



Instituto de Ciências  
Biomédicas de Abel Salazar  
Universidade do Porto



Thomas Jefferson  
University



Instituto Português de  
Oncologia do Porto  
Francisco Gentil

**PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES DA FAMÍLIA  
DAS SEPTINAS NOS VÁRIOS SUBGRUPOS  
GENÉTICOS DE LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**

JOANA CRISTINA GOUVEIA SANTOS

Dissertação de Mestrado em Oncologia

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade  
do Porto e a Thomas Jefferson University

2009

JOANA CRISTINA GOUVEIA SANTOS

**PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES DA FAMÍLIA  
DAS SEPTINAS NOS VÁRIOS SUBGRUPOS  
GENÉTICOS DE LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Oncologia submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto e a Thomas Jefferson University.

Orientador - Prof. Doutor Manuel Teixeira  
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto e Serviço de Genética do IPO-Porto.

Co-orientador - Dr. Nuno Cerveira  
Serviço de Genética do IPO-Porto.

## **AGRADECIMENTOS**

Os meus agradecimentos à Direcção do IPO-Porto, por me permitir realizar este estudo na instituição e ao Prof. Carlos Lopes pela coordenação deste Mestrado.

Ao orientador desta tese Prof. Manuel Teixeira o meu “Muito Obrigada”, por me ter permitido integrar a sua equipa de investigação, por ter aceite orientar esta tese, por todo o apoio e pelo seu espírito crítico que contribuíram significativamente para a qualidade deste trabalho.

Ao Dr. Nuno Cerveira, co-orientador desta tese, por tudo aquilo que me ensinou, pelo tempo e disponibilidade para qualquer dúvida, pela amizade e apoio. Obrigada!

A todos os colegas do Serviço de Genética que de uma forma ou de outra me permitiram crescer cientificamente. Um agradecimento especial à Susana que me integrou nas minhas primeiras tarefas no laboratório, à Vera, Paula e Mara pela amizade, companheirismo e apoio, à Manuela pela ajuda no laboratório, e ao Ricardo por se demonstrar sempre disponível, por todos os conselhos e ajuda na análise estatística.

Não poderia deixar de agradecer o suporte financeiro prestado pela Liga Portuguesa contra o cancro, sem o qual esta tese de Mestrado não seria possível.

Finalmente, gostaria de agradecer à minha família, que sempre me apoiou! Em especial aos meus pais, Victor e Céu, pela pessoa que sou hoje pessoal e profissionalmente, por estarem comigo em todos os momentos e por me apoiarem nesta minha viagem pela investigação. Aos meus irmãos, Pedro e Paula, pelo companheirismo, e aos meus sobrinhos Bruno e Bruna, por me contagiarem com a vossa alegria de criança. Ao Marco, por tudo! Por toda a paciência, carinho e apoio, por acreditar em mim e querer fazer esta viagem comigo. A todos os amigos e amigas, em especial às Anas, que estiveram sempre lá!

*Aos meus Pais*

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>8</b>
<b>RESUMO</b>	<b>12</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
1. Epidemiologia da leucemia mielóide aguda	19
1.1. Taxas de incidência, sobrevivência e mortalidade	19
2. Etiologia da leucemia mielóide aguda	21
2.1. Factores de risco ambientais e síndromes hereditários	21
3. Classificação da leucemia mielóide aguda	23
3.1. LMA com t(8;21)(q22;q22) - <i>AML1/ETO</i>	24
3.2. LMA com eosinófilia e inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22) - <i>CBFB/MYH11</i>	26
3.3. LMA com t(15;17)(q22;q12) - <i>PML/RARA</i> e variantes	26
3.4. LMA com alterações na região 11q23 ( <i>MLL</i> )	26
4. Tratamento da leucemia mielóide aguda	28
5. Septinas	30
5.1. Septinas - estrutura, funções e interacções	30
5.2. Septinas e Cancro	36
5.2.1. Translocações cromossómicas equilibradas com o gene <i>MLL</i>	36
5.2.2. Alteração da expressão das septinas em neoplasias	38
<b>OBJECTIVOS</b>	<b>41</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>43</b>
1. Material	44
2. Métodos	45
2.1. Citogenética clássica e molecular	45
2.2. Estudo Molecular	45
2.2.1. Processamento das amostras de medula óssea	45
2.2.2. Extração de RNA	45
2.2.3. Avaliação da integridade e quantidade do RNA total	45
2.2.4. Síntese de cDNA (DNA complementar)	46
2.2.5. RT-PCR qualitativo	46
2.2.6. RT-PCR quantitativo	46
2.2.7. Análise estatística	47
<b>RESULTADOS</b>	<b>48</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
<b>ESTUDOS FUTUROS</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>82</b>

