

AFONSO CELSO VIGORITO

**HISTOPATOLOGIA DA MEDULA ÓSSEA E PONTO DE QUEBRA NO GENE
HÍBRIDO *bcr-abl* NA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA**

Orientador: Profa. Dra. Sara T O Saad

Co-Orientador: Profa. Dra. Irene Lorand Metze

Dissertação apresentada ao Departamento de
Clínica Médica da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Mestre

Campinas

1996

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	80
N.º CHAMADA:	1.201.4001
	162211
V.	Ca
TOMEO B012	7779
PRCC.	667136
C	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	14,11
DATA	12/23/96
N.º CPD	

CM-00086169-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DE FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Vigorito, Afonso Celso

V688h Histopatologia da medula óssea e ponto de quebra no gene híbrido bcr-abl na leucemia mielóide crônica / Afonso Celso Vigorito. Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador : Sara Terezinha Ollala Saad

Tese (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

I. Medula óssea - Histologia. 2. Leucemia mielóide crônica. 3. Biologia molecular. I. Saad, Sara Terezinha Ollala. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Aos meus pais, Ivete (*in memoriam*) e Afonso

À Márcia e Manoela

Aos amigos Aranha, Marilda e Valder

AGRADECIMENTOS

À Dra. Sarita, orientadora e amiga, cujo pragmatismo e objetividade foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À Dra. Irene, co-orientadora, grande pesquisadora na área da hemopatologia no Brasil, pela ajuda na revisão das biópsias de medula óssea e pela revisão do texto.

Ao Dr. Fernando pela ajuda na elaboração do projeto e pela orientação inicial do trabalho.

Ao Dr. Cármino, professor e amigo, pelo constante estímulo ao estudo da hematologia clínica.

À Dra. Carmen Sílvia, do departamento de genética médica, pela ajuda nas análises estatísticas.

À Lena e Cida que possibilitaram que a minha rotina no laboratório de biologia molecular fosse menos traumática.

À Malu e à Sandrinha pelo carinho, paciência e tolerância na realização de todo o trabalho de editoração.

À Silvia Miranda responsável pela última compra e envio da sonda dos Estados Unidos.

À Francis, secretária do TMO, pela digitação de grande parte do trabalho, pelo preenchimento da documentação e contatos externos para a finalização da tese.

À todos os funcionários do laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da Unicamp, em especial à Silvana e ao Carlos.

Aos médicos do TMO e aos residentes da hematologia pelas várias coberturas nos ambulatórios e enfermarias, para que pudesse concluir a tese.

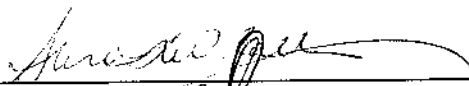
A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Banca examinadora da tese de Mestrado

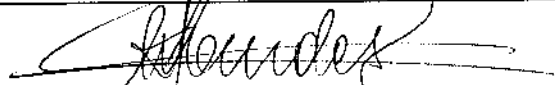
Orientador: Sara Terezinha Olalla Saad

Membros:

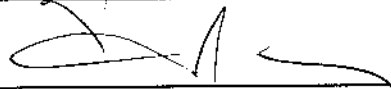
1. Sara Terezinha Olalla Saad



2. Maria de Lourdes Chauffaille



3. Fernando Ferreira Costa



Curso de pós-graduação Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22/02/96

Sumário

	pág
Resumo.....	1
Introdução	3
Objetivos	33
Casuística e Métodos	35
Resultados	46
Discussão.....	57
Conclusões.....	68
Summary.....	70
Referências Bibliográficas	72

Lista de abreviaturas

Sigla	Descrição
b2-a2	rearranjo do exon 2 no gene bcr com o exon 2 no abl
b3-a2	rearranjo do exon 3 no gene bcr com o exon 2 no abl
Baso	basófilos
bcr	<i>breakpoint cluster region</i>
c-abl	homólogo celular normal da sequência transformadora do vírus "Abelson murine leukemia"
DNA	ácido desoxirribonucleico
EGF	fator de crescimento epidérmico
Eo	eosinófilos
FAN	fosfatase alcalina dos neutrófilos
FGP	fator de crescimento de fibroblastos
G-CSF	fator estimulador de colônia de granulócitos
G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
GdA	gene que codifica o tipo A da G6PD
GdB	gene que codifica o tipo B da G6PD
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
GTPase	proteínas que se ligam à guanina da membrana
IFN	interferon
IL-1B	interleucina 1B
IL-6	interleucina 6
kb	kilobases
kD	kiloDaltons
LLA	leucemia linfóide aguda
LMA	leucemia mielóide aguda
LMC	leucemia mielóide crônica
LMC GRAN	leucemia mielóide crônica tipo granulocítica
LMC GRAN-MEG	leucemia mielóide crônica tipo granulocítica/megacariocítica
M-CSF	fator de crescimento de macrófagos
MF	mielofibrose
MO	medula óssea

Sigla	Descrição
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
OMS	osteomielosclerose
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
Ph ¹	cromossomo Philadelphia
RNA	ácido ribonucleico
SP	sangue periférico
TNF	fator de necrose tumoral
v-abl	sequência transformadora do vírus "Abelson murine leukemia"

Lista de Figuras e Tabelas

Figuras

Figura 1	7
Figura 2	16
Figura 3	18
Figura 4	21
Figura 5	23
Figura 6	25
Figura 7	26
Figura 8	44
Figura 9	61
Figura 10	63

Tabelas

Tabela 1	20
Tabela 2	32
Tabela 3	37
Tabela 4	38
Tabela 5	48
Tabela 6	49
Tabela 7	50
Tabela 8	56
Tabela 9	56

Fotos

Foto 1 8

Foto 2 9

Foto 3 10

Foto 4 11

Foto 5 12

Foto 6 13

Foto 7 51

Foto 8 52

Foto 9 53

Foto 10 54

Resumo

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal caracterizada, em mais de 90% dos casos, pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph¹). Esta alteração citogenética resulta de uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 com transferência do proto-oncogene *c-abl* do cromossomo 9 para uma região restrita de quebra no cromossomo 22, de 5,8 kilobases (kb), denominada *breakpoint cluster region (bcr)*. Esta translocação leva à ativação do proto-oncogene *abl* que exerce um papel fundamental na patogênese da neoplasia. Assim, foi objetivo deste trabalho caracterizar, numa população de 35 pacientes com diagnóstico de LMC em primeira fase crônica, o ponto de quebra no gene *bcr* e correlacioná-lo com as características histológicas da medula óssea, tamanho do baço, número de leucócitos, porcentagem de blastos, eosinófilos, basófilos no sangue periférico e medula óssea, número de plaquetas, e citogenética. DNA genômico de leucócitos de sangue periférico foi digerido com as enzimas de restrição Bgl II, Bam HI e Hind III e, por técnica de *Southern blotting*, o local de quebra no *bcr* foi subdividido em extremidades 3' e 5', através da hibridização com as sondas Pr-1 (*Oncogene Science*) e Ph¹ / *bcr* 3 nos casos onde não conseguimos detectar o rearranjo com a primeira. O estudo citogenético foi realizado em 32/35 pacientes e o cromossomo Ph¹ esteve presente em 30 deles. O rearranjo no gene *bcr* foi detectado, pela técnica de *Southern blotting*, nos 35 pacientes estudados, sendo que em 86% dos casos foi possível determinar a zona do ponto de quebra: 13% na zona 1, 33% na zona 2, 27% na zona 3 e 27% na zona 4. Em um caso só detectamos o rearranjo com a utilização da sonda Ph¹/*bcr*-3 sugerindo provável deleção da extremidade 3'. Assim, do total de pacientes, 43% tiveram rearranjo na extremidade 5' e 57% na extremidade 3'. Nenhuma correlação foi encontrada entre o local do rearranjo com os dados laboratoriais e clínico. Quanto à histologia da medula óssea, 50% dos casos GRAN-MEG apresentaram quebra na extremidade 5' e 50% na 3'. Trinta e três por cento dos casos GRAN apresentaram quebra na extremidade 5' e 67% na extremidade 3' (teste de Fischer p= 0,17). Assim, concluímos, que na nossa população houve uma frequência alta do rearranjo *bcr* na zona 4 e na extremidade 3'; não houve correlação entre o ponto de quebra com as características laboratoriais e clínicas, assim como com os subtipos histológicos GRAN-MEG e GRAN. Além disso a técnica de *Southern blotting* foi útil na detecção do rearranjo no gene *bcr* em 2 casos Ph¹ negativo.

Introdução

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença neoplásica hematológica caracterizada por uma proliferação clonal do precursor pluripotente com o envolvimento de células das linhagens mielóide, eritróide, megacariocítica e ocasionalmente células linfóides (Silver, 1990).

Esta doença foi originalmente descrita em 1845 por Craigie, Bennett, e Virchow que chamaram a atenção para a característica "purulenta" do sangue associada a uma grande esplenomegalia. Em 1960, Nowell e Hungerford descreveram um pequeno cromossomo anormal, cromossomo Philadelphia, ou Ph¹, tendo sido esta a primeira alteração cromossômica associada a uma neoplasia, encontrado em mais de 90% dos casos (Sandberg e Hossfeld, 1970). Pelas características clínicas típicas e a presença do cromossomo Ph¹, a LMC é talvez a doença mieloproliferativa melhor definida (Koeffler e Golde, 1981).

As evidências de que a LMC é uma neoplasia clonal do precursor pluripotente surgiram de estudos citogenéticos e isoenzimáticos. O cromossomo Ph¹ é encontrado em neutrófilos, monócitos, eritrócitos, plaquetas, basófilos, mas não está presente em fibroblastos (Chervenick et al, 1971; Whang et al, 1963; Golde et al, 1977; Denegri et al, 1978; Maniatis et al, 1969; Tough et al, 1963; Sandberg e Hossfeld, 1970).

Os estudos da isoenzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), ligada ao cromossomo X, também possibilitaram a caracterização clonal da LMC. Como somente um dos dois cromossomos X é ativo nas células somáticas XX, uma mulher heterozigota no *locus* da G6PD para o gene comum, GdB (que codifica o tipo B da G6PD), e uma variante como a GdA (que codifica o tipo A da enzima) terá duas populações distintas de células. Em uma população de células o GdB é ativo com conseqüente produção de enzima do tipo B; em outra população, o GdA é ativo, produzindo a variante enzimática A. Assim, mulheres heterozigotas com LMC têm somente enzimas do tipo A ou B nos granulócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, plaquetas e eritrócitos, sugerindo origem clonal através de uma célula precursora comum (Barr e Fialkow, 1973; Fialkow et al, 1977). Através do estudo isoenzimático foi possível determinar a participação dos linfócitos B no clone leucêmico e, recentemente, por técnicas de genética molecular dos linfócitos T (Fialkow et al, 1978; Martin et al, 1980; Jonas et al, 1992).

Nos Estados Unidos da América, a LMC é responsável por 20 a 30 por cento dos casos de leucemia e tem uma incidência de quase um caso para cada 100.000 pessoas por ano (Koeffler e

Golde, 1981). No Brasil os números são semelhantes, sendo responsável por 19,5% entre todos os casos de leucemia diagnosticados no período entre 1976 e 1980 (Brumini et al, 1982).

A média de idade de aparecimento da doença é em torno de 50 anos, não havendo predominância de sexo. Os sintomas e sinais desenvolvem-se insidiosamente e incluem fadiga, anemia, esplenomegalia, leucocitose e a sobrevida média é de 3 anos. Esta primeira fase da doença, "benigna" ou "crônica", em geral evolui para uma segunda, mais aguda, chamada fase "blástica" ou "terminal". Embora em muitos casos a crise blástica da LMC tenha um aparecimento abrupto, alguns pacientes mostram um período intermediário, ou fase acelerada, caracterizada por refratariedade às medicações usadas durante a fase crônica, aumento de visceromegalia e sintomas como febre, sudorese, emagrecimento e dores ósseas (Silver, 1990).

Na fase crônica, a contagem de leucócitos está aumentada, com presença de granulócitos no sangue periférico em todos os estágios de diferenciação, e, quase sempre, acompanhada de eosinofilia e basofilia. Por outro lado, o hematócrito pode estar diminuído em muitos pacientes e as plaquetas elevadas em quase 50% dos casos ao diagnóstico, sendo normal no restante (Silver, 1990).

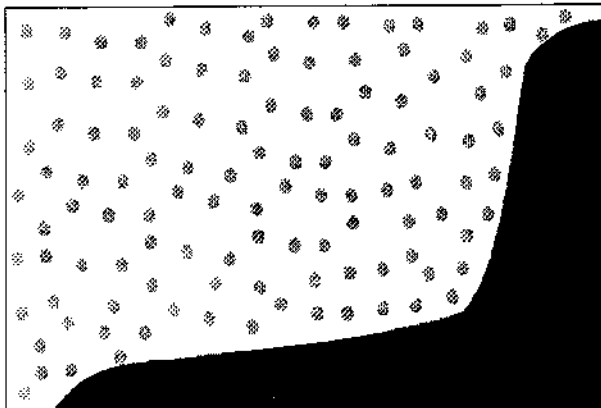
Uma alteração bioquímica comum encontrada na LMC é a redução da atividade da fosfatase alcalina dos neutrófilos; entretanto, a função fagocitária dos granulócitos permanece inalterada (Cramer et al, 1977).

O diagnóstico da LMC pode ser feito pelos dados de hemograma, mielograma, além do encontro do cromossomo Ph¹ na citogenética, e a determinação do rearranjo *bcr-abl* através de técnicas moleculares. Entretanto, a biópsia de medula óssea apresenta características patognomônicas, que permitem o diagnóstico diferencial da LMC com leucocitoses reacionais de uma lado e com as outras síndromes mieloproliferativas por outro lado (Georgii et al, 1990). A medula óssea é densamente celular com ausência virtual de células gordurosas. Ocorre uma proliferação de granulócitos imaturos localizados nos espaços paratrabecular ou perivascular; as formas mais maduras - metamielócitos - bastonetes - segmentados - ocupam as regiões mais centrais. É comum a presença de eosinofilia e basofilia, assim como aumento de macrófagos com inclusões cristalóides - chamados de células "pseudo-Gaucher". Dentro de uma mesma biópsia poderá haver variações no número, tamanho e configuração nuclear dos megacariócitos. São típicos da LMC a presença de formas pequenas e pouco poliplóides (micromegacariócitos). As fibras de reticulina podem estar normais mas é comum o encontro de aumento moderado, assim como infiltração de

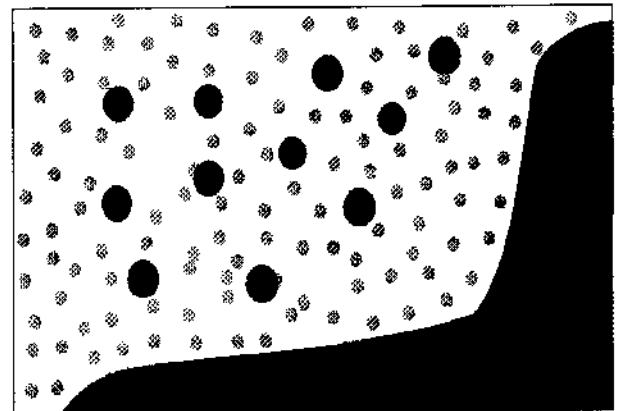
plasmócitos, linfócitos e mastócitos. A eritropoiese é tipicamente reduzida e frequentemente mostra retardo de maturação. Rarefação das trabéculas ósseas sem aumento da atividade osteoclástica poderá ser vista em muitas biópsias. Em algumas formas agressivas de LMC pode ser encontrada necrose da medula óssea, que poderá estar associada com o desenvolvimento de novos clones neoplásicos e o aparecimento de crise blástica (Burkhardt et al, 1982; Frisch et al, 1989). Tem-se descrito também alguns aspectos de importância prognóstica como a presença de fibrose colágena e focos de blastos em regiões centrais (Dickstein e Vardiman, 1992).

A histologia da LMC não é uma entidade uniforme, podendo ser classificada em duas categorias de acordo com os achados histológicos da medula óssea. A forma granulocítica (LMC GRAN) apresenta uma hiperplasia granulocítica unilinear, sem aumento acentuado dos megacariócitos, que não são marcadamente pleomórficos; mas muitas vezes apresentando-se em formas anãs (micromegacariócitos). Um segundo tipo, denominado de LMC granulocítica/megacariocítica (LMC GRAN-MEG), caracteriza-se por uma hiperplasia bilinear megacariocítica/granulocítica com megacariócitos pleomórficos, imaturos e heterotópicos encontrados em todas as regiões da medula óssea, mas frequentemente próximos a sinusóides alargados ou dentro do seu lúmen. Neste tipo os megacariócitos podem estar agrupados (*clusters*) ou dispersos isoladamente. As fibras de reticulina estão localizadas próximas aos *clusters* ou ao redor dos vasos sanguíneos (Burkhardt et al, 1982, 1984, 1986; Georgii, 1983; 1990; Frisch et al, 1989) (Figura 1). (Fotos 1, 2, 3, 4, 5 e 6)

A forma GRAN tem uma frequência de 45% e a GRAN-MEG 55%.(Bartl et al, 1993). Entretanto, em uma população brasileira com LMC Ph¹ positivo, onde foi estudada a heterogeneidade citológica e histológica da medula óssea, a frequência encontrada foi de 30% para o tipo GRAN e 70% para o tipo GRAN-MEG (Lorand-Metze et al, 1987).



GRAN



GRAN / MEG

Figura 1. Representação esquemática da subdivisão histológica GRAN e GRAN / MEG na LMC (modificado de Frisch et al, 1989)

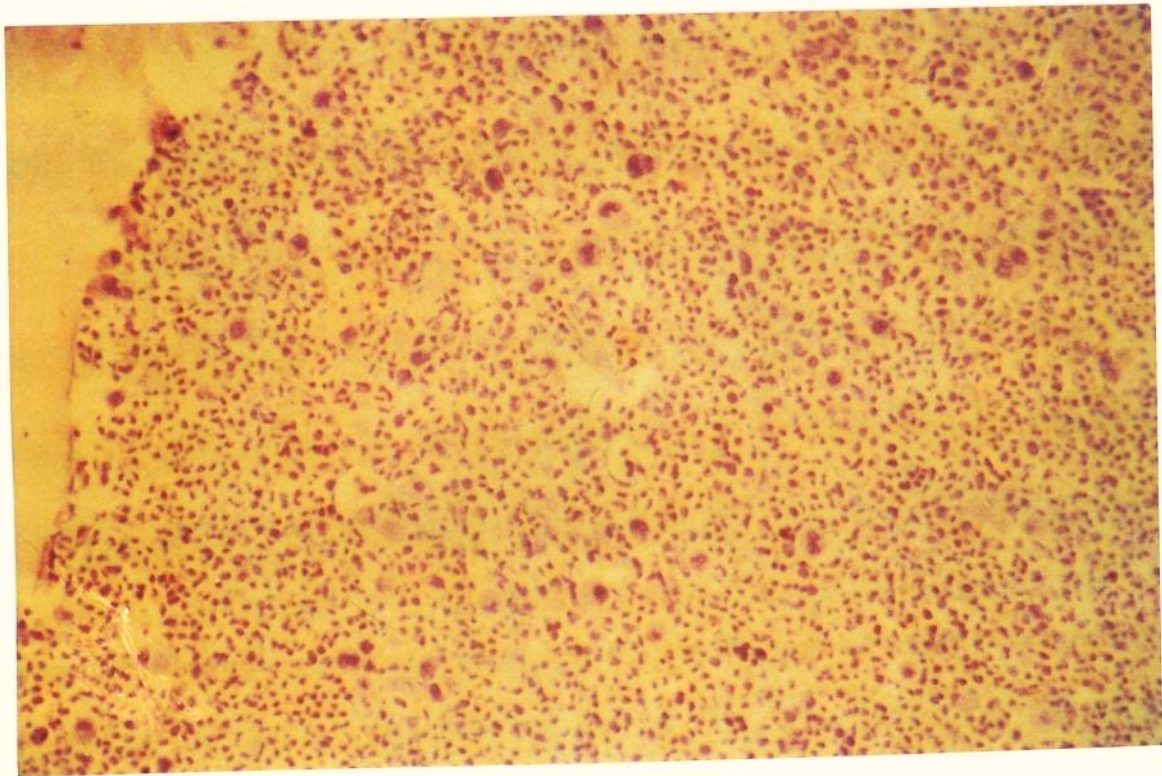


Foto 1: Corte histológico de LMC tipo GRAN-MEG. Medula Óssea densamente celular com hiperplasia bilinear megacariocítica/granulocítica. Observar aumento acentuado de megacariócitos que são pleomórficos, heterotópicos e dispostos de maneira agrupada. (HE x 100)

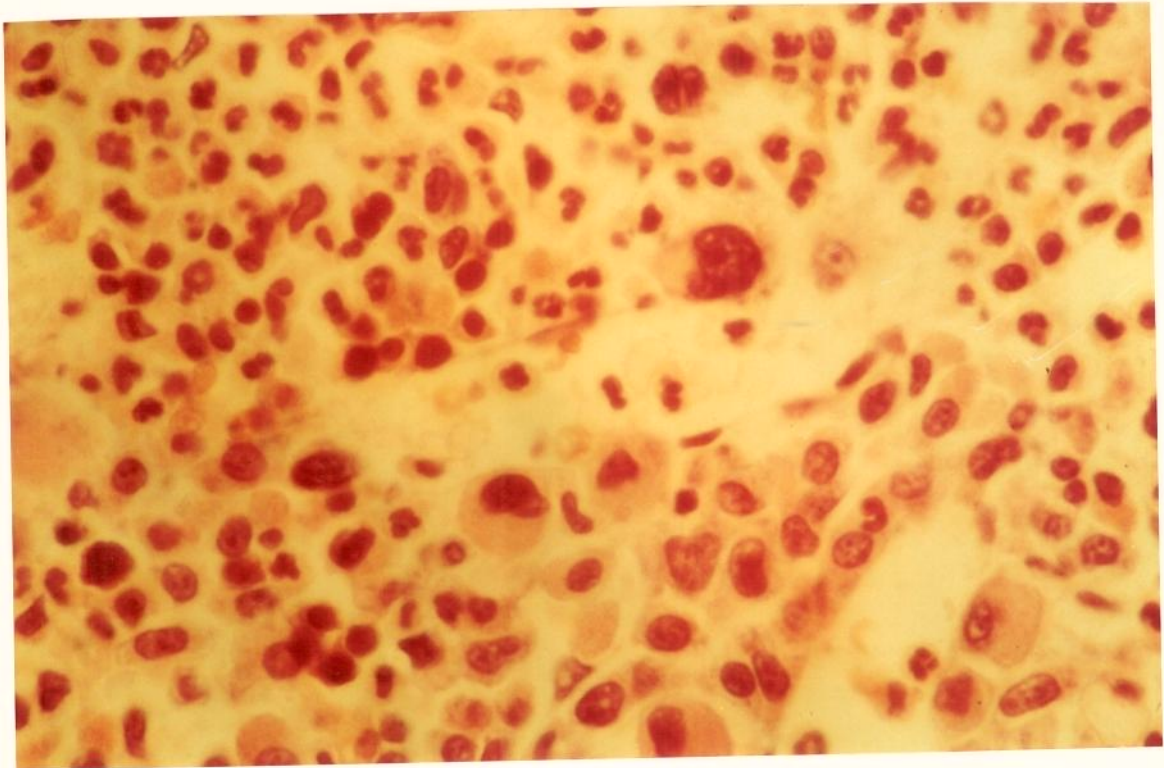


Foto 2: Corte histológico de LMC tipo GRAN-MEG. Observar megacariócitos localizados próximos a sinusóides alargados. (HE x 400)

