



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ANÁLISE MOLECULAR EM PACIENTES COM  
NEOPLASIAS HEMATOPOIÉTICAS: ALTERAÇÕES  
CROMOSSÔMICAS E EXPRESSÃO DO GENE *SIDT1***

**Stenia Gonçalves Magalhães**

**Brasília**

**2013**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ANÁLISE MOLECULAR EM PACIENTES COM  
NEOPLASIAS HEMATOPOIÉTICAS: ALTERAÇÕES  
CROMOSSÔMICAS E EXPRESSÃO DO GENE *SIDT1***

**Stenia Gonçalves Magalhães**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo**

**Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Beatriz Dolabela de Lima**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas.

**Brasília**

**2013**

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo de travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos”.

Fernando Pessoa

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir conquistar este objetivo tão sonhado.

Ao meu esposo, Valdemir, sempre tão interessado pelo meu trabalho. Obrigada pelo incentivo na busca do conhecimento e pelo companheirismo de sempre.

À minha família: meus pais, Reni e Irene; as minhas irmãs, Stefânia e Sterliane, por apoiar sempre minhas escolhas e por estarem sempre presente, mesmo que fosse só por telefone.

Ao Prof. Dr. César Martins de Sá (*in memoriam*) por ter me recebido em seu laboratório e pela confiança depositada em mim.

À Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima por ter me estendido às mãos e apoiado a desenvolver este trabalho. Obrigada pela oportunidade de aprendizado e amadurecimento profissional.

À Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo pela generosidade com que aceitou me orientar. Obrigada pelos ensinamentos e incentivos na busca pelo conhecimento.

A Dra. Débora Rabello pelo treinamento da técnica de diagnóstico molecular das leucemias.

A toda equipe do laboratório Biologia do Gene pela convivência. Ao Ricardo pela paciência com que me ajudou a padronizar as metodologias e por todo suporte oferecido. Ao Agenor pela disposição em realizar a coleta das amostras. A Marinez pela organização dos materiais, amizade e companhia. A Aurea pela amizade e incentivo.

A Dra. Margarete Daldegan, pelo tempo e trabalho dedicado à coleta das amostras. Pela confiança e amizade desde o estágio no Laboratório de Hematologia. Minha eterna gratidão.

Aos pacientes por aceitar em participar deste trabalho em um momento tão frágil de suas vidas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas e a CAPES pela oportunidade de realizar esse trabalho.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal pelo financiamento do projeto.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
1. LEUCEMIA.....	1
1.1. Leucemia Linfoide Aguda.....	3
1.2. Leucemia Mieloide Aguda.....	4
1.3. Leucemia Mieloide Crônica.....	6
2. Diagnóstico de leucemia.....	8
3. RNA interferente.....	10
3.1. Os miRNAs.....	12
3.2. <i>SIDT1</i> .....	13
OBJETIVOS.....	16
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	17
1. Pacientes.....	17
2. Linhagem celular.....	17
3. Técnicas para a análise molecular.....	17
3.1. Isolamento da camada leucoplaquetária.....	17
3.2. Extração de RNA.....	18
3.3. Eletroforese de RNA.....	18
3.4. Transcrição reversa.....	19
3.5. Reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR).....	20
3.6. RT - PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	20
4. Análise estatística.....	22
RESULTADOS.....	23
1. Análise molecular dos rearranjos cromossômicos.....	23
2. Análise quantitativa do gene <i>SIDT1</i> .....	26
DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	36

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXOS.....	57
I. Soluções preparadas.....	57
II. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FEPECS do HB-DF.....	59
III. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FEPECS Hospital da Criança de Brasília José Alencar.....	60

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do mecanismo de RNAi em <i>C. elegans</i> .....	15
<b>Figura 2.</b> Gel de agarose 1% evidenciando RT-PCR positivo para amplificação do rearranjo gênico <i>BCR-ABL1</i> , p190.....	24
<b>Figura 3.</b> Gel de agarose 1% evidenciando RT-PCR positivo para amplificação do rearranjo gênico <i>E2A-PBX1</i> .....	24
<b>Figura 4.</b> Gel de agarose 1% evidenciando RT-PCR positivo para amplificação do rearranjo gênico <i>PML-RAR<math>\alpha</math></i> , bcr3.....	25
<b>Figura 5.</b> Gel de agarose 1% evidenciando RT-PCR positivo para amplificação do rearranjo gênico <i>BCR-ABL1</i> , p210 b3-a2 e b2-a2.....	25
<b>Figura 6.</b> Gel de agarose 1% evidenciando RT-PCR negativo para translocações agudas da linhagem linfóide e mieloide.....	26
<b>Figura 7.</b> Quantificação relativa do nível de mRNA do gene <i>SIDT1</i> em indivíduos não leucêmicos e linhagens de células leucêmicas.....	28
<b>Figura 8.</b> Quantificação relativa do nível de mRNA do gene <i>SIDT1</i> em indivíduos não leucêmicos e leucêmicos para o grupo LLA, LMA e LMC.....	29

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Relação dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos transcritos gênicos por RT-PCR.....	21
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene <i>GAPDH</i> e <i>SIDT1</i> .....	21
<b>Tabela 3.</b> Resultado das amostras clínicas analisadas para os rearranjos cromossômicos.....	23
<b>Tabela 4.</b> População de referência do estudo de indivíduos leucêmicos e não leucêmicos da análise da expressão do gene <i>SIDT1</i> .....	27



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

cDNA - DNA complementar

DMSO - Dimetilsulfóxido

dsRNA - RNA fita dupla

dNTP - Desoxi-Nucleotídeo Trifosfato

EDTA - Ácido etileno-diamino-tetra-acético

FAB - Franco-Americano-Britânico

GAPDH - Gliceraldeído fosfato desidrogenase

HB-DF - Hospital de Base do Distrito Federal

HCB - Hospital da Criança de Brasília José Alencar

MOPS - 3-(N-morpholino) ácido propanesulfônico

LLA - Leucemia Linfóide Aguda

LMA - Leucemia Mieloide Aguda

LMC - Leucemia Mieloide Crônica

RISC - complexo de silenciamento induzido por RNA

RNA - ácido ribonucleico

RNAi - RNA interferente

shRNA - short hairpin RNA

siRNA - small interference RNA

mRNA - RNA mensageiro

PBS - Tampão salina fosfato

RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase

qRT-PCR - Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real

SID-1 - Systemic RNA interference-defective-1

SID-2 - Systemic RNA interference-defective-2

SIDT1 - Systemic RNA Interference-defective-1 Transmembrane Family Member 1

## RESUMO

A leucemia é um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas resultante de várias alterações genéticas. A análise das alterações cromossômicas em pacientes com leucemia tem uma aplicação direta no diagnóstico, prognóstico e tratamento. Além disso, o estudo da expressão gênica oferece uma importante fonte para compreender as consequências moleculares das alterações genéticas em leucemia. Os objetivos desse trabalho foram: (a) identificar a presença de alterações cromossômicas em pacientes ao diagnóstico com hipótese de LLA B, LMA e LMC atendidos no Hospital de Base do Distrito Federal, possibilitando a incorporação do protocolo de diagnóstico molecular; (b) analisar o perfil da expressão do gene *SIDT1* em amostras clínicas leucêmicas ao diagnóstico, linhagens de células leucêmicas e em indivíduos não leucêmicos. Deste modo, a detecção das alterações cromossômicas foi realizada em 48 amostras com suspeita de leucemia. As alterações cromossômicas recorrentes detectadas foram: *BCR-ABL1, p190 (1)*, *E2A-PBX1 (1)*, *PML-RAR $\alpha$  (2)* e *BCR-ABL1, p210 (9)*. A análise quantitativa da expressão do gene *SIDT1* foi realizada em 80 amostras a partir de três grupos de pacientes leucêmicos (LLA, LMA e LMC) antes de iniciar o tratamento, sete linhagens de células leucêmicas (697, RS4, 11, Nalm-6, Jurkat, REH, HL-60 e K562) e amostras de indivíduos não leucêmicos, as quais foram utilizadas como controle. Os resultados da análise demonstraram que o gene *SIDT1* foi regulado negativamente nas sete linhagens de células leucêmicas humanas analisadas, principalmente para as linhagens de células 697, REH e HL-60 quando comparado com as amostras não leucêmicas. A linhagem celular K562 não apresentou qualquer expressão do gene *SIDT1*. Nas amostras clínicas analisadas também foi observado que o gene *SIDT1* foi regulado negativamente principalmente na LMA. O estudo das alterações cromossômicas possibilitou incorporar a metodologia de diagnóstico molecular no Hospital de Base do Distrito Federal, como exame de rotina dos pacientes com suspeita de leucemia para auxiliar na avaliação dos pacientes. Estudos futuros são necessários para compreender a desregulação do gene *SIDT1* ocasionada por diferentes tipos de alterações cromossômicas.

## ABSTRACT

Leukemia is a heterogeneous group of hematologic malignancies resulting from multiple genetic alterations. The analysis of chromosomal abnormalities in leukemia patients has a direct application in the diagnosis, prognosis and treatment. Furthermore, the study of gene expression provides an important source for understanding the molecular consequences of genetic alterations in leukemia. The aims of this study were: (a) to identify the presence of chromosomal abnormalities in patients with a presumptive diagnosis of B ALL, AML and CML treated at Hospital de Base do Distrito Federal, enabling the incorporation of molecular diagnostic protocol; (b) to analyze the expression profile of *SIDT1* gene in clinical samples of leukemia patients at diagnosis, leukemic cell lines and in non-leukemic. Therefore, the detection of chromosomal abnormalities was performed on 48 samples of suspected leukemia. The recurrent chromosomal alterations were detected: *BCR-ABL1*, p190 (1), *E2A-PBX1* (1), *PML-RAR $\alpha$*  (2) and *BCR-ABL1*, p210 (9). Quantitative analysis of *SIDT1* gene expression was performed in 80 samples from three groups of leukemia patients (ALL, AML and CML) before starting treatment, seven lines of leukemic cells (697, RS4, 11, Nalm-6, Jurkat, HEK, HL-60 and K562) and non-leukemic samples from individuals, which were used as controls.. The analysis results showed that the *SIDT1* gene is negatively regulated in the seven human leukemia cell lines examined, especially for cell lines 697, HL-60 and REH when compared to the non-leukemic samples. The K562 cell line showed no expression of the *SIDT1* gene. *SIDT1* gene has also been observed to be negatively regulated in the samples, especially in AML. The study of chromosomal abnormalities allowed to incorporate the molecular diagnostics methodology in the Hospital de Base do Distrito Federal, as a routine examination for patients with suspected leukemia to assist in the evaluation of patients. Future studies are needed to understand the dysregulation of *SIDT1* gene caused by different types of chromosomal alterations.

## INTRODUÇÃO

### 1. LEUCEMIA

O processo hematopoiético corresponde a um desenvolvimento hierárquico organizado das células sanguíneas iniciado pelas células-tronco hematopoiéticas (HSCs). Essas células apresentam a capacidade de auto-renovação, diferenciação e manutenção das células do sistema hematológico durante toda a vida do organismo. Esse processo fisiológico chamado hematopoiese é regulado pela expressão coordenada de vários fatores de transcrição, que são ativados ou inibidos, garantindo a maturação da população celular (TENEN, 2003). Quando os processos de proliferação e diferenciação tornam-se desregulados através da aquisição de alterações genéticas, essas alterações têm o potencial de induzir a transformação das células tronco hematopoiéticas em células leucêmicas (SACHS, 1996; CRANS; SAKAMOTO, 2001; WANG; DICK, 2005).

As leucemias são neoplasias hematológicas, resultantes de várias alterações genéticas as quais se acumulam em um único clone celular de qualquer estágio do desenvolvimento da hematopoiese, conferindo uma vantagem proliferativa em relação às demais células e impedindo seu processo de diferenciação normal associada à sobrevivência celular aumentada e diminuição da resposta a estímulos apoptóticos (SHIPITSIN; POLYAK, 2008; REYA et al., 2001). As translocações, inversões, inserções ou deleções são consideradas fundamentais na patogênese da leucemia. Deste modo, a ativação de proto-oncogenes, a inativação de genes supressores tumorais e as alterações em genes de reparo de DNA e reguladores transcricionais são alvos frequentes dessas alterações, desregulando a expressão de genes que regulam o ciclo celular (POPESCU; ZIMONJIC, 1997; HALL et al., 1997; ALCALAY et al., 2001).

Vários fatores de transcrição importantes para a hematopoiese normal têm sido alvo de rearranjos cromossômicos associados à leucemia (DOWNING, 1999). Alguns fatores de transcrição afetados são RUNX1, PU.1, C/EBP $\alpha$ , HOX, CBF, MLL e GATA que desempenham um papel importante no controle do crescimento, diferenciação e sobrevivência das células hematopoiéticas (LOOK, 1997; ZHANG, 2008). A expressão desregulada desses fatores que regulam genes ativos no crescimento e proliferação celular pode proporcionar uma vantagem no crescimento das células malignas (BOXER, 1994).

De acordo com a fisiopatologia da doença, as leucemias são classificadas como agudas ou crônicas. Nas leucemias agudas, que compreendem a leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia mieloide aguda (LMA), a célula que origina o clone neoplásico é um precursor cuja alteração mutacional causa perda da capacidade maturativa, com consequente acúmulo de blastos na medula óssea e no sangue periférico (PUI; EVANS, 1998). Entretanto nas leucemias crônicas, que compreendem a leucemia linfóide crônica (LLC) e leucemia mieloide crônica (LMC), a mutação permite a manutenção da capacidade de diferenciação e maturação celular, havendo um aumento característico no número de células maduras na medula óssea e no sangue periférico (PASTERNAK et al., 1998; ROZMAN; MONTSERRAT, 1995).

As leucemias são divididas em dois subgrupos principais, conforme a linhagem da célula hematopoiética que originou o clone leucêmico: leucemia mieloide e leucemia linfóide. Diante da heterogeneidade desse subgrupo o grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) propôs em 1976 uma classificação que se baseava nos aspectos morfológicos, grau de maturação e presença de componentes específicos identificando seis diferentes subtipos de LMA (M1 a M6) (BENNETT et al., 1976). Em 1985 esta classificação foi revisada, tendo sido acrescentados dois novos subtipos para LMA (M0 e M7) e três de LLA (L1, L2 e L3) (BENNETT et al., 1985). No entanto, em 2001 a Organização Mundial de saúde (OMS) associa a imunofenotipagem e a genética aos parâmetros clínicos, morfológicos e citotóxicos utilizados na classificação FAB (HARRIS et al., 1999). Em 2008 a OMS incorporou novas informações como critério de diagnóstico, por exemplo, mutações em genes reconhecidos como marcadores importantes para o diagnóstico e prognóstico em neoplasias mieloides. Estes incluem, entre outros, as mutações de *JAK2*, *MPL*, *NRAS*, *KRAS*, *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3*, *RUNX1*, *KIT*, *WT1* e *MLL* (VARDIMAN et al., 2009).

A etiologia da leucemia tem sido associada a alguns fatores ambientais, tais como o tabagismo, benzeno, radiação ionizante (raio X) e produtos químicos (herbicidas e pesticidas) (BUFFLER; KWAN, 2005; BELSON et al., 2007) e apenas alguns casos (<5%) estão associados a doenças genéticas conhecidas por aumentar a predisposição à doença como síndrome de Down, síndrome de Bloom, neurofibromatose e anemia de Fanconi. No entanto, na maioria dos casos, a etiologia é desconhecida (DESCHLER; LUBBERT, 2006). Na leucemia pediátrica geralmente os clones leucêmicos têm origem pré-natal, frequentemente por translocações cromossômicas, seguidas por eventos mutacionais pós-natal e estabelecimento da doença (BUFFLER; KWAN, 2005; GREAVES, 2006).

No Brasil, conforme dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), as leucemias representam 3,1% dos casos de neoplasias, com estimativa de incidência de 4.570 novos casos para homens e 3.940 novos casos em mulheres para o ano de 2012 (INCA, 2012). Nos EUA, de acordo com os dados do programa SEER (*Surveillance Epidemiology and End Results*), as taxas médias de casos de leucemia diagnosticados de 2006-2010 foram de 16,3 por 100.000 homens e 10 por 100.000 mulheres e estima-se que 27.880 homens e 20.730 mulheres serão diagnosticados em 2013.

