hibridação Genômica Comparativa (HGC). Estes são um dos métodos avaliativos de suma importância no auxílio diagnóstico da doença e na identificação desta.

Palavras-chave: LPC; citogenética; FISH; t(15;17); SKY, HGC.

ABSTRACT: This article aims to investigate through literature review, cytogenetic and molecular biology techniques applied in the detection of acute promyelocytic leukemia (LPC), which is a subtype of acute myeloid leukemia (AML) with translocation of chromosome t (15, 17) or PML rearrangement / RAR α . Aims at reviewing the changes in chromosomal LPC through hybridization techniques by fluorescence in situ (FISH) technique spectral karyotyping (SKY) and Comparative Genomic Hybridization (HGC) probes. These are one of the evaluation methods of paramount importance for the diagnosis of disease and in identifying this.

Key-words: LPC; cytogenetics; FISH; t (15; 17); SKY, HGC.

INTRODUÇÃO

A citogenética das células malignas foi um dos avanços de grande importância no estudo das neoplasias, principalmente no campo da leucemogênese, auxiliando no diagnóstico de leucemias assim como em sua classificação e escolha terapêutica. (9,1).

A leucemia promielocítica aguda (LPA) é um subtipo da leucemia mielóide aguda (LMA), sendo classificada pela FAB como LMA-M3 e LPA com t(15;17) ou rearranjo PML/RAR α pela Organização Mundial de Saúde, correspondendo 10% - 15% das LMA. Alguns pacientes podem evoluir rapidamente ao óbito, devido a fenômenos hemorrágicos causados pelos distúrbios da coagulação e outros sintomas como anemia, trombocitopenia e organomegalia ocasionados pela doença. A incidência da LPA é de aproximadamente 10 a 15% dos adultos com idade média de 40 anos com diagnóstico de LMA e 3 a 10% dos casos de crianças com LMA. (11,10)

O diagnóstico exige a demonstração das alterações cromossômicas específicas capazes de detectar a translocação dos genes t(15;17) ou o gene híbrido PML-RAR α . Citogenética convencional, hibridização por sondas de fluorescência *in situ* (FISH), técnica de cariotipagem espectral (SKY), Hibridação Genômica Comparativa (HGC) são opções disponíveis. (11,4)

Este artigo visa investigar através da revisão bibliográfica, as técnicas citogenéticas aplicáveis na detecção da Leucemia Promielocítica Aguda (LPA).

CITOGENÉTICA

O termo Citogenética atualmente refere-se a todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que se diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução. É utilizada nos campos da medicina, nos quais estudos genéticos tem sido utilizados para atender aos anseios de um número cada vez maior de especialidades e detectar o quanto antes as malformações congênitas, os desvios metabólicos, as doenças hereditárias, as