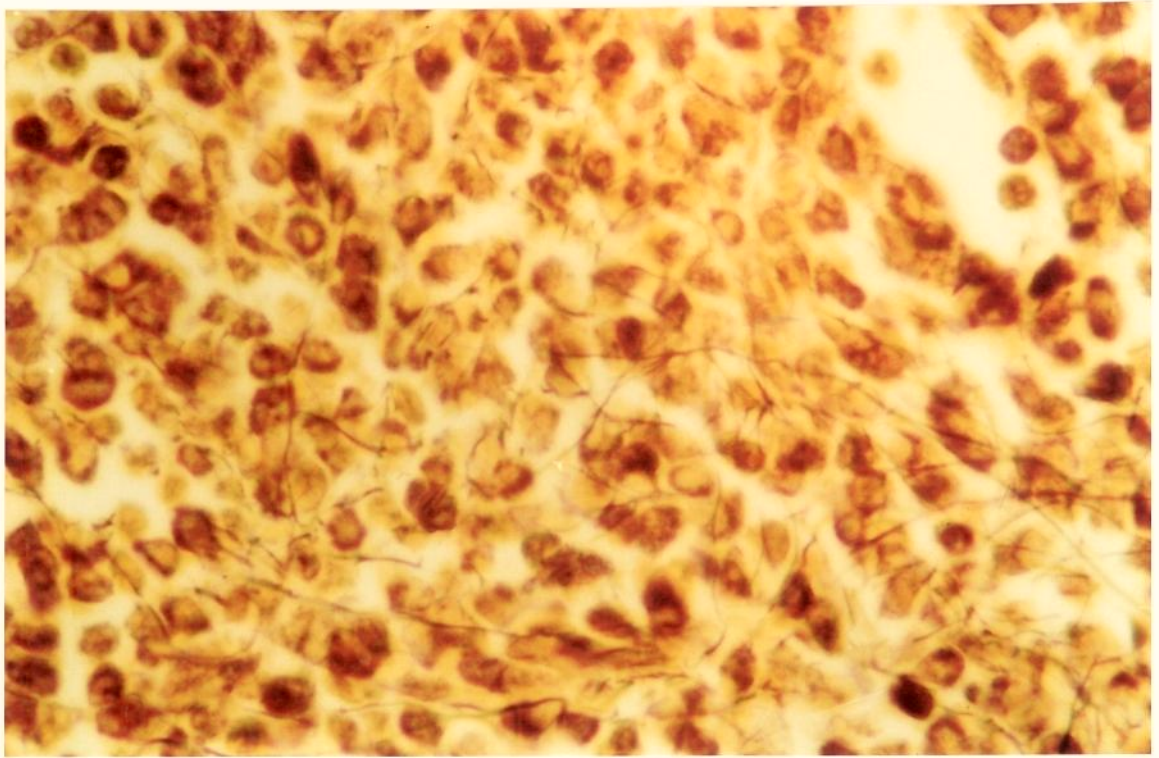


Foto 3: Corte histológico de LMC tipo GRAN-MEG. Observar aumento difuso de fibras de reticulina. (Impregnação pela prata x 400)

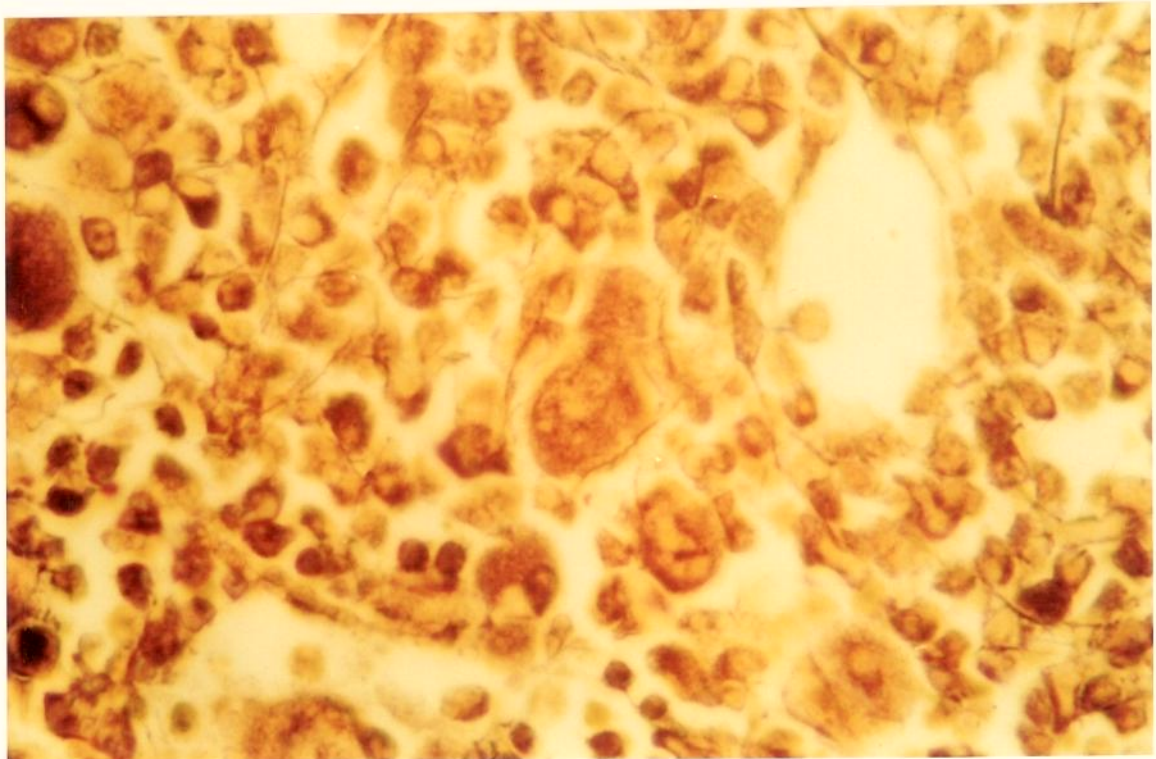


Foto 4: Corte histológico de LMC tipo GRAN-MEG. Observar aumento difuso de fibras de reticulina e ao redor de megacariócito. (Impregnação pela prata x 400)

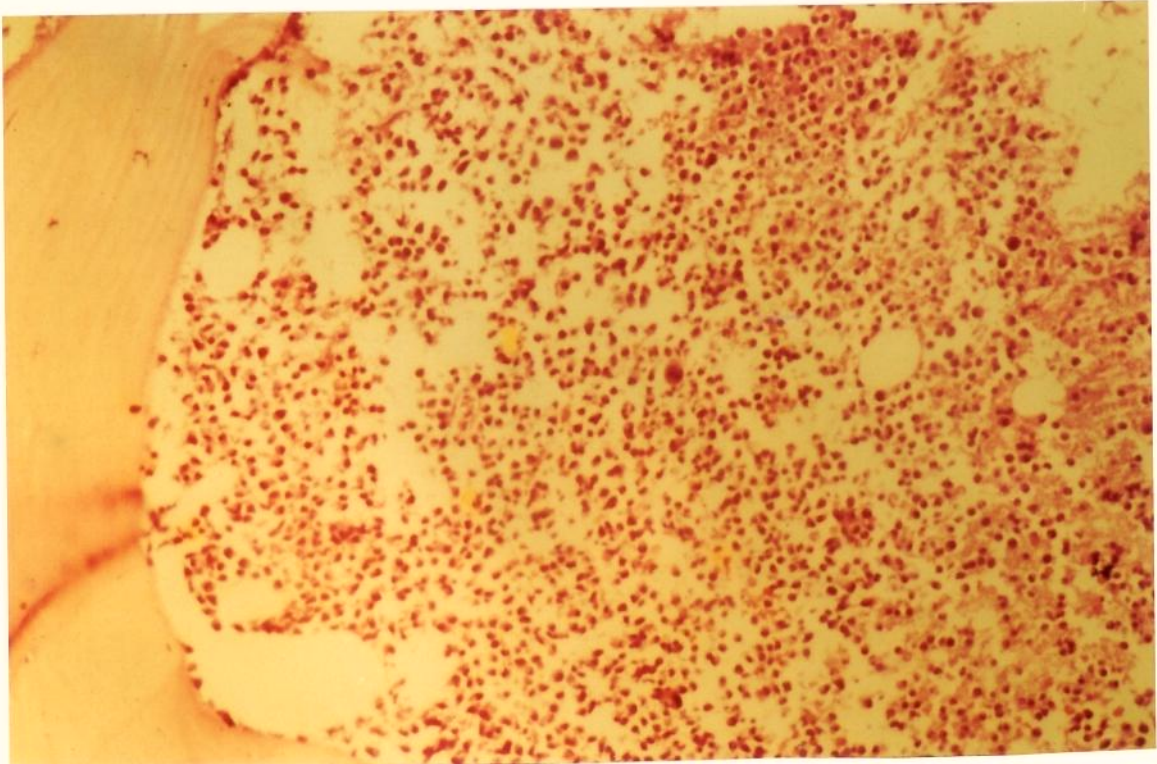


Foto 5: Corte histológico de LMC tipo GRAN. Observar hiperplasia granulocítica unilinear sem aumento acentuado de megacariócitos. (HE x 100)

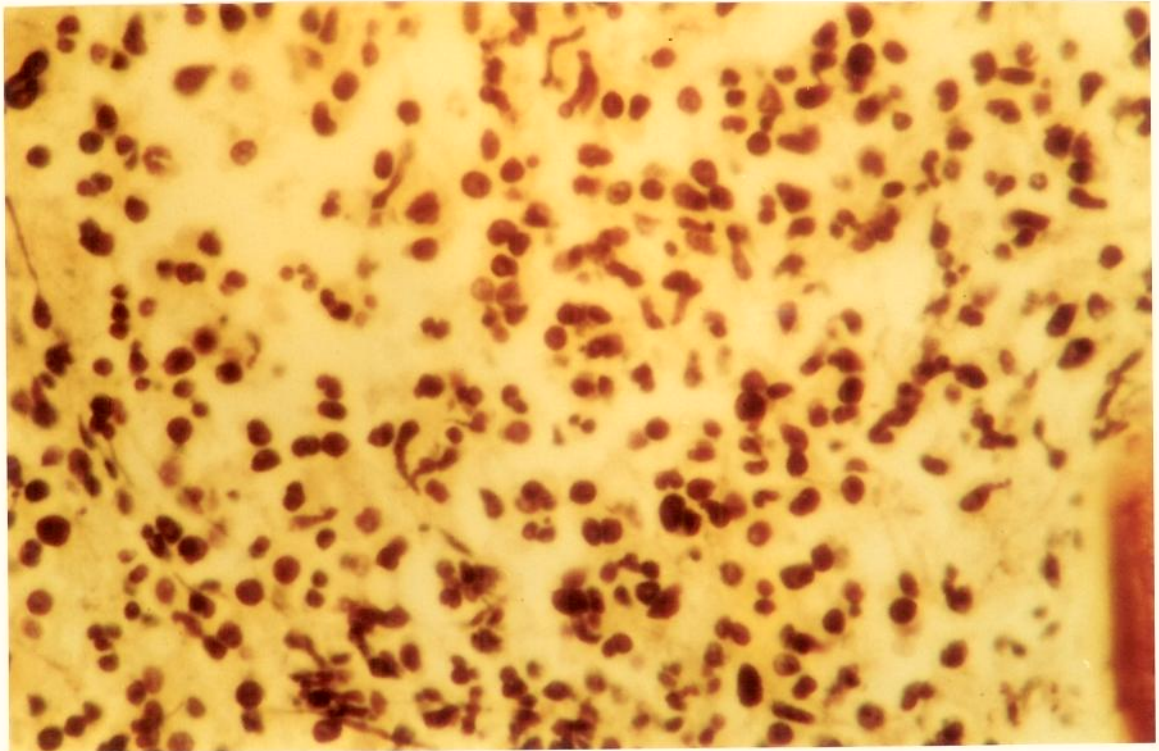


Foto 6: Corte histológico de LMC tipo GRAN. Observar ausência de fibras de reticulina.
(Impregnação pela prata x 400)

A anormalidade característica da LMC é o aumento do componente mielóide. O *pool* total dos granulócitos está aumentado em 10 a 150 vezes, comparado ao normal (Galbraith e Abu-Zahra, 1972). Há vários anos sabe-se que as células "malignas" na fase crônica não são completamente autônomas e que estão sujeitas a algum controle regulatório. Entretanto, a razão exata pela qual as células leucêmicas possuem uma vantagem proliferativa permanece desconhecida (Silver, 1990).

Foi sugerido que o defeito biológico primário não é uma proliferação desordenada da célula tronco pluripotencial, mas sim uma maturação discordante que mantém os promielócitos e mielócitos mais tempo no *pool* proliferativo aumentando a massa mielocítica (Ogawa et al, 1970; Strife e Clarkson, 1988; Fokas et al, 1991). Em contraste ao estado normal, em que os progenitores primitivos possuem uma ampla capacidade proliferativa produzindo a maioria das células, na LMC os progenitores possuem uma capacidade proliferativa limitada. Desta maneira, o aumento da massa mielocítica ocorrerá em consequência do assincronismo de maturação núcleo-citoplasmático no compartimento proliferativo mais maduro (blastos tardios, promielócitos e mielócitos), e por uma duração maior da vida média destas células. Como o núcleo não amadurece adequadamente, as células permanecem em proliferação (Ogawa et al, 1970; Strife e Clarkson, 1988; Fokas et al, 1991). De acordo com esta hipótese, as células leucêmicas permanecem responsivas aos mecanismos regulatórios normais de crescimento, não necessitam de aumento na capacidade proliferativa e o compartimento da célula tronco leucêmica permanecerá menor do que o compartimento normal. Tal modelo prediz que seja necessário um período considerável de tempo para que a população neoplásica ultrapasse o clone normal. Isto é compatível com as estimativas médias de 8 anos entre o aparecimento do cromossomo Ph¹ na primeira célula tronco e o desenvolvimento de sintomas clínicos (Strife e Clarkson, 1988).

As células malignas necessitam geralmente de uma menor quantidade de fatores de crescimento exógenos para o seu crescimento e multiplicação, quando comparadas com células semelhantes, mas não neoplásicas. Isto deve-se talvez à produção, pelas células neoplásicas, de seus próprios fatores de crescimento (Sporn e Todaro, 1980). Os primeiros modelos experimentais que mostraram uma relação causal entre a produção autócrina de fatores de crescimento e o surgimento de tumores, vieram de técnicas de transferência gênica para algumas linhagens celulares específicas (Lang et al, 1985; Johnson et al, 1989). Estes modelos documentaram o surgimento de células que sintetizavam fatores estimuladores de colônias de granulócitos-macrófagos (*GM-CSF*), proliferavam na ausência de *GM-CSF* exógeno e produziam leucemias em

camundongos. Entretanto, a expressão dos fatores de crescimento ocorreram em linhagens celulares já "imortalizadas", ou seja, células em que a capacidade tumoral está aumentada ou totalmente convertida. Em contraste, quando células não neoplásicas eram transfectadas com genes de fatores de crescimento, estas células não expressavam o fenótipo maligno (Wong et al, 1987). Assim, o estímulo autócrino sozinho parece não levar à "imortalização" e os fatores de crescimento representam apenas um estágio no processo da transformação maligna (Lang et al, 1985).

As evidências para uma produção autócrina excessiva de fatores de crescimento na LMC é limitada. Células neoplásicas maduras de pacientes na fase crônica parecem produzir fatores estimuladores de colônia de granulócitos (*G-CSF*), além de apresentarem receptores para estas moléculas (Klein et al, 1990). Entretanto, a interação entre os fatores de crescimento e os fatores inibidores do crescimento autócrino parece ser o determinante do comportamento biológico desta neoplasia, podendo inclusive explicar as diferenças clínicas entre as fases aguda e crônica da doença. O fator de necrose tumoral (TNF) é um inibidor do crescimento autócrino na LMC, contribuindo para a manutenção da fase crônica através de um efeito inibitório sobre o clone maligno. É produzido, na grande maioria, pelas próprias células mielóides (Duncombe et al, 1989).

Outros fatores estão relacionados à proliferação celular na LMC, principalmente durante a evolução da doença para a crise blástica. Alguns pacientes com doença avançada podem ser resistentes ao tratamento com alfa-interferon (IFN) havendo, nestes casos, um aumento significativo na produção de interleucina-1B (IL-1B), que por sua vez parece favorecer o crescimento do clone leucêmico. Com a inibição da atividade da IL-1B ocorre uma redução da colônia hematopoiética, sugerindo, assim, um estímulo autócrino da IL-1B na progressão da doença (Estrov et al, 1991). A expressão de IL-1B, IL-6 e *GM-CSF* nas células do estroma da medula óssea de pacientes com LMC em crise blástica também parece estar associada à progressão da neoplasia. Segundo esta teoria, as células leucêmicas estão em íntimo contato com as células estromais reguladoras, que são de origem mesenquimal e não hematopoiética. Os fatores gerados pelas células leucêmicas poderão influenciar a atividade do microambiente e, por sua vez, as interações entre as células mesenquimais reguladoras e as leucêmicas determinarão a capacidade de diferenciação e proliferação destas últimas (Wetzler et al, 1991) (Figura 2).

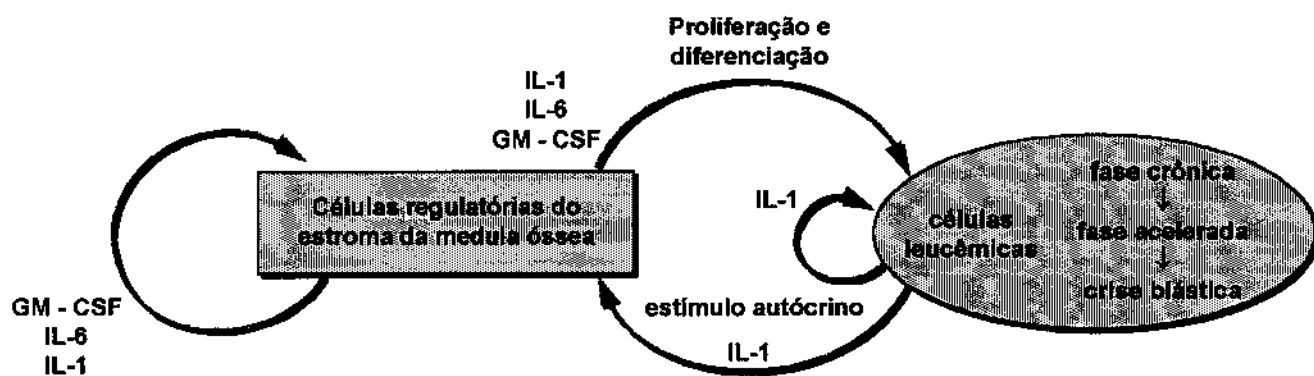


Figura 2. Mecanismo de estímulo autócrino na LMC

Caracterização Citogenética e Molecular na LMC

Oncogenes

Os recentes avanços no estudo da biologia molecular tiveram talvez seu maior impacto no campo da oncologia devido à identificação de genes que são em parte responsáveis pelo desenvolvimento de neoplasias. Estes genes podem ser classificados em duas categorias: genes causadores de câncer, chamados de oncogenes, e genes supressores de tumor, chamados de anti-oncogenes (Fishleder, 1990).

Oncogenes são formas estruturalmente ou funcionalmente alteradas de genes celulares normais, denominados de proto-oncogenes (Fishleder, 1990).

Sabe-se desde o início do século que o sarcoma *Rous*, em galinhas, era causado por um agente infeccioso, mais tarde identificado como sendo um retrovírus. Em 1980, tornou-se claro que as sequências gênicas virais (oncogenes virais), responsáveis por tumores em animais, eram sequências de genes celulares normais modificadas, que já eram conhecidos por ter um papel importante na regulação do ciclo celular. Aparentemente, sequências virais de RNA foram transcritas de células infectadas durante a evolução viral. Assim, genes celulares normais com sequências homólogas aos oncogenes virais são chamados de proto-oncogenes (Yarnold, 1992). Estes genes controlam uma variedade de processos associados ao crescimento, proliferação e diferenciação celular (Druker et al, 1989). Os proto-oncogenes podem sofrer mutações, resultando na sua ativação e passando a ser chamados, então, de oncogenes celulares, para distingui-los dos seus homólogos virais (Yarnold, 1992). Como consequência, pode haver uma expressão alterada do oncogene ou a produção de uma proteína anormal, uma oncoproteína (Patterson, 1992) (figura 3).

Quatro mecanismos básicos podem estar associados com a ativação dos oncogenes nos tumores humanos: aumento da transcrição, amplificação, translocação e mutação (Willecke e Schafer, 1984; Pimentel, 1985; Wiedemann et al, 1992; Patterson, 1992). Apesar da demonstração, em células tumorais, de rearranjo, amplificação ou mutação de ponto em sequências gênicas, poderem funcionar como um oncogene, a prova inequívoca será obtida apenas com a transformação de células apropriadas, causada por uma expressão gênica alterada, ou introdução de uma oncoproteína (Patterson, 1992).