### 1.1. Leucemia Linfoide Aguda

A Leucemia Linfoide Aguda (LLA) é o câncer mais comum em crianças, sendo responsável por 75% dos casos de leucemia, com um pico de incidência entre 3 a 5 anos e tem uma grande mortalidade em adultos (PUI et al., 2008; PENDERGRASS, 1985). Apesar das chances de cura ser de 80%, a recaída em pacientes com LLA continua sendo uma das principais causas de mortalidade infantil (MULLIGHAN, 2012). Em adultos a remissão completa atinge 80% a 90%, no entanto, as taxas de cura são de apenas 30% a 40% (LARSON et al., 1997), em parte, devido a um aumento na frequência de alterações genéticas com prognóstico desfavorável, como a translocação t(9;22) e alterações cromossômicas envolvendo o gene *MLL* (STOCK et al., 2010). Além disso, a taxa de sobrevida global para os adultos é de apenas 30% a 40% para os menores de 60 anos e menos de 10% para aqueles com mais de 60 anos (GLEISSNER et al., 2005; ROWE et al., 2005; GILLILAND; TALLMAN, 2002).

Nas LLA de linhagem B, as alterações cromossômicas mais frequentes incluem a hiperdiploidia (mais de 50 cromossomos), hipodiploidia (menos de 44 cromossomos), e translocações cromossômicas incluindo t(4;11)(q21;q23), t(12;21)(p13;q22), t(1;19)(q23;p13), t(9;22)(q34;q11), e rearranjo no gene *MLL* em 11q23 com diversos parceiros de fusão, com mais de 30 diferentes translocações cromossômicas descritas (AYTON; CLEARY, 2001; YEOH et al., 2002, HURET et al., 2001). A translocação t(12;21)(p13;q22) que tem como consequência a fusão gênica *TEL-AML1* é a mais prevalente em LLA em crianças ocorrendo em aproximadamente 25% dos casos (DRUNAT et al., 2001).

Em 8% dos casos de LLA de linhagem B em crianças são encontradas mutações no gene *FLT3* que codifica uma tirosina quinase que estão frequentemente associadas com

translocações cromossômicas recorrentes específicas ou com mutações no fator de diferenciação granulocítica. O aumento na expressão desse gene em pacientes que apresentam rearranjos envolvendo o gene *MLL* tem sido associado a um prognóstico desfavorável (MEIJERINK et al., 2009).

Nas LLA de linhagem T as principais alterações incluem as translocações  $t(10;14)(q24;q11)$ ,  $t(11;14)(p13;q11)$  (ZUTTER et al., 1990), mutações no gene *NOTCH1*, que possui um papel central na transformação das células T e está presente em mais de 50% dos casos de LLA-T (WENG et al., 2004) e rearranjos gênicos com os fatores de transcrição que consequentemente alteram sua expressão normal. Dentre eles destacam-se: TAL1 (60% dos casos infantis e 45% dos adultos), LX1 (5 a 10% dos casos pediátricos e 30% em adultos) (FERRANDO et al., 2002), TLX3 superexpresso em 20 a 25% dos casos pediátricos e 5% dos casos que possuem a translocação  $t(5;14)(q35;q32)$  (BERNARD et al., 2001). Outras mutações afetam os genes *JAK1* (3 a 20%), *WT1* (8 a 13%) e *PTEN* (8%) (CHIARETTI et al., 2010).

O início imaturo da LLA-T tem sido associado com o grupo de ativação da transcrição relacionado com as células estaminais hematopoiéticas e progenitores mieloides, expressão aberrante do gene *MEF2C*, mutações em oncogenes da LMA, supressores tumorais e inativação de fatores de transcrição importantes como *RUNX1*, *GATA3* e *ETV6* (VLIERBERGHE; FERRANDO, 2012).

## 1.2. Leucemia Mieloide Aguda

A Leucemia Mieloide Aguda é um distúrbio das células hematopoiéticas caracterizada pelo bloqueio da diferenciação celular com subsequente aumento de células imaturas (FERRARA; SCHIFFER, 2013). É classificada como a leucemia aguda mais comum em adultos (LOWENBERG et al., 1999) e sua incidência aumenta com a idade, com idade média ao diagnóstico de 67 anos (KLEPIN; BALDUCCI, 2009). A sobrevivência média em pacientes com idade superior a 65 anos é inferior a um ano e apenas 20% desses pacientes sobrevivem dois anos (GREGORY et al., 2009).

A LMA é uma doença heterogênea resultante de várias alterações genéticas, como inserções, inversões, deleções, translocações, trissomias e monossomias. Estas alterações genéticas são encontradas em aproximadamente 55% dos pacientes adultos com LMA (MARCUCCI et al., 2005). Diferentes translocações têm sido descritas sendo as mais



frequentes a  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $inv(16)(p13q22)$  e  $t(15;17)(q22;q21)$  que representam cerca de 40% de todas as LMAs e são associadas com um prognóstico favorável (RIVA et al., 2012; LOOK, 1997). No entanto, alterações cromossômicas raras como  $inv(3)(q21q26)$  e  $t(3;3)(q21;q26)$  que representam 1% a 2% da LMA,  $t(6;9)(p23;q34)$ ,  $t(6;11)(q27;q23)$ ,  $t(11;19)(q23;p13)$ ,  $t(3;5)(q25;q35)$  e  $t(9;11)(p22;q23)$ ,  $del(5q)$ ,  $del(7q)$  e cariótipos complexos ( $\geq 3$  anormalidades cromossômicas) estão associados a um prognóstico desfavorável, ou seja, com baixa taxa de remissão e tempo de sobrevida (FARAG et al., 2006; APPELBAUM et al., 2006; FROHLING et al., 2006; VARDIMAN et al., 2009; MARCHESI et al., 2011a). Além disso, mais de 80% das leucemias mieloides tem sido associada com uma ou mais alterações genéticas adicionais (LOOK, 1997; FERRARA; SCHIFFER, 2013).

Fatores de transcrição tais como, *C/EBP $\alpha$* , *PU.1* e *RUNX1*, que são essenciais no processo de diferenciação celular mielóide têm sido alvos de mutações pontuais na LMA (TENEN, 2003; PETERSON; ZHANG, 2004; LICHT; STERNBERG, 2005; PABST; MUELLER, 2007). O *C/EBP $\alpha$*  (*CCAAT/enhancer binding protein alpha*) é um fator de transcrição envolvido na regulação da mielopoiese, especialmente na diferenciação granulocítica (BARJESTEJH et al., 2003). Estudos relatam que mutações no gene *CEBPA* ocorrem em aproximadamente 10% a 15% das LMAs e sugere-se que a mutação pode contribuir para o bloqueio da diferenciação celular (FROHLING et al., 2004; PABST et al., 2001).

Vários estudos têm indicado que a expressão do gene *PU.1* é suprimida em diferentes subtipos de LMA, como na presença das proteínas de fusão *PML-RAR $\alpha$*  ou *AML1-ETO* (MUELLER et al., 2002). Em um estudo de Mueller et al. (2002) mutações do gene *PU.1* foram detectadas em 7% dos pacientes com LMA. A mutação diminuiu a capacidade de *PU.1* colaborar com proteínas como *RUNX1* ou *JUN*, que interagem na ativação de genes alvo, como os receptores do fator estimulador de colônias.

O gene *RUNX1* codifica o *core binding protein* (CBP) $\alpha$  um complexo fator transcricional envolvido na regulação da hematopoiese (SILVA et al., 2003) tem sido alvo frequente de rearranjos gênicos tais como  $t(8;21)RUNX1-ETO$ ,  $t(3;21)RUNX1-EVII$  e  $inv(16)CBF-MYH11$  (PABST; MUELLER, 2007). A ocorrência de mutações de ponto no gene *RUNX1*, tem sido identificada predominantemente no subtipo M0 (PREUDHOMME et al., 2000).

Os genes supressores tumorais são frequentemente inativados por mutações. Embora ocorram em apenas 10 a 15% das LMAs e raramente nas LLAs ao diagnóstico, são associados a um curso da doença mais agressivo e resistência às drogas (WATTEL et al., 1994; ZHAO et al., 2010).

As vias de sinalização PI3K/AKT e mTOR, controlam a proliferação celular de blastos e progenitores leucêmicos e também são alvos na LMA. A ativação de PI3K é detectável em 50% das amostras de LMA, enquanto que a mTORC1 é ativada em todos os casos desta doença (PARK et al., 2010; XU et al., 2003).

Em estudos moleculares realizados nos últimos anos, vários marcadores genéticos importantes na caracterização da LMA foram identificados e classificados na revisão da OMS de 2008, possibilitando uma classificação deste subgrupo de pacientes com LMA de cariótipo normal (que compreende 45% de todos os casos), porém com mutações gênicas. Essas mutações ocorrem com mais frequência nos genes *CEBPA*, *FLT3*, *NPM1* e *MLL* e parecem ser potentes indicadores de prognóstico, mesmo quando eles não definem um subtipo específico de leucemia (BACHER et al., 2010). Aproximadamente 25% a 35% dos pacientes com LMA têm mutações no gene *NPM1*. As mutações no gene *FLT3* que ocorrem como duplicação interna em tandem são observadas em 15% a 35% dos casos (WILSON et al., 2006). A duplicação parcial em tandem no gene *MLL* (*MLL*-PTD) ocorre em cerca de 8% dos pacientes com cariótipo normal (MROZEK et al., 2007).

### 1.3. Leucemia Mieloide Crônica

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma desordem mieloproliferativa das células troncos pluripotentes hematopoiéticas caracterizada pelo acúmulo de precursores mieloides na medula óssea e sangue periférico (BRUNS et al., 2009). Esta foi a primeira neoplasia humana associada a uma anormalidade citogenética, a translocação cromossômica conhecida como cromossomo Philadelphia (Ph). O cromossomo Philadelphia é resultado de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos nove e 22,  $t(9, 22)(q34; q11)$ , em que ocorre a fusão das regiões dos pontos de interrupção do gene *breakpoint cluster region* (*BCR*) no cromossomo 22 com o gene *Abelson leukemia virus* (*ABL1*) do cromossomo nove produzindo um gene híbrido *ABL1-BCR*, que não tem influência na patogênese da doença, e *BCR-ABL1*, que codifica uma proteína quimérica BCR-ABL com atividade tirosina-quinase (ROWLEY, 1973).

O ponto de interrupção no gene *BCR*, localizado no cromossomo 22, pode ocorrer em três áreas diferentes chamados m-BCR, M-BCR e  $\mu$ -BCR. A região de interrupção M-BCR do cromossoma 22 que abrange os exons 12 ao 16 é unida ao gene *ABL1* localizado no cromossomo 9, dando origem ao transcrito *BCR-ABL1* com uma junção b2-a2 ou b3-a2, que codificam uma proteína BCR-ABL1 de 210 kDa. O gene *ABL1* apresenta apenas uma região de ponto de quebra, entre os exons 1b e 2. Como consequência dos pontos de interrupção m-BCR apenas o primeiro exon do gene *BCR* (também chamado exon e1) é unida ao *ABL1* (junção e1-a2), resultando na produção de uma proteína BCR-ABL de 190 kDa. Uma pequena proporção de pacientes com LMC Ph<sup>+</sup> resulta de uma fusão entre *BCR* exon 19 e *ABL1* exon 2, o que é causado por pontos de interrupção na região  $\mu$ -bcr entre *BCR* exon 19 e 20. Este gene de fusão *BCR-ABL1* codifica uma proteína de 230 kDa (KURZROCK et al., 1987; van DONGEN et al., 1999).

A alteração inicial da LMC ocorre em uma célula tronco pluripotente, assim, ela pode seguir para a linhagem mieloide ou para a linhagem linfoide. Na LMC a translocação t(9;22)/*BCR-ABL1* é encontrada em mais de 90% dos casos e na LLA, ocorrem em cerca de 20% dos casos adultos e 5% dos casos pediátricos (OTTMANN; WASSMANN, 2005). Sua incidência é de um a dois casos para cada 100 mil indivíduos por ano, sendo responsável por 15 a 20% de todas as leucemias. A idade média de diagnóstico é de 45 a 55 anos de idade, entretanto, pode ocorrer raramente em idosos, crianças e adolescentes (TEFFERI et al., 2005).

A LMC normalmente evolui em três fases clínicas distintas: crônica, acelerada e blástica. Inicia com a fase crônica, de duração variável, e é caracterizada por acumulação de células maduras na medula óssea e sangue periférico. Em seguida pode ocorrer ou não a fase acelerada que dura 4 a 6 meses e é caracterizada por um aumento das células progenitoras em vez de células diferenciadas, progredindo para uma crise blástica durando apenas alguns meses com uma rápida expansão da população de células imaturas (SAVAGE et al., 1997).

A transição da fase crônica para crise blástica é caracterizada pelo acúmulo de anormalidades cromossômicas. Cerca de 60% a 80% dos pacientes com LMC desenvolve anormalidades cromossômicas adicionais como: um segundo cromossomo Philadelphia, a trissomia dos cromossomos 8, 17, 19 e mutações envolvendo genes supressores tumorais *p53* e retinoblastoma (*Rb*) (CALABRETTA; PERROTTI, 2004; CLARKSON et al., 2003). Os genes *p53* e *Rb1* estão quase sempre normais na fase crônica, mas 20% a 30% dos

casos em crise blástica apresentam perda de função resultando em um fenótipo mais agressivo e resistente a drogas (AHUJA et al., 1991; SKORSKI et al., 1996), sugerindo que a perda da função dos supressores tumorais desempenha um importante papel na progressão da doença. Neste cenário, as alterações citogenéticas e moleculares observadas na LMC em crise blástica podem também ser devidas à capacidade da oncoproteína *BCR-ABL1* em aumentar a instabilidade genômica (DIEROV et al., 2009).

A formação do gene de fusão *BCR-ABL1* resulta na produção de uma proteína quimérica com atividade constitutiva da tirosina-quinase que promove a desregulação de diferentes vias de sinalização que influenciam na proliferação, diferenciação e sobrevivência das células neoplásicas. Essas desregulações incluem: aumento da proliferação celular com ativação da via RAS; baixa apoptose devido a hiperativação da molécula anti-apoptótica Bcl-x<sub>l</sub> pela ativação da via STAT5; inativação da molécula pro-apoptótica BAD via AKT e desregulação da adesão celular, com liberação prematura de células imaturas na circulação (efeito CRKL) (MARLEY; GORDON, 2005; MELO; DEININGER, 2004).

A principal característica da LMC em crise blástica é a incapacidade dos progenitores mieloides se diferenciarem em células maduras. Isto é principalmente devido a inibição da *CCAAT/enhancer binding proteina* (C/EBP $\alpha$ ) (PERROTTI et al., 2002), um fator de transcrição essencial para a diferenciação granulocítica (KEESHAN et al., 2003). Outros fatores de transcrição também foram encontrados mutados na fase aguda da doença. Estes incluem o gene *RUNX1* mutado em 38% dos casos das células de linhagem mieloide, o gene *CDKN2A/B* em 50% dos casos e o gene *IKZF1* em 55% dos casos de linhagem linfóide (ROCHE-LESTIENNE et al., 2008; MULLIGHAN et al., 2008; NAKAYAMA et al., 1999).

## 2. Diagnóstico de leucemia

O primeiro exame a ser realizado quando há suspeita de diagnóstico de leucemia é o hemograma. O hemograma com contagem diferencial e análise morfológica apresenta-se alterado ao detectar células blásticas, no caso de leucemias agudas, e aumento da série granulocítica, na LMC. Uma vez detectada alteração, a confirmação ocorre com análise morfológica da medula óssea, ao evidenciar achado de 20% ou mais de blastos, no caso

das leucemias agudas e hiperplasticidade com predomínio dos granulócitos, no caso da LMC (VARDIMAN et al., 2002; BENNETT et al., 1985).

A imunofenotipagem, um importante método auxiliar no diagnóstico, possibilita a diferenciação entre os subtipos de leucemias através da identificação da linhagem celular comprometida e o seu grau de maturação através de anticorpos monoclonais reativos com os antígenos de superfície expressos pelas células leucêmicas (PERFETTO et al., 2004; ZOLA et al., 2005).

Devido a sua elevada sensibilidade, rapidez e precisão, a análise imunofenotípica tem um importante papel na determinação dos subtipos de leucemias agudas, auxiliando na escolha de uma abordagem terapêutica adequada (DONG et al., 2011; KALEEM et al., 2003). Como por exemplo, os casos de LMA-M2 associados com a translocação t(8;21)(q22;q22) expressam os antígenos CD19 e CD56 (KOZU et al., 1993) e rearranjos com o gene *MLL* são frequentemente CD10<sup>-</sup> e CD15<sup>+</sup> quando a translocação t(4;11)(q21;q23) esta presente (BOROWITZ et al., 1993).

