



MUTAÇÕES EM *PML-RARA* E RESISTÊNCIA AO ATRA NA LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA

PML-RARα MUTATIONS AND RESISTANCE TO ATRA IN PEDIATRIC ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA

GALVÃO, Beatriz Mendes.¹; MAHANA, Glaucia Dehn²; YUNES, José Andrés³.

¹Graduanda do Curso de Biomedicina – Universidade São Francisco; ²Professora do Curso de Biomedicina – Universidade São Francisco; ³Professor no Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular-UNICAMP.

bmendesgalvao@gmail.com

RESUMO. A leucemia promielocítica aguda (LPA) possui a translocação t(15;17) em 95% dos casos, envolvendo os genes *PML* (15q24.1) e *RARA* (17q21.2) e resulta na em um transcrito e proteína de fusão *PML-RARA*. Para o tratamento da LPA utiliza-se o ácido all-trans retinóico (ATRA) combinado à quimioterapia com antraciclina e o recém adicionado trióxido de arsênio. Porém, alguns pacientes apresentam má resposta ou resistência ao tratamento e estudos sugerem que mutações em *PML-RARA* podem ser responsáveis por esses comportamentos. Acreditamos que, as mutações possam estar no domínio Bbox de *PML*, responsável pela supressão de crescimento e apoptose das células e/ou no domínio LBD de *RARA*, responsável pela formação do complexo *RARA/RXR* permite a ligação do ATRA às células leucêmicas. Este estudo pretende identificar e analisar mutações em *PML-RARA* em casos de LPA em tratamento no Centro Infantil Boldrini entre 2000 e 2020. Neste período, foram admitidos 121 pacientes pediátricos com LPA, com a t(15;17), destes, 12 apresentaram recaída e 3 má resposta ao tratamento. Até o presente momento, 7 pacientes foram sequenciados por Sanger. Dentre eles, 1 recidivado, apresentou uma mutação no domínio LBD, que foi analisada no Chromas e a sequência em FASTA analisada no MutationExplorer. Diante disso, pode-se concluir até o presente momento, que 14% dos pacientes que apresentaram recaída da LPA possuem mutações no domínio LBD. Todos os pacientes serão sequenciados e analisados perante a clínica.

Palavras-chave: leucemia, LPA, *PML-RARA*.

ABSTRACT. Leukemias are hematologic neoplastic diseases, which are characterized by the uncontrolled Acute promyelocytic leukemia (APL) has the t(15;17) translocation in 95% of cases, involving the *PML* (15q24.1) and *RARA* (17q21.2) genes and results in a transcript and fusion protein *PML-RARA*. For the treatment of APL, all-trans retinoic acid (ATRA) is used combined with chemotherapy with anthracycline and the newly added arsenic trioxide. However, some patients show poor response or resistance to treatment and studies suggest that mutations in *PML-RARA* may be responsible for these behaviors. We believe that the mutations may be in the Bbox domain of *PML*, responsible for suppressing cell growth and apoptosis and/or in the LBD domain of *RARA*, responsible for the formation of the *RARA/RXR* complex, which allows the binding of ATRA to leukemic cells. This study aims to identify and analyze mutations in *PML-RARA* in cases of ALI under treatment at the Centro Infantil Boldrini between 2000 and 2020. During this period, 121 pediatric patients with ALI were admitted, with at(15;17), of these, 12 had relapse and 3 poor response to treatment. To date, 7 patients have been sequenced by Sanger. Among them, 1 relapsed had a mutation in the LBD domain,

which was analyzed in Chromas and the sequence in FASTA analyzed in MutationExplorer. Therefore, it can be concluded so far that 14% of the patients who presented ALI relapse have mutations in the LBD domain. All patients will be sequenced and analyzed before the clinic.

Keywords: leukemia, APL, PML-RARA.

INTRODUÇÃO

A biologia molecular tem contribuído para os avanços científicos em diversas áreas e dentre elas, as neoplasias hematológicas. Por meio de estudos pode-se compreender melhor a fisiopatologia das neoplasias hematológicas, auxiliando no delineamento de novas abordagens terapêuticas e diagnósticos para os pacientes.

As leucemias são neoplasias caracterizadas pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas na medula óssea, que posteriormente podem migrar para o sangue periférico. Essa proliferação é resultado da expansão clonal de uma única célula-progenitora hematopoiética que acumula uma série de modificações genéticas que lhe conferem vantagem proliferativa em relação às demais células, impedindo ao mesmo tempo a diferenciação celular (ESTEY, 2001).

As leucemias podem ser classificadas como agudas ou crônicas e linfóides ou mieloides, essa classificação baseia-se no fenótipo das células malignas. A leucemia mieloide aguda (LMA) é caracterizada pela proliferação descontrolada, diferenciação reduzida e apoptose diminuída de células-progenitoras da linhagem mieloide e é uma doença com grande variabilidade de base genética e molecular (HEINZ et al., 2011, LAGUNAS-RANGEL et al., 2017). A LMA é dividida morfológicamente em 8 subgrupos, de M0 a M7, de acordo com a classificação morfológica Franco-Americana-Britânica (FAB). A leucemia promielocítica aguda (LPA) se enquadra no subgrupo LMA-M3 ou M3 variante (hipogranular) da classificação FAB e é considerada uma leucemia rara com frequência de 4-8% do total das leucemias mieloides pediátricas, podendo haver maior incidência em crianças de origem Hispânica e Mediterrânea (BENNETT et al., 1976, GREGORY; FEUSNER, 2003).

A LPA é caracterizada pela expansão clonal de promielócitos na medula óssea e pela presença da translocação recíproca $t(15;17)(q24;q21)$, que resulta na fusão dos genes *PML* (Promyelocytic Leukemia Protein) e *RARA* (Retinoic Acid Receptor Alpha) (figura 1). Essa translocação está presente em 95% dos casos dessa leucemia (GRIMWADE et al., 2000). Nos casos de LPA sem a $t(15;17)$, é comum encontrar translocações cromossômicas envolvendo o gene *RARA* com os genes *PLZF* (11q23), *NPM* (5q35), *NUMA* (11q13) ou *STAT5B* (17q21) (ZELENT et al., 2001), revelando a importância de alterações no *RARA* para a leucemogênese da LPA.

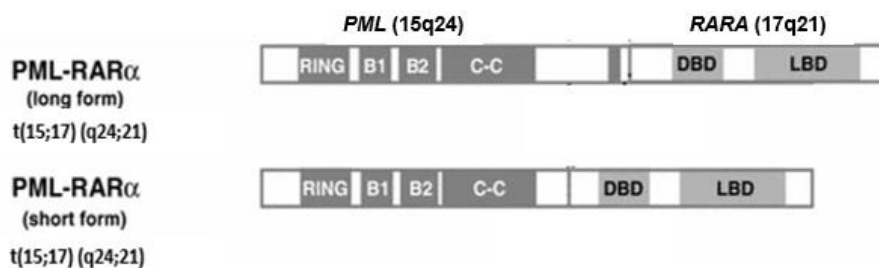


Figura 1 - Representação esquemática da $t(15;17)(q24;q21)$ (adaptada de Tomita *et al.*, 2013).