## **ABREVIATURAS**



<b>%</b>	Porcentagem (medida de razão com base 100)
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>aa</b>	Aminoácido
<b>ABL1</b>	Gene <i>c-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase</i>
<b>AKE</b>	Solução hipotónica Amino-(K)Potássio-EDTA
<b>AML1</b>	Gene <i>acute myeloid leukaemia 1</i>
<b>AML1/ETO</b>	Gene quimérico resultante da fusão entre os genes <i>AML1</i> e <i>ETO</i>
<b>Ara-C</b>	Citosina Arabinosídeo (agente quimioterápico)
<b>ARTS</b>	Transcrito alternativo do gene <i>SEPT4</i>
<b>BAX</b>	Gene <i>BCL2-associated X protein</i>
<b>BCR</b>	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
<b>Bp</b>	Pares de bases
<b>C-</b>	Extremidade carboxilo da proteína
<b>CBFB</b>	Gene <i>core-binding factor beta subunit</i>
<b>CBFB/MYH11</b>	Gene quimérico resultante da fusão entre os genes <i>CBFB</i> e <i>MYH11</i>
<b>CC</b>	Domínio proteico <i>coiled-coil</i>
<b>Cdc11</b>	<i>Cell division cycle 11</i>
<b>Cdc2</b>	<i>Cell division cycle 2</i>
<b>Cdk5</b>	<i>Cyclin-dependent kinase 5</i>
<b>cDNA</b>	DNA (ácido desoxirribonucleico) complementar
<b>DMP</b>	Doença mieloproliferativa
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido edético (ácido etilendiaminotetracético)
<b>ETO</b>	Gene <i>eight-twenty-one</i>
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FAB</b>	French-American-British (Sistema de Classificação)
<b>GLAST</b>	Proteína transportadora de glutamato
<b>GST</b>	Gene supressor tumoral
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>HCA</b>	Análise de agregação hierárquica
<b>IAPs</b>	<i>Inhibitors of Apoptosis Proteins</i>
<b>IARC</b>	The International Agency for Research on Cancer
<b>Kb</b>	Kilobases (1000 Bp)

<b>KHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de Potássio
<b>L</b>	Litro
<b>LLA</b>	Leucemia linfoblástica aguda
<b>LMA</b>	Leucemia mielóide aguda
<b>LPA</b>	Leucemia promielocítica aguda
<b>min.</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MLL</b>	Gene <i>mixed-lineage leukaemia</i>
<b>MLL/SEPT2</b>	Gene quimérico resultante da fusão entre os genes <i>MLL</i> e <i>SEPT2</i>
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MYH11</b>	Gene <i>smooth muscle myosin heavy chain</i>
<b>N-</b>	Extremidade amina da proteína
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloreto de amónio
<b>nm</b>	Nanomolar
<b>°C</b>	grau Celsius de temperatura
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>p</b>	Valor <i>p</i>
<b>PB</b>	Região proteica polibásica
<b>PBS</b>	Solução tampão salina de fosfato
<b>PCR</b>	Reacção em cadeia da polimerase
<b>pH</b>	Potencial de hidrogénio iónico
<b>p-loop</b>	<i>Phosphate-binding loop</i>
<b>PML</b>	Gene <i>promyelocytic leukaemia</i>
<b>PML/RARA</b>	Gene quimérico resultante da fusão entre os genes <i>PML</i> e <i>RARA</i>
<b>PRD</b>	Domínio proteico rico em resíduos de prolina
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RARA</b>	Gene <i>retinoic acid receptor alpha</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>RNAse free water</b>	Água livre de ribonucleases
<b>RORENO</b>	Registo Oncológico Regional do Norte
<b>RT-PCR</b>	Reacção em cadeia da polimerase - transcriptase reversa
<b>s.</b>	Segundos
<b>ScCdc3</b>	Gene <i>cell division cycle 3</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

<b>SEPT1</b>	Gene <i>Septin 1</i>
<b>SEPT1</b>	Proteína Septina 1
<b>-SH3</b>	Domínio proteico <i>Src homology 3</i>
<b>Sint1</b>	<i>Integration site 1</i>
<b>SL3-3 MLV</b>	SL3-3 <i>murine leukaemia vírus</i>
<b>SMD</b>	Síndrome mielodisplásico
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SPSS</b>	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
<b>SUD</b>	Região específica das septinas
<b>TCR</b>	Família de genes receptores das células T
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Gene <i>transforming growth factor beta 1</i>
<b>THSP1</b>	Gene <i>thrombospondin 1</i>
<b>t-LLA</b>	Leucemia linfoblástica aguda secundária a terapia
<b>t-LMA</b>	Leucemia mielóide aguda secundária a terapia
<b>Topo II</b>	Enzima Topoisomerase II
<b>XIAP</b>	Gene <i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>

---

\* Lista de abreviaturas ordenada por ordem alfabética

**RESUMO**

As leucemias agudas constituem um grupo heterogéneo de neoplasias hematopoiéticas com características genéticas e clinicopatológicas distintas e de prognóstico variável com as terapias actualmente disponíveis. A identificação de rearranjos cromossómicos específicos em determinados tipos de leucemias permite uma melhor estratificação dos doentes por grupos de risco, com a consequente selecção da terapia mais adequada a cada caso. Nos últimos anos, tem surgido um interesse crescente no estudo das alterações de expressão genética que poderão conduzir ao desenvolvimento do fenótipo neoplásico. Deste modo, o estudo da expressão de determinados genes poderá permitir uma melhor compreensão da etiologia da leucemia mielóide aguda (LMA), assim como auxiliar no estabelecimento de grupos de prognóstico, na selecção de terapias mais adequadas e no seguimento dos doentes com LMA.

Vários estudos relativos à funcionalidade das septinas têm vindo a ser desenvolvidos nos últimos anos, identificando o seu envolvimento em fenómenos cruciais à divisão e manutenção da integridade celular, entre os quais, a determinação da polaridade, a reorganização do citoesqueleto, a manutenção da dinâmica membranar, o transporte através de vesículas, a exocitose e a apoptose.

Até à data, foram identificados 14 genes humanos pertencentes à família das septinas, cinco das quais (*SEPT2*, 5, 6, 9 e 11) foram observados em translocações recíprocas envolvendo o gene *MLL* (*Mixed Lineage Leukaemia*) em doentes com neoplasias mielóides. O envolvimento de 5 das 14 septinas humanas em translocações com o gene *MLL* sugere a existência de um papel fundamental das septinas no processo neoplásico. Adicionalmente, estão já descritos vários estudos que procuram caracterizar a expressão de septinas em diversos tecidos tumorais, tais como tumores da mama e ovário.