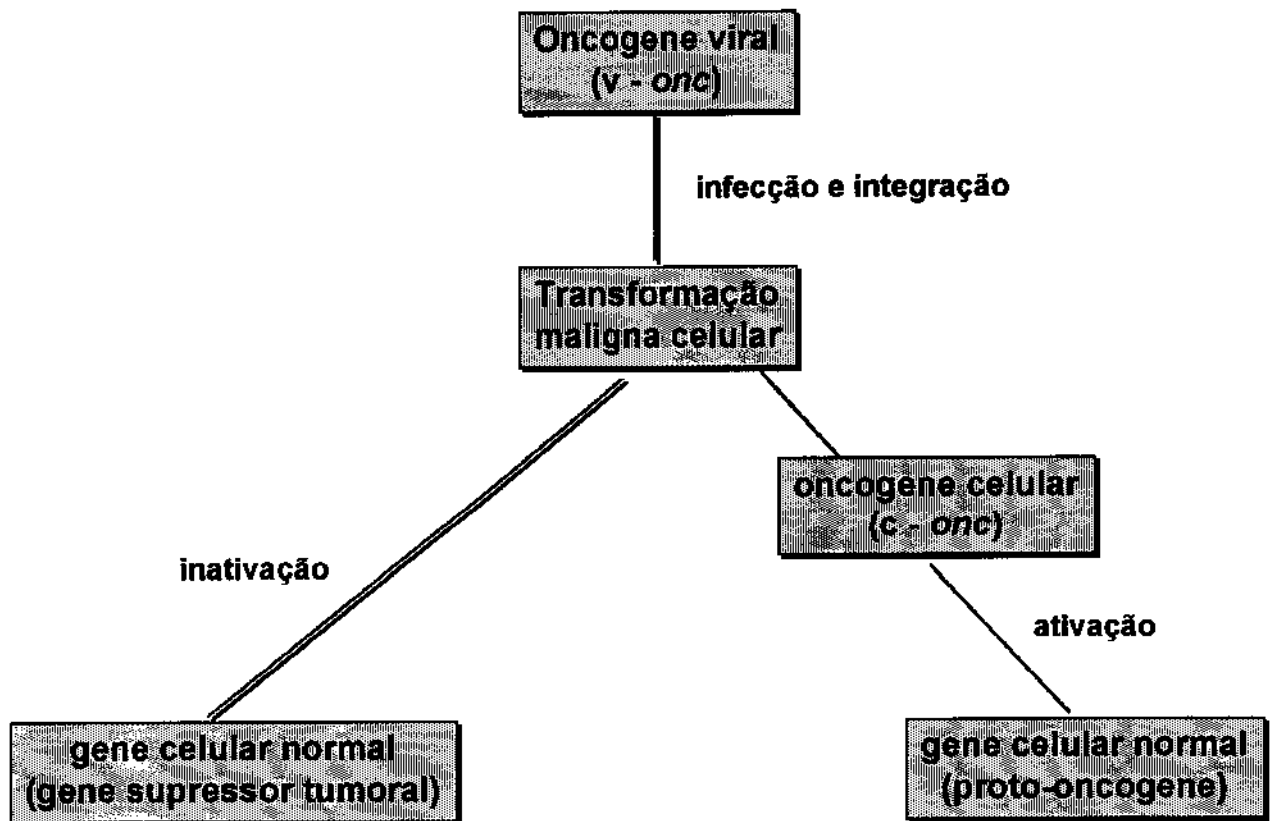


Figura 3. Esquema da terminologia usada para a definição dos oncogenes (modificado de Yarnold, 1992)

Há dois tipos distintos de retrovirus indutores de tumores. Os retrovirus de transformação aguda contêm o oncogene viral e são caracterizados pela capacidade de induzir tumores em animais e rapidamente transformar células em culturas. Já foram identificados mais de 20 retrovirus com diferentes oncogenes como o *v-myc*, *v-H-ras*, *v-K-ras*, *v-abl*, *v-src*, *v-erbA* e *v-erbB* (Patterson, 1992). Os retrovirus de transformação crônica induzem a tumores em animais de uma maneira mais demorada, não apresentam o oncogene, mas atuam via integração proviral no genoma do hospedeiro alterando as sequências proto-oncogênicas celulares e o seu controle de transcrição (Ex. *int1*, *int2* e *pim1*) (Patterson, 1992).

Apesar do grande número e da diversidade das suas ações, os oncogenes são classificados de acordo com o papel que irão desempenhar na via regulatória do crescimento celular (tabela 1). Eles codificam as oncoproteínas que são muito semelhantes aos produtos normais dos proto-oncogenes, com exceção de que perderam, em sua atividade, mecanismos regulatórios importantes, além de não precisarem de sinais externos para ativação (Druker et al, 1989). O grupo melhor conhecido de oncogenes são os que codificam receptores de membranas para fatores de crescimento. Quando um fator de crescimento se liga ao seu receptor, este se torna transitoriamente ativado. Esta ativação causará a ativação de outras proteínas e a produção de uma variedade de pequenas moléculas reguladoras chamadas de mensageiros secundários. Estes sinais serão ultimamente transmitidos ao núcleo, onde será induzida a expressão de um gene específico, resultando na divisão celular. Neste processo, sinais inibitórios de crescimento são gerados para prevenir uma proliferação celular indefinida. Um controle preciso destes sinais, tanto positivos como negativos, parece ser necessário para manter a divisão celular normal (Druker et al, 1989; Yarnold, 1992) (figura 4).

Além da ativação de genes, as mutações de ponto também poderão resultar em inativação gênica. Isto levará à eliminação de um produto gênico que poderá ser necessário ao controle da proliferação celular. Os genes deste tipo foram denominados supressores porque eles poderão agir como supressores de um fenótipo tumoral. Um dos primeiros genes supressores identificados foi o gene RB, implicado em formas familiares e esporádicas do retinoblastoma. Também foi identificado um grande número de mutações de ponto no gene p53 (outro gene supressor) em carcinomas de cólon e outros tumores sólidos (Wiedemann e Morgan, 1992).

Tabela 1. Lista parcial dos oncogenes conhecidos e as neoplasias associadas (Druker et al, 1989)

Categoria	Oncogene	Gene celular homólogo	Neoplasia associada
Fator de crescimento	<i>sis</i> <i>int-2</i>	PDGF FGF	Carcinoma de mama
Receptores transmembrânicos para fator de crescimento	<i>erbB</i> <i>neu (erbB-2, HER-2)</i> <i>fms</i> <i>ros, kit, e outros</i>	receptor para EGF receptor para M-CSF	Carcinoma de mama
Tirosina quinase associada à membrana	<i>abl</i> família <i>src</i> <i>fes, fps</i>		Leucemia mielóide crônica (LMC), Leucemia linfóide aguda (LLA), Leucemia mielóide aguda (LMA)
Proteínas que se ligam à guanina da membrana (GTP)	K-, N-, e H- <i>ras</i>		Adenoma ou carcinoma de cólon, Adenocarcinoma de pulmão, Câncer de próstata, Leucemias (LMA e LLA), outros
Serina-trionina citoplasmática	<i>raf/mil</i> <i>mos</i>		
Receptores de hormônios citoplasmáticos	<i>erbA</i>	receptor de hormônio tireoideano	
Fatores nucleares	<i>c-myc</i> <i>N-myc</i> <i>L-myc, N-myc</i> <i>fos</i> <i>jun</i> <i>myb, ets, ski</i> e outras		Linfoma de Burkitt, Neuroblastoma, Carcinoma de pequenas células do pulmão
Antioncogenes Outros	<i>p53</i> <i>RB</i> <i>bcl-2</i> <i>bcl-1</i> <i>int-1</i>		Ca de cólon Retinoblastoma, Linfomas não Hodgkin Carcinoma de mama

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
EGF: fator de crescimento epidérmico

FGF: fator de crescimento de fibroblastos
M-CSF: fator de crescimento de macrófagos

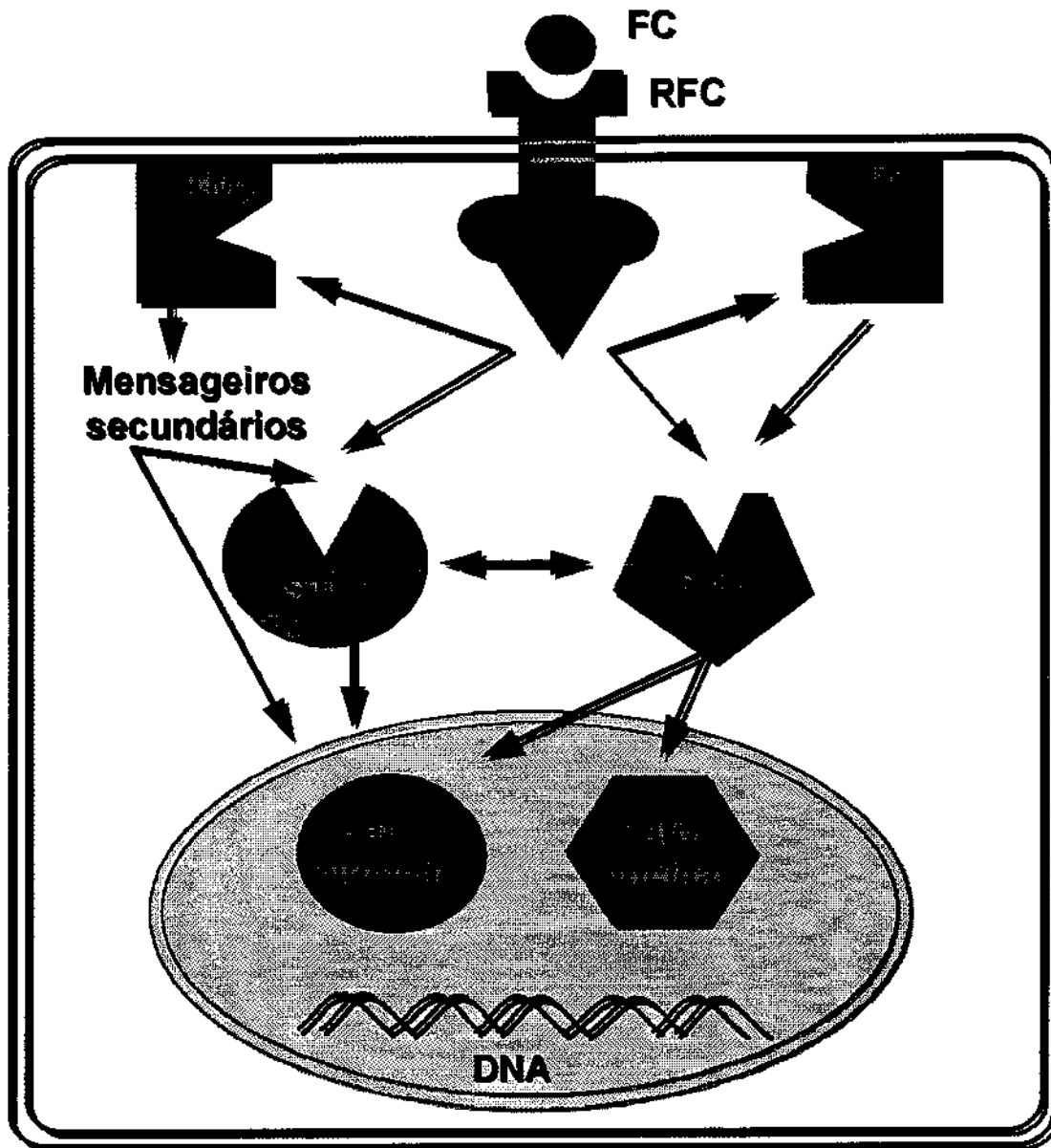


Figura 4. Sinal de transdução através dos receptores da membrana celular. Representação esquemática dos eventos que se seguem à ligação do fator de crescimento (FC) ao seu receptor (RFC) (Druker et al, 1989)

Cromossomo Philadelphia

A anormalidade genética encontrada na leucemia mielóide crônica é talvez a melhor associação entre a disfunção de um proto-oncogene e o aparecimento de uma neoplasia (Fishleder, 1990).

A marca citogenética da LMC, encontrada em 90% a 95% dos casos, é o cromossomo Philadelphia (Ph^1), que é um cromossomo 22 diminuto, originado de uma translocação recíproca de material genético entre o braço longo do cromossomo 9 na banda q34.1 e o braço longo do cromossomo 22 na banda q11.21, $t(9;22)(q34.1; q11.21)$, descrita por Rowley em 1973 (figura 5). Em alguns pacientes poderá haver translocações complexas envolvendo três, quatro ou cinco cromossomos, incluindo os cromossomos 9 e 22 (Sonta e Sandberg, 1977). A translocação recíproca envolvendo o braço longo do cromossomo 9 e 22 não é específica para a LMC, podendo também ocorrer em aproximadamente 20% das leucemias linfóides agudas de adultos "de novo" (LLA), 10% das LLA de crianças, e menos de 5% das leucemias mielóides agudas de adultos (LMA) (Bloomfield et al, 1980; Whang-Peng et al, 1970).

Estrutura molecular do cromossomo Philadelphia

O proto-oncogene *c-abl* está localizado no cromossomo 9 (banda q34) (Heisterkamp et al, 1982) e é transferido para o cromossomo 22 como consequência da translocação recíproca entre estes dois cromossomos (de Klein et al, 1982; Bartram et al, 1983; Heisterkamp et al, 1983) (figura 5). O gene *c-abl* é o homólogo celular normal da sequência transformadora do vírus *Abelson murine leukemia*, conhecido com *v-abl*, que causa leucemias de origem celular pré-B em camundongos (Abelson e Rabstein, 1970). O gene *c-abl* foi altamente conservado durante a evolução e está presente não somente em humanos e outros vertebrados, mas também na *Drosophila melanogaster*. Esta conservação filogenética demonstra que o gene *c-abl* normal pode participar de processos essenciais do desenvolvimento celular (Hoffmann et al, 1983).

O gene *c-abl* humano normal tem uma extensão aproximada de 230 kb (kilobases), contendo 11 exons, sendo que a sua extremidade 5' está orientada em direção ao centrômero (Figura 6). Existem dois primeiros exons alternativos, exon 1a e exon 1b. O exon 1a está 19 kb proximal ao exon 2; o exon 1b está 200 kb proximal ao exon 2. Como resultado serão transcritos dois RNA mensageiros (mRNA) de 6-kb e 7-kb. O mRNA de 6-kb consiste dos exons 1a ao 11; o mRNA de 7-kb começa com o exon 1b, omite a distância de 200 kb até o exon 2 (omitindo o exon 1a), juntando-se aos exons 2 a 11 (Shtivelman et al, 1985; Shtivelman et al, 1986).

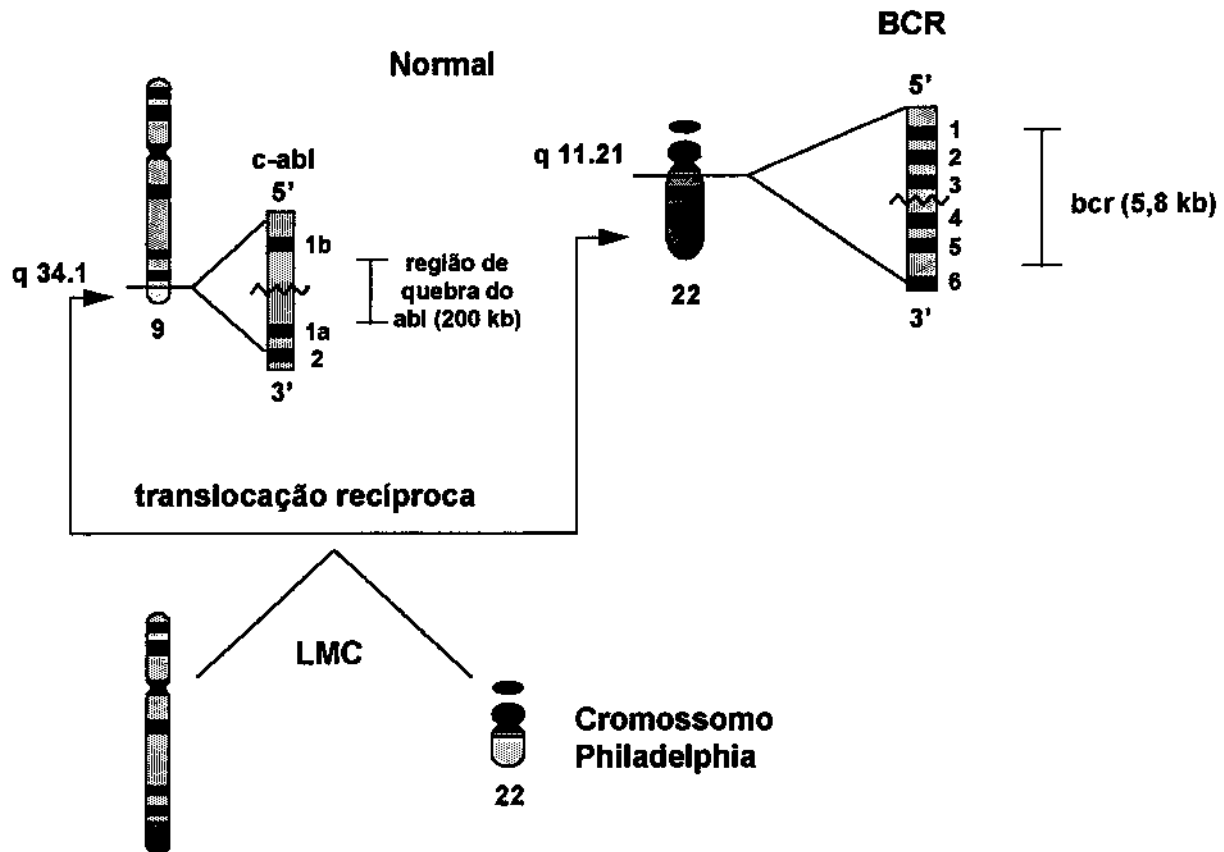


Figura 5. Cromossomo Philadelphia. O cromossomo Philadelphia é produzido por uma translocação recíproca do braço longo do cromossomo 9 e do braço longo do cromossomo 22, onde o segmento 3' do gene *c-abl* é colocado em justa posição ao segmento 5' do gene *BCR*. A quebra no *c-abl* ocorre frequentemente entre os exons 1b e 1a numa região de 200 Kb sendo altamente variável. Também poderá ocorrer entre os exons 1a e 2. Em contraste, a quebra no gene *BCR* ocorre numa área pequena de 5,8 Kb conhecida como "breakpoint cluster region" (*bcr*), frequentemente envolvendo os exons 3 e 4 do *bcr*

Análises sequenciais dos exons 1a e 1b demonstraram que cada um codifica diferentes peptídeos (Shtivelman et al, 1986). Entretanto, somente uma proteína normal *c-abl* foi identificada com um peso molecular de 145 kD (kiloDaltons) denominada de p^{145 c-abl} (Konopka e Witte, 1985). Esta proteína pertence à família de enzimas tirosina-quinase que catalisam a transferência de fosfatos terminais da adenosina trifosfato para resíduos de aminoácidos de substratos proteicos (Kurzrock et al, 1988). A fosforilação de proteínas é um importante mecanismo normal do controle do crescimento celular e da hematopoiese (Kurzrock et al, 1988; Rosti et al, 1992). Uma nova atividade biológica do *c-abl* tem sido associada a um controle negativo do crescimento celular, funcionalmente similar aos genes supressores de tumor, tais como p53 e RB (Sawyers et al, 1994).

O local de quebra do gene *c-abl* no cromossomo 9 geralmente ocorre 5' ao exon 2, podendo ocorrer em qualquer ponto do intron de 200 kb que separa o exon 1b e 1a. Em consequência da grande extensão do primeiro intron, o local preciso da quebra no cromossomo 9 é altamente variável, resultando na translocação do exon 1a (ou exon 2) ao exon 11 para o cromossomo 22 (Dreazen et al, 1988 (A)) (Figuras 5, 6 e 7). A quebra no cromossomo 22 na LMC Ph¹ localiza-se dentro de um segmento de DNA de 5,8 kb denominado de "breakpoint cluster region" (*bcr*) (Groffen et al, 1984). Mais tarde, foi demonstrado que o *bcr* faz parte de um gene com pelo menos 90 kb, *BCR*, (Heisterkamp et al, 1985), expressando dois mRNA de 4,5 kb e 6,7 kb (Shtivelman et al, 1985). A extremidade 5' do gene *bcr* esta localizada na direção do centrômero do cromossomo 22, permanecendo no cromossomo Ph¹, e a extremidade 3' é translocada para o cromossomo 9 na t(9;22) (Heisterkamp et al, 1985) (Figuras 5, 6 e 7). O produto do gene *bcr* é uma proteína de 160 kD (p^{160bcr}), que apresenta rica região serina-trionina, codificada pelo exon 1 e função de GTPase na porção carboxi terminal (Maru e Witte, 1991; Diekmann et al, 1991). O gene *bcr* na região afetada pela translocação do Ph¹ é composto de cinco exons e a quebra ocorre geralmente entre os exons 2 e 3 ou exons 3 e 4 (Heisterkamp et al, 1985). Como resultado da troca recíproca entre o cromossomo 9 e 22, toda a extremidade do *bcr*, 3' ao local de quebra, será removida e rearranjada no cromossomo 9. Os exons 5' do gene *bcr* (incluindo os exons 1 e 2, com ou sem o exon 3) permanecerão no cromossomo 22. Ao mesmo tempo, o proto-oncogene *c-abl* será relocado do cromossomo 9 banda q34 para o cromossomo 22 banda q11. O resultado final é que as sequências proximais do gene *bcr* serão justapostas às sequências do *c-abl* de modo *head-to-tail* formando um gene híbrido *bcr-abl* no cromossomo 22 (Shtivelman et al, 1985) (Figura 7). Em consequência a esta configuração genômica aberrante será transcrito um mRNA anormal de 8,5 kb que compreende os exons proximais do *bcr* fundidos aos exons 2 a 11 do *c-abl* (os exons

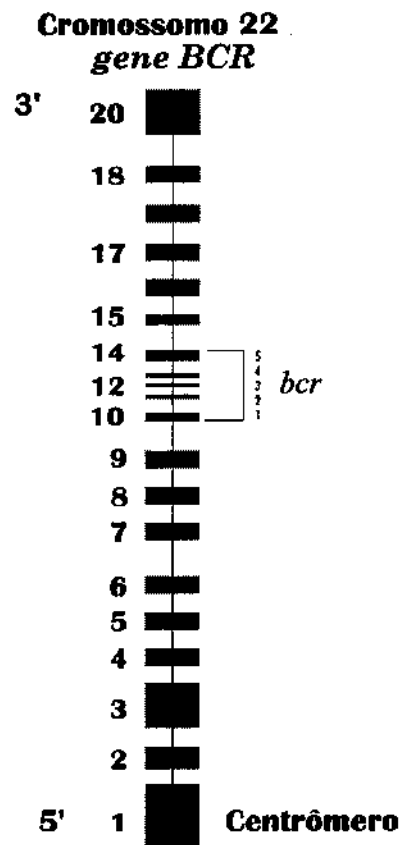
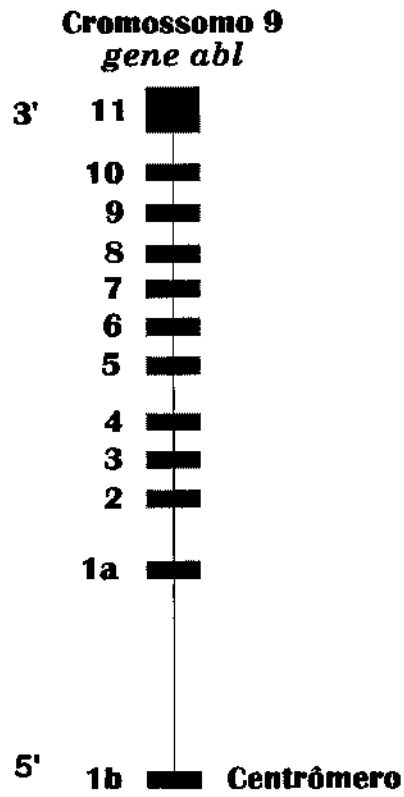