O gene PML possui várias regiões de quebra e splicing alternativo, que resultam em transcritos heterogêneos no caso da fusão PML-RARA. Os pontos de quebra mais comuns no gene PML localizam-se nos íntrons 6 e 3, dando origem aos transcritos PML-RARA denominados bcr1 e bcr3 respectivamente, e a quebra menos comum ocorre no éxon 2, originando o transcrito bcr2. No gene RARA é encontrada apenas uma quebra, invariavelmente no íntron 2 (MELNICK et al., 1999). Os transcritos bcr1 e bcr3 são os mais comuns nas LPAs e são encontrados em 90-95% dos casos (PANDOLFI et al., 1992, GALLAGHER et al., 1995).

A detecção dos transcritos PML-RARA pode ser feita através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RQ-PCR) e serve como marcador da doença residual mínima (DRM). A quantificação da DRM na medula dos pacientes durante o tratamento possibilita o acompanhamento dos pacientes e a avaliação da resposta durante o curso do tratamento, bem como a detecção precoce de recaídas moleculares. O seu estudo possibilita intervenções terapêuticas rápidas em casos de recaídas, antes mesmo da aparição de manifestações clínicas (GRIMWADE et al., 1996, DIVERIO et al., 1998).

De maneira geral, pacientes que possuem a translocação t(15;17), são considerados de prognóstico favorável, pois possuem taxa de remissão completa acima de 90% e sobrevida global acima de 80% em 5 anos (SANZ; LO-COCO, 2011). No entanto, cerca de 20-30% dos pacientes já tratados apresentam recaída da doença (WAGATSUMA et al., 2018).

PML E RARA

O gene PML está localizado no cromossomo 15q24.1 e codifica um fator de transcrição zinc-finger que desempenha várias funções, entre as quais a formação dos corpos nucleares de PML (PML nuclear bodies), os quais participam na indução de senescência celular via interação com p53, E2F e Rb (VERNIER et al., 2011; de THÉ et al., 2012).

O gene RARA está localizado no cromossomo 17q21.2 e codifica um dos receptores nucleares do ácido retinóico (RARA). O RARA forma heterodímeros com o Receptor X Retinóide Gama (RXRG) e se liga a sequências específicas no DNA caracterizadas por repetições em tandem de trechos 5'-AGGTCA-3', denominados Elementos de Resposta ao Ácido Retinóico (RARE, do inglês Retinoic Acid Response Elements). Na ausência do ligante, o RARA-RXRG forma-se um complexo multiproteico com os repressores NCOR1 e SMRT (NCOR2) e proteínas histona desacetilases, que levam à desacetilação de histonas, condensação da cromatina e repressão da transcrição. Na presença do ligante, o complexo de RARA-RXRG assume uma outra conformação 3D, dissociando-se de NCOR1 e SMRT e recrutando fatores da transcrição e proteínas histona acetiltransferases que levam à abertura da cromatina e ativação da transcrição (KASTNER; CHAN, 2001). A proteína RARA possui seis domínios funcionais, que são divididos de A à F. O domínio C é responsável pela ligação às sequências RARE no DNA e o domínio E possui regiões responsáveis pela interação com o ligante e heterodimerização com o RXRG (MELNICK et al., 1999).

A proteína PML-RARA possui domínios funcionais de ambos os genes fusionados, mas ao contrário de PML, mantém a maioria dos domínios funcionais do RARA (GRIGNANI et al., 1993). Entretanto, tanto os domínios de PML quanto os de RARA são importantes para a leucemogênese, como também para a sensibilidade ao tratamento com ácido trans-retinóico e trióxido de arsênio (de THÉ et al., 1990, PODDIGHE; WEGHUIS, 1998). Estudos revelaram que as diferentes isoformas de PML-RARA podem estar correlacionadas com a resposta dos

pacientes ao tratamento, provavelmente devido aos diferentes domínios de PML retidos no transcrito de fusão, porém, os resultados encontrados ainda são controversos (HUANG et al., 1993).

A proteína quimérica resultante da fusão PML-RARA inibe de forma dominante a via dos retinóides, bloqueando a maturação celular da linhagem mieloide, inibindo também a função homeostática/supressora de PML e seus corpos nucleares (di MAIS et al., 2015).

Uso de ácido all-trans-retinóico (ATRA) induz diferenciação da lpa

Os avanços obtidos no tratamento da LPA mudaram o curso clínico da doença, de uma leucemia fatal, para uma leucemia com altas chances de cura (AVVISATI et al., 2001, ANDREAS et al., 2004). Uma das características da LPA é a ocorrência de fenômenos hemorrágicos, sendo essa a causa do óbito em 3% dos pacientes diagnosticados, antes mesmo do início do tratamento (SANZ et al., 2005). O tratamento atualmente é realizado à base de antraciclina e ácido all-trans retinóico (ATRA), combinação que melhorou significativamente o resultado clínico dos pacientes quando comparado com a quimioterapia convencional (HUANG et al., 1988, OHNO et al., 1993, LO-COCO et al., 2010). A incorporação do ATRA ao tratamento da LPA é considerada o primeiro caso de tratamento alvo-dirigido contra o câncer, embora o benefício do ATRA para a LPA tivesse sido descoberto bem antes da caracterização do PML-RARA e não como uma consequência desse conhecimento. O tratamento com ATRA reduz significativamente os fenômenos hemorrágicos e é capaz de levar o paciente à remissão completa da doença (BITTENCOURT et al., 2002). Embora não se saiba ao certo como, o ATRA restaura a ativação da via dos retinóides, aparentemente promovendo a degradação da proteína de fusão PML-RARA e modificando as histonas nos promotores dos genes alvo de RARA, de tal modo que a repressão transcricional da PML-RARA é anulada, restaurando-se a ativação transcricional mediada pelos retinóides, consequentemente promovendo forte indução da diferenciação dos promielócitos em células maduras (GIANNI et al., 2000).

A introdução do trióxido de arsênico (ATO) ao tratamento da LPA também mostrou resultados clínicos favoráveis, tanto quando usado de maneira isolada como associado ao ATRA (ELIHU et al., 2006; BAYARD et al., 2010). Um fato importante é que o uso do ATO é benéfico em casos de recaída da doença associados a resistência ao ATRA. O uso do ATO também pode ser considerado como uma terapia direcionada pois possui interações diretas com o PML. O ATO provoca oxidação, sumoilação, poli-ubiquitinação e degradação proteossomal da proteína PML-RARA, fazendo com que os PML nuclear bodies voltem a atuar na indução de senescência celular (ZHU et al., 2002; ZHOU et al., 2005; MUMFORD et al., 2007). O ATO leva à diminuição da capacidade de auto-renovação bem como de diferenciação das células malignas (ZHU et al., 1997; WANG et al., 1999; RIHAB et al., 2008; de THÉ et al., 2010; CHEN et al., 2011).