Recentemente, a nossa equipa de investigação quantificou a expressão dos genes *MLL* e *SEPT2* numa série de amostras de medula óssea de doentes seleccionados de modo a representar os principais subgrupos genéticos de LMA, assim como nos três casos de neoplasias mielóides apresentando o rearranjo *MLL-SEPT2* descritos na literatura. No presente trabalho, caracterizamos o padrão de expressão dos restantes 13 membros da família de genes das septinas humanas na mesma série de LMA, com o objectivo de definir o padrão de expressão global desta família de genes na LMA. Adicionalmente, foi quantificada a expressão dos genes da família das septinas e do gene *MLL* em neoplasias mielóides apresentando o gene de fusão *MLL-SEPT6* (4 casos) ou o gene de fusão *MLL-SEPT9* (2 casos).

Nos casos com gene de fusão *MLL-SEPT6*, observamos uma redução estatisticamente significativa de 1,7 vezes da expressão do gene *SEPT6*

acompanhada pela redução de 6,4 vezes da expressão do gene *MLL*, quando comparados com os valores de expressão no grupo controlo. Estes casos apresentam um padrão de expressão similar ao observado anteriormente nos casos de LMA com gene de fusão *MLL-SEPT2*. No entanto, não foram observadas reduções da expressão dos genes *MLL* e *SEPT9* nos casos de LMA com gene de fusão *MLL-SEPT9*.

A análise de agregação hierárquica permitiu-nos organizar os diferentes subtipos genéticos de LMA e os diversos genes analisados em grupos baseados no seu nível de similaridade. Observamos que a LMA com *MLL-SEPT2* ou com *MLL-SEPT6* constituem um grupo bastante distinto de todos os restantes subgrupos genéticos de LMA, no que respeita à expressão das septinas. O subgrupo LMA com rearranjo *PML-RARA* apresentava subexpressão da maioria das septinas, com excepção dos genes *SEPT6*, *SEPT8*, *SEPT11* e *SEPT12*. O gene *SEPT5* encontrava-se subexpresso em todos os subgrupos genéticos de LMA estudados. Curiosamente, o gene *SEPT6* encontrava-se sobre-expresso apenas no subgrupo LMA com rearranjo *CBFB-MYH11*.

Este estudo consiste na primeira descrição do padrão de expressão dos genes da família das septinas humanas na LMA, confirmando a hipótese da existência de alterações dos níveis de expressão das diversas septinas humanas nestas neoplasias. Estudos futuros serão necessários para identificar, por um lado, quais os mecanismos inerentes às alterações de expressão observadas nesta família de genes e, por outro lado, quais os efeitos fenotípicos destas alterações.

**Palavras-chave:** Leucemia mielóide aguda | Expressão genética | Septinas | *MLL* | *Real Time PCR*

## **SUMMARY**

Acute leukemias are a complex and heterogeneous group of hematopoietic neoplasias with a diverse pattern of genetic and clinical characteristics. The identification of specific chromosome rearrangements in leukemias allowed a better stratification of patients by risk group and the selection of the most appropriate therapy. In recent years, the study of gene expression changes that are associated with the development of the neoplastic phenotype has increased and this knowledge is expected to allow a better understanding of acute myeloid leukemia etiology, with an impact on better prognostic group definition, therapy selection, and follow-up of affected patients.

Septins are proteins associated with crucial steps in cell division and cellular integrity, such as polarity establishment, cytoskeleton reorganization, maintenance of the membranar dynamics, vesicle traffic, and exocitose. In humans, 14 Septin genes have been identified, of which five (*SEPT2*, 5, 6, 9 and 11) have been found in reciprocal translocations with the *MLL* gene in acute leukemia patients, suggesting a role for these proteins in this type of neoplasias. Additionally, several studies have shown that there is an association between expression levels of septins in different neoplasias, such as breast and ovarian cancer, and neoplastic transformation.

Recently, we have quantified *MLL* and *SEPT2* gene expression in acute myeloid leukemia (AML) patients selected to represent the major AML genetic subgroups, as well as in all three cases of *MLL-SEPT2* associated myeloid neoplasms so far described in the literature. In this work, we aimed to characterize the expression pattern at the RNA level of the 13 remaining septin family genes in the same AML series. We also quantified the septin gene family and the *MLL* gene in four cases of *MLL-SEPT6* and two cases of *MLL-SEPT9* associated myeloid neoplasia.

A statistically significant down-regulation was observed for the expression of both *MLL* (6.2 fold) and *SEPT6* (1.7 fold) in *MLL-SEPT6* leukemia. These findings show a similar pattern to the previously reported by our group in cases with a *MLL-SEPT2* gene fusion. However, we did not find a reduction of wild-type *SEPT9* or *MLL* expression in cases with the *MLL-SEPT9* gene fusion.

Using hierarchical clustering analysis to cluster AML genetic subgroups based on their similarity of septin expression changes, we observed that *MLL-SEPT2* and *MLL-SEPT6* AML constitute a group apart from the remaining AML genetic subgroups. In addition, we observed down-regulation of *SEPT5* in all AML genetic subgroups. In our series, the *PML-RARA* genetic subgroup showed a global disturbance of the expression of septin family genes, with most (the exception being *SEPT6*, *SEPT8*, *SEPT11* and *SEPT12*) being down-regulated. The *CBFB-MYH11* subset was the only



genetic subgroup where up-regulation of septin gene expression was observed, namely of the *SEPT6* gene.

In this work we showed the existence of a global disturbance of the pattern of septin expression in myeloid neoplasia. Further studies will be necessary not only to identify the mechanism of septin expression changes in myeloid neoplasia but also their phenotypic impact of the observed expression abnormalities.