Na LLA a identificação da linhagem celular, B ou T, apresenta grande relevância clínica e terapêutica (PUI; EVANS, 1998). Aproximadamente 90% dos casos de LLA em crianças e 80% dos casos de LLA em adultos são derivadas de células de linhagem B. Marcadores, tais como, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24 e HLA-DR são frequentemente usados para caracterizar LLA-B (CORTES; KANTARJIAN, 1995). A LLA de linhagem T representa aproximadamente 15% dos casos em crianças e 25% em adultos (HAN; BUESO-RAMOS, 2007; REAL; FERNANDO, 2009).

Associada aos aspectos morfológicos e imunofenotípicos a análise citogenética permite detectar anormalidades cromossômicas dos clones leucêmicos. As alterações cromossômicas podem ser numéricas ou estruturais. Dentre as alterações numéricas, a hiperdiploidia (> 50 cromossomos) é a única alteração citogenética mais frequente em LLA na infância composto por um quarto de todos os casos, mas é apenas um pequeno subgrupo de LLA em adulto (6% de todos os casos). Em contraste, a hipodiploidia (<46 cromossomos) é encontrada em cerca de 5% dos pacientes LLA pediátricos e adultos (COUSTAN-SMITH et al., 2003; NORDGREN et al., 2001). As alterações estruturais incluem as translocações, inversões, duplicações e deleções.

Estudos citogenéticos também têm sido importantes na identificação de anormalidades secundárias que podem ter impacto no prognóstico do paciente. Wetzler et al. (2004) relatam a aquisição de uma ou mais cópias adicionais de der(22) foi avaliado

como um dos mecanismos de resistência à terapia com imatinib em pacientes com LMC positivos para t(9;22). Em alguns casos, há alterações moleculares que são difíceis de serem identificadas pelo método citogenético. Um exemplo disto é a fusão gênica *TEL-AML1* resultante da translocação t(12;21) (SHURTLEFF et al., 1995).

Estudos com técnicas moleculares permitem a identificação das alterações cromossômicas com mais sensibilidade, além de fornecer dados importantes sobre os mecanismos da tumorigênese (PALLISGAARD et al., 1998). Dentre as técnicas mais utilizadas na identificação das alterações cromossômicas estão a hibridação *in situ* fluorescente (FISH), análise por Southern blotting, reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) e PCR quantitativa em tempo real (qPCR) (POLAMPALLI et al., 2011). Além do diagnóstico, essas técnicas são utilizadas para monitorar a doença residual mínima durante e após o tratamento. No entanto, a qPCR possui maior sensibilidade por analisar a quantidade de células leucêmicas na proporção de um clone leucêmico em  $10^6$  células normais (van der VELDEN et al., 2003).

### 3. RNA Interferente

RNA interferente (RNAi) é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional iniciado por moléculas de RNA dupla fita (dsRNA). Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez em 1998 no nemátodeo *Caenorhabditis elegans*, quando se observou que a presença de algumas moléculas de dsRNA com sequência complementar ao mRNA alvo foram capazes de inibir a expressão gênica (FIRE et al., 1998). Este fenômeno também foi observado em outros organismos como fungos, plantas, insetos e animais (MELLO; CONTE, 2004; RONEMUS et al., 2006).

A via de RNAi é um mecanismo celular desencadeado por RNAs endógenos não codificantes, os microRNAs (miRNAs), que são codificados naturalmente no genoma e por RNAs exógenos não codificantes que incluem os pequenos RNAs interferentes fita dupla (dsRNAs), pequenos RNAs em forma de "stem loop" (shRNAs) (DINGER et al., 2008) que são sintetizados *in vitro* e introduzidos na célula. Os RNAs interferentes não codificantes dsRNAs são os principais RNA reguladores utilizados para realizar a clivagem de sequências homólogas do mRNA e promover o silenciamento da expressão gênica (KIM; ROSSI, 2007; AMERES et al., 2007).

O RNA regulador dsRNA é clivado dentro da célula por uma RNase III conhecida como *Dicer* formando fragmentos de 21-25 nucleotídeos (ELBASHIR et al., 2001a; MI et al., 2008) com 2 nucleotídeos livres na porção 3' (ELBASHIR et al., 2001b).

Os pequenos fragmentos de dsRNA, conhecidos como pequenos RNAs interferência (siRNAs), correspondem às fitas sense e antisense do RNA alvo e se associam a proteínas celulares formando um complexo multimérico chamado RISC (do inglês, *RNA Interference Specificity Complex*). Uma helicase presente no complexo abre a dupla-fita dos siRNAs, permitindo que somente uma das fitas do siRNA seja incorporada ao RISC (MARTINEZ et al., 2002). Zamore et al. (2000) determinaram que a fita *antisense* é a principal responsável por reconhecer o alvo.

A incorporação de uma das fitas do siRNA ao complexo RISC orienta a clivagem do mRNA específico, promovendo assim a sua degradação (TABARA et al., 1999). Todos os complexos RISC já caracterizados possuem pelo menos uma proteína da família Argonauta (MARTINEZ et al., 2002). O silenciamento nesse processo é causado por um mecanismo pós-transcricional: o gene é normalmente transcrito dentro da célula, mas não consegue ser traduzido, pois é degradado antes disto (MONTGOMERY et al., 1998).

Para interferir com a expressão de um gene específico requer o conhecimento da sequência alvo exata, ou seja, de pelo menos um segmento de 20 nucleotídeos de seu mRNA codificado (ELBASHIR et al., 2002). Portanto, deve-se selecionar cuidadosamente uma região do mRNA alvo e evitar que a região escolhida tenha similaridade com regiões pertencentes a outros RNAs não relacionados (HOLEN et al., 2002).

A tecnologia de RNA interferente (RNAi) representa uma nova abordagem terapêutica para o tratamento de doenças humanas. Uma melhor compreensão das alterações cromossômicas e sua influência no desenvolvimento da leucemia têm proporcionado oportunidades para desenvolver novas abordagens terapêuticas que afeta especificamente as células tumorais (LANDRY et al., 2012), superando os efeitos colaterais e a resistência aos agentes quimioterápicos das terapias atuais (GERVASINI; VAGACE, 2012).

O mecanismo de RNAi tem sido utilizado em várias pesquisas para demonstrar que siRNAs sintéticos podem seletivamente silenciar a expressão de produtos de translocações cromossômicas, como por exemplo, o transcrito gênico *BCR-ABL1* resultante da translocação t(9;22) que caracteriza a LMC. Em um estudo realizado por Withey et al. (2005) em linhagens de células K562 derivadas da LMC em crise blástica, obteve-se

redução da proteína BCR-ABL1 de até 84% utilizando siRNAs anti-BCR-ABL1. Scherr et al. (2003) observaram uma redução de 80% da proteína BCR-ABL1 em linhagens de células e em células primárias de pacientes com LMC. No entanto, Heidenreich et al. (2003) observou uma redução do transcrito *AML1-MTG8* em aproximadamente 40% na linhagem celular Kasumi-1.

Vários autores (WILDA et al., 2002; SCHERR et al., 2005; WOHLBOLD et al., 2003) tem demonstrado que o mecanismo de RNAi pode resultar na inibição da proliferação das células leucêmicas *in vitro*. Uma abordagem que utiliza os siRNAs sintéticos para eliminar as células leucêmicas *in vivo*, seria o ideal, mas, infelizmente, ainda não há uma entrega eficiente de siRNA para células hematopoiéticas (OLIVEIRA; GOODELL, 2003).

### 3.1. Os miRNAs

Os miRNAs representam pequenos RNAs endógenos não codificantes, com aproximadamente 22 nucleotídeos, cuja principal função é atuar como silenciadores pós-transcricionais, inibindo a tradução do mRNA-alvo em proteína (LAI, 2004). Os genes que codificam miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II em um longo microRNA primário (pri-miRNA) que, ainda no núcleo, é clivado por um complexo proteico do qual fazem parte uma RNase III (*Drosha*) que apresenta um domínio de ligação para dsRNA (VENTURINI et al., 2006; DU; ZAMORE, 2005). A clivagem resulta no pré-miRNA, com cerca de 70 pares de bases, contendo um trecho de fita dupla e uma alça de fita simples, formando uma estrutura denominada *hairpin*. O pré-miRNA é exportado para o citoplasma pela Exportina-5, onde é clivado pela *Dicer*, gerando um miRNA maduro com cerca de 22 nucleotídeos de comprimento (ALVAREZ-GARCIA; MISKA, 2005). Posteriormente, o miRNA maduro é incorporado no complexo proteico RISC que o direciona ao mRNA do gene alvo, regulando-o negativamente (LEE et al., 2002).

Em função dos miRNAs possuírem sequências pequenas e agirem sem a necessidade de pareamento completo, um único miRNA pode regular muitos mRNA alvo. Desta forma, os miRNAs constituem uma enorme e complexa rede regulatória da sinalização celular (BRENNECKE et al., 2005).

Estudos têm demonstrado que os miRNAs estão envolvidos na regulação de genes envolvidos nos processos celulares essenciais para uma hematopoiese normal, tais como



desenvolvimento e diferenciação celular e a apoptose (BHAGAVATHI; CZADER, 2010; CHEN et al., 2004; BARTEL, 2004). Portanto, sua expressão desregulada pode contribuir para a formação de neoplasmas leucêmicos (GARZON; CROCE, 2008).

A desregulação dos miRNAs pode ser devido a alterações genômicas incluindo mutações pontuais, ampliações e translocações (ESQUELA-KERSCHER; SLACK, 2006). De forma semelhante aos genes codificantes, os miRNAs podem ter sua expressão aumentada ou diminuída, como também, podem atuar como supressores de tumor ou oncogenes conforme o alvo que o miRNA controla. Os miR-15 e miR-16 foram os primeiros miRNA supressores tumorais descritos. Estão localizados dentro de uma região de 30 kb de perda na LLC, e ambos são deletados ou tem sua expressão diminuída em aproximadamente em 65% dos casos de LLC (CALIN et al., 2002; CIMMINO et al., 2005; MI et al., 2007).

miRNAs supressores tumorais têm sido encontrados regulados negativamente em várias alterações cromossômicas como a t(8;21), inv(16), translocação balanceada 11q23 e mutação no gene *NPM1* (GARZON et al., 2008; VENTURA et al., 2008). Entretanto, em um estudo da expressão de miRNAs realizado por Mi et al. (2007) entre os 27 miRNA analisados os miRNAs 18a, 128b, 151, 5, 10b e 210 tiveram sua expressão aumentada em LLA, enquanto o restante foram regulados positivamente em LMA.

Os níveis de expressão dos miRNAs diferem geralmente entre tecidos normais e neoplásicos, mas pouco se sabe como esses padrões de expressão são regulados (LU et al., 2005). Calin et al. (2004) sugerem que vários miRNAs podem estar localizados em locais frágeis ou em pontos do genoma que são alterados no câncer. Isso indica que os miRNAs pode ter uma função importante na progressão de neoplasias.

### **3.2. *SIDT1***

Diante do interesse em melhorar a entrega de RNAs não codificantes sintéticos às células, e assim, promover o silenciamento gênico pós-transcricional para o tratamento de diversas doenças humanas. Uma alternativa seria utilizar um receptor que foi recentemente descoberto, a proteína SIDT-1, e que está presente nas células humanas.

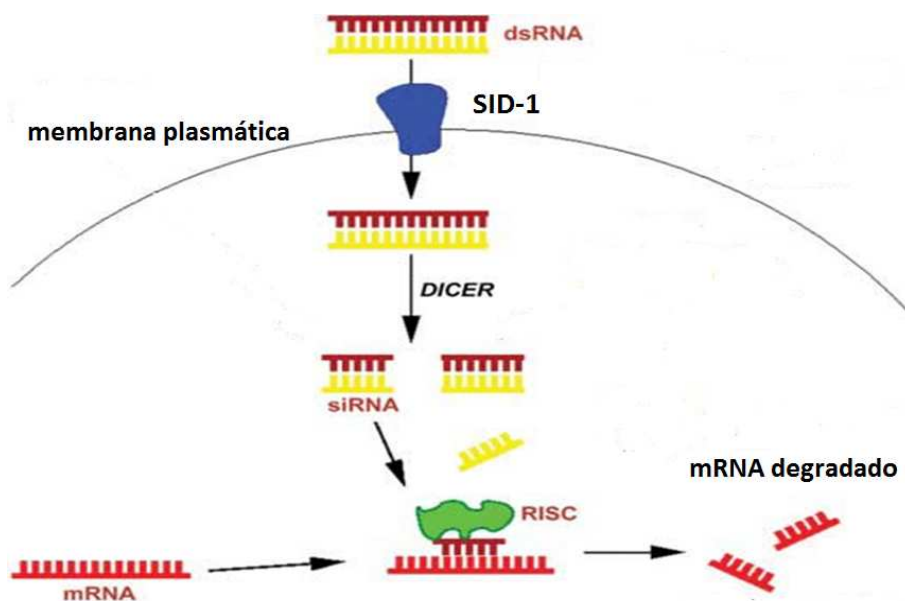
SID-1 (systemic RNA interference-defective-1) é um gene que codifica uma proteína transmembrana recentemente identificada em um estudo genético realizado no nematódeo *Caenorhabditis elegans* para identificar genes que eram capazes de transmitir o

sinal de RNAi de célula-a-célula (WINSTON et al., 2002). Este gene codifica uma proteína de 776 aminoácidos com 11 domínios transmembranares com a região N-terminal localizada extracelularmente e a C-terminal no citosol detectada em todas as células não neurais e relatada em vários organismos (WINSTON et al., 2002; FEINBERG; HUNTER, 2003).

Em um estudo de caracterização de SID-1 realizado em células de *Drosophila* (onde falta o homólogo de SID-1) indica que SID-1 funciona como um canal capaz de transportar dsRNA para dentro das células, e assim, promover o silenciamento gênico (FEINBERG; HUNTER, 2003). Kobayashi et al. (2012) também demonstrou que SID-1 contribui para a absorção de dsRNA quando expressado em cultura de células de *Bombyx*.

O SID-1 homólogo humano, SIDT1 (Systemic RNA Interference-defective-1 Transmembrane Family Member 1) foi demonstrado em células de adenocarcinoma pancreático de mamíferos que ele atua no aumento da internalização do dsRNA indicando função conservada entre SIDT1 e SID-1 (DUXBURY et al., 2005). SID-1 pode importar ativamente RNAs não codificantes como RNA de cadeia simples ou dupla, hairpin RNA (shRNA) e pré-microRNA para ativar o sinal de RNAi (Figura 1) (SHIH; HUNTER, 2011).

Esta família *systemic RNAi defective (SID)* compreende mais um membro o *SID-2* também identificado pela primeira vez em *C. elegans* como um gene necessário para a absorção de dsRNA ingerido. *SID-2* codifica uma proteína transmembrana expressa no intestino e localizada na membrana apical do lúmen intestinal (WINSTON et al., 2007). A superexpressão do homólogo de *SID-2*, o *SIDT2*, em células epiteliais do peixe *Siniperca chuatsi* permitiu um aumento na absorção de dsRNA e também ajudou a proteger contra a infecção viral (REN et al., 2011).



**Figura 1. Representação esquemática do mecanismo de RNAi em *C. elegans*.** O RNAi é iniciado com o transporte de dsRNAs para dentro da célula pela proteína SID-1, seguindo com a clivagem do dsRNAs em siRNAs pela DICER. Os siRNAs é conduzido por RISC ao mRNA complementar, promovendo assim, a sua degradação. Figura retirada e modificada de BUCKINGHAM et al., 2004.

## OBJETIVOS

Identificar a presença de alterações cromossômicas e analisar o perfil da expressão do gene *SIDTI* em pacientes e linhagens celulares com neoplasias hematopoiéticas e em indivíduos não leucêmicos.

Objetivos específicos:

- 1- Identificar a presença de alterações cromossômicas em pacientes ao diagnóstico com hipótese de LLA B, LMA e LMC atendidos no Hospital de Base do Distrito Federal, possibilitando a incorporação do protocolo de diagnóstico molecular;
- 2- Analisar o perfil da expressão do gene *SIDTI* em amostras clínicas ao diagnóstico com LLA, LMA, LMC, linhagens de células leucêmicas e em indivíduos não leucêmicos.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 1. Pacientes

O grupo de estudo incluiu pacientes ao diagnóstico do Hospital de Base do Distrito Federal-HB-DF e do Hospital da Criança de Brasília José Alencar-HCB e amostras não leucêmicas utilizadas como controle. O diagnóstico dos pacientes do HB-DF foi realizado no laboratório de Biologia do Gene da Universidade de Brasília-LaBioGene através da análise molecular. No entanto, as amostras dos pacientes do HCB já apresentavam diagnóstico concluído não sendo necessário realizar a análise molecular. A análise molecular desses pacientes foi realizada no laboratório do Hospital de Apoio do Distrito Federal que cedeu ao LaBioGene as amostras processadas até a fase de cDNA para análise do gene *SIDT1*. O sangue periférico dos pacientes do HB-DF foi coletado em EDTA antes do início do tratamento e processado imediatamente. O consentimento informado foi obtido de cada paciente antes do estudo. O estudo foi aprovado pela Fundação para a Educação e Pesquisa em Ciências da Saúde-FEPECS.