Mutações em PML-RARA e resistência ao tratamento

Alguns pacientes apresentam resistência ao ATRA e/ou ATO e essa resistência está relacionada a mutações em PML-RARA. Essas mutações são encontradas de 30-60% na primeira ou segunda recaídas dos pacientes com LPA (LOU et al., 2015; HATTORI et al., 2018). A resistência ao ATRA está associada a mutações no domínio de ligação ao ligante (LBD) de RARA. Já as mutações missense no domínio B2 box do PML conferem resistência

ao ATO e foram encontrados em pacientes refratários ou recidivados, esse domínio de PML é importante para a ligação direta ao ATO (DELVA et al., 1993, DING et al., 1998, IMAIZUMI et al., 1998, ZHOU et al., 2002, GALLAGHER et al., 2006, GALLAGHER et al., 2012).

No quadro 1 apresenta-se uma revisão da literatura com todas as mutações descritas em associação à resistência ao ATRA em pacientes com LPA. Como pode-se observar, na maioria dos casos as mutações ocorrem na região LBD de RARA.

Quadro 1 - Descrição das mutações segundo a literatura em pacientes com recaída de LPA. Referenciado de acordo com “Ref”.

Local da mutação	Descrição da mutação	Amostras analisadas	Amostras com mutação	Ref.
LBD de RARA	Deleção de 7 aminoácidos (p.K227_T233del), e uma mutação pontual, (p.R217S).	1	1	Q1
LBD de RARA	Substituição G815A e A889T.	23	2	Q2
LBD de RARA	Substituição Leu290Val, Arg394Trp, Met413Thr e T38C.	12	3	Q3
LBD de RARA	Mutações missenses em Arg394 e deleção de 12 aminoácidos de Arg394 à Leu398, substituição de Met394.	18	6	Q4
LBD de RARA	Mutações missenses (L224P e R276Q), deleções e sem sentido.	45	18	Q5
LBD de RARA	Substituição Pro407Ser, Arg294Trp, Gly289Arg, Lys207Asn e Arg272Gln.	8	5	Q6

A implementação dos testes para detecção de mutações em PML-RARA, e o conhecimento da frequência e características dessas mutações e sua associação à resposta clínica dos pacientes pode se tornar uma informação útil para a escolha do tratamento a ser seguido em casos de recidiva ou resistência ao tratamento. Embora a sobrevida global da LPA tenha obtido melhora significativa desde a introdução do ATRA e do ATO, a recaída da doença devido à resistência à essas drogas continua sendo um problema clínico (HATTORI et al., 2018).

Diante dessas informações, o presente estudo tem como objetivo identificar e analisar mutações nos domínios Bbox e LBD do gene de fusão PML-RARA, respectivamente e sua possível relação com a recaída e/ou resistência ao tratamento com ATRA e ATO em pacientes pediátricos com Leucemia Promielocítica Aguda.

METODOLOGIA

Este trabalho foi aprovado pelo CEP-Boldrini (CAAE 38962720.9.0000.5376).

No período entre janeiro de 2000 e junho de 2020 foram admitidos para tratamento no Centro Infantil Boldrini, 121 pacientes com leucemia promielocítica aguda, positivos para a



translocação t(15;17). Pacientes que haviam iniciado o tratamento em outra instituição foram excluídos do estudo.

Destes 121 casos, 42 foram diagnosticados entre 2000 e 2008 e receberam tratamento de acordo com diversos protocolos para a LPA, ao passo que 79 casos, diagnosticados a partir de 2009, foram tratados de acordo com o protocolo ICC APL Study One (Consórcio Internacional para Leucemia Promielocítica Aguda Infantil).

No presente estudo serão incluídas amostras de células da medula óssea de todas as recaídas moleculares de LPA, ocorridas entre 2000 e 2020, independentemente do protocolo de tratamento, bem como as amostras dos pacientes de 2009 em diante, que apresentaram resposta lenta ao tratamento, conforme critérios estabelecidos pelo protocolo ICC APL Study One.

As recaídas moleculares são as identificadas nas análises da Doença Residual Mínima por PCR qualitativo (resultado positivo) e/ou por PCR em Tempo Real (resultado $>10^{-4}$), realizadas nas diversas etapas do tratamento. No momento, 12 pacientes apresentaram recaída molecular e foram analisados para as mutações em PML-RARA. No caso de mais de uma recaída ao longo do tratamento todas as amostras de recaída serão analisadas. Como controle, foram analisadas 15 amostras de pacientes de LPA que não apresentaram recaída molecular.

O protocolo ICC APL Study One classifica os pacientes em Alto ou Baixo Risco de acordo com a leucometria ao diagnóstico (GB $>10.000/mm^3$ ou $<10.000/mm^3$, respectivamente). Pacientes Alto Risco são considerados maus respondedores se apresentarem DRM $>10^{-4}$ após a 3ª consolidação. Pacientes Baixo Risco são considerados maus respondedores se tiverem DRM $>10^{-4}$ após a 2ª consolidação. Até o presente momento, 3 pacientes foram considerados maus respondedores e foram incluídos para análise.

Extração de RNA e Síntese de cDNA

As amostras de medula óssea encontram-se armazenadas no Biobanco do Centro Boldrini. As mesmas, logo após a coleta, foram submetidas à separação através de gradiente de Ficoll Hypaque Plus (GE Healthcare) e as células mononucleadas foram isoladas, aliquotadas e armazenadas em solução de isotiocianato de guanidina 4M.

Quantidade correspondente a 2-5 milhões de células foi utilizada para a extração de RNA, realizada utilizando o illustra RNAspin Mini Kit (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, a integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose e a quantificação do mesmo realizada por método fluorimétrico seguindo as instruções do fabricante do Qubit Fluorometer (Invitrogen). A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se 1 a 2,5 ug de RNA, com primers randômicos N6, transcriptase reversa ImProm-II (Promega) e o inibidor de RNase RNaseOUT (ThermoFisher), conforme protocolo indicado pelo fabricante da ImProm-II. O cDNA será diluído 5X e armazenado a $-20^{\circ}C$.

A qualidade do cDNA sintetizado foi verificada através de PCR de 4 transcritos, correspondentes aos genes BCR, $\beta 2$ -MG, PBGD e ABL, conforme publicado por Watzinger F, Lion T, 1998 (50), utilizando os primers e protocolo de amplificação apresentados nas tabelas 2 e 3.

Análise das Mutações de PML-RARA

As análises de mutações em PML-RARA foram realizadas por PCR-nested seguido de sequenciamento Sanger. O software Primer Premier (Premier Biosoft) foi utilizado para desenho dos oligonucleotídeos usados no PCR (first e nested-PCR). A PCR First tem a



finalidade de amplificar o gene de fusão PML-RARA entre a região do exon 3 de PML e a região LBD de RARA, já o PCR Nested será realizado com os primers específicos para amplificar separadamente as regiões PML e RARA. Para as reações de PCR utilizou-se a enzima GoTaq DNA Polimerase (Promega) e os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose. Foram utilizados como controle negativo amostras de medula de pacientes que não apresentam a t(15;17) e H₂O milliQ, com o objetivo de descartar qualquer contaminação nas reações de PCR.