**Key-words:** Acute myeloid leukemia | Gene expression | Septins | *MLL* | *Real Time*  
PCR

## **INTRODUÇÃO**

As leucemias agudas constituem um grupo heterogéneo de neoplasias das células progenitoras hematopoiéticas, caracterizadas por proliferação clonal acompanhada por um bloqueio ao nível da diferenciação. Estas neoplasias podem dividir-se em dois grandes grupos distintos, de acordo com a sua origem ou diferenciação: leucemias linfóides ou linfoblásticas agudas (LLA) e leucemias mielóides ou mieloblásticas agudas (LMA) (Haferlach T *et al*, 2005).

## **1. Epidemiologia da leucemia mielóide aguda**

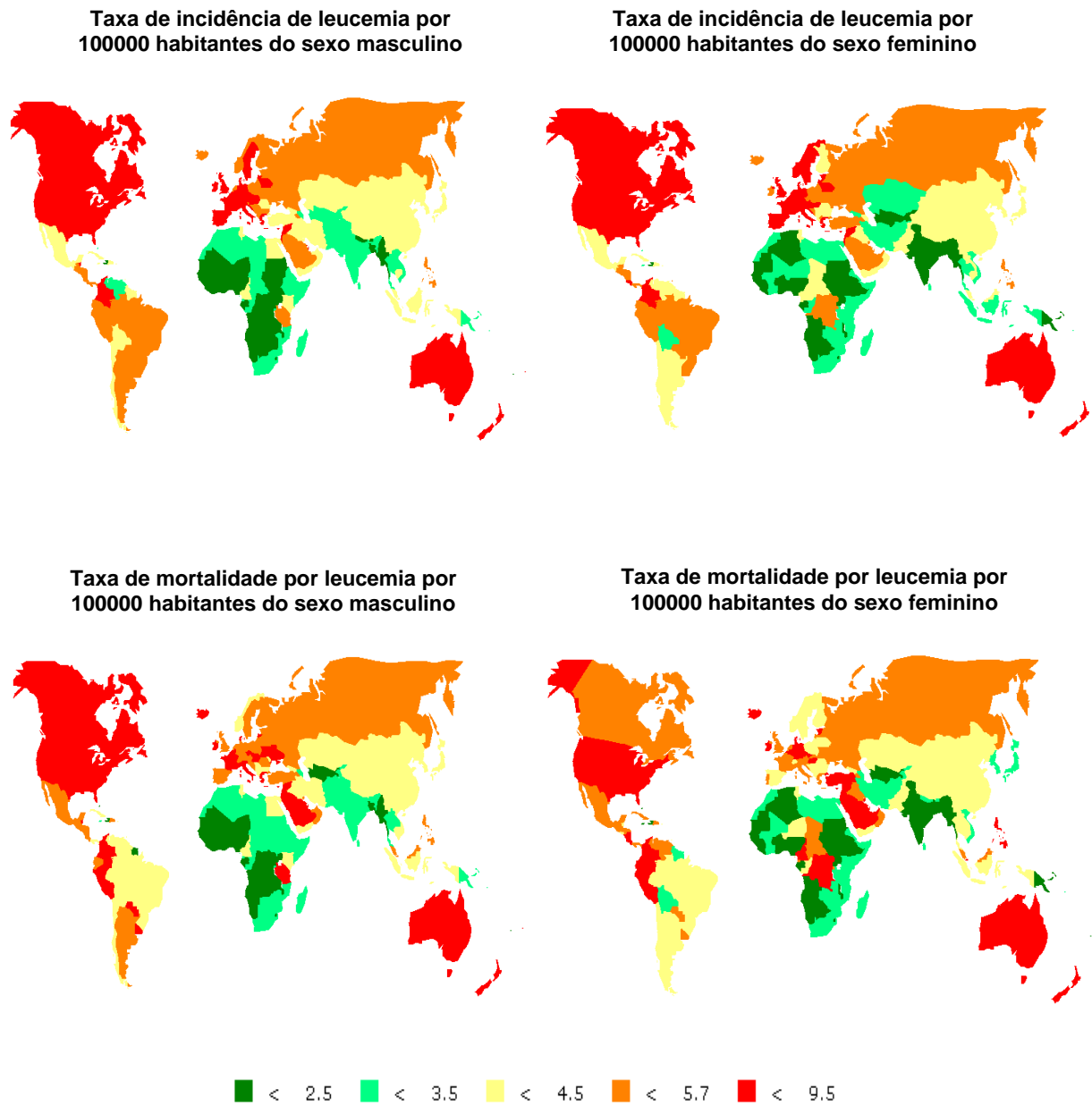
### **1.1. Taxas de incidência, sobrevivência e mortalidade**

A LMA é a leucemia mieloide mais comum, apresentando, nos EUA em 2007, uma prevalência de 3,8 casos por 100000 indivíduos; no entanto, em adultos com mais de 65 anos a prevalência é de 17,9 casos por 100000 indivíduos (Estey E *et al*, 2006). A taxa de mortalidade por LMA, nos EUA em 2004, foi de 2,7 por 100000 indivíduos (Figura 1) (Estey E *et al*, 2006).

O pico de incidência da LMA ocorre no primeiro ano de vida e decresce até aos 4 anos, a partir do qual se mantém constante ao longo da infância e adolescência, aumentando com a idade (Deschler B *et al*, 2006). A média de idade ao diagnóstico de LMA é de 70 anos, sendo que três homens são afectados por cada duas mulheres (Estey E *et al*, 2006).

Segundo dados da IARC (*International Agency for Research on Cancer*), em Portugal no ano 2002, a taxa de incidência de leucemia foi de 8,8 e 6,1 casos por 100000 indivíduos do sexo masculino e feminino, respectivamente (Figura 1), contudo a taxa de mortalidade por leucemia foi de 5,2 e 3,0 casos por 100000 indivíduos do sexo masculino e feminino, respectivamente (Figura 1) (Swerdlow SH *et al*, 2000). No Norte de Portugal, segundo dados do Registo Oncológico Regional do Norte (RORENO) de 2001, a taxa de incidência foi de 8,0 casos por 100000 indivíduos (Deschler B *et al*, 2006).