### 2. Linhagem celular

As linhagens celulares leucêmicas utilizadas foram 697, RS4;11, Nalm-6, Jurkat, REH, K562, HL-60. As células foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corporation) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (100 µg/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) incubado a 37°C, em uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. A viabilidade celular foi analisada utilizando o corante azul de Trypan 0,4% (Merck), no qual, cora as células mortas diferenciando-as das células vivas e contadas em Câmara de Neubauer.

### 3. Técnicas para a análise molecular

#### 3.1. Isolamento da camada leucoplaquetária

Para realizar a técnica, foi adicionado 1,5 mL a 2,0 mL de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare), em um tubo falcon. Sobre o Ficoll-Paque PLUS, foi acrescentado vagarosamente, de 2 a 4 mL da amostra (sangue periférico) e centrifugado a 3.000 g em temperatura ambiente por 20 min. Para as linhagens celulares as células foram coletadas quando apresentavam uma densidade de aproximadamente 10<sup>7</sup> células/mL de cultura. As

células foram coletadas por centrifugação, lavadas 2 vezes com PBS 1 X livre de RNase e ressuspendidas em TRIzol (Invitrogen). Após a centrifugação, quatro camadas distintas de acordo com sua densidade, foram visualizadas: Soro-Camada leucoplaquetária-Ficoll-Hemácias. A camada superior foi desprezada e a camada leucoplaquetária transferida para um tubo eppendorf de 2 mL, completando o volume com tampão PBS 1X. Centrifugando a 4.000 g por 5 min na temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, obtendo um sedimento celular cujo volume foi então estimado. A este sedimento celular foi adicionado um volume de solução TRIzol (Invitrogen) correspondente a 10 vezes o volume do sedimento e o material homogeneizado para continuidade do procedimento ou armazenado a -20°C.

### **3.2. Extração de RNA**

Para a extração de RNA, a amostra em TRIzol foi deixada por 5 min na temperatura ambiente caso ela tenha sido armazenada a -20°C. Foi adicionado clorofórmio em um volume correspondente a 1/5 do volume do TRIzol. Agitou-se vigorosamente o material e, posteriormente, o mesmo foi deixado por 3 min em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 12.000 g por 15 min a 4°C. Após a centrifugação, fase aquosa superior (o RNA) foi retirada cuidadosamente para não contaminar com a fase fenólica, onde se encontra o DNA, e então transferida para outro tubo eppendorf. O isopropanol foi adicionado em um volume correspondente à metade do volume do TRIzol utilizado inicialmente. A amostra foi homogeneizada e deixada por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, foi centrifugada a 12.000 g por 10 min a 4°C e um sedimento branco correspondendo ao RNA foi visualizado na parte inferior do tubo eppendorf. Etanol a 75% (-20°C) em volume igual à quantidade de TRIzol foi adicionado sem ressuspender o sedimento e em seguida, centrifugou-se a 8.000 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo eppendorf invertido para a evaporação do etanol. Ao sedimento (RNA) já seco, adicionou-se água RNase free e gentilmente foi ressuspenso a fim de dissolver o pellet.

### **3.3. Eletroforese de RNA**

Preparou-se um gel desnaturante composto por agarose a 1% em tampão MOPS 10X e formaldeído a 38% sendo todos os reagentes livres de RNase. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (GeneQuant, Pharmacia Biotech) e a partir dos valores

obtidos, calculou-se o valor de cada amostra de forma que fosse aplicado 1 µg de RNA no gel. Adicionou-se 12,5 µL de tampão de RNA 1X e água para um volume final de 17,5 µL, em seguida, as amostras foram desnaturadas incubando-as por 10 min em banho-maria a 65°C e em seguida foi adicionado brometo de etídio 0,0001%. A eletroforese foi realizada com tampão MOPS 1X, a 80 V. O gel foi visualizado em transluminador e o resultado documentado digitalmente com o auxílio do software Quantity one (Bio-Rad).

### 3.4. Transcrição reversa

Para evitar qualquer contaminação com DNA genômico, o RNA total foi tratado com DNase onde foram utilizados: 2 µg de RNA, tampão DNase 1X, 1U da enzima DNase (RNase free, Promega) e água livre de RNase para um volume final de 10 µL. O tratamento foi realizado a 37°C por 30 min, após esse período, foi adicionado 1 µL de Stop Solution e submetido a 65°C por cinco min.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir dos 10 µL de RNA total tratado com DNase de acordo com as instruções do fabricante do High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) onde foram utilizados: tampão RT 1X, mix dNTP 1 X, Random Primers RT 1X, 50U da enzima transcriptase reversa, 40U do inibidor RNase e água livre de nucleasse para um volume final de 20 µL.

As condições utilizadas para a síntese do cDNA foram:

Passo 1: 25°C 10 min

Passo 2: 37°C 120 min

Passo 3: 85°C 5 min

A qualidade do cDNA sintetizado foi avaliada por amplificação do gene constitutivo gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase (*GAPDH*) utilizado um volume final de 30 µL contendo: 1 µL de cDNA; tampão Taq DNA polimerase 1 X; 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10 µM de primer 0,2 mM de dNTP e 1 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen). Foram consideradas válidas para análise todas as amostras que apresentaram amplificação do gene constitutivo *GAPDH*.

As condições de amplificação da PCR foram:

Passo 1: Desnaturação inicial: 95°C por 30 s

Passo 2: Desnaturação: 94°C por 30 s

Passo 3: Anelamento: 65°C por 60 s

Passo 4: Extensão: 72°C por 60 s

Repetição dos passos 2 a 4 por 35 vezes.

### **3.5. Reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR)**

A amplificação dos transcritos gênicos por RT-PCR, foi realizada de acordo com o protocolo de van Dongen et al., (1999). De acordo com o protocolo primeiramente é realizado uma PCR utilizando os primers (*single*) e, em caso de amplificação deste, realiza-se outra PCR com outro par de primers (*shifted*) para confirmação, sempre seguindo a mesma programação para todos os rearranjos gênicos pesquisados conforme descrito na Tabela 1. As condições de amplificação dos transcritos gênicos foram as mesmas utilizadas para a amplificação do gene constitutivo *GAPDH* como descrito no item 3.4.

### **3.6. RT - PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)**

A PCR quantitativa em tempo real é uma metodologia que permite verificar mudanças na expressão gênica através da avaliação da quantidade de transcritos ao longo da reação. Com a quantificação relativa é possível verificar quantas vezes o gene de interesse é mais expresso na amostra alvo em relação ao controle tendo como normalizador um gene constitutivo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

A PCR quantitativa foi realizada no equipamento StepOnePlus™ (Applied Biosystems) em uma reação final de 10 µL contendo: 5 µL do Fast SYBR Green Master Mix (Invitrogen), 0,2 µL (0,2 mM) de cada primer e 2 µL de cDNA de uma diluição de 1/10. As condições da reação foram as seguintes: desnaturação inicial de 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 s e 60°C por 30 s. Cada amostra foi realizada em triplicata.

Os níveis de expressão do gene alvo foram determinados após normalização com o gene endógeno constitutivo empregado para avaliar a variação de expressão de cada gene de interesse. Para essa normalização foi utilizado a média do valor do  $C_T$  (threshold cycle) das triplicatas.  $C_T$  é definido como ciclo no qual a amplificação do gene ultrapassa o limite de amplificação estabelecido. É um ponto definido pelo pesquisador e obrigatoriamente deve estar na faixa em que a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras torna-se significativamente maior que a fluorescência de base. O limiar é definido na fase exponencial da reação de amplificação dos transcritos.



Para a determinação da quantidade relativa dos níveis de mRNA foi baseado no cálculo  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (RQ) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), tendo como calibrador amostras de indivíduos não leucêmicos.

**Tabela 1.** Relação dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos transcritos gênicos por RT-PCR, de acordo com o protocolo de van Dongen et al., 1999.

Alteração	Rearranjo gênico	Tipo de transcrito	Single	pb	Shifted	pb
t(9;22)	<i>BCR/ABLp190</i>	e1-a2	A+B	521	C+E	445
t(4;11)	<i>MLL/AF4</i>	e1-a3	A+B	347	C+E	271
		variável	A+B	variável	D+E	variável
t(1;19)	<i>E2A/PBX1</i>	padrão	A+B	373	C+E	401
		Splic. Alter.	A+B	400	C+E	428
t(12;21)	<i>TEL/AML1</i>	padrão	A+B*	298	D+E*	545
		Splic.alter.	A+B*	259	D+E*	506
t(8;21)	<i>AML1/ETO</i>	padrão	A+B	395	D+E	338
t(15;17)	<i>PML/RAR<math>\alpha</math></i>	bcr 1	A1 + B	381	C1 + E	470
		bcr 2	A1 + B	345	C1 + E	434
		bcr 1	A2 + B	1329	C2 + E	944
		bcr 2	A2 + B	819	C2 + E	908
		bcr 3	A2 + B	376	C2 + E	545
inv(16)	<i>CBFB/MYH11</i>	variável	A+B2	variável	D2+E	variável
		variável	A+B1	variável	D1+E	variável
t(9;22)	<i>BCR/ABL p210</i>	b3-a2	A1+B	417	C1+E	424
		b2-a2	A1+B	342	C1+E	349
		b3-a3	A1+B	243	C1+E	250
		b2-a3	A1+B	168	C1+E	175

**Tabela 2.** Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene *GAPDH* e *SIDT1*.

Primers	Características	Sequencia 5' – 3'	Ta	Tm
PR 194*	GAPDH 5'	CCCATCACCATCTTCCAGG	19	60
PR 195*	GAPDH 3'	AGTGAGCTTCCCGTTCAGC	19	60
PR 398	SIDT1 5'	CCGACCAGGTGACAGCCGTG	20	68
PR 399	SIDT1 3'	CCTCTGGTATAGTCCTTGGGAAGA	23	68

PR 455	GAPDH 5'	TGCACCACCAACTGCTTAGC	20	62
PR 456	GAPDH 3'	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	21	66

\*Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação por RT-PCR semi-quantificativa. Ta: tamanho; Tm: tempo de anelamento.

#### 4. Análise estatística

Para verificar a existência de diferença na expressão gênica entre as amostras e linhagens leucêmicas em relação aos indivíduos não leucêmicos, a análise estatística foi determinada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparação de médias de Tukey utilizando o software GraphPad Prism. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### 1. Análise molecular dos rearranjos cromossômicos

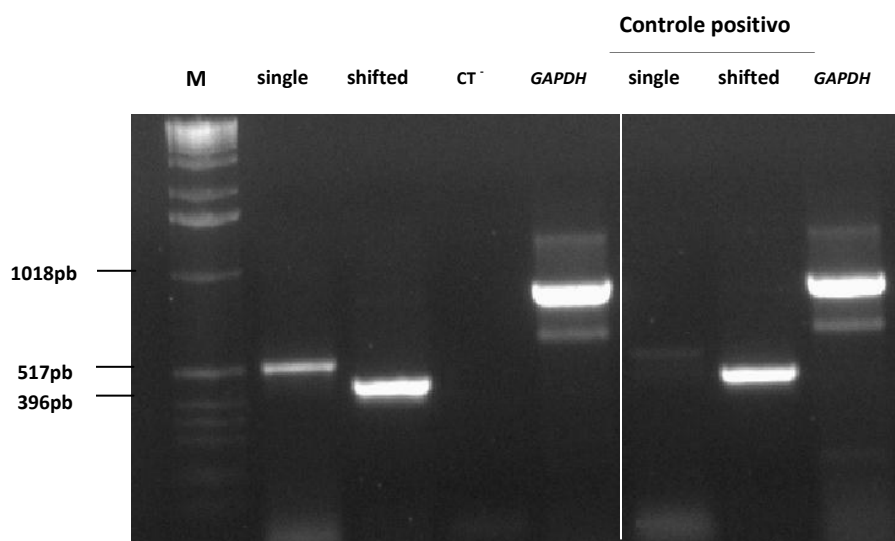
Um total de 48 amostras com diagnóstico clínico inicial de leucemia (Tabela 3), foram cedidas pelo HB-DF para a análise molecular. Destas, 12 casos que tinham como hipótese diagnóstica de LLA, dois casos foram positivos, sendo um caso do sexo masculino (31 anos) que apresentou o rearranjo *BCR-ABL1*, *p190* (Figura 2) referente à translocação t(9;22) e outro do sexo feminino (46 anos) positivo para o rearranjo *E2A-PBX1* (Figura 3) referente à translocação t(1;19). Dos casos que foram negativos para os transcritos analisados, três tinham diagnóstico de LLA-T e sete de leucemia aguda.

Na LMA dois casos foram positivos, ambos do sexo masculino, para o rearranjo *PML-RAR $\alpha$*  referente à translocação t(15;17), ambos do subtipo *bcr3*, num total de 14 amostras analisadas (Figura 4). Das 12 amostras negativas para os transcritos analisados, três eram LMA-M3 em recaída, seis LMA e três eram leucemias agudas.

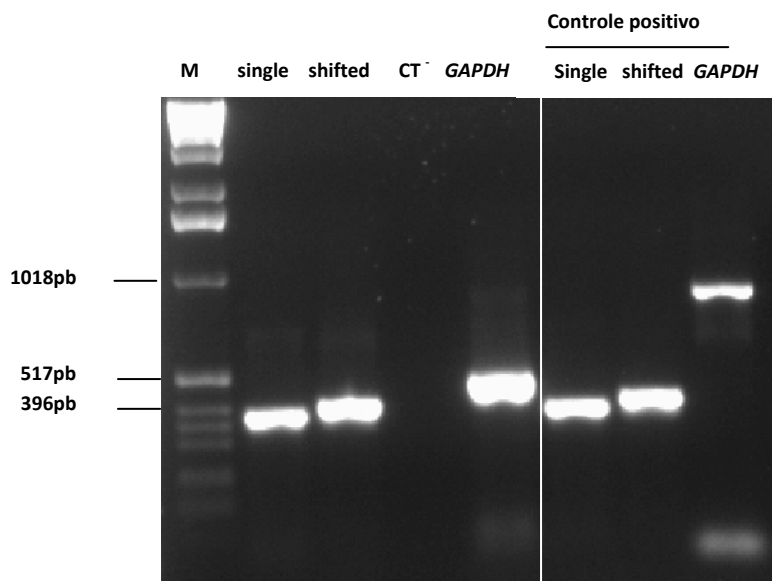
Na LMC entre os 14 casos analisados, nove casos, sendo sete do sexo masculino e dois femininos com uma idade média de 38 anos, identificou-se a presença do transcrito do rearranjo *BCR-ABL1*, *p210* referente à translocação t(9;22), sendo seis para o subtipo *b3-a2* e três *b2-a2* (Figura 5). Das cinco amostras negativas para o rearranjo *BCR-ABL1*, quatro tinham como diagnóstico pelo HB-DF de LMC e uma de Policitemia vera. Das oito amostras que tinham apenas hipótese de leucemia foram negativas para todas as translocações pesquisadas. Destes tinham como diagnóstico pelo HB-DF: uma LLC, cinco leucemias agudas e duas LMA (Figura 6).