Os produtos do nested PCR para PML e RARA foram sequenciados bidirecionalmente através de sequenciamento Sanger e os cromatogramas analisados por inspeção visual no software Chromas. As sequências obtidas foram comparadas com aquelas descritas em banco de dados como cDNA GenBank (número de acesso NM_033238 para *PML* e NM_000964 para *RARA*) para a identificação das mutações nas amostras estudadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Padronização da técnica

A padronização da técnica foi inicialmente realizada seguindo como base os resultados obtidos por YINJUN LOUL et al., 2015. O grupo descreveu o uso de PCR em duas etapas, com primers para a PCR-Fist que amplificavam a fusão PML-RARA e primers para a PCR-Nested que amplificavam de forma separada o gene *PML* e *RARA*. Os primers foram desenhados para cobrir o éxon 3 de *PML* e a região LBD de *RARA*.

De posse dessas informações, testes foram realizados com o objetivo de confirmar se os primers e a metodologia apresentados por YINJUN LOUL et al., 2015 poderiam ser aplicados à casuística do projeto. As condições da reação de PCR foram adaptadas para a enzima utilizada e a Reação e ciclagem do PCR- First e PCR-Nested, tinham uma desnaturação de 94°C à 2 minutos, seguida de desnaturação de 94°C por 30 segundos, anelamento de 65°C por 30 segundos e extensão de 72°C por 30 segundos, durante 35 ciclos, com extensão final à 72°C por 5 minutos .

O teste inicial foi realizado utilizando amostras previamente extraídas, sendo elas: (1) uma amostra de recaída de um paciente com LPA positivo para a translocação t(15;17), (2) uma amostra ao diagnóstico de paciente LPA positivo para t(15;17) utilizada como controle positivo da reação (denominada controle positivo LPA) e (3) uma amostra de um paciente portador de leucemia linfóide aguda (denominada controle LLA) e que foi utilizada como controle negativo da reação. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e os resultados mostraram amplificação em todas as amostras testadas, inclusive no controle negativo (Figura S1 a).

Para excluir a possibilidade de contaminação da reação anterior, um novo PCR foi realizado com novos reagentes e em ambiente estéril, porém os resultados permaneceram os mesmos, gerando a hipótese de que os primers estariam amplificando os alelos selvagens dos genes *PML* e *RARA* (Figura 2).

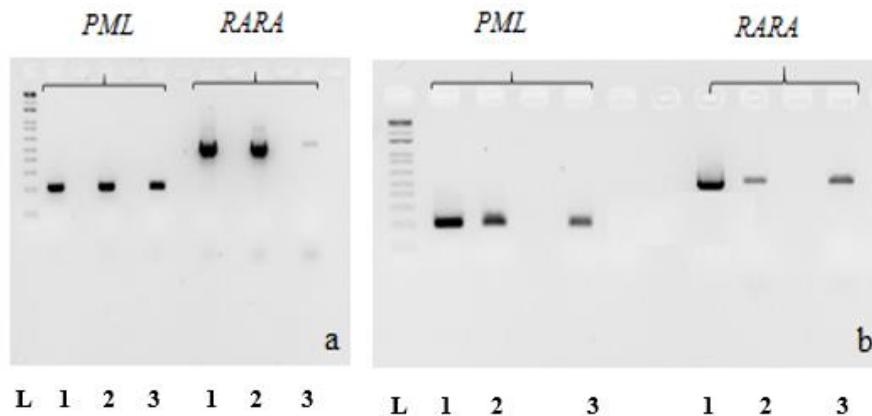


Figura 2- a) Primeiro teste para mutações em *PML-RARA*. b) Segundo teste realizado em ambiente estéril
Legenda: L. Padrão de massa molecular, 1. Amostra de recaída, 2. Controle positivo para t(15;17), 3. Controle negativo (LLA), 4. Controle negativo (H₂O).

Diante desses resultados, foram desenhados oligonucleotídeos específicos para cada ponto de quebra da t(15;17), *bcr1/2* e *bcr3* utilizando o software Primer Premier 5 (Premier Biosoft). Para a amplificação dos fragmentos de interesse, ainda utilizou-se a técnica de PCR em duas etapas (PCR-First e PCR-Nested), sendo assim, primers diferentes foram desenhados para cada etapa da PCR (Tabela W).

Com o objetivo de amplificar apenas os pacientes que possuem a translocação e não amplificar amostras do grupo controle negativo sem translocação, os oligonucleotídeos (Quadro 2) foram desenhados de maneira que abrangessem a fusão dos genes *PML* e *RARA*, tanto para a PCR-First quanto para a PCR-Nested. Para isso, os primers foram desenhados sempre cobrindo alguns pares de base do outro gene em questão, como por exemplo, o primer antisense utilizado para amplificar o gene *PML* continha alguns pares de base do gene *RARA*, assim como o primer sense do gene *RARA* continham alguns pares de base do gene *PML*.

Quadro 2 - Relação dos oligonucleotídeos utilizados nos testes para amplificação de *PML-RARA*.

Nome do Oligo	Finalidade	Sequência
PML F Fr 1/2/3	PML <i>First Sense bcr1/2/3</i>	5'-CTTCGGAGGAGGAGTTCCAGTT-3'
ENR 962	PML <i>First Antisense bcr1/2/3</i>	5'-GCTTGTGATGCGGGGTAGAG-3'
PML F Ne 1/2/3	PML <i>Nested Sense bcr1/2/3</i>	5'- GGAGGAGGAGTTCCAGTTTCT-3'
RARA D	PML <i>Nested Antisense bcr1/2/3</i>	5'- CTGCTGCTCTGGGTCTCAAT-3'
PML C1	RARA <i>First Sense bcr 1/2</i>	5'-TCAAGATGGAGTCTGAGGAGG -3'
RARA R Fr 3	RARA <i>First Antisense bcr 1/2/3</i>	5'- TGGCGTTTGCTGGTGATG-3'



<http://ensaios.usf.edu.br>

RARA F Ne 1/2	RARA <i>Nested Sense bcr1/2</i>	5'- CTGCCCAACAGCAACCACG-3'
RARA R Ne 3	RARA <i>Nested Antisense bcr1/2/3</i>	5'- GGTCACATGGTCGGTAGAAAGG-3'
RARA F Fr 3	RARA <i>First Sense bcr3</i>	5'- GCGACTACGAGGAGATGGC-3'
RARA F Ne 3	RARA <i>Nested Sense bcr3</i>	5'- GGGGAAAGCCATTGAGACC -3'
PML F Seq 1/2/3	PML Sequenciamento Sense <i>bcr 1/2/3</i>	5'- AAGCCAAGTGCCCGAAGC-3'
PML F Seq 1/2/3	PML Sequenciamento Antisense <i>bcr 1/2/3</i>	5'-TTGGAACATCCTCGGCAGTAG-3'
RARA F Seq 1/2/3	RARA Sequenciamento Sense <i>bcr 1/2/3</i>	5'-GTGAGAAACGACCGAAACAAGA-3'
RARA R Seq 1/2/3	RARA Sequenciamento Antisense <i>bcr 1/2/3</i>	5'-CGGGCTGCTTCTGTTGGA-3'

Analisando que a região de interesse a ser amplificada é uma região rica em conteúdo GC decidimos realizar um teste, baseado nas metodologias descritas por ZHANG et al, 2009 e PRATYUSH et al, 2012, nas quais ambos descrevem protocolos para melhor amplificação desse tipo de região. ZHANG et al, 2009 demonstra em seus resultados, que o uso do reagente etileno glicol (1,075M) é eficaz para a amplificação de grandes fragmentos ricos em GC e PRATYUSH et al, 2012 descreve o uso do reagente Betaína (5M) com touchdown (gradiente de temperatura) decrescendo 0,2°C da temperatura de anelamento em vinte ciclos foi eficaz para a mesma condição.