Figura 6. Genes *abl* e *BCR* no cromossomo 9 e 22 respectivamente

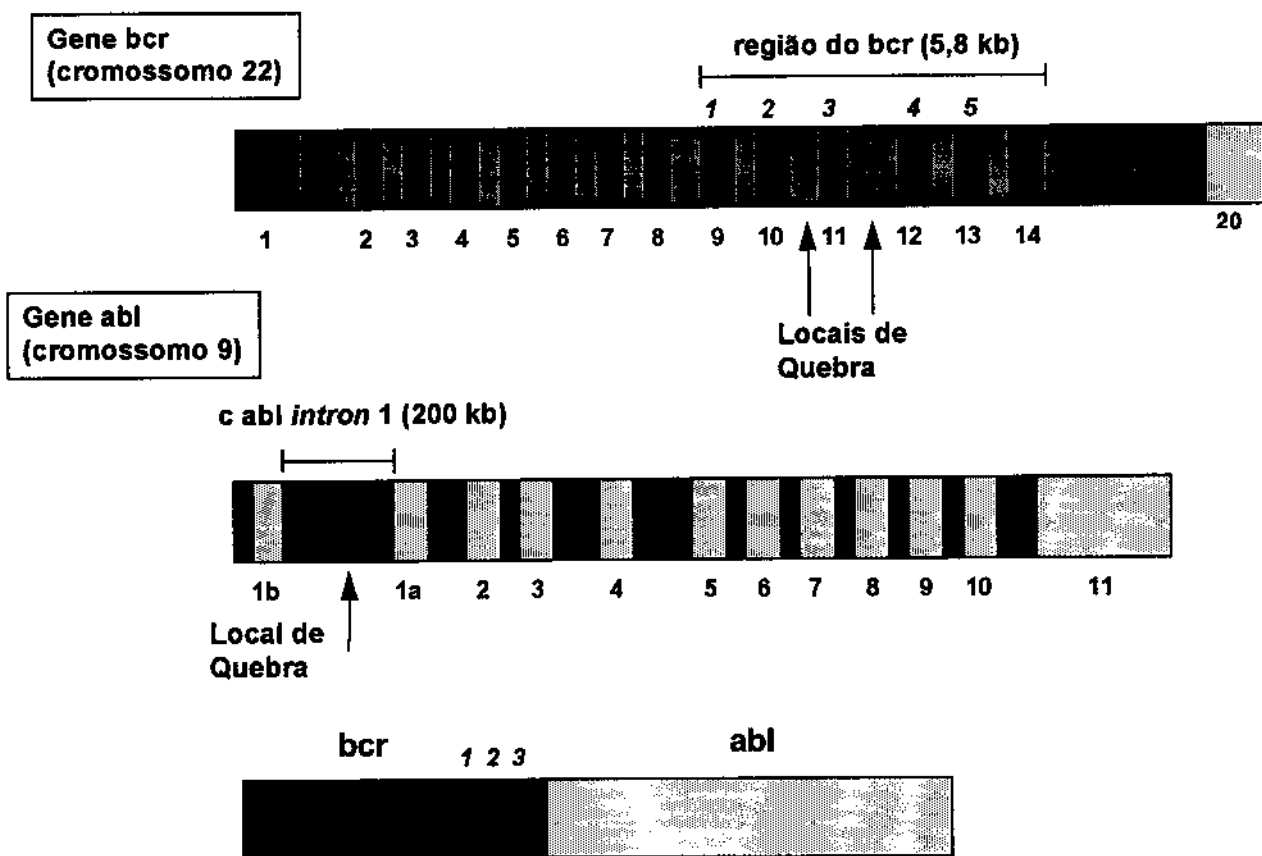


Figura 7. Detalhes da translocação dos genes *bcr/abl* na leucemia mielóide crônica (LMC). Na LMC clássica, a quebra no gene *BCR* ocorre dentro de um segmento de 5,8 Kb do *BCR* (*bcr*). Isto resultará na fusão da extremidade 5' do *bcr* com o segmento 3' do *c-abl* levando à formação do gene híbrido *bcr-abl*

1a ou 1b do *c-abl* não são transcritos) (Shtivelman et al, 1985). A tradução do mRNA anormal será uma proteína quimérica de 210 kD - $p^{210bcr-abl}$ que tem uma atividade enzimática tirosina-quinase muito maior do que a sua homóloga normal $p^{145c-abl}$, podendo contribuir desta maneira para o processo de transformação maligna na LMC (Konopka et al, 1984; Kloetzer et al, 1985; Kurzrock et al, 1987; Lugo et al, 1990). Embora quase todos os pacientes com LMC apresentem rearranjo no *bcr*, o local preciso da quebra dentro do *bcr* é bastante variável (Groffen et al, 1984). Duas espécies distintas de mRNA poderão ser codificados e tanto o exon 2 quanto o exon 3 do *bcr* poderão ser fundidos ao exon 2 do *abl*, quebra tipo L-6 e quebra tipo K-28, respectivamente (Shtivelman et al, 1985; Heisterkamp et al, 1985; Shtivelman et al, 1986). Os dois tipos de mRNA híbrido diferirão em apenas 25 aminoácidos (Heisterkamp et al, 1985). A identificação de variantes moleculares da $p^{210bcr-abl}$ na LMC poderá estar associada a manifestações clínicas diferentes desta neoplasia (Kurzrock et al, 1987).

Participação do bcr-abl no desenvolvimento da LMC

Sabe-se que existe uma expressão diferente do mRNA *bcr-abl* e da $p^{210bcr-abl}$ entre os progenitores primitivos e os maduros na LMC. Há um aumento da expressão nos progenitores maduros, em detrimento dos primitivos, explicando a expansão do clone leucêmico a nível dos progenitores mielóides maduros (Bedi et al, 1993).

Além desta evidência também foram criados vários modelos animais com o objetivo de se testar o papel do *bcr-abl* em induzir leucemias (Daley, 1993).

Em culturas de medula óssea de camundongos infectadas com retrovírus contendo o *bcr-abl* houve uma proliferação de células linfóides B que mantinham sua capacidade de diferenciação (Scherle et al, 1990). A introdução do *bcr-abl* em linhagens celulares hematopoiéticas favoreceu a proliferação autônoma destas células, inclusive com capacidade tumoral (Daley e Baltimore, 1988; Takahashi et al, 1994). Camundongos que receberam doses letais de irradiação e transplantados com medula óssea que continha o retrovírus com o *bcr-abl* desenvolveram várias doenças fatais com acúmulos anormais de macrófagos, eritrócitos, mastócitos e células linfóides. Manifestação clássica de LMC não foi observada, mas os tumores originados dos macrófagos eram acompanhados por uma síndrome semelhante à LMC, provavelmente pela produção de um fator

de crescimento mielóide pelas células tumorais. Estes resultados levaram à conclusão de que o *bcr-abl* favorece uma proliferação de células hematopoiéticas, mas a transformação completa deve envolver outras alterações genéticas (Elefanty et al, 1990). Populações de células tronco hematopoiéticas infectadas com retrovírus contendo tanto o *v-abl* como o *bcr-abl* e usadas para transplantar camundongos letalmente irradiados levou a um desenvolvimento tumoral em mais de 90% dos animais, independente da forma ativada do *abl*. Quase 50% deles desenvolveram uma síndrome mieloproliferativa com várias características da fase crônica da LMC; os outros animais morreram de linfomas de células pré-B. Esta síndrome se desenvolveu em células que estavam infectadas tanto com o *v-abl* como com o *bcr-abl*, sugerindo que a introdução do gene *abl* ativado em células alvos apropriadas é o maior determinante da doença (Kelliher et al, 1990). Medula óssea de camundongos infectada com um retrovírus que codifica a $p^{210bcr-abl}$ e transplantada em receptores singênicos irradiados levou ao aparecimento de várias neoplasias hematológicas nos receptores; entre elas, uma síndrome mieloproliferativa muito semelhante à fase crônica da LMC. Estes resultados demonstram que a expressão da $p^{210bcr-abl}$ pode induzir a LMC (Daley et al, 1990).

Os relatos anteriores evidenciam que a expressão do *bcr-abl* afeta a expansão clonal da LMC através do descontrole da proliferação celular. Entretanto, os precursores primitivos mielóides não apresentam características de aumento da proliferação celular, já que possuem índices mitóticos e respostas a fatores de crescimento de colônias normais, além de não proliferarem ou maturarem mais rápido do que os seus homólogos normais. Desta maneira, um outro mecanismo da expansão clonal poderia ser explicado por um prolongamento da sobrevivência celular, onde a atividade tirosina quinase *abl* agiria como supressora da apoptose. A inibição do *bcr-abl* por antisense oligonucleotídeos reverte a supressão da apoptose diminuindo a sobrevivência celular. A diminuição da morte celular programada (apoptose) parece ser um outro meio pela qual o *bcr-abl* afeta a expansão do clone leucêmico na LMC (McGahon et al, 1994; Bedi et al, 1994; Smetsers et al, 1994).

Fatores Prognósticos na LMC

Clinicos

A tentativa de discriminar os pacientes com LMC, em relação ao prognóstico, levou o desenvolvimento de vários sistemas de escore. Estes estudos foram baseados em dados clínicos e laboratoriais com análises uni e multivariada da sobrevida destes pacientes. Uma variedade de características da doença mostrou associação significativa com a sobrevida (Jacquillat et al, 1978; Gomez et al, 1981; Tura et al, 1981; Cervantes e Rozman, 1982; Oguma et al, 1982; Kantarjian et al, 1985). Porém, apesar da maioria destes autores terem mostrado concordância em relação à significância de alguns dados, não houve unanimidade. De sete características comuns examinadas (idade; sexo; tamanho do baço; nível de hemoglobina; número de plaquetas; número de leucócitos e número de blastos/promielócitos no sangue periférico), somente o tamanho do baço foi uniformemente aceito como indicador prognóstico (Sokal et al, 1988).

O grupo internacional de estudos de prognóstico na LMC realizou uma avaliação prospectiva de discriminação prognóstica na LMC. Os pacientes foram divididos em três grupos: baixo risco, risco intermediário e alto risco. O cálculo do risco relativo foi baseado na utilização de quatro variáveis: idade, tamanho do baço, número de plaquetas e porcentagem de blastos circulantes. A análise estatística mostrou resultados altamente significativos em relação à progressão da doença e sobrevida dos pacientes entre os três grupos de risco. Durante 2 anos, 87% dos pacientes do grupo de baixo risco permaneceram na fase crônica, *versus* 78% do intermediário e 63% do alto risco. A sobrevida em 2 anos para os 3 grupos foi de 94%, 80% e 73%, respectivamente (Sokal et al, 1988).

Histopatológicos

Os vários estudos realizados analisando os fatores prognósticos na LMC não levaram em consideração os achados histológicos da medula óssea (Jacquillat et al, 1978; Gomez et al, 1981; Tura et al, 1981; Cervantes e Rozman, 1982; Oguma et al, 1982; Kantarjian et al, 1985; Sokal et al, 1988). Porém, as investigações sequenciais das biópsias em pacientes com LMC têm valor prognóstico, podendo evidenciar três tipos de evolução:

- a) transformação da forma bilinear (LMC GRAN-MEG) para mielofibrose (MF)/osteomielosclerose (OMS), com diminuição do risco de evolução para crise blástica e portanto

com prognóstico mais favorável. A sobrevida média entre as outras entidades clínicas mieloproliferativas é de 35 meses.

b) evolução da forma unilinear (LMC-GRAN) para crise blástica com uma sobrevida menor. A sobrevida média é de 26 meses.

c) transição entre os dois tipos (Burkhardt et al, 1982, 1984; Bartl et al, 1993).

Entretanto, a associação da forma GRAN-MEG com menor evolução para a crise blástica e melhor sobrevida, e da forma GRAN com pior sobrevida, deve ser questionada, já que a crise blástica envolve igualmente os pacientes com os dois subtipos histológicos (Thiele et al, 1988). Neste contexto, provavelmente, muitos casos com o subtipo GRAN-MEG com Ph¹ negativo seriam na verdade formas incipientes de mielofibrose (Thiele et al, 1988).

A observação sequencial das biópsias de medula óssea de pacientes com o subtipo GRAN mostrou que raramente ocorre o aparecimento de fibrose, enquanto que os casos GRAN-MEG apresentam tendência significativa para transformação em mielofibrose, que está associada a um prognóstico mais desfavorável. O subtipo GRAN, sem crescimento proeminente de megacariócitos, teria portanto um prognóstico mais favorável (Lazzarino et al, 1986; Thiele et al, 1988; Buhr et al, 1992; Thiele e Fischer, 1992; Thiele et al, 1993;).

A forma GRAN/MEG também está associada a outros fatores prognósticos desfavoráveis, tais como: esplenomegalia, alta contagem de leucócitos no sangue periférico, blastos circulantes excedendo 1%, alto grau de atipias de megacariócitos e maior aumento de fibras de reticulina (Lazzarino et al, 1986; Lorand-Metze et al, 1987; Thiele et al, 1988; Thiele e Fischer, 1992; Thiele et al, 1993).

Estes dados mostram que a biópsia de medula óssea na LMC fornece subsídios de valor diagnóstico e prognóstico constituindo um parâmetro adicional na investigação desta doença.

Moleculares

Tão relevante como os dados clínicos e histológicos em determinar características prognósticas na LMC é o emprego de critérios moleculares na identificação de pacientes de alto risco. O ponto de quebra dentro do gene *bcr* pode ser determinado pela técnica de *Southern blotting* através da digestão do DNA genômico com enzimas de restrição e posterior hibridização com sondas

específicas. Desta maneira, o gene *bcr* pode ser dividido em 4 zonas, 1, 2, 3 e 4, sendo as quebras ocorridas nas zonas 1 e 2 agrupadas como 5' e as ocorridas nas zonas 3 e 4 como 3' (Schaefer-Rego et al, 1987; Mills et al, 1988).

Tem-se tentado correlacionar o local de ponto de quebra no gene *bcr* com parâmetros clínicos e laboratoriais durante a evolução da doença, porém com resultados bastante contraditórios. Alguns estudos sugerem que a quebra na extremidade 3' pode ter uma correlação com a crise blástica (Schaefer-Rego et al, 1987; Eisenberg et al, 1988; Mills et al, 1989) e com uma maior atividade trombopoética (Inokuchi et al, 1991(A) e (B); Inokuchi e Nomura, 1993) ; quebra na extremidade 5' parece estar associado com uma fase crônica mais longa (Mills et al, 1988). Outros estudos, entretanto, não encontraram nenhuma associação entre o local de ponto de quebra com a duração da fase crônica, características clínicas, laboratoriais, tipo de crise blástica, atividade trombopoética e prognóstico (Dreazen et al, 1988(B); Shtalrid et al, 1988; Przepiorka, 1988; Dyck e Bosco, 1989; Ogawa et al, 1989; Jaubert et al, 1990; Tefferi et al, 1990; Tien et al, 1990; Morris et al, 1990; Opalka et al, 1991,1992; Zaccaria et al, 1992, 1993; Rozman et al, 1995) (Tabela 1).

Baseado na grande heterogeneidade do rearranjo molecular na LMC, nos resultados conflitantes que tentam correlacionar o local de quebra no *bcr* com as características da doença e nas diferenças histológicas da medula óssea, propusemos estudar uma possível correlação do local de quebra do gene *bcr* com as características histopatológicas da medula óssea.

Tabela 2. Fatores prognósticos na LMC e aspectos moleculares

Ponto de Quebra	Provável Significado da Alteração	Referência
extremidade 3'	parece identificar grupo de pacientes que possuem alto risco para entrar em crise blástica	Schaefer-Rego et al, 1987
-	quebra <i>bcr/abl</i> isoladamente não determina a duração da fase crônica	Dreazen et al, 1988(B)
-	não há correlação com local do ponto de quebra e características clínicas, laboratoriais, tipo de crise blástica e duração da fase crônica	Shtalrid et al, 1988
extremidade 3'	sugere progressão mais rápida para crise blástica	Eisenberg et al, 1988
extremidade 5'	parece estar associado com fase crônica mais longa	Mills et al, 1988
-	A zona de quebra no <i>bcr</i> não tem correlação com a fase e prognóstico da doença	Przepiorka et al, 1988; Dyck e Bosco, 1989; Ogawa et al, 1989
extremidade 3'	sugere fase crônica mais curta	Mills et al, 1989
-	A posição da quebra no <i>bcr</i> não prediz a duração da fase crônica e nem a sobrevida	Jaubert et al, 1990; Tefferi et al, 1990
-	duração da LMC do diagnóstico ao aparecimento da crise blástica não apresenta diferença significativa nos pacientes com ponto de quebra na extremidade 5' e 3'. O local de ponto de quebra não se altera com progressão da doença	Tien et al, 1990
-	O ponto de quebra no <i>bcr</i> não influencia a duração da fase crônica e sobrevida na LMC. Sugere ter um papel na determinada linhagem da crise blástica	Morris et al, 1990
-	Não há diferença quanto à resposta ao interferon, curso clínico e evolução para a crise blástica	Opalka et al, 1991
extremidade 3'	sugere maior atividade trombopoética	Inokuchi et al,(A) (B), 1991
-	não há correlação entre a atividade trombopoética e o local de ponto de quebra	Opalka et al, 1992
-	O local do ponto de quebra não tem significado prognóstico	Zaccaria et al, 1992
extremidade 3'	O tipo do RNA mensageiro, b3-a2, tem maior atividade trombopoética	Inokuchi et al, 1993
-	O tipo do RNA mensageiro não tem relação com a sobrevida	Zaccaria et al, 1993
-	Nenhuma relação entre contagem de plaquetas e sobrevida quanto ao local do ponto de quebra e o tipo de RNA mensageiro	Rozman et al, 1995

Objetivos

1. Analisar o local do rearranjo dentro do gene *bcr* na população estudada.
2. Correlacionar o ponto de quebra no *bcr* com as formas histopatológicas GRAN e GRAN-MEG da medula óssea.
3. Correlacionar o local de quebra no *bcr* com o tamanho do baço, número de leucócitos, de plaquetas, de blastos, de eosinófilos, de basófilos no sangue periférico e medula óssea.
4. Correlacionar a análise citogenética com o rearranjo no *bcr*.

Casuística e Métodos

Casuística

Foram avaliados 33 pacientes provenientes do ambulatório de hematologia do Hemocamp e 2 do ambulatório de hematologia do Hospital São Paulo da Escola Paulista de Medicina com o diagnóstico de leucemia mielóide crônica em primeira fase crônica (Sokal et al, 1988).

O diagnóstico foi baseado em esplenomegalia associada a leucocitose com desvio à esquerda não escalonado, eosinofilia e/ou basofilia e/ou plaquetose no sangue periférico, aspecto histológico e mielograma compatível com síndrome mieloproliferativa crônica tipo LMC, fosfatase alcalina diminuída dos neutrófilos e citogenética.

A avaliação clínica e o acompanhamento dos pacientes foram realizados pelo autor, exceto nos casos 6, 18, 34 e 35, que foram avaliados por hematologistas ligados ao nosso Serviço.

A definição de fase crônica foi baseada na ausência de quaisquer características compatíveis com fase acelerada ou crise blástica conforme as definições encontradas na Tabela 3.

As características clínicas e laboratoriais encontram-se na Tabela 4.

Avaliação Hematológica

Hemograma

Avaliação do nível de hemoglobina, hematócrito, número de hemácias, leucócitos e de plaquetas foi realizada através de contador automático, *cell dyn 1600*. A contagem do diferencial de leucócitos foi obtida através do exame de esfregaço e observado por um observador.

Biópsia de medula óssea

O material foi colhido de crista ilíaca póstero-superior com agulha de Jamshidi ou similar. Os fragmentos foram incluídos em parafina, cortados com espessura de 3-4 μm e após, realizadas colorações: hematoxilina e eosina, PAS, impregnação pela prata e Giemsa. Os casos foram classificados pelos achados histológicos da medula óssea em forma GRAN e GRAN-MEG após observação por dois investigadores (Burkhard et al, 1982, 1984, 1986; Georgii, 1983; Frisch et al, 1989).

Tabela 3. Definições de fase acelerada e crise blástica na LMC (Kantarjian et al, 1993)

Crise blástica	blastos no sangue periférico ou medula óssea > 30% doença extramedular com blastos
-----------------------	---

Fase acelerada	blastos no sangue periférico > 15% blastos mais promielócitos no sangue periférico > 30% basófilos no sangue periférico > 20% plaquetopenia < $100 \times 10^9/l$ não relacionada à terapêutica evolução clonal demonstrada por avaliação citogenética necessidade de aumento na dosagem das medicações esplenomegalia não responsiva ao tratamento aumento das fibras de reticulina ou fibrose colágena na medula óssea blastos na medula óssea > 10% triade composta de leucócitos > $50 \times 10^9/l$, hematócrito < 25% e plaquetas < $100 \times 10^3/l$ não controlada com o tratamento febre e dor óssea persistentes e não explicadas
-----------------------	---

Tabela 4. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC

Paciente	Idade (anos)	Sexo	FAN (score)	Hb (g/dl)	Leucócitos ($\times 10^9/l$)	Plaquetas ($\times 10^9/l$)	Fígado (cm)	Baço (cm)	Citogenética
1	64	F	5	10,8	170	881	NP	20	NR
2	57	M	7	10,9	276	Normal	4	10	Ph ¹ +
3	63	M	4	12,2	193	313	8	5	Ph ¹ +
4	59	M	0	11,5	148	1.080	1,5	10	Ph ¹ +
5	49	M	14	12,2	85	Normal	3	4	Ph ¹ +
6	42	M	0	9,3	120	183	?	?	Ph ¹ +
7	54	F	12	13,8	86	1.161	NP	2	Ph ¹ +
8	78	M	6	9,9	65	140	NP	2	Ph ¹ -
9	44	F	3	12,0	400	Normal	2	10	Ph ¹ +
10	65	M	7	13,2	82	335	NP	NP	Ph ¹ +
11	59	F	0	14,9	200	Normal	2	8	Ph ¹ +
12	59	F	0	12,4	105	186	4	NP	Ph ¹ +
13	68	M	6	10,5	434	360	4	7	Ph ¹ +
14	20	M	0	10,8	590	389	10	20	Ph ¹ +
15*	46	F	0	13,1	9	Normal	RCD	6	Ph ¹ +
16	36	M	14	14,0	315	368	6	10	Ph ¹ +
17	42	M	NR	12,9	132	268	NP	NP	Ph ¹ +
18	63	M	NR	8,5	194	1.500	8	NP	Ph ¹ +
19	25	F	NR	12,5	39	370	3	20	Ph ¹ +
20	63	M	NR	10,8	111	663	NP	2	Ph ¹ +

continua

continuação Tabela 4

Paciente	Idade (anos)	Sexo	FAN (score)	Hb (g/dl)	Leucócitos ($\times 10^9/l$)	Plaquetas ($\times 10^9/l$)	Fígado (cm)	Baço (cm)	Citogenética
21	24	M	63	11,1	258	271	NP	10	Ph ¹ +
22	23	M	NR	11,7	315	322	6	15	Ph ¹ +
23	28	M	47	5,3	164	435	3	2	Ph ¹ -
24	49	M	NR	9,6	300	704	NP	15	Ph ¹ +
25	63	M	6	5,3	186	378	10	10	Ph ¹ +
26	38	F	NR	10,0	290	740	4	7	Ph ¹ +
27	38	F	20	11,6	79	331	4	6	NR
28	60	M	NR	11,7	246	279	3	10	Ph ¹ +
29	44	F	0	12,5	436	435	4	15	Ph ¹ +
30	63	M	16	9,7	344	220	4	10	Ph ¹ +
31	67	M	NR	9,3	54	378	NP	8	NR
32	48	M	6	14,4	30	240	NP	NP	Ph ¹ +
33	35	M	3	6,5	159	211	NP	3	Ph ¹ +
34	77	M	NR	11,0	58	110	4	4	Ph ¹ +
35	62	M	NR	11,0	68	150	8	NP	Ph ¹ +

FAN - Controles Normais = score 35 - 100

* Paciente em vigência de tratamento

NP = não palpável

NR = não realizado

RCD = rebordo costal direito

Citologia de medula óssea

A avaliação da porcentagem de blastos, basófilos, eosinófilos, número e forma de megacariócitos foi obtida através de exame de esfregaço da medula óssea, contadas 200 células e observado por pelo menos 2 investigadores.