**Tabela 3.** Resultado das amostras clínicas analisadas para os rearranjos cromossômicos.

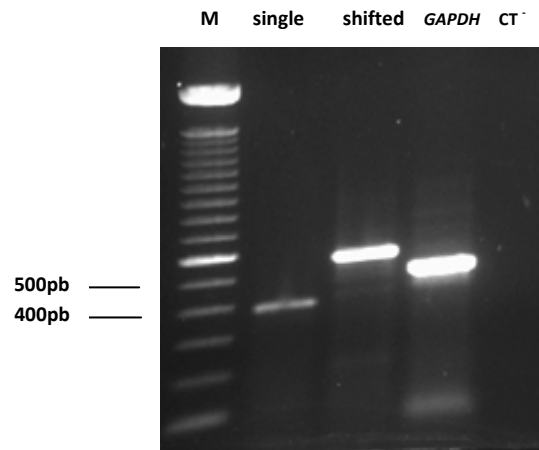
Hipótese	Alterados	Transcrito gênico
LLA	12	<i>BCR-ABL1</i> , <i>p190</i> (1) <i>E2A-PBX1</i> (1)
LMA	14	<i>PML-RAR<math>\alpha</math></i> (2)
LMC	14	<i>BCR-ABL1</i> , <i>p210</i> (9)
Leucemia	8	-



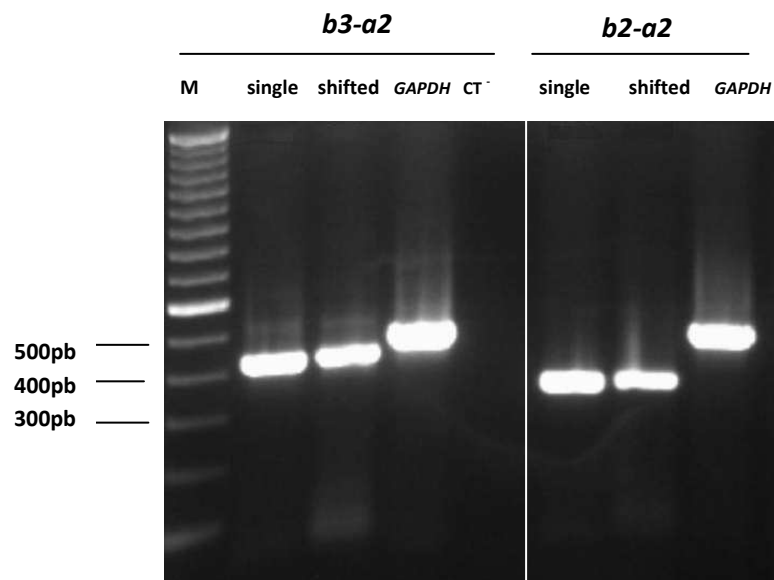
**Figura 2.** Gel de agarose 1% evidenciando RT-PCR positivo para amplificação do rearranjo gênico *BCR-ABL1*, p190. M: marcador 1 kb Ladder.



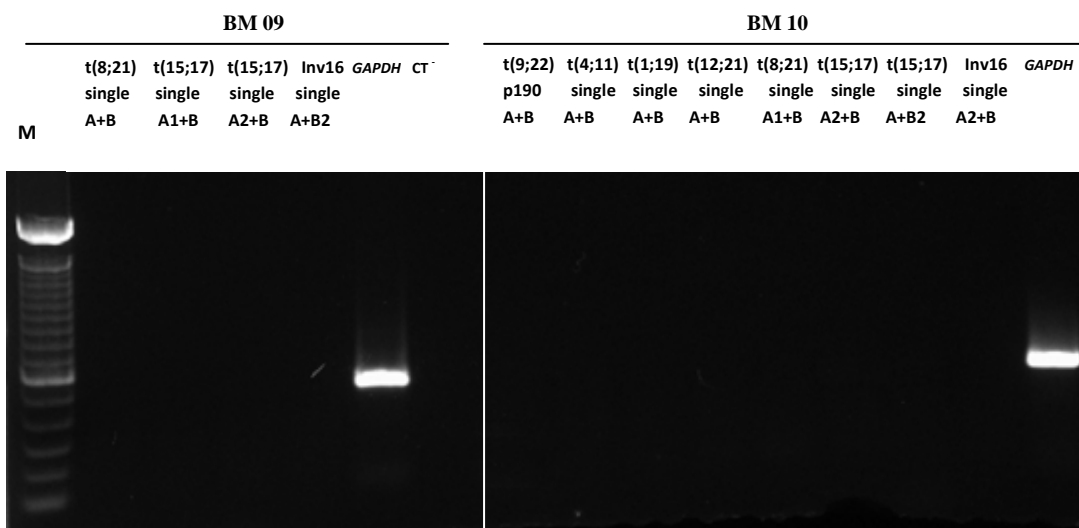
**Figura 3.** Gel de agarose 1% evidenciando RT-PCR positivo para amplificação do rearranjo gênico *E2A-PBX1*. M: marcador 1 kb Ladder.



**Figura 4.** Gel de agarose 1% evidenciando RT-PCR positivo para amplificação do transcrito gênico *PML-RAR $\alpha$* , *bcr3*. M: marcador 100 pb.



**Figura 5.** Gel de agarose 1% evidenciando RT-PCR positivo para amplificação do rearranjo gênico *BCR-ABL1*, p210 *b3-a2* e *b2-a2*. M: marcador 100 pb.



**Figura 6.** Gel de agarose 1% evidenciando RT-PCR negativo para translocações agudas da linhagem linfóide e mieloide. M: marcador 100 pb.

## 2. Análise quantitativa do gene *SIDTI*

O presente estudo concentrou-se na identificação do perfil da expressão do gene *SIDTI*. Foram analisadas 80 amostras (65 de medula óssea, e 15 de sangue periférico) a partir de três grupos de pacientes leucêmicos ao diagnóstico (LLA, LMA e LMC), sete linhagens de células leucêmicas (697, RS4, 11, Nalm-6, Jurkat, REH, HL-60 e K562) e amostras de indivíduos não leucêmicos, as quais foram utilizadas como controle (Tabela 4).

As amostras com diagnóstico de LLA apresentavam diferentes alterações genéticas como, translocações cromossômicas que têm como consequência as fusões gênicas; t(12;21)/*TEL-AML1* (12), t(1;19)/*E2A-PBX1* (6) e t(9;22)/*BCR-ABL*, p190 (4); deleção (1) e aneuploidia (2), entretanto, na maioria das amostras não foi detectada alteração cromossômica (32) (Tabela 4). Nas amostras com diagnóstico de LMA foram encontradas apenas translocações cromossômicas que resultou nas seguintes fusões gênicas t(8;21)/*AML1-ETO* (2), (15;17)/*PML-RAR $\alpha$*  (6), inv(16)/*CBF $\beta$ -MYH11* (1) (sete amostras utilizadas no estudo refere-se ao banco de amostras do Laboratório de Biologia do gene). Todas as amostras com diagnóstico de LMC apresentavam o rearranjo gênico t(9;22)/*BCR-ABL*, p210 (cinco amostras utilizadas no estudo referem-se ao banco de amostras do Laboratório de Biologia do gene).

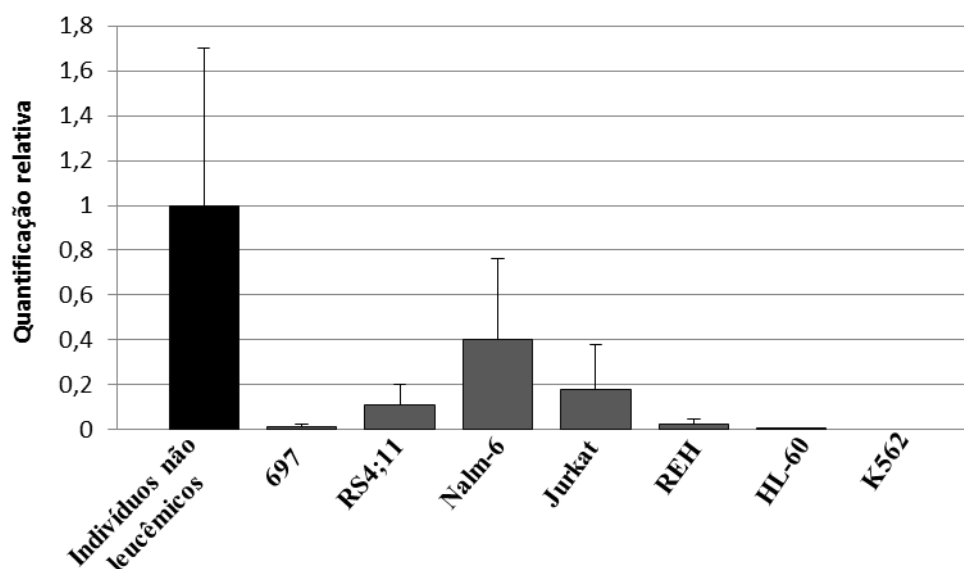
Os resultados da análise da quantificação relativa da expressão do transcrito de *SIDTI* demonstram que o gene foi regulado negativamente nas sete linhagens de células

leucêmicas humanas analisadas, principalmente para as linhagens de células 697, REH e HL-60 quando comparado com as amostras não leucêmicas (Figura 7). A linhagem celular K562 não apresentou qualquer expressão do gene *SIDT1*, uma vez que o mRNA não foi detectado por RT-qPCR. Os níveis da expressão do mRNA de *SIDT1* também foram observados regulados negativamente em amostras clínicas positivas para LLA, LMA e LMC em relação aos indivíduos não leucêmicos (Figura 8).

**Tabela 4.** População de referência do estudo de indivíduos leucêmicos e não leucêmicos da análise da expressão do gene *SIDT1*.

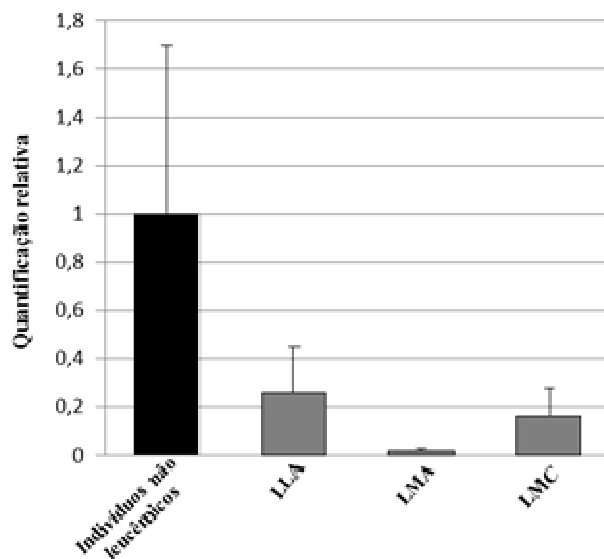
População	Idade ao diagnóstico	Número de amostras	Alterações genéticas encontradas
não leucêmico	20 a 45	27	-
LLA	2 a 15	57	t(12;21) t(1;19) t(9;22)p190 del(2) hiperdiploidia
LMA	2 a 69	9	t(8;21) t(15;17) inv(16)
LMC	19 a 81	14	t(9;22) p210

Não leucêmico: controle, LLA: Leucemia Linfóide Aguda, LMA: Leucemia Mieloide Aguda, LMC: Leucemia Mieloide Crônica.



**Figura 7.** Quantificação relativa do nível de mRNA do gene *SIDT1* em indivíduos não leucêmicos e linhagens de células leucêmicas. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. As médias de todas as linhagens foram consideradas estatisticamente significativas em comparação aos indivíduos não leucêmicos ( $p < 0,05$ ). LLA: Leucemia Linfóide Aguda, LMA: Leucemia Mieloide Aguda, LMC: Leucemia Mieloide Crônica, 697: LLA precursor de células B, RS 4;11: LLA precursor de células B, Nalm-6: LLA precursor de células B, Jurkat: LLA precursor de células T, REH: LLA precursor de células B, HL-60: LMA, K562: LMC em crise blástica.





**Figura 8.** Quantificação relativa do nível de mRNA do gene *SIDT1* em indivíduos não leucêmicos e leucêmicos para o grupo LLA, LMA e LMC. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. As médias foram consideradas estatisticamente significativas em comparação aos indivíduos não leucêmicos ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

O conhecimento da análise molecular que permite uma rápida avaliação da expressão gênica tem se tornado essencial na avaliação das leucemias, pois contribui para a orientação do melhor esquema terapêutico permitindo uma melhora na sobrevivência dos pacientes.

Considerando a grande relevância da realização do exame diagnóstico molecular em pacientes leucêmicos, verificou-se a necessidade de se realizar a implantação de uma Unidade de Diagnóstico Molecular para detecção de rearranjos cromossômicos recorrentes em leucemia no Distrito Federal. Esta ação beneficiará a todos os pacientes portadores de leucemias admitidos no Núcleo de Oncologia e Hematologia do Hospital de Base do Distrito Federal (Brasília-DF) ao possibilitar que esse exame seja realizado de forma rotineira e acessível.

A análise molecular para a detecção do transcrito gênico foi realizada em 48 amostras clínicas e obteve-se resultado positivo em 13, respectivamente neste grupo de estudo. Na análise das amostras com suspeita de LLA, os valores obtidos para a fusão *BCR-ABL1*, p190 (8,3%) foi inferior à frequência relatada na literatura (20 a 30%) (WETZLER et al., 2004). No entanto, para a fusão *E2A-PBX1* (8,3%) foi superior (3%) (HUNGER et al., 1997; VEY et al., 2006). Estes resultados podem ser consequência do pequeno número de amostras analisadas.

Nas amostras com suspeita de LMA, apenas o transcrito *PML-RAR $\alpha$*  do subtipo *bcr3* (16,6%) foi detectado. O subtipo de maior expressão foi diferente do relatado por alguns autores (Chauffaille et al., 2001; Douer, 2003; Melo et al., 2006) que relatam que pacientes oriundos da América Latina apresentam uma alta incidência de transcritos *bcr1/2* e que a variabilidade genética, correlacionada à distribuição geográfica, pode influenciar na frequência de um determinado sítio de quebra do gene *PML*.

Os valores encontrados na análise da expressão do transcrito *BCR-ABL1* (64,2%) foram diferentes em relação ao relatado na literatura em que 95% dos casos de LMC apresentam o transcrito *BCR-ABL1*, p210 (van Dongen et al., 1999). Essa diferença pode ser devido ao número pequeno de amostras analisadas. Entretanto, ao observar a diferença de expressão entre os dois transcritos (*b3-a2* 42,8% e *b2-a2* 21,4%), o predomínio do transcrito *b3-a2*, foi semelhante ao estudo de Verschraegen et al., (1995) que encontrou uma frequência do transcrito *b3-a2* e *b2-a2* de 67,9% e 30,2% . Em outro estudo a

frequência foi de *b3-a2* (67,21%) e *b2-a2* (28,42%) (ANAND et al., 2012). De acordo com Melo (1996) a maioria dos pacientes com LMC apresenta uma frequência de 55% para o transcrito *b3-a2* e 40% para o transcrito *b2-a2*. Em 5% dos casos, ambos transcritos *b3-a2* e *b2-a2* podem ser encontrados como um resultado de splicing alternativo.

A análise dos transcritos gênicos por RT-PCR é de grande importância ao complementar os dados clínicos da citogenética e imunofenotipagem para auxiliar em um diagnóstico mais preciso. É uma técnica sensível, na qual a detecção molecular de transcritos gênicos é a partir de 1 célula leucêmica em  $10^4$  células normais (van DONGEN et al., 1999).

A técnica molecular RT-PCR tem sido cada vez mais utilizada na detecção de alterações cromossômicas recorrentes para auxiliar na avaliação dos pacientes, especialmente em termos de diagnóstico, prognóstico, estratificação de risco, monitoramento da eficácia do tratamento e detecção de doença residual mínima.

A caracterização dos pacientes adultos com leucemia mieloide aguda de acordo com a alteração cromossômica proporciona uma base importante para a seleção da terapia a ser utilizada. Na leucemia promielocítica aguda, por exemplo, os resultados da remissão em pacientes com a translocação *t(15;17)/PML-RAR $\alpha$* , melhoraram substancialmente (90%) com a utilização do ácido trans-retinóico em combinação com a quimioterapia, mas o fármaco é, sem benefício para os pacientes sem esta translocação (TALLMAN; ALTMAN, 2009). Além disso, a análise das células residuais do transcrito *PML-RAR $\alpha$*  prediz fortemente uma recaída e, portanto, é um parâmetro importante para as decisões no tratamento (SCHNITTGER et al., 2003).

Os transcritos *CBFB-MYH11* e *AML1-ETO* embora estejam associados a um prognóstico favorável sua identificação é de grande importância para distinguir entre os subtipos de LMAs que necessitam de estratégias terapêuticas intensivas (GRIMWADE et al., 2001).

Nos pacientes com suspeita de LLA, a análise molecular utilizada para diferenciar entre os diferentes tipos de transcritos gênicos é fundamental para a estratificação dos grupos de risco, especialmente para os transcritos gênicos associados a um prognóstico desfavorável, como por exemplo, os transcritos *BCR-ABL1*, *MLL-AF4* e *E2A-PBX1*.

O cromossomo Philadelphia, resultante da translocação *t(9;22)/BCR-ABL1*, compreende de 20 a 30% dos casos adultos com LLA (WETZLER et al., 2004). A remissão completa pode ser alcançada em 80 a 90%, entretanto, quando o diagnóstico é

realizado no início da doença a remissão completa é alcançada em aproximadamente 95% (ROWE, 2009; LEE et al., 2011).