Para a realização deste, fizemos a PCR utilizando touchdown no programa de ciclagem, um programa com a temperatura decrescendo de 65°C à 60°C por ciclo de um minuto. Utilizamos amostras de diagnóstico de dois pacientes, ambos apresentaram t(15;17) positiva, porém um deles com a isoforma *bcr1/2* e o outro com a isoforma *bcr3*.

Com o uso do touchdown na ciclagem e a adição de etileno glicol à reação houve amplificação de bandas compatíveis com os tamanhos esperados para o *bcr1/2* do domínio PML. (3) a adição de betaína à reação de PCR não se mostrou eficaz para a amplificação das regiões esperadas (Figura 3 e 4).

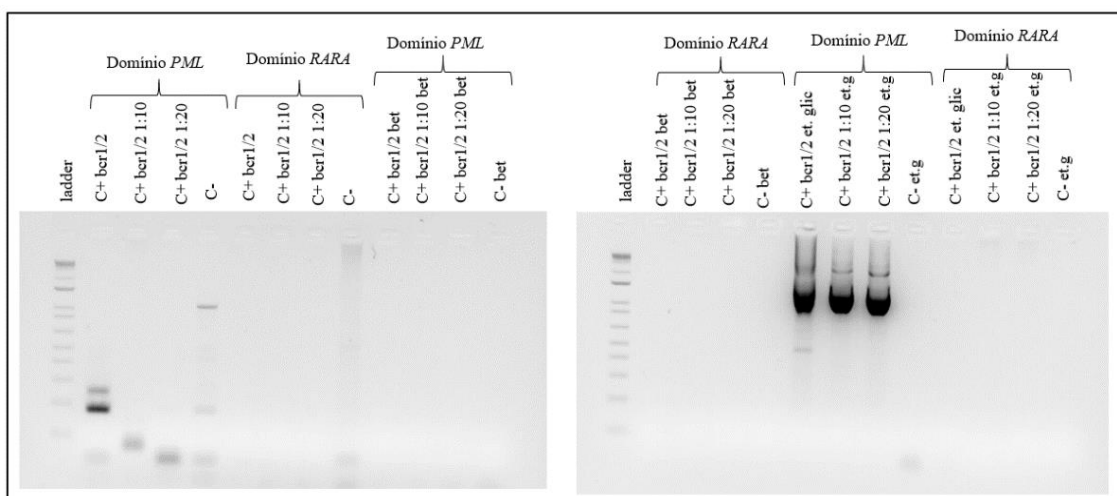


Figura 3 - Teste com etileno glicol e Betaína com *touchdown* para amplificar *bcr1/2* dos domínios *PML* e *RARA*. **bet)** Betaina **et.g)** Etileno Glicol

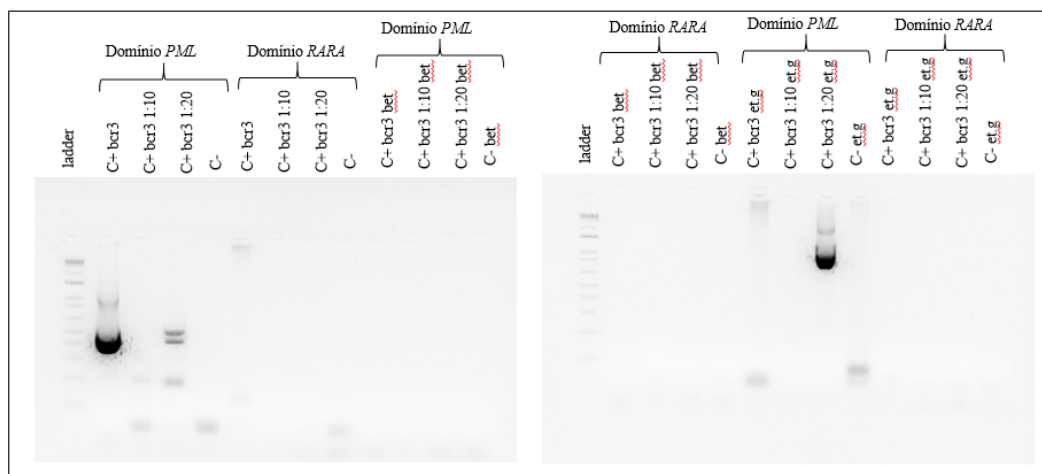


Figura 4 - Teste com etileno glicol e Betaína com *touchdown* para amplificar *bcr3* dos domínios *PML* e *RARA*. **bet)** Betaina **et.g)** Etileno Glicol

Tendo em vista a amplificação do domínio PML *bcr1/2* realizando o Touchdown com o uso de etileno glicol, resolvemos realizar mais uma tentativa para amplificar RARA *bcr3*. Neste teste utilizamos etileno glicol na reação e o touchdown na ciclagem foi de 65° à 55°C na temperatura de anelamento.

Utilizamos neste teste, as mesmas amostras de diagnóstico de dois pacientes positivos para t(15;17) e uma diluição da mesma em 1:10, como controle negativo utilizamos a linhagem celular K562 (Figura 5).

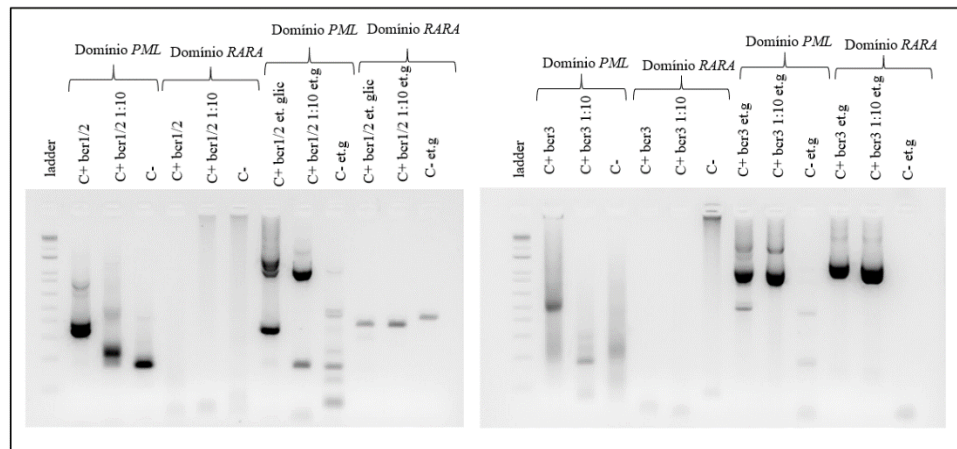


Figura 5 - Teste com etileno glicol com touchdown para amplificar *bcr1/2* e *bcr3* dos domínios PML e RARA. et.g) Etileno Glicol

Pode-se observar que o Touchdown até 55°C com a adição de etileno glicol na reação de PCR, demonstrou amplificação de bandas do tamanho esperado nos domínios PML *bcr1/2*, *bcr3* e RARA *bcr3*.