Fosfatase alcalina dos neutrófilos (FAN)

Foi realizada por método citoquímico com o *kit* Merck, Leucognost - alfa, código 16300, lote 13094 e observado por dois investigadores. Considerou-se como valores normais *score* variando entre 35 a 100 (Dacie e Lewis, 1984).

Citogenética

As amostras para análise da citogenética foram provenientes de aspiração da medula óssea, 3 a 5 ml, colocados em meio RPMI com 25% de soro fetal bovino, e mantidos em estufa a 37°C durante 24 horas. Para o estudo das metáfases utilizou-se a técnica de coloração com banda G (Yunis, 1981; Testa e Rowley, 1980).

Análise Molecular

O rearranjo gênico *bcr-abl* foi caracterizado com o emprego da técnica de *Southern-blotting*.

Extração do DNA genômico

O DNA foi isolado de células nucleadas a partir de 10-20 ml de sangue venoso (Maniattis et al, 1989). O sangue foi inicialmente centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos. Para a lise de hemácias, foi adicionada solução de NH_4Cl 0,144 M (cloreto de amônio), na proporção de 5 vezes o volume de células, e solução de NH_4HCO_3 0,01 M (bicarbonato de amônio), na proporção de 0,5 vezes o volume de células. A solução foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos,

seguida de centrifugação por 15 minutos a 2.500 rpm a 4°C. Esta etapa foi repetida até a obtenção de um precipitado nuclear de leucócitos livre de hemácias.

Os leucócitos foram dissolvidos em 10 ml de tampão contendo NaCl 0,3 M, EDTA 10 mM, Tris/HCL pH 7,5 10mM, Uréia 7 M, SDS (duodecil sulfato de sódio 0,5%) e incubados a 37° C por aproximadamente 16 horas.

Após a incubação foram realizadas três extrações com igual volume de mistura contendo fenol (redesilado e saturado em Tris/HCL pH 8,0 200 Mm, contendo 0,1% de hidroxiquinolina), clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1. Cada extração foi seguida por centrifugação a 5.000 rpm durante 15 minutos. Ao final, a camada superior contendo o DNA foi transferida para um novo tubo e realizada nova extração apenas com clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção de 24:1. Para a precipitação do DNA foi utilizado etanol absoluto gelado (2,5 vezes o volume) e de acetato de sódio 3M (10% do volume).

O DNA precipitado foi lavado em etanol a 70%, para eliminar resíduos de fenol e sal. Posteriormente, o DNA foi diluído em água estéril ou solução de TE (Tris pH 8,0 10mM, EDTA 0,1 mM pH 7,4).

A concentração do DNA foi realizada em espectrofotômetro pela leitura das densidades ópticas, nos comprimentos de onda de 260 e 280 em luz ultravioleta. (Maniatis et al, 1989).

Southern-blotting (Southern, 1975)

A partir de 5 µg do DNA genômico, foi realizada a digestão com as endonucleases de restrição BglII, BamHI e Hind III, de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante (*New England Biolab*). Os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,5%, usando o DNA digerido com a enzima HindIII como marcador de peso molecular. O tampão TEA (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,01 M pH 8,3) foi utilizado na preparação da agarose e na eletroforese realizada em cuba horizontal por 12 horas, na potência de 25 a 30 V à temperatura ambiente. Após a corrida eletroforética, o DNA contido no gel foi visualizado em luz ultravioleta, após coloração com solução de brometo de etídio (0,5 mg/ml). O gel foi então submetido ao tratamento com NaOH 0,4N, para a desnaturação da hélice dupla de DNA. As lavagens foram realizadas em duas etapas de 15 minutos, sob leve agitação constante, à

temperatura ambiente. A transferência do DNA para a membrana de *nylon* (Hybond N+, Amershan) foi realizada usando NaOH 0,4 N como solução de transferência, durante um período de 4 a 6 horas à temperatura ambiente. A membrana foi então lavada por 2 minutos em solução de SSC 2X (NaCl 3 M, citrato de sódio 0,3 M). A membrana contendo o DNA em hélice simples foi colocada em recipiente plástico contendo 15 ml de solução de 0,25 M NaPi, 0,25 M NaCl, 7% SDS, 1 mM EDTA e 10% Polietilenoglicol (PEG-6000). Esta incubação foi realizada por 10 a 20 minutos a 65°C, sob suave agitação. Posteriormente foi adicionada a sonda específica para o gene em estudo e a hibridização realizada por 16 horas a 65°C. Após a hibridização, as membranas foram lavadas a 65°C por etapas de 15 minutos, em solução de 2X SSC e 0,1% SDS, 15 minutos em solução de 1X SSC e 0,1% SDS e lavagens adicionais em soluções de 0,3X e 0,1 X SSC e 0,1% SDS. O controle da presença de radiatividade inespecífica foi realizado pelo monitoramento com contador Geiger. As membranas foram submetidas a lavagem por 5 minutos em solução de SSC 2X, secas e envoltas em filme de PVC e colocadas em cassetes contendo filme KODAK X-OMAT. O filme foi revelado após 16 horas de exposição a -70° C para a primeira avaliação e, se necessário, após prolongada exposição de 7 a 14 dias. O tamanho dos fragmentos foi determinado por gráfico contendo a distância das bandas a partir do ponto de aplicação *versus* a curva padrão do marcador de peso molecular, medidas em centímetros.

Marcação das sondas

As sondas utilizadas neste estudo foram a "Pr-1" (Oncogene Science Inc., Manhasset, NY, USA - Cat HP 09), um fragmento da extremidade 3' do gene *bcr* (HindIII - BglII) com 1,2 Kb, e a sonda *PhI/bcr-3, transprobe-1* (Oncogene Science Inc., Manhasset, NY, USA - Cat TP 88), com 4,5 Kb, que compreende as extremidades do gene *bcr*, poupando a sua região central. (Figura 8). Esta segunda sonda só foi utilizada nos casos onde não conseguimos detectar o rearranjo com a primeira. As sondas foram marcadas com $\alpha^{32}\text{P}$ por *Random primed* (USB). Nessa técnica o DNA é desnaturado e misturado a primers (iniciadores) ao acaso (*Random*) com molaridade elevada. A reação utiliza a enzima Klenow, uma DNA polimerase I, que perde a atividade exonucleásica 5'-3'. Devido à ausência desta atividade, os nucleotídeos radioativos incorporados durante a marcação não são liberados como monofosfatos (Maniatis et al, 1989). A reação foi realizada utilizando-se 100 ng da sonda em quantidade de água destilada estéril para um volume de 9 μl . O

DNA foi desnaturado a 100°C por 10 minutos e imediatamente colocado no gelo. Após esse período, foi adicionado ao DNA 3 µl de uma mistura de nucleotídeos (dATP, dGTP, dTTP), 2 µl da mistura contendo os primers, 5µl de $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP, 1 µl da enzima Klenow (5 U/µl) e água destilada para um volume total de 20 µl. A reação foi incubada durante 1,5 hora a 37°C e interrompida pela adição de 130 µl do tampão STE. Após a marcação, a sonda foi purificada em coluna de Sephadex G-50 para a remoção de nucleotídeos não incorporados. O controle da incorporação foi realizado em detector de emissão beta. As marcações adequadas para hibridização situavam-se entre 1X107 a 1X108 cpm/µg de DNA.

Metodologia utilizada para a detecção do local do rearranjo no gene *abl-abl*

O diagnóstico da zona de quebra no gene *bcr* foi realizado pelo aparecimento de fragmentos extras após a digestão do DNA genômico com as enzimas de restrições BglII, Bam HI, Hind III e posterior hibridização, separadamente, com a sonda Pr-1. Assim, dividiu-se o gene *bcr* em 4 zonas (Mills et al, 1988):

Zona 1: detectados fragmentos extras com a enzima BglII e não com a Bam HI e Hind III

Zona 2: detectados fragmentos extras com as enzimas BglII e Bam HI, mas não com a Hind III

Zona 3: detectados fragmentos extras com as 3 enzimas

Zona 4: detectados fragmentos extras com a enzima Bam HI e HIND III

As quebras nas zonas 1 e 2 foram agrupadas como 5' e aquelas nas zonas 3 e 4 como 3' (Schaefer-Rego et al, 1987) (Figura 8).

Mapa do *bcr* no cromossomo 22

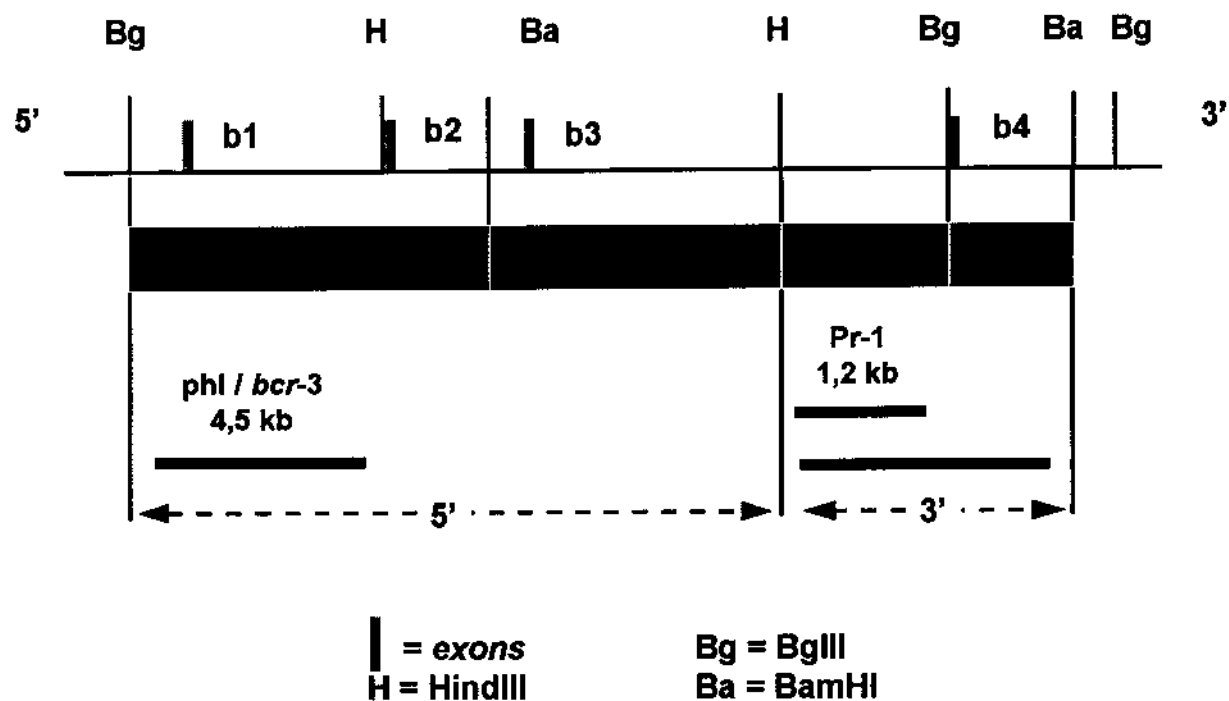


Figura 8. Mapa da região do *bcr* no cromossomo 22 mostrando a posição da sonda Pr-1 e Phl/*bcr*-3 e as zonas 1, 2, 3 e 4. Quebra nas zonas 1 e 2 / foram agrupadas como 5' e nas 3 e 4 como 3'. Exons estão indicados por barras verticais

Análise Estatística

Na análise estatística dos dados referentes aos tipos histológicos da medula óssea utilizamos o teste de Fisher. Na avaliação dos dados laboratoriais, da citologia da medula óssea e do tamanho do baço utilizamos os testes de análise de variância e de Kruskal-Wallis nas variáveis de distribuição normal e não normal respectivamente.

Resultados

Análise Cromossômica

O estudo citogenético foi realizado em 32/35 pacientes e o cromossomo Ph¹ foi positivo em 30 deles (94%). Em 2 casos não foi identificado o cromossomo Ph¹ ou outra anormalidade citogenética.

Rearranjo do *bcr* e Correlação com a Análise Citogenética

Em todos os 30 pacientes com a presença do Ph¹ bem como nos dois casos Ph¹ negativo foi detectado o rearranjo no gene *bcr*. Esses dois casos apresentavam características clínicas e laboratoriais semelhantes aos com Ph¹ positivo. Nos três casos restantes sem estudo citogenético o rearranjo no *bcr* também foi detectado. Em um destes (caso 1), o rearranjo foi detectado apenas com a sonda de 4,5 kb Ph¹/*bcr*-3 (*transprobe* 1) (Tabela 5).

Análise do Local do Rearranjo dentro do Gene *bcr*

Detectamos o rearranjo no gene *bcr* nos 35 pacientes estudado. Em 30/35 dos casos (86%) conseguimos determinar a zona do ponto de quebra no gene *bcr*. Assim, 4 (13%) pacientes apresentaram rearranjo na zona 1, 10 (33%) na zona 2, 8 (27%) na zona 3 e 8 (27%) na zona 4. No caso 1, apesar de não determinada a zona em que ocorreu o rearranjo, sugere-se que tenha ocorrido na extremidade 5', porque provavelmente a extremidade 3' foi deletada durante a translocação. Em quatro casos (2, 8, 11, 34), detectamos o rearranjo apenas com a enzima de restrição Hind III. No caso 31, apesar de não termos obtido resultado com a enzima de restrição Hind III por problemas técnicos, o local do rearranjo no gene *bcr* foi determinado como sendo na zona 4, extremidade 3', baseando-nos nos resultados obtidos com as enzimas BglII (sem rearranjo) e BamHI (com rearranjo) (Figura 8).

Desta maneira, 15 (43%) tiveram rearranjo na extremidade 5' e 20 (57%) na extremidade 3' (Tabelas 6 e 7) e (Fotos 7, 8, 9 e 10).

Tabela 5. Correlação do rearranjo gênico *bcrl* e cromossomo Ph¹ em pacientes com LMC

Número de pacientes	Presença do Ph¹	Rearranjo
30	+	+
2	-	+
3	não realizada	+

Tabela 6. Determinação da zona e do local do ponto de quebra

Paciente	BMO	BglII	BamHI	HindIII	Zona	Ponto De Quebra
1	GRAN-MEG	-	-	-	?	5'
2	GRAN	-	-	+	?	3'
3	GRAN-MEG	-	+	+	4	3'
4	GRAN-MEG	+	+	-	2	5'
5	GRAN	-	+	+	4	3'
6	GRAN-MEG	+	+	+	3	3'
7	GRAN	+	+	+	3	3'
8	GRAN	-	-	+	?	3'
9	GRAN-MEG	+	+	+	3	3'
10	GRAN	+	+	+	3	3'
11	GRAN	-	-	+	?	3'
12	GRAN	+	+	-	2	5'
13	GRAN-MEG	+	+	+	3	3'
14	GRAN-MEG	+	+	+	3	3'
15	GRAN	-	+	+	4	3'
16	GRAN-MEG	+	+	+	3	3'
17	GRAN-MEG	+	+	-	2	5'
18	GRAN-MEG	+	-	-	1	5'
19	GRAN-MEG	+	+	-	2	5'
20	GRAN-MEG	+	+	+	3	3'
21	GRAN	+	-	-	1	5'
22	GRAN-MEG	+	+	-	2	5'
23	GRAN-MEG	+	-	-	1	5'
24	GRAN-MEG	+	+	-	2	5'
25	GRAN-MEG	-	+	+	4	3'
26	GRAN-MEG	+	+	-	2	5'
27	GRAN-MEG	-	-	+	4	3'
28	GRAN	-	+	+	4	3'
29	GRAN-MEG	+	+	-	2	5'
30	GRAN	+	+	-	2	5'
31	GRAN-MEG	-	+	?	4	3'
32	GRAN	+	+	-	2	5'
33	GRAN	+	-	-	1	5'
34	GRAN	-	-	+	?	3'
35	GRAN	-	+	+	4	3'

Tabela 7. Local do ponto de quebra no gene *bcr*, classificado quanto à zona e extremidade (5' e 3') em pacientes com LMC

	Local de quebra no <i>bcr</i>			
	5'		3'	
Número de pacientes	zona 1	zona 2	zona 3	zona 4
30	4(13%)	10(33%)	8(27%)	8(27%)
35	15(43%)*		20(57%)**	

* No total da extremidade 5' está incluído o caso 1, onde não detectamos a zona do rearranjo

** No total da extremidade 3' estão incluídos os casos 2, 8, 11, 34.

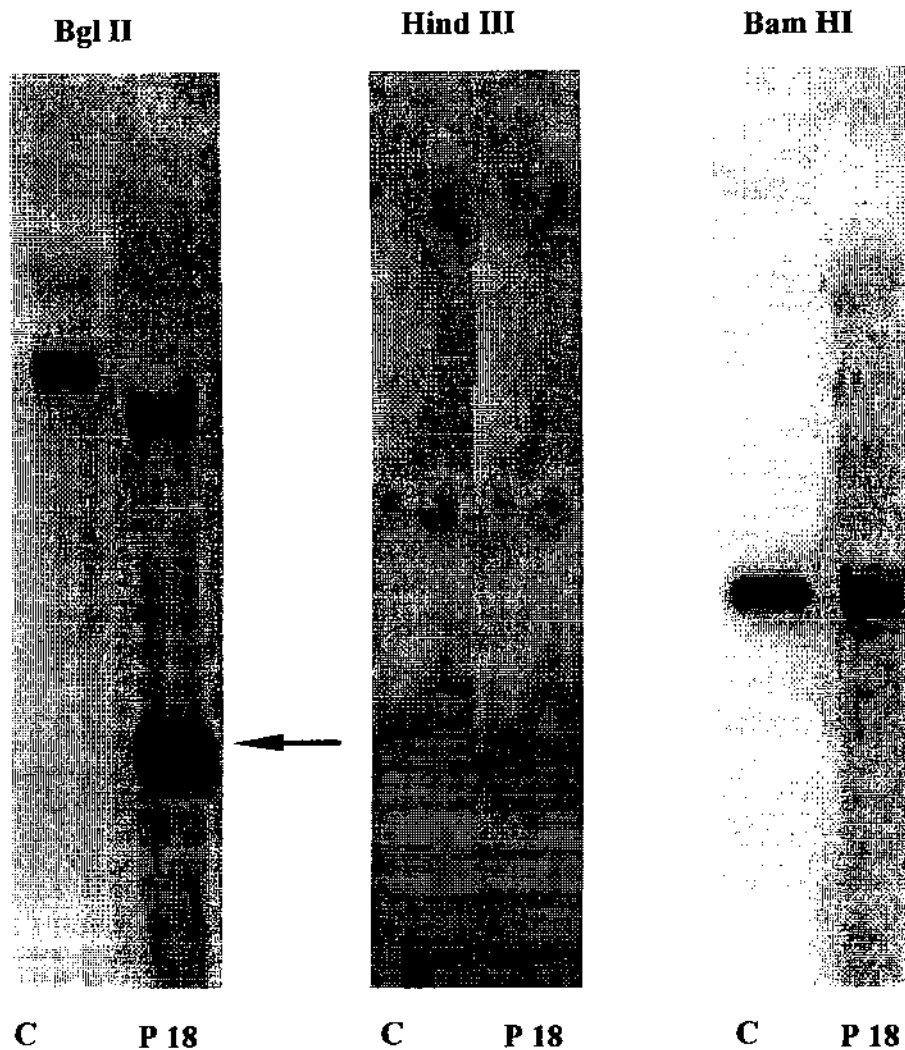


Foto 7. Representação de rearranjo na zona 1. C = controle e P 18 = n^o. do paciente de acordo com a Tabela 6. A seta demonstra o presença de fragmentos extras (rearranjo).

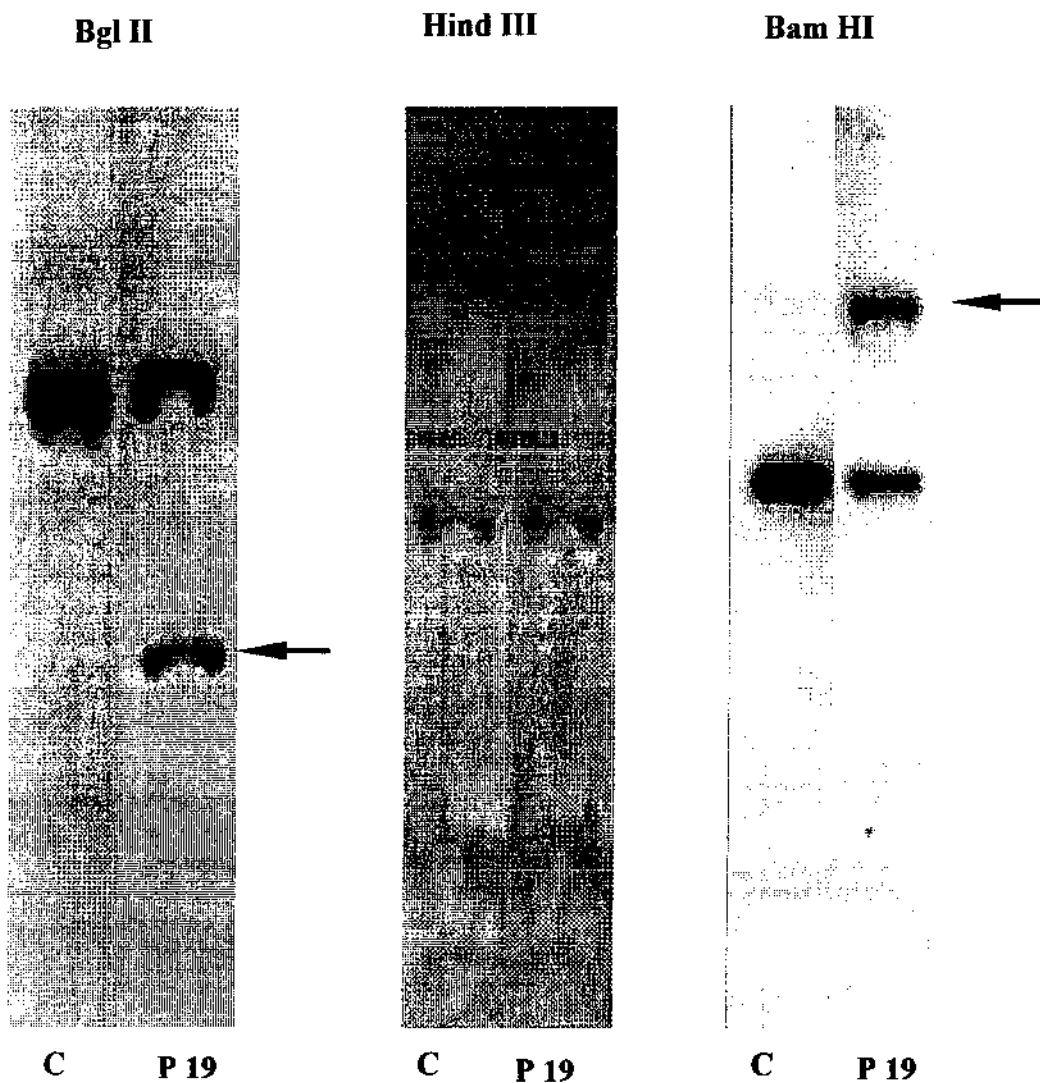


Foto 8. Representação de rearranjo na zona 2. C = controle e P 19 = n°. do paciente de acordo com a Tabela 6. As setas demonstram a presença de fragmentos extras (rearranjo).