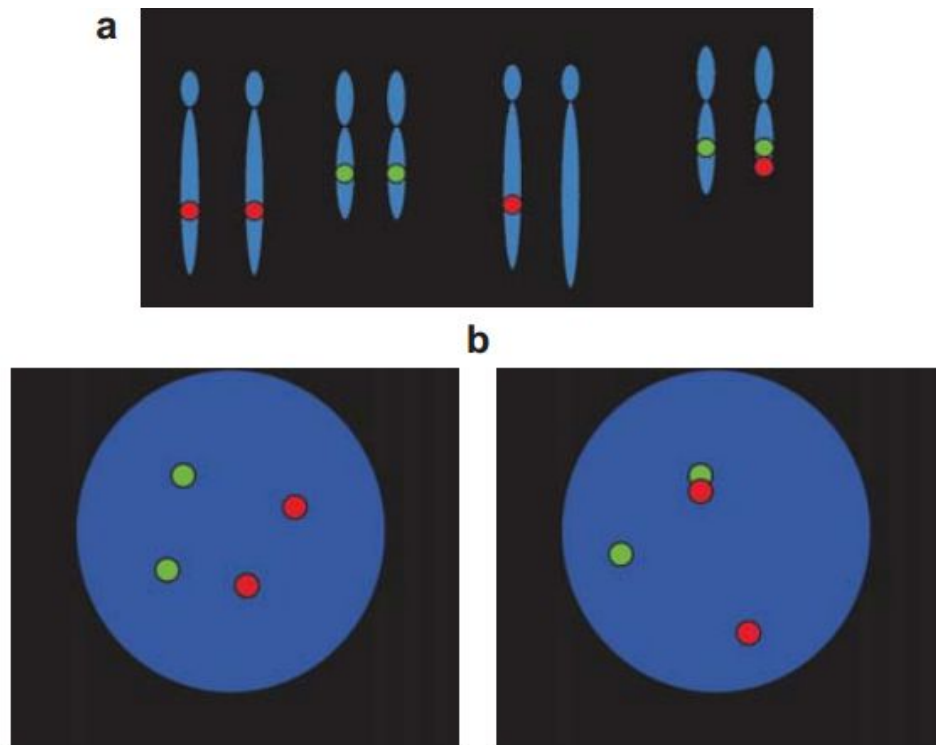
displasias esqueléticas e os demais distúrbios genéticos passíveis de um diagnóstico pré ou pós-natal. Desta maneira, a citogenética tem prestado grande subsídio, não só para a disciplina de genética, mas também para outras áreas. (2)

A citogenética está dividida em citogenética clássica e molecular, na qual a clássica envolve a análise dos cromossomos a partir de uma cultura de células em divisão na fase da mitose; a molecular, o uso de técnicas e métodos tecnológicos através do DNA independente da divisão celular. (9,1)

A análise citogenética tradicional tem sido utilizada para confirmar o diagnóstico morfológico da LPA. Embora a t(15;17) não seja detectada em outros tipos de leucemia, podem ocorrer resultados “falsos-negativos” decorrentes da análise de células que não pertencem ao clone neoplásico, da dificuldade de visualização da translocação ou até mesmo da existência de rearranjos crípticos que mascaram a translocação. (7,8)

O método FISH tem mostrado vantagens em relação à citogenética clássica em determinadas situações pela maior sensibilidade, especificidade e rapidez no diagnóstico, ele consiste no uso de sondas constituídas por fita de DNA (única ou dupla) marcadas com fluorocromo para produzir fluorescência. Estas fitas ligam-se ao DNA cromossômico no núcleo da célula. As lâminas são submetidas a um pré tratamento com solução de 2XSSC (NaCl/ citrato de sódio) e desidratadas em uma bateria de álcoois 70%, 80% e 100% a temperatura ambiente para desnaturação, as lâminas são colocadas em uma solução de 70% formamida, 30% 2XSSC (pH 7,0) aquecida a 73° C por cinco minutos. A sonda desnaturada simultaneamente é aplicada sobre as lâminas, cobertas com lamínula e colocadas em câmara úmida e no escuro, em estufa a 37°C por no mínimo seis horas. Após esse período o material é analisado em microscópio com uso de filtros específicos (Figura 1). (3,11)

Figura 1. Esquema da visualização da técnica de FISH em cromossomos metafásicos (a) e em núcleos interfásicos (b) mostrando a célula normal à esquerda e com o rearranjo PML/RARa à direita.



FONTE: Sagrillo, R.M; *Et All.* Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). Rev. bras. hematol. hemoter. 2005;27(2):94-101

A técnica de cariotipagem espectral (SKY) permite a observação dos 24 cromossomos em um único procedimento, através da utilização de um coquetel único de sondas cromossômicas, que marcam diferencialmente e identificam cada par cromossômico. Esse coquetel é constituído de uma mistura de 5 (cinco) fluorocromos com espectros distintos: *rhodamine*, *Spectrum-Orange*, *Texas Red*, *Cy5* e *Cy5.5*. A combinação desses fluorocromos permite que cada cromossomo tenha uma assinatura espectral única. Esta técnica tem sido utilizada para detectar aberrações estruturais não diagnosticadas por métodos de citogenética convencional e por FISH, principalmente translocações e origem de cromossomos marcadores, porém, não identifica deleções, duplicações e inversões.