Tendo em vista essas informações foi padronizado de maneira distinta a reação de PCR e o programa de ciclagem para cada região de interesse. Sendo assim, iremos utilizar para RARA *bcr1/2* o programa com a reação de PCR descrita na tabela 2 e para RARA *bcr3* e PML *bcr3* o programa descrito na tabela 7 com a adição de etileno glicol e para PML *bcr1/2* iremos utilizar o programa descrito na tabela 6, com a adição de etileno glicol. A próxima etapa programada para o projeto, será amplificar todos os pacientes incluídos no estudo através dessa padronização.

O BCR ½ de RARA amplificou a banda de tamanho esperado utilizando a ciclagem padrão recomendada pela fabricante da enzima utilizada. Houve contaminação no C- do domínio RARA *bcr1/2* devido a ruptura dos poços da eletroforese em agarose (Figura 6).

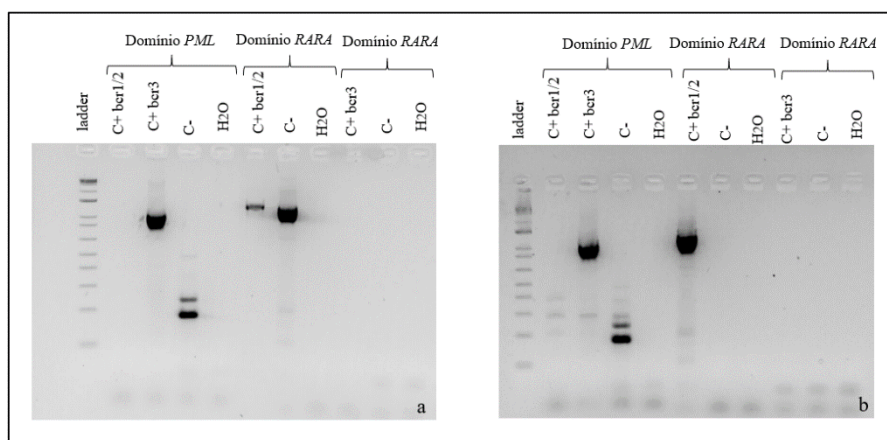


Figura 6 - Eletroforese de agarose 2%. Teste para amplificação de domínio PML e RARA utilizando o protocolo do fabricante da enzima.



Ao decorrer dos ensaios de RT-PCR, observamos que alguns pacientes não estavam amplificando a fusão, esse fato foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1%, no qual era aplicado amostras de pacientes que não haviam amplificado e amostras de pacientes que funcionavam com a metodologia empregada, chamados de “controle positivo”.

A partir desses resultados, hipóteses dos motivos pelos quais os oligonucleotídeos não estavam funcionando em algumas amostras foram levantadas, sendo elas: a ausência de células leucêmicas e conseqüentemente, ausência do transcrito de fusão PML-RARA na amostra, mutações nos éxons dos quais os oligos estavam localizados e baixa qualidade do material utilizado, seja ele o RNA ou cDNA. Para confirmação ou descarte dessas hipóteses, ensaios adicionais à metodologia proposta deverão ser adicionados ao projeto no futuro.

Primeiramente, foi extraído novamente o RNA de todas as amostras que não estavam amplificando. Foi conferida a qualidade do mesmo através de eletroforese em agarose 0.8% e em seguida realizada a síntese de cDNA, o qual também teve sua integridade confirmada através da PCR de controle interno e eletroforese em gel de agarose 2%.

Foram feitas novas reações de RT-PCR utilizando os novos cDNAs para amplificar o gene de fusão PML-RARA com a metodologia padronizada, mas não obtivemos sucesso neste teste, as amostras seguiam sem apresentar em eletroforese a amplificação esperada.

Para avaliar o se existe um perfil mutacional nas amostras que não funcionam na metodologia, serão necessários testes complementares, como por exemplo o Sequenciamento de Nova Geração (NGS).

A partir das amostras que foram amplificadas no PCR convencional, seguimos para o próximo passo do sequenciamento Sanger.

Padronização de Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado através do aparelho ABI 3500, com precipitação EDTA-Acetato de Sódio (3M). O protocolo para a reação do sequenciamento foi adaptado para o volume utilizado de Big Dye Terminator v3.1 (redução de 8 µL para 1µL) e as amostras utilizadas foram aquelas obtidas através da amplificação do gene de fusão PML-RARA. Os oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento estão descritos na quadro 3.

Quadro 3 - Relação dos oligo nucleotídeos utilizados para sequenciamento.

Nome do Oligo	Finalidade	Sequência
PML F Ne 1/2/3	PML <i>Nested Sense bcr1/2/3</i>	5'- GGAGGAGGAGTTCAGTTTCT-3'
RARA D	PML <i>Nested Antisense bcr1/2/3</i>	5'- CTGCTGCTCTGGGTCTCAAT-3'
PML F Seq 1/2/3	PML Sequenciamento Sense <i>bcr 1/2/3</i>	5'- AAGCCAAGTGCCCGAAGC-3'
RARA R Ne 3	RARA <i>Nested Antisense bcr1/2/3</i>	5'- GGTCACATGGTTCGGTAGAAAGG-3'
RARA F Ne 1/2	RARA <i>Nested Sense bcr1/2</i>	5'- CTGCCCAACAGCAACCACG-3'
RARA F Seq 1/2/3	RARA Sequenciamento Sense <i>bcr 1/2/3</i>	5'-GTGAGAAACGACCGAAACAAGA-3'

Os resultados do sequenciamento foram submetidos a comparação com a sequência de referência do banco de dados NCBI genbank através da ferramenta BLAST.

A partir da metodologia apresentada, até o presente momento, 7 pacientes foram sequenciados, dos quais um paciente com recaída molecular, apresentou uma mutação no domínio LBD do gene RARA, sendo ela uma deleção de aproximadamente 600 pares de base (pb) deste domínio. A mutação, parece estar presente em uma subpopulação de células ou ser oriunda de uma deleção posterior à duplicação da região cromossômica PML-RARA, porque a paciente apresenta na eletroforese em gel de agarose 1% duas bandas, as quais representam o tamanho esperado de aproximadamente 1239pb e outra banda de aproximadamente 630pb.