Na Europa, a sobrevivência relativa para adultos diagnosticados com LMA durante o período 1990 a 1994 foi de 34% a 1 ano e 15% a 5 anos, sem diferenças significativas entre sexos. A taxa de sobrevivência decresce significativamente com a idade ao diagnóstico, de 37% para jovens e 2% para doentes com mais de 75 anos (Smith M *et al*, 2004).



**Figura 1.** Gráficos de incidência e mortalidade por leucemia, em ambos os sexos, por áreas geográficas mundiais (Adaptado de [Swerdlow SH et al, 2000](#)).

## 2. Etiologia da leucemia mielóide aguda

### 2.1. Factores de risco ambientais e síndromes hereditários

O desenvolvimento de LMA tem sido relacionado com vários factores de risco, sumarizados na Tabela 1.

**Tabela 1. Factores de risco associados ao desenvolvimento de LMA\***

<b>Anomalias genéticas</b>	Síndrome de Down
	Síndrome de Klinefelter
	Síndrome de Patau
	Síndrome de Scwachman
	Síndrome de Kostman
	Síndrome de Bloom
	Síndrome de Diamond-Blackfan
	Neutrofibromatose
	Anemia de Fanconi
	Síndrome de Li-Fraumeni
<b>Exposição a agentes físicos e químicos</b>	Benzeno
	Drogas
	Pesticidas
	Fumo de cigarro
	Herbicidas
<b>Exposição a radiações</b>	Radiação terapêutica ou de outra origem
<b>Quimioterapia</b>	Agentes alquilantes
	Inibidores da enzima topoisomerase-II
	Antraciclinas
	Taxanos

A génese das leucemias é um processo multifaseado que requer a susceptibilidade de uma célula progenitora hematopoiética, em vários estádios, a factores inductores. Os diferentes subtipos de LMA associam-se a distintos mecanismos causais, sugerindo uma ligação funcional entre uma alteração molecular

\* Adaptado de [Deschler B et al, 2006](#).

particular ou mutação e o agente causal. No entanto, a maioria dos casos de LMA de novo têm origem numa exposição leucemogénica não identificável (Deschler B *et al*, 2006).

Apesar de grande parte das leucemias serem esporádicas, indivíduos com algumas doenças congénitas, como a anemia de Fanconi e as síndromes de Down, Bloom, Kostmann, Diamond-Blackfan, entre outras, apresentaram um risco acrescido de desenvolvimento de LMA (Deschler B *et al*, 2006; Scheinberg DA *et al*, 2001). Adicionalmente, algumas alterações genéticas herdadas na linha germinativa conferem predisposição hereditária para doenças hematológicas malignas, como é o caso de mutações nos genes *AML1* em doentes com perturbação hereditária da função das plaquetas, que conferem um risco acrescido para o desenvolvimento de LMA. Foram também observadas mutações no gene *CBPA*, um factor de transcrição, em estudos de segregação de famílias com leucemia hereditária, apresentando um padrão autossómico dominante (Owen C *et al*, 2008).

Relativamente a factores ambientais, muitos estudos têm sido realizados, mas são geralmente inconclusivos. No entanto, segundo alguns autores, existe uma forte associação entre a exposição a radiação ionizante e determinados agentes químicos (como o benzeno e as drogas alquilantes) e o aumento de risco de desenvolvimento de LMA (Deschler B *et al*, 2006; Scheinberg DA *et al*, 2001). Assim, os casos de leucemias secundárias relacionados com terapia (t-LMA) são relativamente frequentes, como resultado de tratamentos prévios com inibidores da enzima DNA topoisomerase II, tais como as epipodofilotoxinas, antraciclinas, mitoxantrona, dactinomicina e derivados da dioxipiperazina, ou ainda por radiações ionizantes (Scheinberg DA *et al*, 2001; Felix CA, 2001; Larson RA *et al*, 2005).

### 3. Classificação da leucemia mielóide aguda

A LMA caracteriza-se pela acumulação de formas miéloides imaturas na medula óssea, pois tem origem nos precursores das células mielóides, os mieloblastos. De acordo com o sistema de classificação French-American-British (FAB), o diagnóstico dos vários tipos de leucemia aguda é realizado recorrendo apenas às características morfológicas e histoquímicas da população blástica da medula óssea, sendo a LMA morfolologicamente subclassificada em oito subtipos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Sistema de classificação FAB das LMA\*

Categoria	Morfologia
M0	LMA sem diferenciação
M1	LMA sem maturação
M2	LMA com maturação granulocítica
M3	Leucemia promielocítica aguda
M4	Leucemia mielomonocítica aguda
M5a	Leucemia monoblástica aguda
M5b	Leucemia monocítica aguda
M6	Eritroleucemia
M7	Leucemia megacarioblástica

Contudo, exames laboratoriais adicionais, como a imunofenotipagem, a determinação do cariótipo e os estudos de genética molecular, além de poderosos instrumentos de diagnóstico, são também importantes para a avaliação prognóstica (Crans HN *et al*, 2001; Smith M *et al*, 2004). Deste modo, a identificação de rearranjos cromossômicos específicos em determinados subtipos de leucemias agudas permite o estabelecimento de marcadores de diagnóstico e prognóstico e também uma maior elucidação sobre os mecanismos moleculares envolvidos na transformação neoplásica das células hematológicas malignas (Crans HN *et al*, 2001). Alterações cromossômicas e moleculares específicas têm sido incluídas na classificação das neoplasias hematológicas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e, juntamente com a caracterização morfológica, imunofenotípica e clínica, são utilizadas para

\* Adaptado de Swerdlow SH *et al*, 2000.

distinguir os vários subtipos de LMA (Mrózek K *et al*, 2004). Assim, a classificação FAB está actualmente em desuso, tendo vindo progressivamente a ser substituída pela classificação da OMS (Tabela 3). Esta classificação apresenta recomendações actualizadas e modificadas dos critérios diagnósticos utilizados pela FAB, valorizando critérios citogenéticos e moleculares e resulta de uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes às doenças hematopoiéticas malignas com a finalidade de estabelecer o prognóstico clínico e a terapia adequada por grupos de risco (Haferlach T *et al*, 2004).