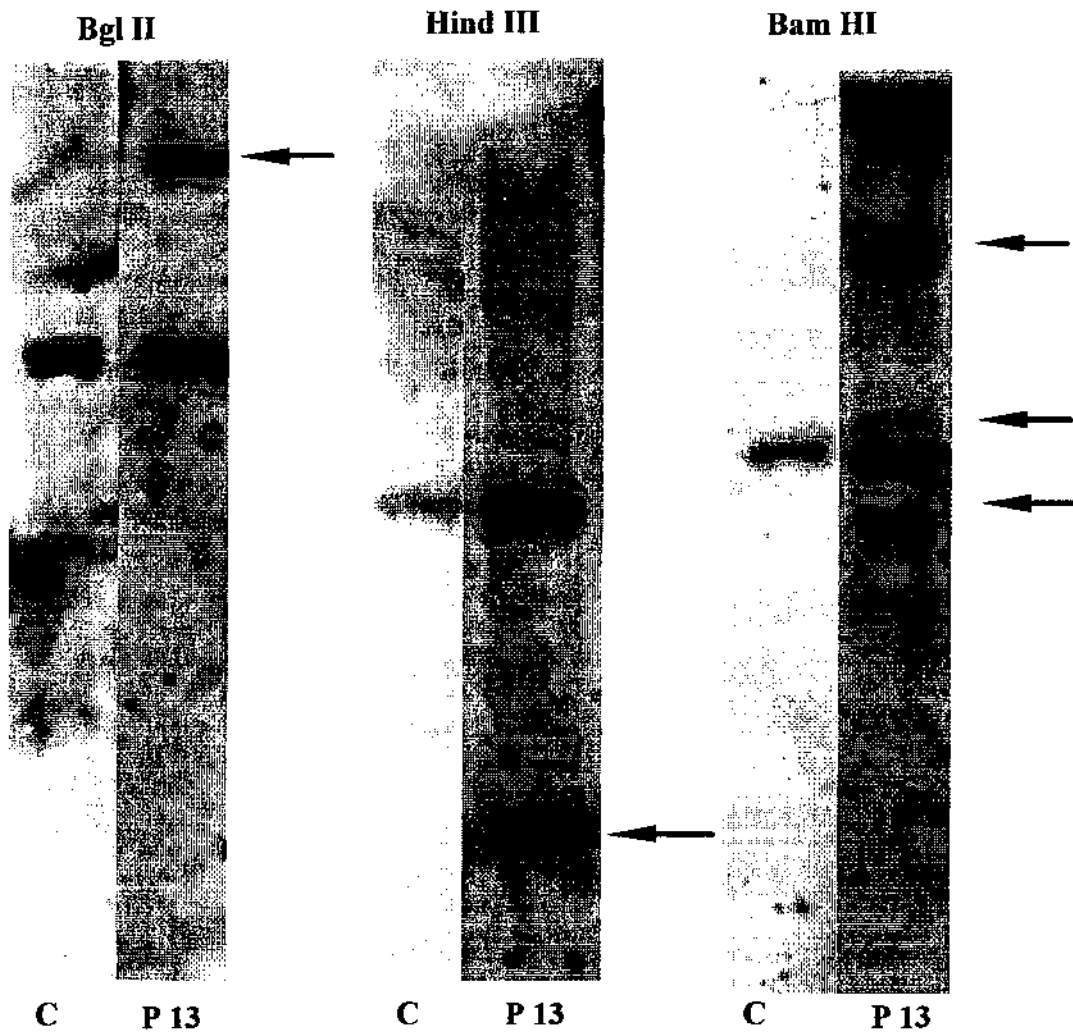


Foto 9. Representação de rearranjo na zona 3. C = controle e P 13 = n^o. do paciente de acordo com a Tabela 6. As setas demonstram a presença de fragmentos extras (rearranjo).

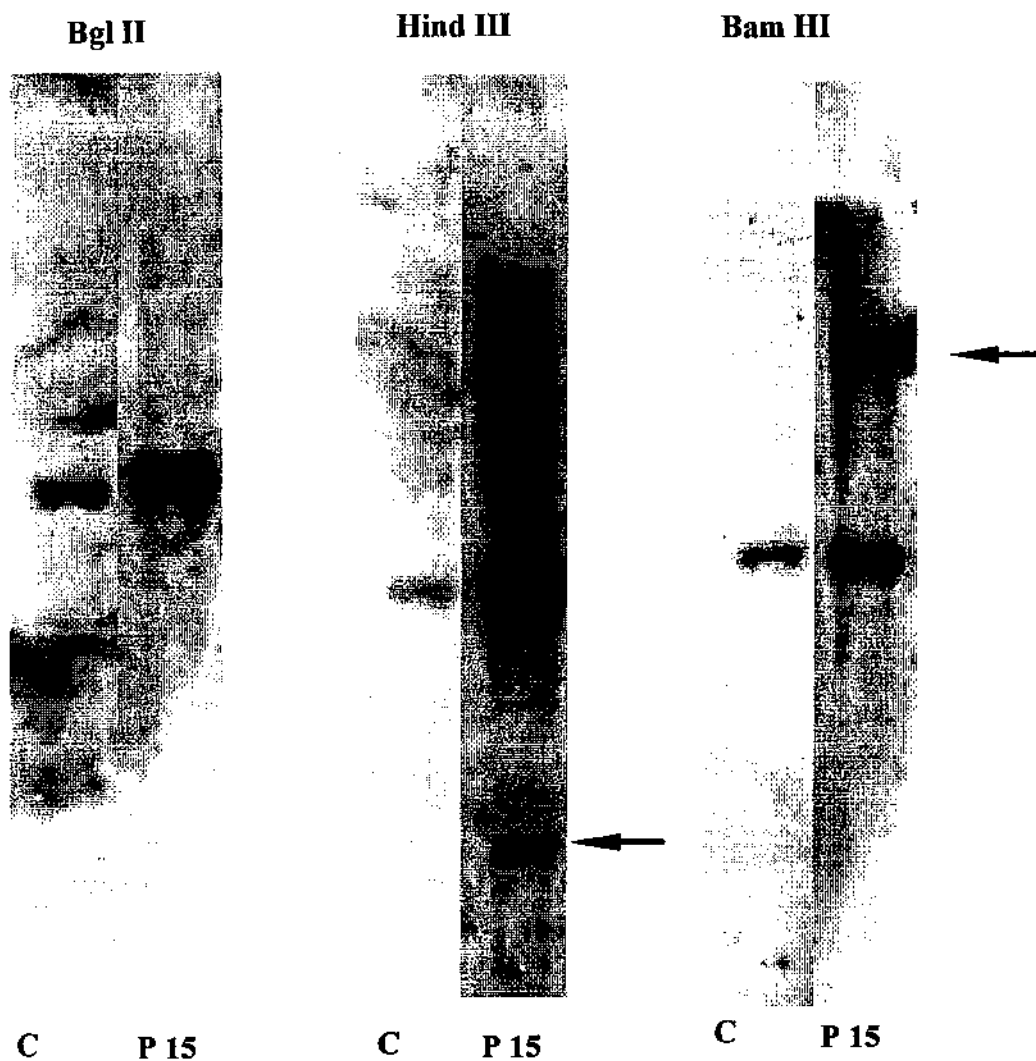


Foto 10. Representação de rearranjo na zona 4. C = controle e P 15 = n°. do paciente de acordo com a Tabela 6. As setas demonstram a presença de fragmentos extras (rearranjo).

Correlação do local do rearranjo com os dados laboratoriais do sangue periférico (SP), da citologia da medula óssea (MO) e tamanho do baço

O nº. de Leucócitos, Blastos SP, Eosinófilos (Eo) no SP, Basófilos (Baso) no SP, Blastos MO, Eo MO, Baso MO, Plaquetas, Baço, não apresentaram correlação estatística significativa com os locais de quebra 5' e 3'. (Tabela 8).

Correlação do local do rearranjo com a histologia da medula óssea

Dos 35 pacientes estudados, 15 (43%) apresentaram medula óssea do tipo GRAN e 20 (57%) GRAN-MEG.

Dez dos 20 casos do tipo morfológico GRAN-MEG apresentaram rearranjo no gene *bcr* na extremidade 5' (50%) e 10/20 casos na extremidade 3' (50%).

Cinco dos 15 casos do tipo morfológico GRAN apresentaram rearranjo no gene *bcr* na extremidade 5' (33%) e 10/15 casos apresentaram rearranjo na extremidade 3' (67%).

A análise estatística com o teste de Fisher, não mostrou correlação estatística significativa entre os tipos GRAN-MEG e GRAN com os locais de quebra 5' e 3' ($p = 0,17$) (Tabela 9).

Tabela 8. Correlação do local do rearranjo com os dados laboratoriais do sangue periférico, da citologia da medula óssea, tamanho do baço e nível de significância (p). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

	5'		3'		p
Baço (cm)	8,5	$\pm 7,1$	6,5	$\pm 4,8$	0,4928
Leucócitos/(10⁹/l)	206	± 111	192	± 147	0,7743
Blastos SP (%)	3,4	$\pm 2,4$	2,8	$\pm 1,5$	0,3913
Eo SP (%)	3,0	$\pm 2,6$	3,7	$\pm 2,4$	0,3996
Baso Sp (%)	6,1	$\pm 5,0$	5,0	$\pm 3,2$	0,4754
Plaquetas/(10⁹/l)	524	± 371	370	± 249	0,0704
Blastos MO (%)	2,8	$\pm 1,3$	2,4	$\pm 1,2$	0,4212
Eo MO (%)	4,6	$\pm 3,5$	5,5	$\pm 2,4$	0,4102
Baso MO (%)	2,6	$\pm 2,1$	1,6	$\pm 1,9$	0,1802

Tabela 9. Correlação do local do ponto de quebra do gene *bcr* com as características morfológicas da medula óssea

	5'	3'
GRAN-MEG	10(50%)	10(50%)
GRAN	5(33%)	10(67%)
Total	15	20

teste de Fisher p = 0,17

Discussão

O cromossomo Ph¹ [t (9,22)] foi a primeira alteração genética associada consistentemente com leucemias. Por apresentar caracterização molecular bem definida, esta translocação é um modelo excelente para investigar as aplicações de técnicas de biologia molecular na caracterização bem como no manejo clínico destas doenças.

A citogenética é o principal meio para a detecção do Ph¹ e, ainda hoje, a única técnica acessível para muitos clínicos. A análise citogenética durante o curso da doença pode ser usada não somente para a documentação da presença do cromossomo Ph¹, que é essencial para o diagnóstico de certeza de LMC, mas também para identificar e monitorizar a aquisição de outras alterações cromossômicas, que é uma característica de progressão desta neoplasia. Por outro lado, esta técnica é pouco sensível e não é a mais adequada para acompanhar os efeitos do tratamento (Westbrook, 1992; Morgan e Wiedemann, 1992).

Vários métodos foram desenvolvidos para a identificação molecular do rearranjo *bcr-abl* no diagnóstico da LMC. O método de *Southern blotting* utiliza DNA extraído do sangue periférico ou da medula óssea que é digerido com enzimas de restrição, transferido para uma membrana de *nylon* e posterior exposição a sondas radioativas específicas para o *bcr* ou *abl* (Epner e Koeffler, 1990). Este método não requer células viáveis e nem metáfases, e pode detectar a presença do Ph¹ mesmo em pequeno número de células alteradas (Westbrook, 1992). Quando comparado à citogenética, o *Southern blotting* é mais sensível e específico (Westbrook, 1992). É ideal para acompanhar a resposta a alguns tipos de tratamento, como o interferon, mas é pouco sensível para detectar uma recidiva precoce após transplante de medula óssea (Westbrook, 1992).

Uma nova técnica para a detecção da t(9;22) é a reação em cadeia da polimerase (PCR). Através deste método, pequenas amostras de DNA, através da transcrição reversa, são amplificadas seletivamente mais de um milhão de vezes. O PCR permite uma detecção rápida de uma célula leucêmica em 10.000 células não leucêmicas. Ele pode ser quantitativo, como o *Southern blotting* e a citogenética, mas não é o mais adequado para acompanhar os estágios iniciais de tratamento. Comparado à citogenética e ao *Southern blotting* é mais sensível e específico para a detecção de doença residual mínima, antes dela tornar-se clínica ou citogeneticamente identificável (Epner e Koeffler, 1990; Westbrook, 1992; Morgan e Wiedemann, 1992).

Um método alternativo ao *Southern blotting* e ao PCR para a identificação da fusão *bcr-abl* é a hibridização *in situ* por fluorescência. É baseado na detecção direta da fusão genética em células na interfase ou na metáfase, usando sondas com marcação não radioativa. Ele detecta mais a fusão

gênica do que o Ph¹ propriamente, podendo achar casos adicionais que são citogeneticamente negativos. É um método rápido, de alta sensibilidade e útil na monitorização terapêutica e na detecção da doença residual mínima (Tkachuk et al, 1990; Westbrook, 1992).

Menos de 10% dos pacientes com diagnóstico presuntivo de LMC não apresentam o cromossomo Ph¹ (Kurzrock et al, 1988; Kurzrock e Talpaz, 1991). A análise citogenética revela cariótipo normal em quase 2/3 deles e no 1/3 restante poderá ser encontrada uma variedade de anormalidades, mais comumente a trissomia do cromossomo 8. Em outra minoria de pacientes ocorre quebra no cromossomo 9q34 com translocação recíproca para outros locais (Kurzrock et al, 1988).

Estudos iniciais relatam que pacientes com LMC e Ph¹ negativo apresentam características clínicas distintas: sobrevida curta, pouca resposta ao tratamento, ausência de basofilia e presença de plaquetopenia (Ezdinli et al, 1970). Muitos destes pacientes tiveram sua doença reclassificada como uma síndrome mielodisplásica (Pugh et al, 1985). Entretanto, entre os pacientes com LMC Ph¹ negativo, existe um subgrupo cujas características clínicas e evolução são muito similares aos com LMC Ph¹ positivo (Ezdinli et al, 1970). Estes casos apresentam alterações moleculares idênticas aos Ph¹ positivo, sendo o rearranjo no *bcr* encontrado em 40% a 100% dos casos. Há o rearranjo na região de 5.8-kb do *bcr*, justaposição do *c-abl* na extremidade 5' do *bcr* e expressão do mRNA *bcr-abl* de 8.5-kb e da proteína *bcr-abl* de 210-kD (Bartram et al, 1985; Bartram, 1985; Ganesan et al, 1986; Kurzrock et al, 1986; Fitzgerald et al, 1987; Wiedemann et al, 1988; van der Plas et al, 1989).

Técnicas de hibridização *in situ* têm sugerido que nas LMC Ph¹ - *bcr* + os genes *abl* e *bcr* estão justapostos, mas não como resultado da translocação típica t(9;22). Nestes casos, o rearranjo é originado de uma inserção intersticial do gene *abl* no gene *bcr* no cromossomo 22, ou de uma translocação complexa, com a fusão *bcr-abl* ocorrendo em outro cromossomo (Morris et al, 1986; Dreazen et al, 1987).

A presença do rearranjo no *bcr* nos casos com citogenética normal poderá ser a única indicação de persistência da doença quando estes pacientes entram em remissão hematológica. Assim, os estudos moleculares apresentam grande importância no diagnóstico e também na detecção de doença residual mínima nos pacientes com LMC Ph¹ negativo (Kurzrock e Talpaz, 1991).

No presente trabalho tivemos o objetivo de avaliar o ponto de quebra no gene *bcr*, através da técnica de *Southern blotting*, numa população de pacientes com LMC, correlacionando esses

achados com os tipos morfológicos de medula óssea, características clínicas (tamanho do baço), laboratoriais, citogenética e caracterizar o rearranjo no gene *bcr*.

A análise citogenética revelou a presença do cromossomo Ph¹ em 94% dos pacientes. Nos demais casos não identificamos o cromossomo Ph¹ ou qualquer outra anormalidade citogenética. Detectamos o rearranjo no gene *bcr* em todos os pacientes com a presença do Ph¹ e em dois com Ph¹ negativo. Estes dois casos apresentavam características clínicas e laboratoriais semelhantes aos com Ph¹ positivos, reforçando a importância do estudo da biologia molecular no diagnóstico preciso da LMC Ph¹ negativo. O rearranjo no *bcr* também esteve presente em três casos onde não foram realizados estudos citogenéticos. Em um deles (caso 1), não detectamos o rearranjo com a utilização da sonda que compreende a extremidade 3' do *bcr* (Pr-1), apesar da digestão com as 3 enzimas de restrição BglII, BamHI e Hind III. O rearranjo só foi identificado quando utilizamos a sonda de 4,5 kb Ph1/*bcr*-3 ("transprobe" 1) que compreende quase todo o gene *bcr*, excluindo a sua região central. Isto sugere que a extremidade 3' do *bcr* tenha sido deletada durante a translocação. Estas deleções ocorrem entre 10%-30% dos casos de LMC Ph¹ positivo não havendo nenhuma característica clínica ou laboratorial específica associada (figura 9). Por outro lado, estas deleções impedem a detecção de rearranjos no gene *bcr* quando apenas a sonda da extremidade 3' (Pr-1) é utilizada para a hibridização (Popenoe et al, 1986; Hirose et al, 1988; Shtalrid et al, 1988).

A determinação do rearranjo no *bcr* tem sido correlacionada com parâmetros clínicos durante o curso da doença, em particular, com o aparecimento da crise blástica. Estes trabalhos porém têm apresentado resultados bastante contraditórios. Assim, Schaefer-Rego et al (1987) sugeriram uma forte correlação entre a quebra 3' no *bcr* com a crise blástica pois observaram que, em oito de nove pacientes com crise blástica, a quebra ocorreu na extremidade 3' e, em 17 pacientes na fase crônica, na extremidade 5'. Estes resultados foram confirmados por Eisenberg et al (1988). Por outro lado, Mills et al (1988) descreveram que pacientes com ponto de quebra 5' apresentaram duração da fase crônica quatro vezes mais longa (média de 203 semanas) do que aqueles com quebra 3' (média de 52 semanas). Resultados semelhantes também foram obtidos por Mills et al (1989) onde pacientes com quebra 3' tiveram fase crônica mais curta (25 meses) do que os pacientes com quebra 5' (55 meses). Grossman et al (1989) mostraram que a presença do exon 3 do *bcr*, independente do local de quebra, determinaria evolução mais curta para crise blástica. Entretanto, os resultados que correlacionam a quebra 3' com a crise blástica não foram

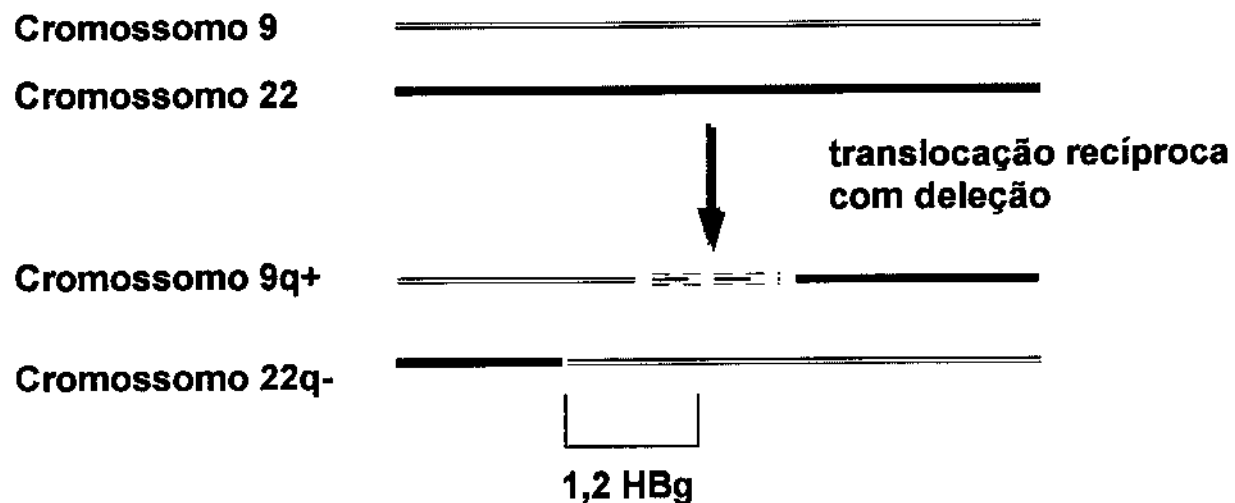


Figura 9. Um possível diagrama da deleção no gene *bcr* durante a translocação. As duas linhas superiores representam o gene *c-abl* do cromossomo 9 e o gene *bcr* do cromossomo 22. Uma parte do *c-abl* é translocado para o *bcr*, resultando no cromossomo 22q-. Uma parte do *bcr* é translocado para o *c-abl* resultando no cromossomo 9q+, com uma porção do *c-bcr* (área em destaque) deletada (Hirosawa et al, 1988)

confirmados por estudos prospectivos que mostraram que o local de quebra dentro do *bcr* não altera durante a progressão da doença (Mills et al, 1988; Shtalrid et al, 1988; Tien et al, 1990).

Publicações mais recentes não evidenciam associação com as manifestações clínicas, laboratoriais, sobrevida ou tempo de evolução para a crise blástica (Dreazen et al, 1988(B); Shtalrid et al, 1988; Przepiorka, 1988; Dyck e Bosco, 1989; Ogawa et al, 1989; Jaubert et al, 1990; Tefferi et al, 1990; Tien et al, 1990; Zaccaria et al, 1992). É possível que estas discordâncias, principalmente no que se refere à duração da fase crônica, decorreria de seleção inadequada dos pacientes, contribuindo para este problema o encaminhamento precoce de jovens para o transplante de medula óssea. Embora Morris et al (1990) não demonstrassem correlação entre o local de quebra no *bcr* com a duração da fase crônica e sobrevida global, houve um predomínio de crise blástica mielóide na subregião 2 e crise blástica linfóide na subregião 3.

Apesar destes trabalhos não encontrarem associação entre os níveis de hemoglobina, contagem de leucócitos e plaquetas com os locais de quebra 5' e 3', Inokuchi et al (1991A), numa amostra de 22 pacientes, demonstraram que a quebra na extremidade 3' estava relacionada a uma atividade trombopoietica maior do que nos casos onde a quebra era na 5'. A contagem de plaquetas para os pacientes com quebra 3' foi de $1395 \times 10^9/l$ comparada a $274 \times 10^9/l$ para os com quebra 5'.

No nosso material, também não encontramos nenhuma correlação significativa entre os locais de quebra 5' e 3' com o tamanho do baço, número de leucócitos, plaquetas e porcentagem de blastos, eosinófilos e basófilos no sangue periférico e medula óssea.