A presença da mutação foi confirmada através da análise do sequenciamento Sanger pelo Software MutationExplorer, o qual apresentou duas sequencias sobrepostas, uma contendo todo o domínio LBD e a outra contendo apenas aproximadamente 200pb do mesmo (Figura 7)

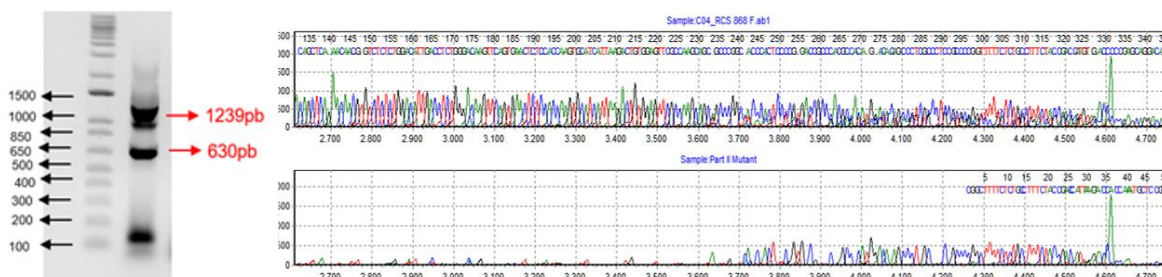


Figura 7. Imagem da Eletroforese em gel de agarose do paciente que apresentou mutação no domínio LBD. Legenda) pb) pares de base demarcados com a seta azul a partir do padrão de molecular de massa, setas vermelhas indicando a altura das bandas obtidas. Análise do sequenciamento através do *Software* Mutation Explorer, que mostra a região a jusante do gene no meio da sequência.

CONCLUSÃO

Desta forma, pode-se concluir até o presente momento, que aproximadamente 14% dos pacientes que apresentaram recaída molecular da LPA possuem mutações no domínio LBD. Pretende-se até o final do ano, sequenciar todos os pacientes e analisar para ambos os domínios, empregando se necessário, novas metodologias para análise de mutações.

De acordo com o que foi encontrado na literatura e descrito na tabela 1, a frequência de mutações está consideravelmente em um nível mais baixo, porém, ainda restam pacientes para serem analisados, fato que mudaria a porcentagem de mutações, caso encontradas.

Além, da percepção de que talvez hajam novos pontos de quebra da translocação t(15;17) ainda não descritos na literatura atual, considerando que os pacientes que não funcionaram na metodologia proposta podem pertencer a um grupo com mutações nos éxons iniciais do gene PML.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por ter cedido bolsa de Iniciação Científica.

Ao Centro Infantil Boldrini, por permitir que a pesquisa acontecesse.

À todos que colaboraram com o decorrer do projeto.

REFERÊNCIAS

AVVISATI, G.; LO COCO, F.; MANDELLI, F. Acute Promyelocytic Leukemia: Clinical and Morphologic Features and Prognostic Factors. **Semin. Hematol.**, v. 38, n. 1, p. 4-12, 2001.

BENNETT, J. M. *et al.* Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. French-American-British (FAB). **Br. J. Haematol.**, v. 33, n. 4, p. 451-8, 1976.

BITTENCOURT, H. Leucemia Promielocítica Aguda com Ênfase nos Aspectos Terapêuticos. **Ser Monogr Esc Bras Hematol.**, v. 9, p. 77-96, 2002.

CHEN, S. J. *et al.* From an Old Remedy to a Magic Bullet: Molecular Mechanisms Underlying the Therapeutic Effects of Arsenic in Fighting Leukemia. **Blood.**, v. 117, n. 24, p. 6425-37, 2011.

DE THÉ, H. *et al.* The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus. *Nature.*, v. 347, n. 6293, p. 558-61, 1990.

DE THÉ, H.; CHEN, Z. Acute Promyelocytic Leukaemia: Novel Insights Into the Mechanisms of Cure. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 10, n. 11, p. 775-83, 2010.

DE THÉ, H.; LE BRAS, M.; LALLEMAND-BREITENBACH, V. The Cell Biology of Disease: Acute Promyelocytic Leukemia, Arsenic, and PML Bodies. **J. Cell. Biol.**, v. 198, n. 1, p. 11-21, 2012.

DELVA, L. *et al.* Resistance to All-Trans Retinoic Acid (ATRA) Therapy in Relapsing Acute Promyelocytic Leukemia: Study of in Vitro ATRA Sensitivity and Cellular Retinoic Acid Binding Protein Levels in Leukemic Cells. **Blood.**, v. 82, n. 7, p. 2175-81, 1993.

DI MAIS, A. *et al.* Retinoic acid receptors: From molecular mechanisms to cancer therapy. **Mol. Aspects. Med.**, v. 41, p. 1-115, 2015.

DING, W. *et al.* Leukemic Cellular Retinoic Acid Resistance and Missense Mutations in the PML-RARalpha Fusion Gene After Relapse of Acute Promyelocytic Leukemia From Treatment With All-Trans Retinoic Acid and Intensive Chemotherapy. **Blood.**, v. 92, n. 4, p. 1172-83, 1998. **(Ref Q3)**

DIVERIO, D. *et al.* Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the PML/RARalpha fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter —AIDA” trial. **Blood.**, v. 92, n. 3, p. 784-9, 1998.

ELIHU, H. Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. **Cancer.**, v. 92, n. 5, p. 1059-73, 2001.

ESTEY, E. *et al.* Use of All-Trans Retinoic Acid Plus Arsenic Trioxide as an Alternative to Chemotherapy in Untreated Acute Promyelocytic Leukemia. **Blood.**, v. 107, n. 9, p. 3469-73, 2006.



GALLAGHER, R. E. *et al.* Characterization of acute promyelocytic leukemia cases with PML-RAR alpha break/fusion sites in PML exon 6: Identification of a subgroup with decreased in vitro responsiveness to all-trans retinoic acid. **Blood.**, v. 15, n. 4, p. 1540-7, 1995.

GALLAGHER, R. E. *et al.* Relapse of acute promyelocytic leukemia with PML-RARalpha mutant subclones independent of proximate all-trans retinoic acid selection pressure. **Leukemia.**, v. 20, n. 4, p. 556-62, 2006. (Ref Q4)

GALLAGHER, R. E. *et al.* Treatment influenced associations of PML-RARalpha mutations, FLT3 mutations, and additional chromosome abnormalities in relapsed acute Ann Hematol promyelocytic leukemia. **Blood.**, v. 120, n. 10, p. 2098-108, 2012. (Ref Q5)

GIANNI, M. *et al.* Retinoid-dependent Growth Inhibition, Differentiation and Apoptosis in Acute Promyelocytic Leukemia Cells. Expression and Activation of Caspases. **Cell. Death. Differ.**, v. 7, n. 5, p. 447-60, 2000.

GREGORY, J. Jr.; FEUSNER, J. Acute Promyelocytic Leukaemia in Children. **Best. Pract. Res. Clin. Haematol.**, v. 16, n. 3, p. 483-94, 2003.

GRIGNANI, F. *et al.* The Acute Promyelocytic Leukemia-Specific PML-RAR alpha fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. **Cell.**, v. 74, n. 3, p. 423-31, 1993.

GRIMWADE, D. *et al.* Characterization of Acute Promyelocytic Leukemia Cases Lacking the Classic t(15;17): Results of the European Working Party. Groupe Français De Cytogénétique Hématologique, Groupe De Français d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies". **Blood.**, v. 96, n. 4, p. 1297-308, 2000.

GRIMWADE, D. *et al.* Minimal Residual Disease Detection in Acute Promyelocytic Leukemia by Reverse-Transcriptase PCR: Evaluation of PML-RAR Alpha and RAR alpha-PML Assessment in Patients Who Ultimately Relapse. **Leukemia.**, v. 10, n. 1, p. 61-6, 1996.