Actualmente, sabe-se que a génese das neoplasias compreende a acumulação de diversas alterações genéticas, incluindo o ganho de função de proto-oncogenes e a inactivação de genes supressores tumorais (GST) (Smith M *et al*, 2004). Diversas translocações cromossómicas estão na origem de genes de fusão oncogénicos que actuam sinergisticamente com a inactivação de GST no processo multifaseado da génese das leucemias agudas (Smith M *et al*, 2004). As leucemias mielóides agudas com alterações genéticas recorrentes são geralmente associadas a translocações equilibradas, apresentando alta taxa de remissão completa e prognóstico favorável. As alterações mais frequentemente observadas são as translocações recíprocas t(8;21), inv(16) ou t(16;16), t(15;17) e várias translocações envolvendo quebras da banda cromossómica 11q23. Estudos moleculares têm demonstrado que estes rearranjos cromossómicos originam genes de fusão que codificam proteínas quiméricas com propriedades oncogénicas.

### **3.1. LMA com t(8;21)(q22;q22) - AML1/ETO**

A translocação t(8;21)(q22;q22) é uma das alterações estruturais mais frequentes na LMA, encontrada em cerca de 5 a 12% dos casos de LMA e num terço dos casos de LMA com cariótipo anormal com maturação. Esta translocação envolve o gene *AML1* (*acute myeloid leukaemia 1*) e o gene *ETO* (*eight-twenty-one*). O transcrito de fusão *AML1/ETO* é consistentemente encontrado em doentes com LMA com t(8;21). O subtipo LMA com t(8;21) está normalmente associado a boa resposta à quimioterapia e alta taxa de remissão completa com longos períodos de intervalo livre de doença quando sujeitos a tratamento com elevadas doses de citarabina durante a fase de consolidação (Swerdlow SH *et al*, 2000).



**Tabela 3.** Classificação da OMS da leucemia mielóide aguda\*

---

<b>Leucemia mielóide aguda com alterações genéticas recorrentes</b>
LMA com t(8;21)(q22;q22); ( <i>AML1/ETO</i> )
LMA com eosinófilos anormais na medula óssea com inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22); ( <i>CBFB/MYH11</i> )
Leucemia promielocítica aguda [LMA com t(15;17)(q22;q12) ( <i>PML/RARA</i> ) e variantes]
LMA com alterações na região 11q23 ( <i>MLL</i> )
<b>Leucemia mielóide aguda com displasia de várias linhagens</b>
Após síndrome mielodisplásico (SMD) ou doença mieloproliferativa (DMP)
Sem antecedente de SMD ou DMP mas com displasia em pelo menos 50% de células em duas ou mais linhagens mielóides
<b>Leucemia mielóide aguda e síndromes mielodisplásicos relacionados com a terapêutica</b>
Relacionados com radiação ou agentes alquilantes
Relacionados com inibidores da enzima topoisomerase-II
Outros tipos
<b>Leucemia mielóide aguda não caracterizada</b>
LMA com diferenciação mínima
LMA sem maturação
LMA com maturação
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monoblástica ou monocítica aguda
Leucemia eritróide aguda
Leucemia megacarioblástica aguda
Leucemia basofílica aguda
Panmielose aguda com mielofibrose
Sarcomas mielóides
<b>Leucemia aguda de linhagem ambígua</b>
Leucemia aguda não diferenciada
Leucemia aguda com bilinhagem
Leucemia aguda bifenotípica

---

\* Adaptado de [Swerdlow SH et al, 2000](#).

### **3.2. LMA com eosinofilia e inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22) - CFBF/MYH11**

A LMA com inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22) apresenta, normalmente, diferenciação monocítica e granulocítica acompanhada da presença de eosinófilos anormais na medula óssea. A inv(16)(p13q22) é encontrada em cerca de 10-12% de todos os casos de LMA, pode ocorrer em qualquer idade, mas é mais frequente em jovens. Ambas as anomalias, inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22), originam a fusão do gene *core-binding factor beta subunit (CBFB)* com o gene *smooth muscle myosin heavy chain (MYH11)*. O gene *CBFB* está localizado na banda 16q22 e codifica a subunidade  $\beta$  do *core-binding factor (CBF)*, um factor de transcrição heterodimérico conhecido por estabelecer ligações com sequências de DNA que aumentam a afinidade da maquinaria de transcrição para o promotor de genes *T cell receptors (TCR)*. A subunidade *CBFB* heterodimeriza com a subunidade proteica *CBFA*, resultante do produto do gene *AML1*, um dos genes envolvido na t(8;21) normalmente associada à LMA com maturação (Swerdlow SH *et al*, 2000).