A definição do local de quebra dentro do *bcr*, adotada por Inokuchi et al (1991A), diferiu da usada por Schaefer-Rego et al (1987), e por nós adotada, onde a divisão entre 5' e 3' é baseada na presença de rearranjos localizados 5' ou 3' do sítio de restrição para Hind III. Este sítio de restrição se encontra na posição central do gene *bcr* e é distal ao exon 3. Inokuchi et al (1991a) utilizaram o local da enzima de restrição Bam HI, que está proximal ao exon 3, como divisão entre 5' e 3' (Figura 10).

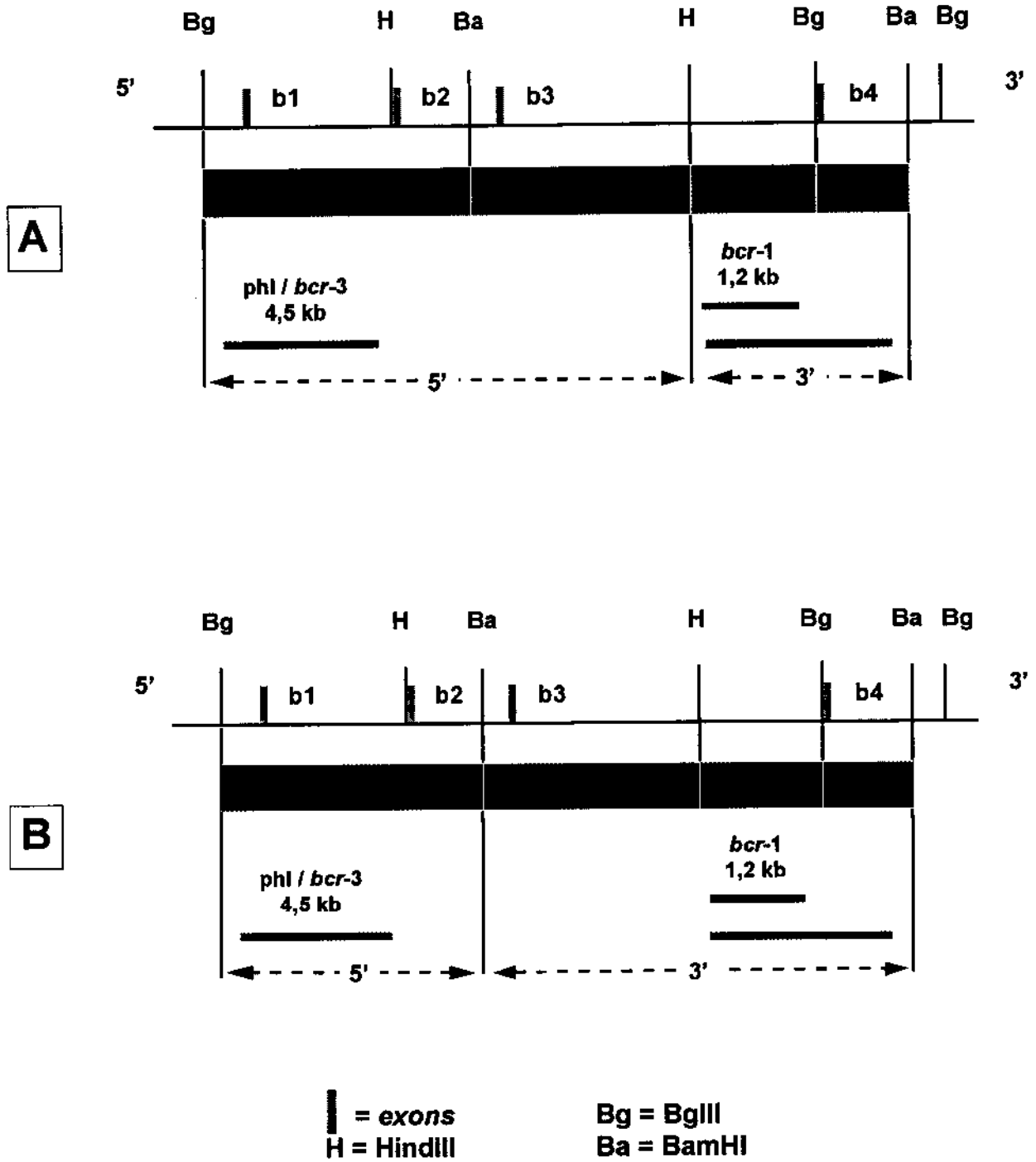


Figura -10 A - Divisão 5'e 3' do *bcr* segundo Shaefer-Rego et al (1987)

B - Divisão 5'e 3' do *bcr* segundo Inokuchi et al (1991a)

Assim sendo, se eles considerassem o critério de Schaefer-Rego et al (1987) não seria obtida nenhuma correlação entre o local de quebra com a trombopoiese. Posteriormente, Inokuchi et al (1991b) e Inokuchi e Nomura (1993), através da análise do tipo de mRNA *bcr-abl* transcrito, confirmaram os seus resultados preliminares. O rearranjo do exon 3 no gene *bcr* com o exon 2 no *abl* (b3-a2) estava relacionado com uma contagem plaquetária maior do que o rearranjo do exon 2 no gene *bcr* com o exon 2 no *abl* (b2-a2), sugerindo que a presença do exon 3 do *bcr* talvez tivesse importância em determinar a atividade trombopoética. Entretanto, Opalka et al (1992) seguindo a divisão entre 5' e 3' proposta por Inokuchi et al (1991a), não conseguiram determinar correlação entre a contagem de plaquetas e o local de quebra entre os seus 53 pacientes avaliados. Rozman et al (1995) também não encontraram associação entre o número de plaquetas e o rearranjo 5' e 3', usando os critérios de Schaefer-Rego et al (1987) e de Inokuchi et al (1991A), e nem com o tipo de mRNA.

Apesar da controvérsia quanto à correlação do local do rearranjo com as características clínicas e laboratoriais na LMC, parece haver um consenso quanto à distribuição das zonas de quebra dentro do *bcr* (Schaefer-Rego et al, 1987; Shtalrid et al, 1988; Mills et al, 1988, 1989; Eisenberg et al, 1988; Przepiorcka et al, 1988; Grossman et al, 1989; Jaubert et al, 1990; Morris et al, 1990; Tien et al, 1990). Uma revisão realizada por Mills et al (1991), levando em consideração os resultados obtidos em todos estes trabalhos, concluiu que em média 26% das quebras ocorreram na zona um, 31% na zona dois, 39% na zona três e 4% na zona quatro, sendo a distribuição global entre 5' e 3' de 55% e 45% respectivamente. Entretanto, Ogawa et al (1989) mostraram que 80% dos seus pacientes apresentavam quebra na zona 3 com distribuição 5' de 13% e 3' de 87%. Outros dois trabalhos utilizando os critérios de Inokuchi et al (1991A) também mostraram predomínio da quebra na extremidade 3'. Porém, esta definição implica num número maior de zonas compreendidas na extremidade 3' (Inokuchi et al, 1991a; Opalka et al, 1992) (figura 10).

No presente trabalho detectamos o rearranjo no gene *bcr* nos 35 pacientes estudados. Em 86% dos casos analisados neste estudo foi possível definir a zona do ponto de quebra no gene *bcr*: 13% ocorreu na zona um, 33% na zona dois, 27% na zona três e 27% na zona quatro, totalizando 43% na extremidade 5' e 57% na 3'. No caso 1 não determinamos a zona do rearranjo porque não foi identificado nenhum fragmento extra com a sonda Pr1. Concluimos, porém, através da hibridização com a sonda "transprobe", que este se encontrava provavelmente na extremidade 5', sugerindo deleção da extremidade 3' (Figura 9). Semelhante ao observado por Dyck e Bosco

(1989), em quatro casos (2, 8, 11, 34), detectamos o rearranjo apenas com a enzima de restrição Hínd III. Também aqui não conseguimos determinar a zona de quebra, mas caracterizamos estes casos como 3' porque o rearranjo foi observado com a enzima de restrição Hínd III (Eisenberg et al, 1988). No caso 31, apesar de não observado rearranjo com a enzima Hínd III por problemas técnicos, o local do rearranjo foi determinado como zona 4 baseado nos resultados obtidos com as enzimas BglII (sem rearranjo) e BamHI (com rearranjo) respectivamente. Desta maneira, levando-se em consideração o mapa do gene *bcr*, a única zona em que tal associação pode estar presente é a 4. Estes resultados poderiam ser interpretados como um polimorfismo dentro do gene *bcr*. Entretanto, o polimorfismo no gene *bcr* do cromossomo 22 é muito raro (Grossman et al, 1990).

Estes resultados diferem da literatura por um predomínio maior do rearranjo na zona 4 e na extremidade 3'. Apenas Ogawa et al (1989) mostraram predomínio da extremidade 3', porém com 80% dos casos ocorrendo na zona 3 e apenas 7% na zona 4. Uma possível razão para esta discrepância poderia ser uma heterogeneidade populacional no que se refere às condições sócio-econômicas, étnicas e a fatores ambientais (Mills, 1993).

Os fatores prognósticos na LMC têm sido tradicionalmente relacionados às características clínicas e laboratoriais presentes ao diagnóstico, onde várias delas mostraram associação significativa com a sobrevida, mas não de maneira unânime (Jacquillat et al, 1978; Gomez et al, 1981; Tura et al, 1981; Cervantes e Rozman, 1982; Oguma et al, 1982; Kantarjian et al, 1985). De todas as variáveis analisadas nestes trabalhos como idade, sexo, tamanho do baço, nível de hemoglobina, número de plaquetas, leucócitos e blastos/promielócitos no sangue periférico, somente o tamanho do baço é aceito como indicador prognóstico (Sokal, 1988).

Todos estes estudos e os que correlacionam os parâmetros clínicos e laboratoriais com o rearranjo no gene *bcr* não levaram em consideração os achados histológicos da medula óssea. A medula óssea na LMC apresenta características heterogêneas, típicas, que poderão fornecer informações prognósticas importantes na avaliação inicial e na evolução da doença (Dickstein e Vardiman, 1992). A observação sequencial das biópsias de medula óssea de pacientes com o subtipo GRAN mostrou que raramente ocorre o aparecimento de fibrose, enquanto que os casos GRAN-MEG apresentam tendência significativa para transformação em mielofibrose, que está associada a um prognóstico mais desfavorável. O subtipo GRAN, sem proliferação proeminente de megacariócitos, teria portanto um prognóstico mais favorável (Lazzarino et al, 1986; Thiele et al, 1988; Buhr et al, 1992; Thiele e Fischer, 1992; Thiele et al, 1993).

A forma GRAN/MEG também está associada a outros fatores prognósticos desfavoráveis, tais como: esplenomegalia mais acentuada, alta contagem de leucócitos no sangue periférico, blastos circulantes excedendo 1%, alto grau de atipias de megacariócitos e maior aumento de fibras de reticulina (Lazzarino et al, 1986; Lorand-Metze et al, 1987; Thiele et al, 1988; Thiele e Fischer, 1992; Thiele et al, 1993).

Do mesmo modo que a histologia da medula óssea tem sido pouco associada como fator prognóstico na LMC, não existem dados correlacionando-a com os aspectos moleculares. A análise desta associação foi realizada no presente trabalho baseada na heterogeneidade do rearranjo gênico e dos achados histológicos.

Na população estudada, 20 casos foram do tipo GRAN-MEG (57%) e 15 do tipo GRAN (43%). Dez dos vinte casos do tipo morfológico GRAN-MEG (50%) apresentaram rearranjo na extremidade 5' e dez casos na extremidade 3' (50%). Cinco dos quinze casos do tipo GRAN apresentaram rearranjo na extremidade 5' (33%) e dez na extremidade 3' (67%). Não houve correlação significativa entre cada um dos tipos histológicos com o local de quebra, 5' ou 3', no gene *bcr*.

Apesar de não encontrada associação com os achados histológicos, laboratoriais e clínicos, vários mecanismos moleculares podem ser responsáveis pelos diferentes fenótipos na LMC (Schaefer-Rego et al, 1987; Eisenberg et al 1988; Mills et al, 1989).

O significado biológico da quebra 5' e 3' é baseada na inclusão ou exclusão de locais específicos do gene *bcr* no gene híbrido *bcr-abl* (Eisenberg et al, 1988). Embora a região onde ocorre a quebra no cromossomo 22 seja pequena, existe uma heterogeneidade na estrutura do gene *bcr-abl* resultante. Este pode conter apenas o exon 2 do *bcr*, os exons 2 e 3, ou os exons 2,3,e 4 (Mills et al, 1989). A presença ou ausência do exon 3 é, por si só, suficiente para alterar a especificidade, atividade e estabilidade da proteína *bcr-abl* (Shtivelman et al, 1985; Mills et al, 1988). Assim, as quebras ocorridas na extremidade 5' podem ocasionalmente incluir o exon 3 do *bcr*, e as quebras 3' consistentemente incluem o exon 3 (Eisenberg et al, 1988).

O local de quebra também pode alterar o controle da regulação da transcrição, produzindo um aumento inapropriado de mRNA e da proteína *bcr-abl* ou originar um novo local de fusão com aparecimento de um mRNA e proteína aberrantes. Esta nova proteína pode ter uma atividade tirosina quinase alterada e/ou especificidade diferente (Schaefer-Rego et al, 1987).

A participação destes mecanismos para explicar o fenótipo da LMC é muito especulativo. Entretanto, a ausência da associação do prognóstico, das características laboratoriais e histológicas com a região de quebra dentro do *bcr* é somente uma manifestação da grande variação na estrutura, processamento e expressão do gene híbrido *bcr-abl*.

Conclusões

1. O rearranjo no gene *bcr* foi identificado em todos os pacientes. Em 86% dos casos foi possível determinar a zona do ponto de quebra: 13% na zona um, 33% na zona dois, 27% na zona três, 27% na zona quatro, totalizando 43% na extremidade 5' e 57% na 3'.
2. Houve, na nossa população, uma alta frequência de quebra na zona 4 e predomínio de rearranjo do *bcr* na extremidade 3'.
3. Não houve correlação entre os pontos de quebra 5' e 3' no gene *bcr* com as formas histopatológicas GRAN e GRAN-MEG da medula óssea.
4. Não houve correlação entre o local de quebra no gene *bcr* com o tamanho do baço, número de leucócitos, de plaquetas, de blastos, de eosinófilos, de basófilos no sangue periférico e medula óssea.
5. O estudo molecular pela técnica de Southern blotting confirmou a presença do rearranjo *bcr-abl* nos dois casos com citogenética sem a presença do cromossomo Ph¹.

Summary

Chronic myelogenous leukemia is a myeloproliferative disease characterized by the presence of the Philadelphia chromosome (Ph¹) in more than 90% of patients. This chromosomal abnormality results from a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22 transferring the c-abl proto-oncogene from chromosome 9 to the restricted breakpoint region on chromosome 22, of about 5.8 kilobases (kb), termed the breakpoint cluster region (bcr). The high specificity of this rearrangement strongly suggests a crucial role for bcr in the pathogenesis of CML. In this study we determined the breakpoint within the bcr in 35 CML patients with a first chronic phase and correlated it with clinical data (spleen size), laboratory parameters, cytogenetics and bone marrow histological subgroups, GRAN-MEG and GRAN. Genomic DNA was extracted from peripheral blood white cells and digested with Bgl II, Hind III, Bam HI restriction endonucleases. By using the Southern blotting method, the specific breakpoint within the bcr could be assigned to one of four zones, after hybridization with the 1.2 kb probe Pr-1 (Oncogene science). DNAs for which the breakpoint could not be determined with this probe were analyzed with the Ph1/bcr-3 probe (Oncogene science). Breakpoints in zones 1 and 2 were grouped as 5' and those in zones 3 and 4 as 3'.

The chromosome analysis was done in 32/35 patients and the Ph1 was present in 30 of them.

The bcr rearrangement was determined in all patients. The localization of the breakpoint was assigned in 86% of them : 13% within zone one, 33% in zone two; 27% in zone three, and 27% in zone four.

In one patient, the rearrangement was only detected after hybridization with the 4.5 kb Ph1/bcr-3 probe, suggesting that the 3' end of the bcr was deleted during the translocation. Thus, in the 35 patients analyzed, 43% were grouped as 5' and 57% as 3'. No correlation between breakpoint site and clinical or hematological features was found. In addition, 50% from the GRAN-MEG subgroup presented a bcr breakpoint on the 5' position and 50% on the 3' position; 33% from the GRAN subgroup presented the breakpoint on the 5' position and 67% on the 3' position (the difference was not significant; Fisher Test $p=0.17$).

In conclusion, our population has a higher frequency of bcr breakpoint in zone 4 and 3' position; there was no correlation between 5' and 3' positions and clinical or hematological features, including the histological subgroups GRAN-MEG and GRAN. Moreover, the Southern blotting was useful to detect the bcr rearrangement in 2 Ph¹ negative cases.

Referências Bibliográficas

- Abelson H.T.; Rabstein L.S.: Lymphosarcoma: Virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res* 30:2213-2216, 1970.
- Barr R.D.; Fialkow P.J.: Clonal origin of chronic myelocytic leukemia. *N Engl J Med* 289 : 307-309, 1973.
- Bartl R.; Frisch B.; Wilmanns W.: Potencial of bone marrow biopsy in chronic myeloproliferative disorders (MPD). *Eur J Haematol* 50:41-52, 1993.
- Bartram C.: bcr Rearrangement without juxtaposition of c-abl in Chronic Myelocytic Leukemia. *J.Exp.Med.* 162: 2175-2179, 1985.
- Bartram C.R.; Kleihauer E.; de Klein A.; Grosveld G.; Teyssier J.R.; Heisterkamp N.; Groffen J.: c-abl and bcr are rearranged in a Ph1-negative CML patient. *EMBO J.* 4:683-686, 1985.
- Bartram C.R.; de Klein A.; Hagemeijer A.; van Agthoven T.; van Kessel A.G.; Bootsma D.; Grosveld G.; Ferguson-Smith M.A.; Davies T.; Stone M.; Heisterkamp N.; Stephenson J.R.; Groffen J.: Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306:277-279, 1983.
- Bedi A.; Zehnbaauer B.A.; Barber J.P.; Sharkis S.J.; Jones R.J.: Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* 83:2038-2044, 1994.
- Bedi A.; Zehnbaauer B.A.; Collector M.I.; Barber J.P.; Zicha M.S.; Sharkis S.J.; Jones R.J.: Bcr-abl gene rearrangement and expression of primitive hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia. *Blood* 81:2898-2902, 1993.
- Bennett J.H.: Case of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Med Surg J* 64:413, 1845.
- Bloomfield C.D.; Brunning R.S.; Smith K.A.: Prognostic significance of the Philadelphia chromosome in acute lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1:229-232, 1980.
- Brumini, R. Câncer no Brasil Dados histológicos (1976-1980)- Rio de Janeiro, Cia. Nac. combate ao câncer, Ministério da Saúde, 1982.
- Buhr T.; Choritz H.; Georgii A.: The impact of megakaryocyte proliferation for the evolution of myelofibrosis. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 420: 473-478, 1992.
- Burkhardt R.; Bartl R.; Jager K.; Frisch B.; Kettner G.; Mahl G.; Sund M.: Chronic Myeloproliferative Disorders (CMPD). *Path. Res. Pract.* 179:131-186, 1984.
- Burkhardt R.; Bartl R.; Jager K.; Frisch B.; Kettner G.; Mahl G.; Sund M.: Working classification of chronic myeloproliferative disorders based on histological, haematological, and clinical findings. *J Clin Pathol* 39:237-252, 1986.
- Burkhardt R.; Frisch B.; Bartl R.: Bone biopsy in haematological disorders. *J Clin Pathol* 35:257-284, 1982.
- Cervantes F.; Rozman C.: A multivariate analysis of prognostic factors in chronic myeloid leukemia. *Blood* 60:1298-1304, 1982.
- Chervenick P.A.; Ellis L.D.; Pan S.F.; Lawson A.L.: Human leukemic cells: in vitro growth of colonies containing the Philadelphia (ph1) chromosome. *Science* 174:1134-1136, 1971.

- Craigie D. : Case of disease of the spleen in which death took place in consequence of the presence of purulent matter in the blood. *Edinburgh Med Surg J* 64:400,1854.
- Cramer E.; Auclair C.; Hakim J.: metabolic activity of phagocytosis granulocytes in chronic granulocytic leukemia: Ultrastructural observations of a degranulation defect. *Blood* 50:93-96,1977.
- Dacie J.V. and Lewis S.M.: *Practical Haematology*. 6th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Mulbourne, New York, 1984.
- Daley G.Q.: Animal models of BCR/ABL - induced leukemias. *Leuk Lymphoma* 11 suppl 1:57-60,1993.
- Daley G.Q.; Van Etten R.A.; Baltimore D.: Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210 bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247:824-830,1990.
- Daley G.Q.; Baltimore D.: Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia - specific p210 bcr/abl protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:9312-9316,1988.
- de Klein A.; van Kessel A.G.; Grosveld G.; Bartram C.R.; Hagemeijer A.; Bootsma D.; Spurr N.K.; Heisterkamp N.; Groffen J.; Stephenson J.R.: A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 300:765-767,1982.
- Denegri J.F.; Naiman S.C.; Gillen J.; Thomas J.W.: IN VITRO growth of basophils containing the Philadelphia chromosome in the acute phase of chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 40:351-352,1978.
- Dickstein J.I.; Vardiman J.W.: Issues in the pathology and diagnosis of the chronic myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome. *Am. J. Clin Pathol* 99(4):513-525, 1992.
- Diekmann D.; Brill S.; Garrett M.D.; Totty N.; Hsuan J.; Monfries C.; Hall C.; Lim L.; Hall A.: BCR encodes a GTPase activating protein for p21^{tac}. *Nature* 351:400-402,1991.
- Dreazen O.; Canaani E.; Gale R.P.(A): Molecular biology of chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol* 25:35-49,1988.
- Dreazen O.; Klisak I.; Rassool F.; Goldman J.M.; Sparkes R.S.; Gale R.P.: Do oncogenes determine clinical features in chronic myeloid leukaemia? *Lancet* 1:1402-1405,1987.
- Dreazen, O.; Berman M.; Gale, R.P.(B): Molecular Abnormalities of bcr and c-abl in Chronic Myelogenous Leukemia Associated With a Long Chronic Phase. *Blood* 71: 797-799,1988.
- Druker B.J.; Mamon H.J.; Roberts T.M.: Oncogenes, growth factors, and signal transduction. *N Engl J Med* 321:1383-1391,1989.
- Duncombe A.S.; Heslop H.E.; Turner M.; Meager A.; Priest R.; Exley T.; Brenner M. K.: Tumor necrosis factor mediates autocrine growth inhibition in a chronic leukemia. *J Immunol* 143:3828-3834,1989.