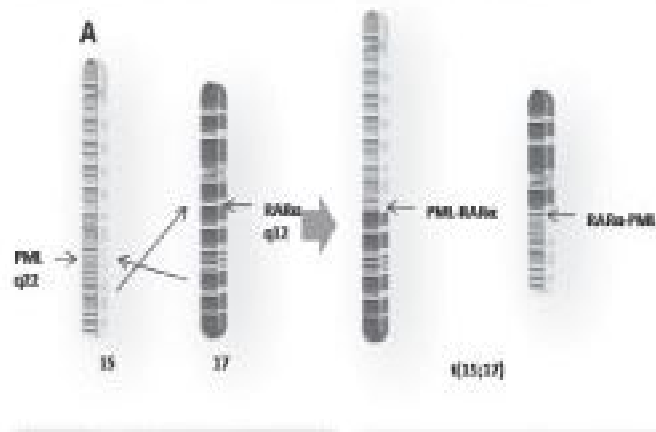
A Hibridação Genômica Comparativa (HGC) é um método que permite a análise das aberrações cromossômicas no genoma de uma população de células. É bastante útil para amostras em que não se tem metáfases já que é necessário apenas o DNA. Consiste na extração do DNA celular (DNA teste), bem como de DNA normal para controle, e a marcação de ambos com fluorocromos diferentes. Depois, os dois são co-hibridizados em cromossomos normais. Como resultado, obtêm-se uma coloração padrão em todos os cromossomos. As seqüências cromossômicas que estiverem hiperexpressas, seja por polissomia ou amplificação, apresentarão coloração mais intensa, enquanto aquelas que estiverem hipoexpressas, monossomia ou deleção, resultarão em coloração mais clara que o controle. No entanto, como HGC só detecta hiper ou hipo expressão de regiões cromossômicas, rearranjos balanceados como as translocações ou inversões ficarão despercebidos. Porém, as alterações genômicas encontradas poderão indicar genes relevantes para a progressão ou desenvolvimento da neoplasia. Assim, HGC será um método importante para detectar proto-oncogenes ou genes supressores tumorais (que estarão expressos por múltiplas cópias ou por deleção). (3)

ALTERAÇÕES CROMOSSOMICAS EM LPA

A anomalia em 90% dos casos, é a translocação $t(15;17)(q22;21)$, que resulta na fusão dos genes PML e RAR α identificada por Rowley *et al*, em 1997, mas como definição dos pontos de quebra em 1984 (Figura 2). Por outro lado, em cerca de 2% dos casos, o gene RAR α está fusionado com outro gene diferente do PML: PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger*), NPM (*nucleophosmin*) e NuMA (*nuclear mitotic apparatus*) como resultado de translocações das

alternativas: $t(11;17)(q23;q21)$, $t(5;17)(q35;q21)$ e $t(11;17)(q13;q21)$, respectivamente. Mais recentemente o gene STAT5b, localizado em 17q21, foi identificado como um novo parceiro do RAR α em um caso de LPA[der(17)]. Nesses casos, o tratamento com ácido *all-trans* retinoico (ATRA) não é eficaz devido a essas translocações variantes levarem à formação de proteínas de fusão conhecidas genericamente como X/RAR α , com sensibilidade diferenciada aos retinóides. Assim, pacientes com LPA resistente ao tratamento como ATRA podem ser portadores da $t(11;17)$ – PLZF/RAR α . Esta proteína de fusão forma complexos repressores da transcrição não só através do domínio RAR α , mas também do PLZF, o qual não exibe afinidade ao ATRA. (7,4)

Figura 2: A) Ilustração da quebra dos cromossomos 15(q22) e 17 (q12), gerando a translocação (15:17).