### **3.3. Leucemia promielocítica aguda - LMA com t(15;17)(q22;q12) - PML/RARA e variantes**

A LMA com t(15;17)(q22;q12) é caracterizada pela predominância de promielócitos, podendo existir duas variantes: hipergranular ou leucemia promielocítica aguda típica e microgranular (hipogranular). Este subtipo representa cerca de 5-8% de todas as LMA, ocorrendo em qualquer idade, mas preferencialmente em adultos de meia-idade. A translocação cromossômica t(15;17)(q22;q12) resulta na fusão entre o gene *retinoic acid receptor alpha (RARA)*, localizado na banda 17q12, com um factor de regulação nuclear presente na banda 15q22, o gene *promyelocytic leukaemia (PML)*, originando o gene de fusão *PML/RARA*. A leucemia promielocítica aguda apresenta especial sensibilidade ao tratamento com ácido trans-retinóico (ATRA), que actua como um agente de diferenciação (Swerdlow SH *et al*, 2000).

### **3.4. LMA com alterações na região 11q23 (MLL)**

Alterações na região cromossômica 11q23, onde se localiza o gene *MLL*, são encontradas em cerca de 5-6% dos casos de LMA, podendo ocorrer em qualquer idade, sendo no entanto mais comuns em crianças. Dois subgrupos clínicos de doentes apresentam elevada frequência de alterações da banda 11q23 (envolvendo o

gene *MLL*): LMA em crianças com idade inferior a 1 ano e LMA secundária, usualmente após terapia com inibidores da enzima DNA topoisomerase II. As translocações mais frequentemente encontradas envolvendo esta banda são: t(9;11)(p21;q23), t(11;19)(q23;p13.1) e t(4;11)(q21;q23) (Swerdlow SH *et al*, 2000; Daser A and Rabbitts TH , 2005). Estão descritos mais de 90 genes parceiros de fusão (GPF) do gene *MLL*, dos quais cinco, *SEPT2*, *SEPT5*, *SEPT6*, *SEPT9* e *SEPT11*, pertencem à família das septinas humanas (Megonigal MD *et al*, 1998; Osaka M *et al*, 1999; Fu JF *et al*, 2003; Kojima K *et al*, 2004; Cerveira N *et al*, 2006).

#### 4. Tratamento da leucemia mielóide aguda

O tratamento da LMA consiste essencialmente na combinação de agentes quimioterápicos de citarabina (Ara-C) e antraciclina, tais como a daunorubicina ou a idarubicina. A terapia divide-se em três fases: a indução, a consolidação e a manutenção. O objectivo da fase de indução é restaurar o sistema hematopoiético atingindo a remissão completa, caracterizada por uma medula óssea aparentemente normal, com a presença de menos de 5% de blastos, contagem de neutrófilos maior que  $1,0 \times 10^9/L$  e contagem de plaquetas maior que  $100 \times 10^9/L$  (Smith M *et al*, 2004; Estey E *et al*, 2006). Por outro lado, a segunda fase terapêutica, a consolidação, tem como objectivo a erradicação das células leucémicas residuais, prevenir a recaída e aumentar a sobrevida, recorrendo a doses elevadas de quimioterapia ou mesmo a transplante de medula óssea autólogo ou ortólogo mediante o estado geral do doente (Estey E *et al*, 2006). A quimioterapia de manutenção em LMA é tipicamente menos intensiva e mielossupressiva do que os ciclos anteriores de quimioterapia, envolvendo pequenos cursos de citarabina subcutânea combinados com agentes orais, tais como ectoposídeo por 2 a 3 anos. Durante as diferentes etapas da quimioterapia é necessária a realização de exames de rotina ao sangue periférico e medula óssea, de forma a se conhecer a evolução da doença e ajustar as doses dos medicamentos (Smith M *et al*, 2004).

As alterações citogenéticas consistem no maior factor prognóstico em LMA. Deste modo os doentes são divididos em três grupos de prognóstico distintos de acordo com os estudos citogenéticos: prognóstico favorável [t(15;17), t(8;21) e inversão 16], prognóstico intermédio (cariótipo normal e translocações envolvendo a banda 11q23) e prognóstico desfavorável (delecções totais ou parciais dos cromossomas 5 e 7 e cariótipos complexos com pelo menos 3 alterações) (Kolitz JE, 2006; Kantarjian H *et al*, 2008).

A leucemia promielocítica aguda apresenta actualmente prognóstico favorável. Este subtipo genético de LMA apresenta especial sensibilidade ao tratamento com ácido trans-retinóico (ATRA), que actua como um agente de diferenciação dos promielócitos imaturos em granulócitos maduros (Swerdlow SH *et al*, 2000). A terapia é normalmente combinada com antraciclina, resultando na remissão completa de aproximadamente 90% dos pacientes e taxas de cura de 70 a 85% dos doentes (Kantarjian H *et al*, 2008).

Vários ensaios clínicos têm comprovado a importância do estudo e compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à LMA com a finalidade de estabelecer o prognóstico clínico e a terapia adequada por grupos de risco. Deste modo têm sido

estudados novos agentes terapêuticos, tais como, inibidores da cinase de tirosina FMS-*like* 3 (FLT-3), da farnesil transferase e das vias de sinalização da apoptose e da angiogenese (Kolitz JE, 2006). Algumas terapias biológicas, como o recurso a anticorpos monoclonais, vacinas peptídicas e interleucina-2, estão sob avaliação. Por outro lado, novos agentes citotóxicos, tais como a clofarabina e a cloratazine, têm vindo a ser testados como agentes únicos ou em combinação com as terapias existentes (Kolitz JE, 2006).

## 5. Septinas

### 5.1. Septinas – estrutura, funções e interacções

Em 1973, num estudo desenvolvido por Leland H. Hartwell e colaboradores em *Sacharomyces cerevisiae*, num grupo de mutantes de ciclo celular (*cdc*) sensíveis à temperatura, foram identificadas pela primeira vez um grupo de proteínas localizadas no septo celular. Neste estudo distinguiram-se quatro mutantes que preveniam a citocinese a temperaturas restritas. As proteínas resultantes dos genes alterados (*ScCdc3*, *ScCdc10*, *ScCdc11* e *ScCdc12*) denominaram-se Septinas e localizavam-se nas estruturas filamentosas presentes no plano de divisão mitótico desta levedura (Hartwell LH *et al*, 1974).