A translocação  $t(4;11)/MLL-AF4$  é responsável por aproximadamente 7% em adultos. Sua taxa de remissão completa é de 75% (TAMAI; INOKUCHI, 2010). Sua identificação ajuda a estabelecer a melhor abordagem terapêutica, incluindo a possibilidade de intensificação do tratamento e de prever a evolução clínica (MARCHESI et al., 2011b).

A translocação  $t(1;19)/E2A-PBX1$  está presente em 5 a 6% dos casos em crianças e aproximadamente 3% dos adultos e tem sido associada a um prognóstico desfavorável. Estudos pediátricos recentes têm mostrado que a utilização do regime de quimioterapia intensiva é capaz de superar o mau resultado de doentes com esta translocação. No entanto, para os pacientes com esta anormalidade precisa-se de uma estratégia adequada de tratamento (VEY et al., 2006; GARG et al., 2009).

A translocação  $t(12;21)$  resultante do rearranjo gênico *TEL-AML1* tem sido demonstrada ser a mais frequente em crianças com LLA (MCLEAN et al., 1996) e ocorre raramente em adultos (1 a 3%) (MOORMAN et al., 2003). Embora seja difícil de ser identificada por técnicas citogenéticas, o uso de técnicas moleculares permitiu diferenciá-la das outras LLAs e identificar a frequência desta translocação.

A identificação da fusão gênica *BCR-ABL1* também é importante ao diferenciar entre as neoplasias mieloproliferativas, que incluem a leucemia mieloide crônica, policitemia vera, mielofibrose idiopática crônica e trombocitemia essencial (SPIVAK; SILVER, 2008). O transcrito *BCR-ABL1* é detectado em 90-95% dos pacientes com LMC (cromossomo Ph positivo) (KURZROCK et al., 2001).

O diagnóstico molecular estabelecido no Laboratório de Biologia do Gene, foi realizado em amostras de pacientes com leucemias ao diagnóstico, registrados no HB-DF. Diante dos resultados obtidos permitiram a transferência da metodologia de Diagnóstico molecular de Leucemias para o HB-DF, e possibilitou incorporar o exame molecular como exame de rotina aos pacientes com suspeita de leucemia.

Na análise da expressão gênica, alguns autores (PABST; MUELLER 2007; MAJETI et al., 2009) têm demonstrado que a transformação de células normais em células leucêmicas, caracterizada por alterações genéticas, promove a regulação negativa e positiva de múltiplos genes e a desregulação de vários mecanismos celulares. Alguns genes são regulados por apenas uma proteína de fusão, ao passo que outros são regulados

por duas ou mais (ALCALAY et al., 2003). Nossos estudos sugerem que, o gene *SIDTI* é regulado por diferentes alterações genéticas, entretanto, algumas são mais agressivas como demonstrado nos dados da LMA e das linhagens 697, REH, HL-60 e K562.

Diante dos resultados obtidos na análise das linhagens celulares, cada uma com sua alteração genética específica, sugere-se que a diferença no número de transcritos observado neste estudo, tanto nas linhagens celulares quanto nas amostras clínicas, possa ser associada às diferentes translocações cromossômicas e suas mutações adicionais. Fine et al. (2004) sugerem que os distintos mecanismos da leucemogênese que podem ser associados às diferentes translocações cromossômicas seria refletida em diferentes padrões de expressão de genes que são compartilhados pelas amostras clínicas e linhagens de células com a mesma translocação em LLA.

Nesse estudo, observamos uma variação na quantidade relativa do mRNA do *SIDTI* entre os subtipos de LLA, LMA e LMC. Dos três subtipos, a LMA foi a que apresentou níveis de expressão do gene *SIDTI* mais baixos em relação aos indivíduos não leucêmicos. Alcalay et al., (2001) relata que na maioria dos casos de LMA, as translocações cromossômicas envolvem fatores de transcrição necessários para a diferenciação mielóide normal. Esses fatores de transcrição anormais, ativados em subtipos específicos de LMA, interferem com o processo de diferenciação mielóide que são essenciais em várias fases da hematopoiese. No entanto, estes não são por si só suficientes para provocar leucemia aguda, mas evidências sugerem que mutações secundárias são necessárias (GILLILAND, 2002). Tais alterações genéticas adicionais incluem mutações nos genes que codificam proteínas que controlam a proliferação celular e conferem vantagem de sobrevivência as células malignas (PASCHKA et al., 2012).

Distintos perfis de expressão gênica foram encontrados em um estudo de análise da expressão em amostras clínicas com as alterações gênicas *BCR-ABL*, *E2A-PBX1*, *TEL-AML1* e rearranjos no gene *MLL* (YEOH et al. 2002). Em outro estudo, com linhagens celulares de LMAs envolvendo rearranjos com o gene *CBF* (*core-binding factor*), essencial para a hematopoiese normal, observou que 39 genes foram regulados negativamente (ANDERSSON et al., 2005; HART; FORONI, 2002).

A diferença obtida entre a linhagem celular K562 e os indivíduos com LMC, em que ambos expressam o transcrito gênico *BCR-ABL1*, sugere-se que seja devido à linhagem celular K562 ser derivada de pacientes com LMC em crise blástica, entretanto nas amostras clínicas com LMC analisadas todos estavam na fase crônica da doença.

Nowicki et al. (2003) relatam que a progressão da LMC em fase crônica para crise blástica está associada a grandes alterações no fenótipo e genótipo das células leucêmicas, o que é refletido pelas diferenças de perfil de expressão gênica.

A LMC em crise blástica é fundamentalmente diferente da fase crônica em muitos aspectos. As principais alterações funcionais que ocorrem na progressão da LMC são marcadas por alterações na proliferação, diferenciação, apoptose e adesão celular. Estas alterações funcionais são acompanhadas por translocações recorrentes. Entre elas estão a  $t(3;21)AML-1/EVI-1$  e  $t(7;11)NUP98/HOXA9$ , cuja expressão bloqueia a diferenciação celular na presença do transcrito *AML-1/EVI-1*, e aumento da proliferação no caso do transcrito *NUP98/HOXA9* (RADICH, 2007). O bloqueio da diferenciação celular também é provocado pela regulação negativa do fator transcricional *C/EBP $\alpha$*  (PERROTTI et al., 2002). A inativação do gene supressor de tumor  $p16^{INK4a}$  e *protein phosphatase 2A* (PP2A) também têm sido associados com a progressão da LMC para a crise blástica (SHET et al., 2002; NEVIANI et al., 2005).

Na análise da expressão gênica em amostras com LMC realizada por Nowicki et al. (2003) foi observado que a expressão de 263 genes envolvidos em várias funções celulares foi alterada (148 regulados positivamente e 115 regulado negativamente). Genes que codificam fatores de transcrição, conhecidos em promover e manter a proliferação de células progenitoras hematopoiéticas precoces (*GATA2*, *KFL1*, *SCL7*) foram regulados positivamente, inversamente, reguladores de transcrição, que tem como função regular a diferenciação (*CEBPB*, *ICSBP1*), e também genes associados com a maturação de células hematopoiéticas (*MNDA*, *CLC*), foram regulados negativamente.

Recentemente, Elhassan et al. (2012), em estudo com células de adenocarcinoma forneceram novas evidências que *SIDT1* dependente do contato celular facilita a transferência de siRNA entre as células humanas e sugere que *SIDT1* pode ter um papel "permissivo" em alguns dos efeitos fenotípicos da superexpressão de miR-21, que promove resistência terapêutica em vários câncer humanos.

A expressão alterada de microRNAs (miRNAs)/[ uma nova classe de RNAs não codificantes que regulam a expressão de RNA mensageiro e de proteínas de genes alvo, foi recentemente demonstrada ter um papel essencial no processo da leucemogênese (MARCUCCI et al., 2009). Rokah et al. (2012) identificou três miRNAs (miR-31, miR-155 and miR-564) regulados negativamente em linhagens de células e em pacientes com LMC, em comparação com indivíduos não leucêmicos. Isken et al. (2008) identificou que

o miR-23b foi regulado negativamente, enquanto que os miR-221/222 e miR-34a foram superexpressos em LMAs. Com base nas evidências de Elhassan et al. (2012) sugerimos que a regulação dos miRNAs poderia ser ocasionada pela ação de *SIDT1*.

Nesse estudo, os nossos resultados demonstram que a presença de alterações celulares que levam ao diagnóstico de leucemia provocam alterações no nível de expressão de mRNA de um gene que é essencial na via de ativação da via de RNA interferente. Os mecanismos que levam esta diminuição ainda são desconhecidos, já que há poucos estudos sobre o gene *SIDT1*. No entanto, estudos futuros são necessários para elucidar a importância da baixa expressão do gene *SIDT1* na patogênese da leucemia.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No estudo sobre a análise molecular dos rearranjos cromossômicos, esse trabalho permitiu a instalação de uma unidade de diagnóstico molecular de leucemia no Hospital de Base do Distrito Federal para auxiliar na estratificação de risco dos pacientes e na escolha de um método terapêutico adequado.

Sugerimos que as alterações genéticas que ocorrem nas células leucêmicas regulam negativamente a expressão do gene *SIDT1* que desempenha importante função no mecanismo de RNAi. Como perspectiva, vemos a necessidade de concluir com os experimentos de clonagem e expressão do gene *SIDT1* na linhagem K562 e subsequente silenciamento do gene *BCR-ABL1* que foram iniciados com o interesse de compreender melhor a função do gene *SIDT1* e verificar se sua expressão permite à célula ser mais susceptível ao RNAi. Além disso, novos experimentos para determinar possíveis fatores de transcrição envolvidos no controle da expressão do gene *SIDT1* devem ser realizados para a elucidação desta desregulação envolvendo diferentes alterações genéticas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, H.; BAR-ELI, M.; ARLIN, Z.; ADVANI, S.; et al. The spectrum of molecular alterations in the evolution of chronic myelocytic leukemia. *J Clin Invest*, 87(6): 2042-2047, 1991.

ALCALAY, M.; ORLETH, A.; SEBASTIANI, C.; MEANI, N.; et al. Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Oncogene*, 20(40): 5680-5694, 2001.

ALCALAY, M.; MEANI, N.; GELMETTI, V.; FANTOZZI, A.; et al. Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. *J Clin Invest*, 112(11): 1751-1761, 2003.

ALVAREZ-GARCIA, I.; MISKA, E.A. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 132(21): 4653-4662, 2005.

AMERES, S.L.; MARTINEZ, J.; SCHROEDER, R. Molecular Basis for Target RNA Recognition and Cleavage by Human RISC. *Cell*, 130(1): 101-112, 2007.

ANAND, M.S.; VARMA, N.; VARMA, S.; RANA, K.S.; et al. Cytogenetic & molecular analyses in adult chronic myelogenous leukaemia patients in north India. *Indian J Med Res*, 135: 42-48, 2012.

ANDERSSON, A.; EDÉN, P.; LINDGREN, D.; NILSSON, J.; et al. Gene expression profiling of leukemic cell lines reveals conserved molecular signatures among subtypes with specific genetic aberrations. *Leukemia*, 19(6): 1042-1050, 2005.

APPELBAUM, F.R.; GUNDAKER, H.; HEAD, D.R.; SLOVAK, M.L.; et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*, 107(9): 3481-3485, 2006.

AYTON PM, CLEARY ML. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene*, 20(40): 5695-5707, 2001.

BACHER, U.; SCHNITTGER, S.; HAFERLACH, T. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*, 22(6): 646-655, 2010.

BARJESTEHE VAN WAALWIJK VAN DOORN-KHOSROVANI, S.; ERPELINCK, C.; MEIJER, J.; VAN OOSTERHOUD, S.; et al. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *J Hematol*, 4(1): 31-40, 2003.

BARTEL, D. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2): 281-297, 2004.

BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. *Environ Health Perspect*, 115(1): 138-145, 2007.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French American British Cooperative Group. *Ann Int Med*, 103(4): 620-625, 1985.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; et al. Proposal for the classification of the acute leucemias. French-American-British (FAB) cooperative group. *Br J Haematol*, 33(4): 451-458, 1976.

BERNARD, O.A.; BUSSON-LECONIAT, M.; BALLERINI, P.; MAUCHAUFFÉ, M.; et al. A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5;14)(q35;q32), is associated with expression of the Hox11L2 gene in T acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 15(10): 1495-1504, 2001.

BHAGAVATHI, S.; CZADER, M. MicroRNAs in Benign and Malignant Hematopoiesis. *Arch Pathol Lab Med*, 134(9): 1276-1281, 2010.

BOROWITZ, M.J.; HUNGER, S.P.; CARROLL, A.J.; SHUSTER, J.J.; et al. Predictability of the t(1;19)(q23;p13) from surface antigen phenotype: implications for screening cases of childhood acute lymphoblastic leukemia for molecular analysis: a Pediatric Oncology Group study. *Blood*, 82(4): 1086-1091, 1993.

BOXER, M.L. The role of oncogenes in hematologic malignancies. *Annu Rev Med*, 45: 1-11, 1994.

BRENNECKE, J.; STARK, A.; RUSSELL, R.B.; COHEN, S.M. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 3(3): e85, 2005.

BRUNS, I.; CZIBERE, A.; FISCHER, J.C.; ROELS, F.; et al. The hematopoietic stem cell in chronic phase CML is characterized by a transcriptional profile resembling normal myeloid progenitor cells and reflecting loss of quiescence. *Leukemia*, 23(5): 892-899, 2009.

BUCKINGHAM, S.D.; ESMAEILI, B.; WOOD, W.; SATTELLE, D.B. RNA interference: from model organisms towards therapy for neural and neuromuscular disorders. *Hum Mol genet*, 13(2): 275-288, 2004.

BUFFLER, P.A.; KWAN, M.L. Environmental and Genetic Risk Factors for Childhood Leukemia: Appraising the Evidence. *Cancer Invest*, 23(1): 60-75, 2005.

CALABRETTA, B.; PERROTTI, D. The biology of CML blast crisis. *Blood*, 103: 4010-4022, 2004.

CALIN, G.A.; DUMITRU, C.D.; SHIMIZU, M.; BICHI, R.; et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(24): 15524-15529, 2002.

CALIN, G.A.; SEVIGNANI, C.; DUMITRU, C.D.; HYSLOP, T.; et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(9): 2999-3004, 2004.

CHAUFFAILLE, M.L.; FIGUEIREDO, M.S.; BELTRANI, R.; ANTUNES, S.V.; et al. 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*, 34(6):735-743, 2001.

CHEN, C.Z.; LI, L.; LODISH, H.F.; BARTEL, D.P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 303(5654): 83-86, 2004.

CHIARETTI, S.; MESSINA, M.; TAVOLARO, S.; ZARDO, G.; et al. Gene expression profiling identifies a subset of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia with myeloid-like gene features and over-expression of miR-223. *Haematologica*, 95(7): 1114-1121, 2010.

CIMMINO, A.; CALIN, G.A., FABBRI, M.; IORIO, M.V.; et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(39): 13944-13949, 2005.

CLARKSON, B.; STRIFE, A.; WISNIEWSKI, D.; LAMBEK, C.L.; LIU, C. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia*, 17(7): 1211-1262, 2003.

CORTES, J.E.; KANTARJIAN, H.M. Acute lymphoblastic leukemia. A comprehensive review with emphasis on biology and therapy. *Cancer*, 76(12): 2393-2417, 1995.

COUSTAN-SMITH, E.; RIBEIRO, R.C.; RUBNITZ, J.E.; RAZZOUK, B.I.; et al. Clinical significance of residual disease during treatment in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 123(2): 243-252, 2003.

CRANS, H.N.; SAKAMOTO, K.M. Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia. *Leukemia*, 15(3): 313-331, 2001.

DESCHLER, B.; LUBBERT, M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*, 107(9): 2099-2107, 2006.

DIEROV, J.; SANCHEZ, P.V.; BURKE, B.A.; PADILLA-NASH, H.; et al. BCR/ABL induces chromosomal instability after genotoxic stress and alters the cell death threshold. *Leukemia*, 23: 279-286, 2009.

DINGER, M.E.; MERCER, T.R.; MATTICK, J.S. RNAs as extracellular signaling molecules. *J Mol Endocrinol*, 40(4): 151-159, 2008.

DONG, H.Y.; KUNG, J.X.; BHARDWAJ, V.; MCGILL, J. Flow Cytometry Rapidly Identifies All Acute Promyelocytic Leukemias With High Specificity Independent of Underlying Cytogenetic Abnormalities. *Am J Clin Pathol*, 135(1): 76-84, 2011.

DOUER, D. The epidemiology of acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 16(3):357-367, 2003.

DOWNING, J.R. The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance. *Br J Haematol*, 106(2): 296-308, 1999.