Fonte: Jácomo, H.R; Pontes, L.L.F; E.M. **Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda.** Rev. Assoc. Med. Bras. vol.54 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2008.

De acordo com LEAL, A.M; *et all* (2009) , 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 3), 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(Figura 3). 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 utilizado. E 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).

Figura 3: Demonstra o cariótipo de paciente que além da t(15;17), apresenta trissomia do cromossomo 8(alteração citogenética adicional)



FONTE: LEAL, A.M; *et al.* Características genéticas da leucemia promielocítica aguda Rev. Bras. Hematol. Hemoter. vol.31 no.6 São Paulo 2009 Epub Dec 11, 2009

CONCLUSÃO

A confirmação do diagnóstico da leucemia promielocítica aguda é feita através do mielograma, com a análise morfológica complementada pelos exames de imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular. Estes últimos fundamentais e de extrema importância para a escolha do esquema terapêutico de cada paciente. De acordo com o presente estudo, não há um método mais eficaz, sendo um complementando o outro caso haja dificuldade na identificação das alterações cromossômicas.

Por se tratar de uma doença que às vezes é de difícil diagnóstico e por alguns pacientes não terem condições financeiras para arcarem com os custos de tais exames, há uma necessidade de se implantar no serviço público de saúde laboratórios responsáveis por análises citogenéticas e citomoleculares, para atender a população carente acometida pela doença e por dar agilidade nos resultados, conseqüentemente ao diagnóstico, já que há uma demora na obtenção dos laudos em cidades que se localizam distante dos grandes centros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHAUFFAILLE, M.L.L.F. Citogenética e Biologia Molecular em Leucemia Linfóide Crônica. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. v.27 n.4 São José do Rio Preto out./dez. 2005.
2. CHAVES, T.F; NICOLAU,L.S. Citogenética y el Cariotipo Humano. Revista Saúde e Desenvolvimento | vol.4 n.2 | jul/dez 2013
3. FLEURY. Citogenética Clássica e Molecular. Disponível em: <http://www.fleury.com.br/medicos/medicina-e-saude/manuais/manual-hematologia/Pages/a-citogenetica-classica-e-molecular.aspx>

4. JÁCOMO, R. H.; FIGUEIREDO-PONTES, L. L.; REGO, E. M. Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. Rev. Assoc. Med. Bras., v. 54, n. 1, 2008.
5. LAUS, A.C. Tese: Caracterização Citogenética Molecular de Cromossomos Marcadores Extranumerarios. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17135/tde-06042009-143340/pt-br.php> . Ribeirão Preto, 2008.
6. LEAL, A.M; KUMEDA, C.A; VELLOSO, E.D.R.P. Características genéticas da leucemia promielocítica aguda Rev. Bras. Hematol. Hemoter. vol.31 no.6. São Paulo 2009
7. MANDELLI. F; AVISATTI. G; LO COCO. F. Advances in the understating and management of acute promyelocytic leukemia. Rev Exp.Hematol v. 6, p. 60-7. 2002
8. MENÉNDEZ. A; GONZALES, A; CABRERA. H; *et al.* Clinical spectrum of extramedullary acute promyelocytic leukemia. Eur. J. Haematol. 64, P. 201-203. 2000
9. MONTENEGRO, V.S; SANTOS, V.M.V.O; VEITH, M. Análise Citogenética na Leucemia Mielóide Crônica. Rev. Fac. Ciênc.Méd. Sorocaba, v. 10, n. 3, p. 5 - 12, 2008.
10. PREVEDELLO, C.P; SAGRILLO, M.R. Leucemia Promielocítica Aguda. Disc. Scientia. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 39-50, 2008
11. SAGRILLO, M. R.S; CARDOSO, S. H; SILVA, L.R. J; *et AL.* Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). Rev. bras. hematol. hemoter. Vol.27, n.2, p. 94-101. 2005