- Dyck J. A.; Bosco J. J. Clinical stage of chronic granulocyte leukaemia and BCR breakpoint location in South-East Asian patients. *Br J Haematol* 72:54-67, 1989.
- Eisenberg A.; Silver R.; Soper L.; Arlin Z.; Coleman M.; Bernhardt B.; Benn P.: The Location of Breakpoints within the Breakpoint Cluster Region (bcr) of Chromosome 22 in Chronic Myeloid Leukemia. *Leukemia* 2 : 642-647, 1988.
- Elefanty A.G.; Hariharan I.K.; Cory S.: bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukaemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice. *EMBO J* 9:1069-1078, 1990.
- Epner D. E.; Koeffler H.P.; Molecular Genetic Advances in Chronic Myelogenous Leukemia. *Ann Intern Med* 113 :3-6, 1990
- Estrov Z.; Kurzrock R.; Wetzler M.; Kantarjian H.; Blake M.; Harris D.; Gutterman J.U.; Talpaz M.: Suppression of chronic myelogenous leukemia colony growth by interleukin-1(IL-1) receptor antagonist and soluble IL-1 receptors: a novel application for inhibitors of IL-1 activity. *Blood* 78:1476-1484, 1991.
- Ezdinli E.Z.; Sokal J.E.; Crosswhite L.; Sandberg A.A.: Philadelphia-chromosome positive and negative chronic myelocytic leukemia. *Ann Intern Med* 72:175-182, 1970.
- Fialkow P.J.; Denman A.M.; Jacobson R.J.; Lowenthal M.N.: Chronic myelocytic leukemia: origin of some lymphocytes from leukemia stem cells. *J Clin Invest.* 62:815-823, 1978.
- Fialkow P.J.; Jacobson R.J.; Papayannopoulou T.: Chronic Myelocytic Leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med* 63:125-130, 1977.
- Fishleder A.: Oncogenes and cancer: clinical applications. *Cleve Clin J Med* 57:721-726, 1990.
- Fitzgerald P.H.; Beard M.E.J.; Morris C.M.; Heaton D.C.; Reeve A.E.: Ph-negative chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 66: 311-314, 1987.
- Fokas A.S.; Keller J.B.; Clarkson B.D.: Mathematical model of granulocytopoiesis and chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res* 51:2048-2091, 1991.
- Frisch B.; Bartl R.; Jaeger K.: Histologic diagnosis of chronic myeloproliferative disorders (CMPD). *Hematology Reviews* 3:131-147, 1989.
- Galbraith P.R.; Abu-Zahra H.T.: Granulopoiesis in chronic granulocytic leukaemia. *Br J Haematol* 22:135-140, 1972.
- Ganesan T.S.; Rassool F.; Guo A-P.; Th'ng K.H.; Dowding C.; Hibbin J.A.; Young B.D.; White H.; Kumaran T.O.; Galton D.A.G.; Goldman J.M.: Rearrangement of the bcr gene in Philadelphia chromosome-negative chronic myeloid leukemia. *Blood* 68: 957-960, 1986.
- Georgii A.: Histopathologie und Klinik der chronischen, myeloproliferativen Erkrankungen. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 67:214-234, 1983.
- Georgii A.; Vykoupil K.F.; Buhr Th.; Choritz H.; Döhler U.; Kaloutsi V.; Werner M.: Chronic Myeloproliferative Disorders in Bone Marrow Biopsies. *Path. Res. Pract.* 186:3-27, 1990.

- Golde D.W.; Burgaleta C.; Sparkes R.S.; Cline M.J.: The Philadelphia chromosome in human macrophages. *Blood* 49:367-370,1977.
- Gomez G.A.; Sokal J.E.; Walsh D.: Prognostic features at diagnosis of chronic myelocytic leukemia. *Cancer* 47:2470-2477,1981.
- Groffen J.; Stephenson J.R.; Heisterkamp N.; de Klein A.; Bartram C.R.; Grosveld G.: Philadelphia Chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36:93-99,1984.
- Grossman A.; Mathew A.; O'Connell M.P.; Tiso P.; Distenfeld A.; Benn P.: Multiple Restriction Enzyme Digests Are Required to Rule out Polymorphism in the Molecular Diagnosis of Chronic Myeloid Leukemia. *Leukemia* 4:63-64,1990.
- Grossman A.; Silver R.T.; Arlin Z.; Coleman M.; Camposano E.; Gascon P.; Benn P.A.: Fine Mapping of Chromosome 22 Breakpoints within the Breakpoint Cluster Region (bcr) Implies a Role for bcr Exon 3 in Determining Disease Duration in Chronic Myeloid Leukemia. *Am. J. Hum. Genet.* 45:729-738,1989.
- Heisterkamp N.; Groffen J.; Stephenson J.R.; Spurr N.K.; Goodfellow P.N.; Solomon E.; Carritt B.; Bodmer W.F.: Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes. *Nature* 299:747-749,1982.
- Heisterkamp N.; Stam K.; Groffen J.; de Klein A.; Grosveld G.: Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph1 translocation. *Nature* 315:758-761,1985.
- Heisterkamp N.; Stephenson J.R.; Groffen J.; Hansen P.F.; de Klein A.; Bartram C.R.; Grosveld G.: Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306:239-242,1983.
- Hirosawa S.; Aoki N.; Matsushime H. and Shibuya M.: Undetectable bcr-abl rearrangements in some CML patients are due to a deletion mutation in the bcr gene. *Am J Hematol* 28:33-36,1988.
- Hoffmann F.M.; Fresco L.D.; Hoffman-Falk H.; Shilo B.Z.: Nucleotide sequences of the Drosophila src and abl homologs: conservation and variability in the src family oncogenes. *Cell* 35:393-401,1983.
- Inokuchi K.; Futaki M.; Yamada T.; Tanabe Y.; Dan K.; Shinohara T.; Kuriya S.I.; Nomura T.(A): The Relationship Between the site of Breakpoints within the BCR Gene And Thrombopoiesis of Philadelphia-Positive Chronic Myelocytic Leukemia. *Leuk Res* 15:1067-1073,1991.
- Inokuchi K.; Inoue T.; Tojo A.; Futaki M.; Miyake K.; Yamada T.; Tanabe Y.; Ohki I.; Dan K.; Ozawa K.; Asano S.; Nomura T.(B): A Possible Correlation Between the Type of bcr - abl Hybrid Messenger RNA and Platelet Count in Philadelphia-Positive Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood* 78:3125-3127,1991.
- Inokuchi K.; Nomura T.: The relationship between the type of bcr- abl hybrid messenger RNA and thrombopoiesis in Philadelphia positive chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 10:9-15,1993.
- Jacquillat C.; Chastang C.; Tanzer J. et al: Prognostic factors in chronic granulocytic leukemia. A study of 798 cases. *Boll Ist Sieroter Milan* 57:237-246,1978.

- Jaubert J.; Martiat P.; Dowding C.; Ifrah N.; Goldman J.M.: The position of the M - BCR breakpoint does not predict the duration of chronic phase or survival in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 74:30-35,1990.
- Johnson G.R.; Gonda T.J.; Metcalf D.; Hariharan I.K.; Cory S.: A lethal myeloproliferative syndrome in mice transplanted with bone marrow cells infected with a retrovirus expressing granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Embo J* 8:441-448,1989.
- Jonas D.; Lubbert M.; Kawasaki E.S.; Henke M.; Bross K.J.; Mertelsmann R.; Herrmann F.: Clonal analysis of bcr-abl rearrangement in T lymphocytes from patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 79:1017-1023,1992.
- Kantarjian H.M.; Smith T.L.; McCredie K.B., et al: Chronic myelogenous leukemia: A multivariate analysis of the associations of patient characteristics and therapy with survival. *Blood* 66:1326-1335,1985.
- Kelliher M.A.; McLaughlin J.; Witte O.N.; Rosenberg N.: Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6649-6653,1990.
- Klein H.; Becher R.; Lubbert M.; Oster W.; Schleiermacher E.; Brach M.A.; Souza L.; Lindemann A.; Mertelsmann R.H.; Herrmann F.: Synthesis of granulocyte colony-stimulating factor and its requirement for terminal divisions in chronic myelogenous leukemia. *J.Exp.Med.* 171: 1785-1790,1990.
- Kloetzer W.; Kurzrock R.; Smith L.; Talpaz M.; Spiller M.; Gutterman J.; Arlinghaus R.: The human cellular abl gene product in the chronic myelogenous leukemia cell line K562 has an associated tyrosine protein kinase activity. *Virology* 140:230-238,1985.
- Koeffler H.P.; Golde D.W.: Chronic Myelogenous Leukemia - New Concepts. *N Engl J Med* 304:1201-1209,1981.
- Konopka J.B.; Watanabe S.M.; Witte O.N.: An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* 37:1035-1042,1984.
- Konopka J.B.; Witte O.N.: Detection of c-ABL tyrosine kinase activity in vitro permits direct comparison of normal and altered abl gene products. *Mol Cell Biol* 5:3116-3123,1985.
- Kurzrock R.; Blick M.B.; Talpaz M.; Velasquez W.S.; Trujillo J.M.; Kouttab N.M.; Kloetzer W.S.; Arlinghaus R.B.; Gutterman J.U.: Rearrangement in the Breakpoint Cluster Region and the Clinical Course in Philadelphia-Negative Chronic Myelogenous Leukemia. *Ann Intern Med* 105:673-679,1986.
- Kurzrock R.; Gutterman F.U.; Talpaz M.: The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 319 :990-998,1988.
- Kurzrock R.; Kloetzer W.S.; Talpaz M.; Blick M.; Walters R.; Arlinghaus R.B.; Gutterman J.U.: Identification of molecular variants of p210bcr-abl in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 70:233-236,1987.
- Kurzrock R.; Talpaz M.: The molecular pathology of chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 79 suppl 1: 34-37,1991.

- Lang R.A.; Metcalf D.; Gough N.M.; Dunn A.R.; Gonda T.J.: Expression of a hemopoietic growth factor cDNA in a factor-dependent cell line results in autonomous growth and tumorigenicity. *Cell* 43:531-542,1985.
- Lazzarino M.;Morra E.; Castello A.; Inverardi D.; Coci A.; Pagnucco G.; Magrini U.; Zei G.; Bernasconi C.:Myelofibrosis in chronic granulocytic leukaemia:clinicopathologic correlations and prognostic significance.*Br J Haematol* 64:227-240,1986.
- Lorand-Metze I.; Vassallo J.; Souza C.A.:Histological and cytological heterogeneity of bone marrow in Philadelphia-positive chronic myelogenous leukaemia at diagnosis. *Br J Haematol* 67:45-49,1987.
- Lugo T.G.;Pendergast A.M.; Muller A.J.; Witte O.N.:Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products.*Science* 247:1079-1082,1990.
- Maniatis A.K.; Amsel S.; Mitus W.J.; Coleman N.: Chromosome pattern of bone marrow fibroblasts in patients with chronic granulocytic leukaemia.*Nature* 222:1278-1279,1969.
- Maniatis T.; Fritsch E.F.; Sambrook J.. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory - 2nd ed., 1989.
- Martin P.J.; Najfeld V.; Hansen J.A.; Penfold G.K.; Jacobson R.J.; Fialkow P.J.: Involvement of the B-lymphoid system in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 287:49-50,1980.
- Maru Y.M. and Witte O.N.: The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon.*Cell* 67:459-463,1991.
- McGahon A.; Bissonnette R.; Schmitt M.; Cotter K.M.; Green D.R.; Cotter T.G.: BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood* 83:1179-1187,1994.
- Mills K. I.; The Relationship Between the Location of the Breakpoint Within the M-BCR and Clinical Parameters. *Leukemia Lymphoma*. 11 (suppl 1) 73-79, 1993.
- Mills K.I.; Benn P.; Birnie G.D.: Does the Breakpoint Within the Major Breakpoint Cluster Region (M-bcr) Influence the Duration of the Chronic Phase in Chronic Myeloid Leukemia? An Analytical Comparison of Current Literature. *Blood* 78:1155-1161,1991.
- Mills K.I.; Hynds S.A.; Burnett A.K.; MacKenzie E.D.; Birnie G.D.: Further Evidence that the Site of the Breakpoint in the Major Breakpoint Cluster Region (M-bcr) May be a Prognostic Indicator. *Leukemia* 3: 837-840,1989.
- Mills, K. I.; Mackenzie, E. D.; Birnie, G. D. The site of the Breakpoint Within the bcr is a Prognostic Factor in Philadelphia Positive CML Patients. *Blood* 72: 1237-1241,1988.
- Morgan G. J.; Wiedemann L. M.: The Clinical Application of molecular Techniques in Philadelphia-Positive Leukaemia. *Br J Haematol* 80:1-5,1992.
- Morris C.M.; Reeve A.E.; Fitzgerald P.H.; Hollings P.E.; Beard M.E.; Heaton D.C.: Genomic diversity correlates with clinical variation in Ph1 negative chronic myeloid leukaemia. *Nature* 320:281-283,1986.

- Morris S. W.; Daniel L.; Ahmed C.M.I.; Elias, A.; Lebowitz P. Relationship of bcr breakpoint to chronic phase duration, survival, and blast crisis lineage in chronic myelogenous leukemia patients presenting in early chronic phase. *Blood* 75:2035-2041,1990.
- Nowell P.C.; Hungerford D.A.: Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *JNCI*. 25:85-109,1960.
- Ogawa H.; Sugiyama H.; Soma T.; Masaoka T.; Kishimoto S.: No Correlation Between Locations of bcr Breakpoints and Clinical States in Ph1 - positive CML Patients. *Leukemia* 3: 492-496,1989.
- Ogawa M.;Fried J.; Sakai Y.;Strife A.; Clarkson B.D.: Studies of cellular proliferation in human leukemia. *Cancer* 25:1031-1049,1970.
- Oguma S.; Takatsuki K.; Uchino H., et al: Factors influencing survival in Philadelphia chromosome positive chronic myelocytic leukemia. *Cancer* 50:2928-2934,1982.
- Opalka B.; Wandl U.B.; Klobe O.; Beer U.; Seeber S.; Niederle N.: No correlation between site of breakpoint in the BCR gene and platelet counts in Philadelphia chromosome - positive CML. *Leuk Res* 16: 937-939,1992.
- Opalka B.; Wandl U.; Beer U.; Roggenbuck U.; Kloke O.; Niederle N.: Breakpoint localization within the M-bcr and clinical course do not correlate in patients with chronic myelogenous leukemia undergoing alfa interferon therapy. *Leukemia* 5 : 452-456, 1991
- Patterson H.: Approaches to Proto-oncogene and tumour suppressor gene identification. *Eur J Cancer* 28:258-263,1992.
- Pimentel E.: Oncogenes and Human cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 14:347-368,1985.
- Popenoe D.; Schaefer-Rego K; Mears J. G.; Bank A. and Leibowitz D.: Frequent and extensive deletion during the 9,22 translocation in CML. *Blood* 68:1123-1128,1986.
- Przepiorka D.: Breakpoint Zone of bcr in Chronic Myelogenous Leukemia Does Not Correlate with Disease Phase or Prognosis. *Cancer Genet Cytogenet* 36:117-122,1988.
- Pugh W.C.; Pearson M.; Vardiman J.W.; Rowley J.D.: Philadelphia chromosome negative chronic myelogenous leukemia: a morphological reassessment. *Br J Haematol* 60:457-467,1985.
- Rosti V.; Bergamaschi G.; Ponchio L.; Cazzola M.:c-abl function in normal and chronic myelogenous leukemia hematopoiesis: in vitro studies with antisense oligomers. *Leukemia* 6:1-7,1992.
- Rowley J.D.: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243:290-292,1973.
- Rozman C.; Urbano-Ispizua A.; Cervantes F.; Rozman M.; Colomer D.; Féliz P.; Pujades A.; Vives Corrons J-L.: Analysis of the clinical relevance of the breakpoint location within M-BCR and the type of chimeric mRNA in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 9:1104-1107, 1995.

- Sandberg A.A.; Hossfeld D.K.: Chromosomal abnormalities in human neoplasia. *Annu Rev Med* 21:379-408,1970.
- Sawyers C.L.; McLaughlin J.; Goga A.; Havlik M.; Witte O.: The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 77:121-131,1994.
- Schaefer-Rego, K.; Dudek H.; Popenoe D.; Arlin, Z.; Mears, J. G.; Bank, A.; Leibowitz D. CML Patients in Blast Crisis Have Breakpoints Localized to a Specific Region of the BCR. *Blood* 70: 448-455,1987.
- Scherle P.A.; Dorshkind K.; Witte O.N.: Clonal lymphoid progenitor cell lines expressing the BCR/ABL oncogene retain full differentiative function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:1908-1912,1990.
- Shtalrid, M.; Talpaz, M.; Kurzrock, R.; Kantarjian H.; Trujillo J.; Gutterman, J.; Yoffe G.; Blick M. Analysis of Breakpoints Within the bcr Gene and Their Correlation With the Clinical Course of Philadelphia Positive Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood* 72: 485-490, 1988.
- Shtivelman E.; Lifshitz B.; Gale R.P.; Roe B.A.; Canaani E.: Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene. *Cell* 47:277-284,1986.
- Shtivelman E.; Lifshitz B.; Gale R.P.; Canaani E.: Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 315:550-554,1985.
- Silver, R. T.: Chronic Myeloid Leukemia. A Perspective of the Clinical and Biologic Issues of the Chronic Phase. *Hematol Oncol Clin North Am* 4: 319-335,1990.
- Smetsers T.F.C.M.; Skorski T.; van de Locht L.T.F.; Wessels H.M.C.; Pennings A.H.M.; de Witte T.; Calabretta B.; Mensink E.J.B.M.: Antisense BCR-ABL oligonucleotides induce apoptosis in the philadelphia chromosome-positive cell line BV 173. *Leukemia* 8:129-140,1994.
- Sokal J.E.; Baccarani M.; Russo D. and Tura S.: Staging and Prognosis in Chronic Myelogenous Leukemia. *Semin Hematol* 25:49-61,1988.
- Sonta S.I.; Sandberg A.A.: Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XXIV. Unusual and complex Ph1 translocations and their clinical significance. *Blood* 50: 691-697,1977.
- Southern E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol. Biol.* 98:503,1975.-
- Sporn M.B.; Todaro G.J.: Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* 303:878-880,1980.
- Strife A.; Clarkson B.: Biology of chronic myelogenous leukemia: Is discordant maturation the primary defect?. *Semin Hematol* 25:1-19,1988.
- Takahashi M.; Furukawa T.; Tanaka I.; Ohsawa Y.; Nikkuni K.; Aoki A.; Goto T.; Hashimoto T.; Kishi K.; Koike T.; Moriyama Y.; Shibata A.: Transfection of the bcr/abl oncogene into factor-dependent cells by electroporation: acquisition of autonomous proliferation. *Hematol Oncol* 12:53-60,1994.

- Tefferi A.; Bren G.D.; Wagner K.V.; Schaid D.J.; Ash R.C.; Thibodeau S.N.: The location of the Philadelphia Chromosomal Breakpoint Site and Prognosis in Chronic Granulocytic Leukemia. *Leukemia* 4:839-842,1990.
- Testa J.R. and Rowley J.D.. Chromosomes in leukemia and lymphoma with special emphasis on methodology. In: Catovsky. D. (ed). *The leukemia cell*. Ediburg,Churchill-Lillingston, pp184,1980.
- Thiele J. and Fischer R.: Prognostic implications of bone marrow features in chronic myelogenous leukaemia. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 421:367-370,1992.
- Thiele J.; Simon K.G.; Fischer R.;Zankovich R.:Follow-up studies with sequential bone marrow biopsies in chronic myeloid leukaemia and so-called primary (idiopathic) osteomyelofibrosis.*Path. Res.Pract.* 183:434-445,1988.
- Thiele J.;Kvansnicka H.M.; Titius B.R.; Parpert U.;Nebel R.; Zankovich R.; Dienemann D.; Stein H.;Diehl V.; Fischer R.:Histological features of prognostic significance in CML - an immunohistochemical and morphometric study(multivariate regression analysis) on trephine biopsies of the bone marrow.*Ann Hematol* 66:291-302,1993.
- Tien, H. F.; Wang C. H.; Chen, Y. C.; shen M. C.; Wu, H. S. Lee, F. Y., Chuang S. M.; liu, C. H. Chromosome and bcr rearrangemet in chronic myelogenous leukemia and their correlation with clinical states and prognosis of the disease. *Br J Haematol* 75:469-475,1990.
- Tough I.M.; Jacobs P.A.; Court Brown W.M., Baikie A.G.; Williamson E.R.D.: Cytogenetic studies on bone-marrow in chronic myeloid leukaemia.*Lancet* 1:844-846,1963.
- Tura S.; Baccarani M.; Corbelli G.:Staging of chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 47:105-119,1981.
- van der Plas D.C.; Hermans A.B.C.; Soekarman D.; Smit E.M.E.; Klein A.; Smadja N.; Alimena G.; Goudsmit R.; Grosveld G.; Hagemeijer A.: Cytogenetic and molecular analysis in Philadelphia negative CML. *Blood* 73:1038-1044,1989.
- Virchow R.: Weisses blut .*Froiep Notizen* 36:151,1845.
- Westbrook C. A. The role of molecular techniques in the clinical management of leukemia *Cancer* 70 : 1695 - 1700, 1992.
- Wetzler M.; Kurzrock R.; Lowe D.G.; Kantarjian H.; Gutterman J.U.; Talpaz M.: Alteration in bone marrow adherent layer growth factor expression: a novel mechanism of chronic myelogenous leukemia progression. *Blood* 78:2400-2406,1991.
- Whang J.; Frei E.I.I.I.;Tjio J.H.; Carbone P.P.; Brecher G.: The distribution of the Philadelphia chromosome in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 22:664-673,1963.
- Whang-Peng J.;Henderson E.S.;Knutsen T.et al: Cytogenetic studies in acute myelocytic leukemia with special emphasis on the occurrence of the occurrence of Ph1 chromosome.*Blood* 36:448-457,1970.

- Wiedemann L.M.; Karhi K.K.; Shivji M.K.K.; Rayter S.I.; Pegram S.M.; Dowden G.; Bevan D.; Will A.; Galton D.A.G.; Chan L.C.: The correlation of breakpoint cluster region rearrangement and p210 *bcr/abl* expression with morphological analysis of Ph-negative chronic myeloid leukemia and other myeloproliferative diseases. *Blood* 71:349-355,1988.
- Wiedemann L.M.; Morgan G.J.: How are cancer associated genes activated or inactivated? *Eur J Cancer* 28:248-251,1992.
- Willecke K.; Schafer R.: Human oncogenes. *Hum Genet* 66:132-142,1984.
- Wong P.M.C.; Chung S.W.; Nienhuis A.W.: Retroviral transfer and expression of the interleukin-3 gene in hemopoietic cells. *Genes Dev* 1:358-365,1987.
- Yarnold J.R.: What are Cancer genes, and how do they upset cell behaviour? *Eur J Cancer* 28:251-255,1992.
- Yunis J.J.: New chromosome techniques in the study of human neoplasia: *Human Pathol* 12: 540-549,1981.
- Zaccaria A.; Martinelli G.; Buzzi M.; Zuffa E.; Zamagni M.D.; Testoni N.; Russo D.; Guerrasio A.; Saglio G.; Saglio G.; Tura S.: M-BCR breakpoint location does not predict survival in Philadelphia chromosome - positive chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 77: 16-20,1992.
- Zaccaria A.; Martinelli G.; Buzzi M.; Testoni N.; Farabegoli P.; Zuffa E.; Zamagni MR; Russo D.; Baccarini M.; Ambrosetti A.; Guerrasio A.; Saglio G.; Tura F.: The Type of BCR/ABL junction does not predict the survival of patients with Ph¹ positive chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 84: 265 - 268, 1993.