DRUNAT, S.; OLIVI, M.; BRUNIE, G.; GRANDCHAMP, B.; et al. Quantification of TEL-AML1 transcript for minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 114(2): 281-289, 2001.

DU, T.; ZAMORE, P.D. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, 132: 4645-4652, 2005.

DUXBURY, M.S.; ASHLEY, S.W.; WHANG, E.E. RNA interference: A mammalian SID-1 homologue enhances siRNA uptake and gene silencing efficacy in human cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 331(2): 459-463, 2005.

ELBASHIR, S.M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15(2): 188-200, 2001a.

ELBASHIR, S.M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALCIN, A.; et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411: 494-498, 2001b.

ELBASHIR, S.M.; HARBORTH, J.; WEBER, K.; TUSCH, T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 26(2): 199-213, 2002.

ELHASSAN, M.O.; CHRISTIE, J.; DUXBURY, M.S. Homo sapiens Systemic RNA Interference-defective-1 Transmembrane Family Member 1 (SIDT1) Protein Mediates Contact-dependent Small RNA Transfer and MicroRNA-21-driven Chemoresistance. *J Biol Chem*, 287(8): 5267-5277, 2012.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F.J. Oncomirs- miRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(4): 259-269, 2006.

FARAG, S.S.; ARCHER, K.J.; MROZEK, K.; RUPPERT, A.S.; et al. Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood*, 108(1): 63-73, 2006.

FEINBERG, E.H.; HUNTER, C.P. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*, 301(5639): 1545-1547, 2003.

FERRARA, F.; SCHIFFER, C.A. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet*, 381(9865): 484-495, 2013.

FERRANDO, A.A.; NEUBERG, D.S.; STAUNTON, J.; LOH, M.L.; et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*, 1(1): 75-87, 2002.

FINE, B.M.; STANULLA, M.; SCHRAPPE, M.; HO, M.; VIEHMANN, S.; et al. Gene expression patterns associated with recurrent chromosomal translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 103(3): 1043-1049, 2004.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669): 806-811, 1998.

FROHLING, S.; SCHLENK, R.F.; STOLZE, I.; BIHLMAYR, J.; et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*, 22(4): 624-633, 2004.

FROHLING, S.; SCHLENK, R.F.; KAYSER, S.; MORHARDT, M.; et al. Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: Results from AML SG trial AMLHD 98-B. *Blood*, 108(10): 3280-3288, 2006.

GARG, R.; KANTARJIAN, H.; THOMAS, D.; FADERL, S.; et al. Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia and Translocation (1;19) Abnormality Have a Favorable Outcome With Hyperfractionated Cyclophosphamide, Vincristine, Doxorubicin, and Dexamethasone Alternating With Methotrexate and High-Dose Cytarabine Chemotherapy. *Cancer*, 115(10): 2147-2154, 2009.

GARZON, R.; CROCE, C.M. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hemato*, 15(14): 352-358, 2008.

GARZON, R.; GAROFALO, M.; MARTELLI, M.P.; BRIESEWITZ, R.; et al. Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci*, 105(10): 3945-3950, 2008.

GERVASINI, G.; VAGACE, J.M. Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Front Genet*, 3: 1-11, 2012.

GILLILAND, D.G. Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Semin Hematol*, 39(4): 6-11, 2002.

GILLILAND, D.G.; TALLMAN, M.S. Focus on acute leukemias. *Cancer Cell*, 1(5): 417-420, 2002.

GLEISSNER, B.; GOEKBUGET, N.; RIEDER, H.; ARNOLD, R.; et al. CD10-pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a distinct high-risk subgroup of adult ALL associated with a high frequency of MLL aberrations: results of the German Multicenter Trials for Adult ALL (GMALL). *Blood*, 106: 4054-4056, 2005.

GREGORY, T.K.; WALD, D.; CHEN, Y.; VERMAAT, J.M.; et al. Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *J Hematol Oncol*, 2(23): 1-10, 2009.

GREAVES, M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature*, 6: 194-203, 2006.

GRIMWADE, D.; WALKER, H.; HARRISON, G.; OLIVER, F.; et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*, 98(5): 1312-1320, 2001.

HALL, I.J.; GIOELI, D.; WEISSMAN, B.E.; TISTY, T.D. Identification of additional complementation groups that regulate genomic instability. *Genes Chromosomes Cancer*, 20(2): 102-112, 1997.

HART, S.M.; FORONI, L. Core binding factor genes and human leukemia. *Haematologica*, 87(12): 1307-1323, 2002.

HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; DIEBOLD, J.; FLANDRIN, G.; et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House Virginia. *J Clin Oncol*, 17(12): 3835-3849, 1999.

HAN, X.; BUESO-RAMOS, C.E. Precursor T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoblastic Lymphoma and Acute Biphentotypic Leukemias. *Am J Clin Pathol*, 127(4): 528-544, 2007.

HEIDENREICH, O.; KRAUTER, J.; RIEHLE, H.; HADWIGER, P.; et al. AML1/MTG8 oncogene suppression by small interfering RNAs supports myeloid differentiation of t(8;21)-positive leukemic cells. *Blood*, 101(8): 3157-3163, 2003.

HOLEN, T.; AMARZGUIOUI, M.; WIIGER, M.T.; BABAIE, E.; et al. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Research*, 30(8): 1757-1766, 2002.

HURET, J.L.; DESSEN, P.; BERNHEIM, A. An atlas of chromosomes in hematological malignancies. Example: 11q23 and MLL. *Leukemia*, 15(6): 987-999, 2001.

HUNGER, S.P.; SUN, T.; BOSWELL, A.F.; CARROLL, A.J.; et al. Hyperdiploidy and E2A-PBX1 fusion in an adult with t(1;19)+ acute lymphoblastic leukemia: case report and review of the literature. *Genes Chromosomes Cancer*, 20(4): 392-398, 1997.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br): Acesso em: 17/04/2013.

ISKEN, F.; STEFFEN, B.; MERK, S.; DUGAS, M.; et al. Identification of acute myeloid leukaemia associated microRNA expression patterns. *Br J Haematol*, 140: 153-161, 2008.

KALEEM, Z.; CRAWFORD, E.; PATHAN, M.H.; JASPER, L.; et al. Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data. *Arch Pathol Lab Med*, 127(1): 42-48, 2003.

KEESHAN, K.; SANTILLI, G.; CORRADINI, F.; PERROTTI, D.; et al. Transcription activation function of C/EBP $\alpha$  is required for induction of granulocytic differentiation. *Blood*, 102(4): 1267-1275, 2003.

KIM, D.H.; ROSSI, J.J. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nature*, 89(3): 173-184, 2007.

KLEPIN, H.D.; BALDUCCI, L. Acute Myelogenous Leukemia in Older Adults. *Oncologist*, 14(3): 222-232, 2009.



KOBAYASHI, I.; TSUKIOKA, H.; KÔMOTO, N.; UCHINO, K.; et al. SID-1 protein of *Caenorhabditis elegans* mediates uptake of dsRNA into *Bombyx* cells. *Insect Biochem Mol Biol*, 42(2): 148-154, 2012.

KOZU, T.; MIYOSHI, H.; SHIMIZU, K.; MASEKI, N.; et al. Junctions of the AML1/MTG8(ETO) fusion are constant in t(8;21) acute myeloid leukemia detected by reverse transcription polymerase chain reaction. *Blood*, 82(4): 1270-1276, 1993.

KURZROCK, R.; SHTALRID, M.; ROMERO, P.; KLOETZER, W.S.; et al. A novel c-abl protein product in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Nature*, 325(6105): 631-635, 1987.

KURZROCK, R.; BUESO-RAMOS, C.E.; KANTARJIAN, H.; FREIREICH, E.; et al. BCR rearrangement–negative chronic myelogenous leukemia revisited. *JCO*, 19(11) 2915-2926, 2001.

LAI, E.C. Predicting and validating microRNA targets. *Genome Biol*, 5(9): 115, 2004.

LANDRY, B.; ALIABADI, H.M.; SAMUEL, A.; GUL-ULUDAG, H.; et al. Effective Non-Viral Delivery of siRNA to Acute Myeloid Leukemia Cells with Lipid-Substituted Polyethylenimines. *PLoS ONE*, 7(8): 1-19, 2012.

LARSON, R.A.; DODGE, R.K.; BLOOMFIELD, C.D.; SCHIFFER, C.A. Treatment of biologically determined subsets of acute lymphoblastic leukemia in adults: Cancer and Leukemia Group B studies. *Acute Leukemias VI*. Springer Berlin Heidelberg, 38: 677-686, 1997.

LEE, Y.; JEON, K.; LEE, J.T.; KIM, S.; MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, 21(17): 4663-4670, 2002.

LEE, H.J.; THOMPSON, J.E.; WANG, E.S.; WETZLER, M. Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer*, 117: 1583-1594, 2011.

LICHT, J.D.; STERNBERG, D.W. The Molecular Pathology of Acute Myeloid Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 137-142, 2005.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Method*, 25(4): 402-408, 2001.

LOOK, A.T. Oncogenic transcription factors in the human acute leucemias. *Science*, 278(5340): 1059-1064, 1997.

LOWENBERG, B.; DOWNING, J.R.; BURNETT, A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 341(14): 1051-62, 1999.

LU, J.; GETZ, G.; MISKA, E.A.; ALVAREZ-SAAVEDRA, E.; et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043): 834-838, 2005.

MAJETI, R.; BECKER, M.W.; TIAN, Q.; LEE, T.L. et al. Dysregulated gene expression networks in human acute myelogenous leukemia stem cells. *Proc Natl Acad Sci*, 106(9): 3396-3401, 2009.

MARCUCCI, G.; MROZEK, K.; BLOOMFIELD, C.D. Molecular heterogeneity and prognostic biomarkers in adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics. *Curr Opin Hematol*, 12(1): 68-75, 2005.

MARCUCCI, G.; MROZEK, K.; RADMACHER, M.D.; BLOOMFIELD, C.D.; et al. MicroRNA expression profiling in acute myeloid and chronic lymphocytic leukaemias. *Best Pract Res Clin Haematol*, 22(2): 239-248, 2009.

MARCHESI, F.; ANNIBALI, O.; CERCHIARA, E.; TIRINDELLI, M.C.; et al. Cytogenetic abnormalities in adult non-promyelocytic acute myeloid leukemia: A concise review Oncology/Hematology. *Crit Rev Oncol Hematol*, 80(3): 331-346, 2011a.

MARCHESI, F.; GIRARDI, K.; AVVISATI, G. Pathogenetic, Clinical, and Prognostic Features of Adult t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4 Positive B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Advances in Hematology*, ID 621627, 1-8, 2011b.

MARLEY, S.B.; GORDON, M.Y. Chronic myeloid leukaemia: stem cell derived but progenitor cell driven. *Clin Sci*, 109(1): 13-25, 2005.

MARTINEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; URLAUB, H.; LUHRMANN, R.; et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110(5): 563-574, 2002.

MCLEAN, T.W.; RINGOLD, S.; NEUBERG, D.; STEGMAIER, K.; et al. TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favourable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 88(11): 4252-4258, 1996.

MEIJERINK, J.P.P.; DEN BOER, M.L.; PIETERS, R. New Genetic Abnormalities and Treatment Response in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Semin Hematol*, 46(1): 16-23, 2009.

MELLO, C.C.; CONTE, D.J.R. Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 431(7006): 338-342, 2004.

MELO, J.V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*, 88(7): 2375-2384, 1996.

MELO, J.V.; DEININGER, M.W. Biology of chronic myelogenous leucemia-signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin North Am*;18(3): 545-568, 2004.

MELO, R.A.; DE VASCONCELLOS, J.F.; MELO, F.C.; MACHADO, C.G.; et al. PML-RARalpha fusion gene transcripts and biological features in acute promyelocytic leukemia patients. *Clin Lab Haematol*, 28(2):126-129, 2006.

MI, S.; CAI, T.; HU, Y.; CHEN, Y.; et al. Sorting of Small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes Is Directed by the 50 Terminal Nucleotide. *Cell*, 133(1): 116-127, 2008.

MI, S.; LU, J.; SUN, M.; LI, Z.; et al. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(50): 19971-19976, 2007.

MONTGOMERY, M.K.; XU, S.; FIRE, A. RNA as a target of double-stranded RNA mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(26): 15502-15507, 1998.

MOORMAN, A.V.; MARTINEAU, M.; HARRISON, C.J. Response to Cuneo et al. *Leukemia*, 17: 477, 2003.

MROZEK, K.; MARCUCCI, G.; PASCHKA, P.; WHITMAN, S.P.; et al. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*, 109(2): 431-448, 2007.

MUELLER, B.U.; PABST, T.; OSATO, M.; ASOU, N.; et al. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood*, 100(3): 998-1007, 2002.

MULLIGHAN, C.G. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 389-96, 2012.

MULLIGHAN, C.G.; WILLIAMS, R.T.; DOWNING, J.R.; SHERR, C.J. Failure of CDKN2A/B (INK4A/B-ARF)-mediated tumor suppression and resistance to targeted therapy in acute lymphoblastic leukemia induced by BCR-ABL. *Genes Dev*, 22(11): 1411-1415, 2008.

NAKAYAMA, H.; ISHIMARU, F.; AVITAH, N.; SEZAKI, N.; et al. Decreases in Ikaros activity correlate with blast crisis in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res*, 59(16): 3931-3934, 1999.

NEVIANI, P.; SANTHANAM, R.; TROTTA, R.; NOTARI, M.; et al. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell*, 8(5): 355-368, 2005.

NORDGREN, A.; FARNEBO, F.; JOHANSSON, B.; HOLMGREN, G.; et al. Identification of numerical and structural chromosome aberrations in 15 high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemias using spectral karyotyping. *Eur J Haematol*, 66(5): 297-304, 2001.

NOWICKI, M.O.; PAWLOWSKI, P.; FISCHER, T.; HESS, G.; et al. Chronic myelogenous leukemia molecular signature. *Oncogene*, 22(25): 3952-3963, 2003.

OLIVEIRA, D.M.; GOODELL, M.A. Transient RNA interference in hematopoietic progenitors with functional consequences. *Genesis*, 36(4): 203-208, 2003.

OTTMANN, O.G.; WASSMANN, B. Treatment of Philadelphia Chromosome - Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Am Soc Hematol Educ Program*, 1: 118-122, 2005.

PABST, T.; MUELLER, B.U. Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML. *Oncogene*, 26(47): 6829-6837, 2007.

PABST, T.; MUELLER, B.U.; ZHANG, P.; RADOMSKA, H.S.; et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBP $\alpha$ ), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet*, 27(3): 263-270, 2001.

PALLISGAARD, N.; HOKLAND, P.; RIISHOJ, D.C.; PEDERSEN, B.; et al. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood*, 92(2): 574-588, 1998.

PARK, S.; CHAPUIS, N.; TAMBURINI, J.; BARDET, V.; et al. Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Haematol*, 95(5): 819-828, 2010.

PASCHKA, P.; DU, J.; SCHLE K, R.F.; GAIDZIK, V.I.; et al. Secondary genetic lesions in acute myeloid leukemia with inv(16) or t(16;16): a study of the German-Austrian AML Study Group (AML5SG). *Blood*, 121(1): 170-177, 2012.

PASTERNAK, G.; HOCHHAUS, A.; SCHULTHEIS, B.; HEHLMANN, R. Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *J Cancer Res Clin Oncol*, 124(12): 643-660, 1998.

POLAMPALLI, S.; CHOUGHULE, A.; PRABHASH, K.; AMARE, P.; et al. Role of RT-PCR and FISH in diagnosis and monitoring of acute promyelocytic leukemia. *Indian J Cancer*, 48(1): 60-67, 2011.

PENDERGRASS, T. Epidemiology of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Oncol*, 12(2): 80-91, 1985.

PERFETTO, S.P.; CHATTOPADHYAY, P.K.; ROEDERER, M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol*, 4(8): 648-655, 2004.

PERROTTI, D.; CESI, V.; TROTTA, R.; GUERZONI, C.; et al. BCR-ABL suppresses C/EBP $\alpha$  expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet*, 30: 48-58, 2002.

PETERSON, L.F.; ZHANG, D.E. The 8;21 translocation in leukemogenesis. *Oncogene*, 23(24): 4255-4262, 2004.

POPESCU, N.C.; ZIMONJIC, D.B. Molecular cytogenetic characterization of cancer cell alterations. *Cancer Genet Cytogenet*, 93(1): 19-21, 1997.

PREUDHOMME, C.; WAROT-LOZE, D.; ROUMIER, C.; GRARDEL-DUFLOS, N.; et al. High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2 alpha B gene in Mo acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21. *Blood*, 96(8): 2862-2869, 2000.