HATTORI, H. *et al.* Identification of the novel deletion-type PML-RARA mutation associated with the retinoic acid resistance in acute promyelocytic leukemia. **Plos One.**, v. 13, n. 10, p. e0204850, 2018. (Ref Q1)

HUANG, M. E. *et al.* Use of All-Trans Retinoic Acid in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia. **Blood.**, v. 72, n. 2, p. 567-72, 1988.

HUANG, W. *et al.* Acute Promyelocytic Leukemia: Clinical Relevance of Two Major PML-RAR Alpha Isoforms and Detection of Minimal Residual Disease by retrotranscriptase/polymerase Chain Reaction to Predict Relapse. **Blood.**, v. 82, n. 4, p. 1264-9, 1993.

IMAIZUMI, M. *et al.* Mutations in the E-domain of RAR Portion of the PML/RAR Chimeric Gene May Confer Clinical Resistance to All-Trans Retinoic Acid in Acute Promyelocytic Leukemia. **Blood.**, v. 92, n. 2, p. 374-82, 1998. (Ref Q2)

KASTNER, P.; CHAN, S. Function of RARalpha during the maturation of neutrophils. **Oncogene.**, v. 20, n. 49, p. 7178-85, 2001.



LAGUNAS-RANGEL, F. A. *et al.* Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis. **Int. J. Hematol. Oncol. Stem. Cell. Res.**, v. 11, n. 4, 328-339, 2017.

LO-COCO, F. *et al.* Front-line Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia With AIDA Induction Followed by Risk-Adapted Consolidation for Adults Younger Than 61 Years: Results of the AIDA-2000 Trial of the GIMEMA Group. **Blood.**, v. 116, n. 17, p. 3171-9, 2010.

LOU, Y. *et al.* Evaluating frequency of PML-RARA mutations and conferring resistance to arsenic trioxide-based therapy in relapsed acute promyelocytic leukemia patients. **Ann Hematol.**, v. 94, n. 11, p. 1829-37, 2015.

MELNICK, A.; LICHT, J. D. Deconstructing a Disease: RARalpha, Its Fusion Partners, and Their Roles in the Pathogenesis of Acute Promyelocytic Leukemia. **Blood.**, v. 93, n. 10, p. 3167-215, 1999.

MUMFORD, J. L. *et al.* Chronic arsenic exposure and cardiac repolarization abnormalities with QT interval prolongation in a population-based study. **Environ. Health. Perspect.**, v. 115, p. 5, p. 690-4, 2007.

NASR, R. *et al.* Eradication of Acute Promyelocytic Leukemia-Initiating Cells Through PML-RARA Degradation. **Nat. Med.**, v. 14, n. 12, p. 1333-42, 2008.

OHNO, R. *et al.* Multi-institutional Study of All-Trans-Retinoic Acid as a Differentiation Therapy of Refractory Acute Promyelocytic Leukemia. Leukaemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare. **Leukemia.**, v. 7, n. 11, p. 1722-7, 1993.

PANDOLFI, P. P. *et al.* Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia. **Embo J.**, v. 11, n. 4, p. 1397-407, 1992.

PODDIGHE, P. J.; WEGHUIS, D. O. t(15;17)(q24;q21) PML/RARA. **Atlas. Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.**, v. 20, n. 12, p. 620-4, 2016.

POWELL, B. L. *et al.* Arsenic Trioxide Improves Event-Free and Overall Survival for Adults With Acute Promyelocytic Leukemia: North American Leukemia Intergroup Study C9710. **Blood.**, v. 116, n. 19, p. 3751-7, 2010.

PRATYUSH, D. D. *et al.* A new approach to touch down method using betaine as co-solvent for increased specificity and intensity of GC rich gene amplification. **Gene.**, v. 497, n. 2, p. 269-72, 2012.

REITER, A.; LENGFELDER, E.; GRIMWADE, D. Pathogenesis, Diagnosis and Monitoring of Residual Disease in Acute Promyelocytic Leukaemia. **Acta. Hematol.**, v. 112, n. 1-2, p. 55-67, 2004.

SANZ, M. A.; LO-COCO, F. Modern Approaches to Treating Acute Promyelocytic Leukemia. **J. Clin. Oncol.**, v. 29, n. 5, p. 495-503, 2011.

SANZ, M. A.; TALLMAN, M. S.; LO-COCO, F. Tricks of the trade for the appropriate management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. **Blood.**, v. 105, n. 9, p. 3018-25, 2005.



SILL, H. *et al.* Therapy-related Myeloid Neoplasms: Pathobiology and Clinical Characteristics. **Br. J. Pharmacol.**, v. 162, n. 4, p. 792-805, 2011.

TOMITA, A.; KIYOI, H.; NAOE, T. Mechanisms of Action and Resistance to All-Trans Retinoic Acid (ATRA) and Arsenic Trioxide (As₂O₃) in Acute Promyelocytic Leukemia. **Int. J. Hematol.**, v. 97, n. 6, p. 717-25, 2013.

VERNIER, M. *et al.* Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. **Genes. Dev.**, v. 25, n. 1, p. 41-50, 2011.

WAGATSUMA, Virgínia M. D. *et al.* Pesquisa de mutações adicionais ao rearranjo PML/RARα por meio da análise do transcriptoma, genoma completo e metiloma de pacientes com leucemia promielocítica aguda em três momentos distintos: diagnóstico, remissão molecular e recaída.

WANG, Z. *et al.* Differentiation Therapy for Acute Promyelocytic Leukemia With All-Trans Retinoic Acid: 10-year Experience of Its Clinical Application. **Chin. Med. J.**, v. 112, p. 11, p. 963-7, 1999.

WATZINGER, F.; LION, T. Multiplex PCR for quality control of template RNA/cDNA in RT-PCR assays. **Leukemia.**, v. 12, n. 12, p. 1984-6, 1998.

ZELEN, A. *et al.* Translocations of the RARα gene in acute promyelocytic leukemia. **Oncogene.**, v. 20, n. 49, p. 7186-203, 2001.

ZHANG, Z. *et al.* Enhanced amplification of GC-rich DNA with two organic reagents. **Biotechniques.**, v. 47, n. 3, p. 775-9, 2009.

ZHOU, D. C. *et al.* Frequent mutations in the ligand-binding domain of PML-RARα after multiple relapses of acute promyelocytic leukemia: analysis for functional relationship to response to all-trans retinoic acid and histone deacetylase inhibitors in vitro and in vivo. **Blood.**, v. 99, n. 4, p. 1356-63, 2002. **(Ref Q6)**

ZHOU, G. B. *et al.* Retinoic acid and arsenic for treating acute promyelocytic leukemia. **PLoS. Med.**, v. 2, n. 1, p. e12, 2005.

ZHU, J. *et al.* Arsenic-induced PML Targeting Onto Nuclear Bodies: Implications for the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 94, n. 8, p. 3978-83, 1997.

ZHU, J. *et al.* How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 2, n. 9, p. 705-13, 2002.