PUI, C.H.; EVANS, W.E. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 339(9): 605-615, 1998.

PUI, C.H.; ROBISON, L.L.; LOOK, A.T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 371(9617): 1030-1043, 2008.

REAL, P.J.; FERNANDO, A.A. NOTCH inhibition and glucocorticoid therapy in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 23(8): 1374-1377, 2009.

RADICH, J.P. The Biology of CML Blast Crisis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 384-391, 2007.

RIVA, L.; LUZI, L.; PELICCI, P.G. Genomics of acute myeloid leukemia: the next generation. *Front Oncol*, 2(40): 1-12, 2012.

REN, R.; XU, X.; LIN, T.; WENG, S.; et al. Cloning, characterization, and biological function analysis of the SidT2 gene from *Siniperca chuatsi*. *Dev Comp Immunol*, 35(6): 692-701, 2011.

REYA, T.; MORRISON, S.J.; CLARKE, M.F.; WEISSMAN, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859): 105-111, 2001.

ROCHE-LESTIENNE, C.; DELUCHE, L.; CORM, S.; TIGAUD, I.; et al. RUNX1 DNA-binding mutations and RUNX1-PRDM16 cryptic fusions in BCR-ABL<sup>+</sup> leukemias are frequently associated with secondary trisomy 21 and may contribute to clonal evolution and imatinib resistance. *Blood*, 111(7): 3735-3741, 2008.

ROKAH, O.H.; GRANOT, G.; OVCHARENKO, A.; MODAI, S.; et al. Downregulation of Mir-31, Mir-155, and Mir-564 in Chronic Myeloid Leukemia Cells. *PLoS One*, 7(4): 1-12, 2012.

RONEMUS, M.; VAUGHN, M.W.; MARTIENSSEN, R.A. MicroRNA-Targeted and Small Interfering RNA-Mediated mRNA Degradation Is Regulated by Argonaute, Dicer, and RNA-Dependent RNA Polymerase in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18(7): 1559-1574, 2006.

ROZMAN, C.; MONTSERRAT, E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 333(16): 1052-1057, 1995.

ROWE, J.M.; BUCK, G.; BURNETT, A.K.; CHOPRA, R.; et al. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood*, 106(12): 3760-3767, 2005.

ROWE, J.M. Optimal management of adults with ALL. *Br J Haematol*, 144(4): 468-83, 2009.

ROWLEY, J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 243: 290-293, 1973.

SACHS, L. The control of hematopoiesis and leukemia: From basic biology. *Proc Natl Acad Sci*. 93(10): 4742-4749, 1996.

SAVAGE, D.G.; SZYDLO, R.M.; GOLDMAN, J.M. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukemia seen at a referral center over a 16-year period. *Br J Haematol*, 96(1): 111-116, 1997.

SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Disponível em: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2010/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/). Acesso em: 01/05/2013.

SCHERR, M.; BATTMER, K.; WINKLER, T.; HEIDENREICH, O.; et al. Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. *Blood*, 101(4): 1566-1569, 2003.

SCHERR, M.; BATTMER, K.; SCHULTHEIS, B.; GANSER, A.; et al. Stable RNA interference (RNAi) as an option for anti-bcr-abl therapy. *Gene Ther*, 12(1): 12-21, 2005.

SCHNITTGER, S.; WEISSER, M.; SCHOCH, C.; HIDDEMANN, W.; et al. New score predicting for prognosis in PML-RARA<sup>+</sup>, AML1-ETO<sup>+</sup>, or CBFβ-MYH11<sup>+</sup> acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood*, 102(8): 2746-2755, 2003.

SHET, A.S.; JAHAGIRDAR, B.N.; VERFAILLIE, C.M. Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia*, 16(8): 1402-1411, 2002.

SHURTLEFF, S.A.; BUIJS, A.; BEHM, F.G.; RUBNITZ, J.E.; et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*, 9(12): 1985-1989, 1995.

SILVA, F.P.; MOROLLI, B.; STORLAZZI, C.T.; ANELLI, L.; et al. Identification of RUNX1/AML1 as a classical tumor suppressor gene. *Oncogene*, 22(4): 538-547, 2003.

SHIH, J.D.; HUNTER, C.P. SID-1 is a dsRNA-selective dsRNA-gated channel. *RNA*, 17: 1057-1065, 2011.

SHIPITSIN, M.; POLYAK, K. The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Lab Invest*, 88(5): 459-63, 2008.

SKORSKI, T.; NIEBOROWSKA-SKORSKA, M.; WLODARSKI, P.; PERROTTI, D.; et al. Blastic transformation of p53-deficient bone marrow cells by p210 bcr/abl tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(23): 13137-13142, 1996.

SPIVAK, J.L.; SILVER, R.T. The revised World Health Organization diagnostic criteria for Polycythemia Vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal. *Blood*, 112(2): 231-239, 2008.

STOCK, W. Adolescents and Young Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 1: 21-29, 2010.

TABARA, H.; SARKISSIAN, M.; KELLY, W.G.; FLEENOR, J.; et al. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, 99(2): 123-132, 1999.



TALLMAN, M.S.; ALTMAN, J.K. How I treat acute promyelocytic leucemia *Blood*, 114(25): 5126-5135, 2009.

TAMAI, H.; INOKUCHI, K. 11q23/MLL Acute Leukemia: Update of Clinical Aspects. *J Clin Exp Hematop*, 50(2): 91-98, 2010.

TEFFERI, A.; DEWALD, G.W.; LITZOW, M.L.; CORTES, J.; et al. Chronic myeloid leukemia: current application of cytogenetics and molecular testing for diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*, 80(3): 390-402, 2005.

TENEN, D.G. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer*, 3(2): 89-101, 2003.

van der VELDEN, V.H.; HOCHHAUS, A.; CAZZANIGA, G.; SZCZEPANSKI, T.; et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, 17(6): 1013-1034, 2003.

van DONGEN, J.J.M.; MACINTYRE, E.A.; GABERT, J.A.; DELABESSE, E.; et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*, 13(12): 1901-1928, 1999.

VARDIMAN, J.W.; HARRIS, N.L.; BRUNNING, R.D. The World Health Organization (OMS) classification of the myeloid neoplasm. *Blood*, 100(7): 2292-2302, 2002.

VARDIMAN, J.M.; THIELE, J.; ARBER, D.A.; BRUNNING, R.D.; et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5): 937-951, 2009.

VEY, N.; THOMAS, X.; PICARD, C.; KOVASCOVICZ, T.; et al. Allogeneic stem cell transplantation improves the outcome of adults with t(1;19)/E2A-PBX1 and t(4;11)/MLL-AF4 positive B-cell acute lymphoblastic leukemia: results of the prospective multicenter LALA-94 study. *Leukemia*, 20(12): 2155-2161, 2006.

VENTURA, A.; YOUNG, A.G.; WINSLOW, M.M.; LINTAULT, L.; et al. Target deletion reveals essential and overlapping of the miR-19-72 family of miRNA clusters. *Cell*, 132(5): 875-886, 2008.

VERSCHRAEGEN, C.F.; KANTARJIAN, H.M.; HIRSCH-GINSBERG, C.; LEE, M.S.; et al. The breakpoint cluster region site in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. Clinical, laboratory, and prognostic correlations. *Cancer*, 76(6): 992-997, 1995.

VENTURINI, L.; EDER, M.; SCHERR, M. RNA-Mediated Gene Silencing in Hematopoietic Cells. *J Biomed Biotechnology*, ID 87340: 1-13, 2006.

VLIERBERGHE, P.V.; FERRANDO, A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leucemia. *J Clin Invest*, 122(10): 3398-3406, 2012.

WANG, J.C.; DICK, J.E. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol*, 15(9): 494-501, 2005.

WATTEL, E.; PREUDHOMME, C.; HECQUET, B.; VANRUMBEKE, M.; et al. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*, 84(9): 3148-3157, 1994.

WENG, A.P.; FERRANDO, A.A.; LEE, W.; MORRIS, J.P.; et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, 306(5694): 269-271, 2004.

WETZLER, M.; DODGE, R.K.; MROZEK, K.; STEWART, C.C.; et al. Additional cytogenetic abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia: a study of the Cancer and Leukaemia Group B2004. *Br J Haematol*, 124(3): 275-288, 2004.

WILDA, M.; FUCHS, U.; WOSSMANN, W.; BORK-HARDT, A. Killing of leukemic cells with a bcr/abl fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene*, 21(37): 5716-5724, 2002.

WINSTON, W.M.; MOLODOWITCH, C.; HUNTER, C.P. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 295(5564): 2456-2459, 2002.

WINSTON, W.M.; SUTHERLIN, M.; WRIGHT, A.J.; FEINBERG, E.H.; HUNTER, C.P. *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *PNAS*, 104(25): 10565-10570, 2007.

WILSON, C.S.; DAVIDSON, G.S.; MARTIN, S.B.; ANDRIES, E.; et al. Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction. *Blood*, 108(2): 685-696, 2006.

WITHEY, J.M.E.; MARLEY, S.B.; KAEDA, J.; HARVEY, A.J.; et al. Targeting primary human leukaemia cells with RNA interference: Bcr-Abl targeting inhibits myeloid progenitor self-renewal in chronic myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol*, 129(3): 377-380, 2005.

WOHLBOLD, L.; VAN DER KUIP, H.; MIETHING, C.; VORNLOCHER, H.P.; et al. Inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate (STI571). *Blood*, 102(6): 2236-2239, 2003.

YEOH, E.J.; ROSS, M.E.; SHURTLEFF, S.A.; WILLIAMS, W.K.; et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*, 1(2): 133-143, 2002.

XU, Q.; SIMPSON, S.E.; SCIALLA, T.J.; BAGG, A.; et al. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood*, 102(3): 972-980, 2003.

ZAMORE, P.D.; TUSCHL, T.; SHARP, P.A.; BARTEL, D.P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1): 25-33, 2000.

ZHANG, S. The role of aberrant transcription factor in the progression of chronic myeloid leucemia. *Leuk Lymphoma*, 49(8): 1463-1469, 2008.

ZHAO, Z.; ZUBER, J.; DIAZ-FLORES, E.; LINTAULT, L.; et al. p53 loss promotes acute myeloid leukemia by enabling aberrant self-renewal. *Genes & Dev*, 24(13): 1389-1402, 2010.

ZOLA, H.; SWART, B.; NICHOLSON, I.; AASTED, B.; et al. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood*, 106(9): 3123-3126, 2005.

ZUTTER, M.; HOCKETT R.D.; ROBERTS, C.W.M.; MCGUIRE, E.A.; et al. The t(10;14)(q24;q11) of T-cell acute lymphoblastic leukemia juxtaposes the  $\alpha$  T-cell receptor with TCL3, a conserved and activated locus at 10q24. *PNAS*, 87: 3161-3165, 1990.

## ANEXOS

### I. Soluções preparadas

#### Antibióticos

Ampicilina (1000 X): 100 mg/mL em H<sub>2</sub>O Mili Q

Streptomicina (1000 X): 100 mg/mL em H<sub>2</sub>O Mili Q

A solução foi esterilizada por filtração através de filtro Milipore 0,22 µm e armazenada a -20°C.

#### Tampão PBS 5X

NaCl	685,0 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	35,0 mM
KCl	13,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,5 mM

#### Tampão TBE 10 X

Tris Base	0,89 M
Ácido Bórico	0,89 M
EDTA	0,02 M

#### Tampão de amostra 10 X

TBE	10 X
Glicerol	50%
Azul de Bromofenol	0,01%,
Xileno Cianol	0,01%

#### Tampão MOPS 10 X

MOPS	0,2 M
EDTA	0,01 M
Acetato de sódio	0,05 M

Ajustar o pH para 7,0 com NaOH (livre de RNase) e armazenar a 4°C.

### **Tampão de amostra para gel desnaturante**

Formamida	750 mL
MOPS 1X	150 mL
Formaldeído	240 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,5 mM
H <sub>2</sub> O nuclease free	100 mL
Glicerol	100 mL
Azul de bromofenol	80 mL

### **Gel desnaturante de agarose**

Agrose	0,3 gr
MOPS 10 X	3 ml
Água Mili Q	22 ml
Formaldeído	5 ml

### **Brometo de etídio**

Solução estoque: 10mg/mL em H<sub>2</sub>O Mili Q

### **Meio de cultura RPMI**

Meio RPMI (1640)	80%
Soro fetal bovino	15%
Penicilina	5mg
Estreptomicina	10mg
Água estéril	1L

## II. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FEPECS do HB-DF



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL  
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE  
Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/SES-DF

PARECER Nº 0194/2011

PROTOCOLO Nº DO PROJETO: 097/2011 – DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TRANSMEMBRANA HUMANO HOMÓLOGA À SID-1 EM PACIENTES COM EVENTO LEUCÊMICO DO HOSPITAL DE BASE DO DISTRITO FEDERAL.

Instituição Pesquisada: Secretaria de Saúde do Distrito Federal/SES-DF.

Área Temática Especial: Grupo III (não pertencente à área temática especial), Ciências da Saúde.


Validade do Parecer: 08/06/2013

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO**.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 08 de junho de 2011.

Atenciosamente,

  
Maria Rita Carvalho Garbi Novaes  
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF  
Coordenadora

AL/CEP/SES-DF

---

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Fone/Fax: 3325-4955 - e-mail: cepesedf@saude.df.gov.br  
SMHN - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP: 70.710-907  
BRASILIA - PATRIMONIO CULTURAL DA HUMANIDADE

### III. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FEPECS Hospital da Criança de Brasília José Alencar



#### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - FEPECS/SES-DF

##### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da pesquisa:** Análise da expressão da proteína transmembrana humano homóloga à *SID-1* em pacientes com evento leucêmico

**Pesquisador:** Stenia Gonçalves Magalhães

**Área Temática:** Área 1-Genética Humana

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima)

**CAAE:** 09930813.5.0000.5553

**Instituição proponente:** FUNDAÇÃO DE ENSINO PESQUISA

Financiamento Próprio

##### Dados do Parecer

Número do Parecer: 251.325

Data da Relatoria: 22/04/2013

##### Apresentação do Projeto:

As leucemias são resultantes da expansão clonal de uma única célula tronco pluripotente que adquiriu uma série progressiva de alterações genéticas, conferindo vantagem proliferativa em relação às demais células e impedindo seu processo de diferenciação normal. A descoberta da função de vários genes tem auxiliado na introdução



de novos métodos de intervenção do material genético, usando técnicas de biologia molecular. Dados atuais sugerem que um gene denominado *SID-1* identificado no nematódeo *Caenorhabditis elegans* funciona como um canal capaz de transportar dsRNA para dentro das células. Em estudos realizados utilizando células de mamíferos foi observado o gene *FLJ20174*, uma proteína transmembrana homóloga à *SID-1* de *C. elegans*, sugerem que este gene e as proteínas relacionadas devem ser úteis para aumentar a suscetibilidade das células à interferência por RNA mediada por siRNA, o que pode representar uma nova estratégia terapêutica aplicável a uma gama de doenças humanas.

### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário: Avaliar o perfil da expressão do gene para a proteína transmembrana humano homóloga à *SID-1* em pacientes positivos para leucemia no período de 2013 a 2015, comparando com amostras controles, por PCR em tempo real.

Objetivo Secundário: a- Avaliar o perfil da expressão do gene para a proteína transmembrana humano homóloga à *SID-1* em pacientes com leucemia; b- Avaliar o perfil da expressão do gene para a proteína transmembrana humano homóloga à *SID-1* em amostras controle.

### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os prováveis danos são menores que os benefícios que o estudo pode gerar, e se encontra com adequada fundamentação teórica.

### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A amostra obtida do Hospital da Criança de Brasília José Alencar-HCB será processada até a fase de cDNA, pela equipe do Laboratório de Genética Molecular Oncológica. Tamanho da amostra: 100. A frequência genética será obtida com um estudo caso controle, onde os dois grupos (caso e controle) serão pareados por sexo e idade. Após a verificação dos dados, serão escolhidos os testes estatísticos mais apropriados.

### **Considerações sobre os Temas de apresentação obrigatória:**

Os Termos de apresentação obrigatória estão presentes

**Recomendações:****Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências ou inadequações

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita de apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Pendência resolvida

Brasília, 22 de Abril de 2013.

---

Assinado por:

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes

(Coordenador)

Endereço: SMHN 2 Qd 501 Bl A – FEPECS

Bairro: Asa Norte                      Cep.: 70.710-904

Brasília-DF

Telefone: (61) 3325-4955      E-mail: [cepsesdf@saude.df.gov.br](mailto:cepsesdf@saude.df.gov.br)