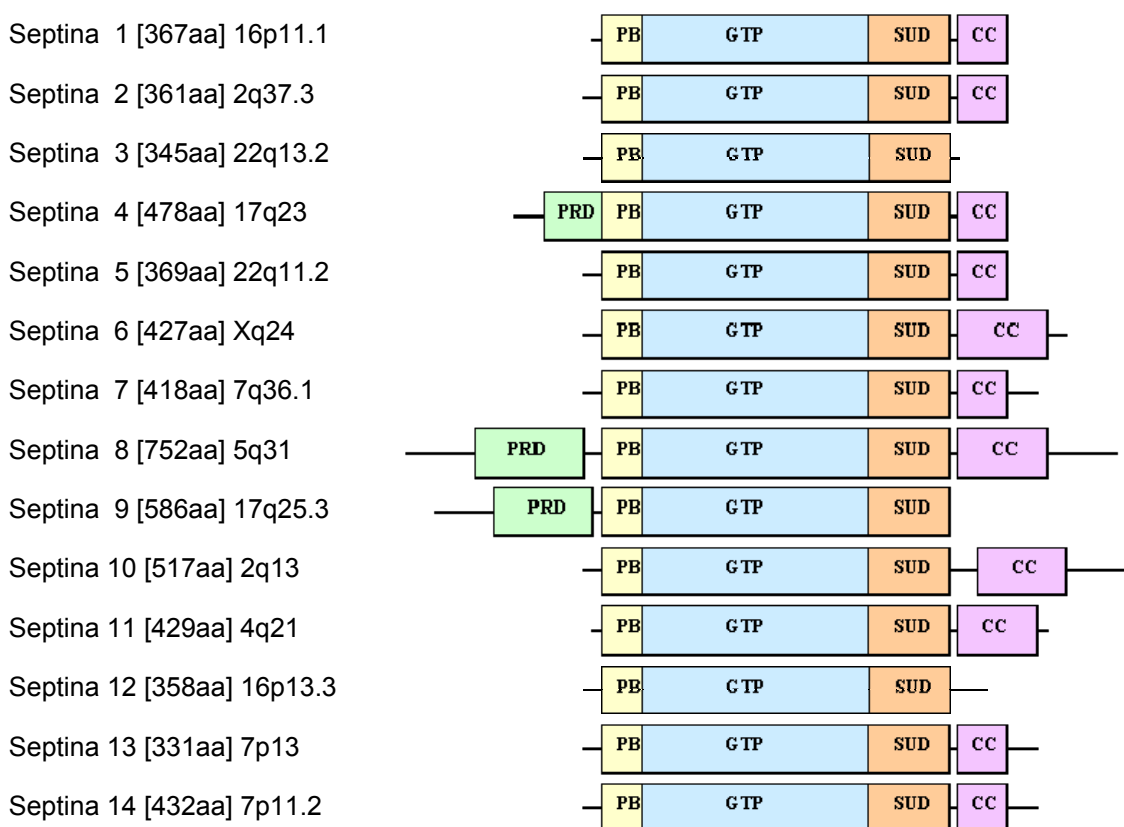
Durante a última década, foram desenvolvidos vários estudos sobre a biologia celular básica de septinas em leveduras e outros organismos. Estes estudos demonstraram que esta família de genes se encontra evolucionariamente e filogeneticamente conservada ao longo da filogenia eucariótica. Deste modo, as septinas foram identificadas em vários organismos eucarióticos, animais e fungos, mas não foram identificadas até à data em plantas e protozoários (Hall PA *et al*, 2004).

As septinas desempenham as suas funções através do recrutamento de um enorme conjunto de outras proteínas. Vários estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de compreender as interacções proteicas estabelecidas entre estas proteínas entre si e com outras proteínas. Sabe-se porém que existem diversos complexos proteicos envolvendo as septinas em processos fundamentais ao funcionamento da célula. De facto, vários estudos relativos à funcionalidade das septinas têm sido desenvolvidos, identificando o seu envolvimento em fenómenos cruciais à divisão e manutenção da integridade celular, entre as quais, a determinação da polaridade (Faty M *et al*, 2002), a reorganização do citoesqueleto (Kinoshita M *et al*, 1997; Nagata K *et al*, 2003), a manutenção da dinâmica membranar (Finger FP *et al*, 2003), o transporte através de vesículas (Kartmann B *et al*, 2001), a exocitose (Beites CL *et al*, 1999; Amin ND *et al*, 2008) e a apoptose (Larisch S *et al*, 2000).

Em leveduras, o processo de citocinese é conduzida por duas septinas independentes, que conduzem ao recrutamento e contracção do anel actina-miosina e à conseqüente formação de um septo de divisão por fusão de vesículas com a membrana citoplasmática (Hall PA *et al*, 2004). Em contraste com os mutantes de septinas, a quebra de uma via conduz ao atraso da citocinese, mas não a uma falha completa do processo de divisão celular (Hall PA *et al*, 2004).

Na espécie humana foram identificados, até à data, 14 genes pertencentes à família das septinas. A nomenclatura destes genes e proteínas foi uniformizada

recentemente por Macara e colaboradores, designando-se por *SEPT1* a *SEPT14* e *SEPT1* a *SEPT14*, respectivamente (Macara IG *et al*, 2002). Estruturalmente, as septinas codificam uma proteína com um domínio central conservado de ligação à guanosina trifosfato (GTP), flanqueado por um domínio polibásico, conservado ao longo da filogenia eucariótica, e uma região *coiled-coil* (Figura 2 e Tabela 4) (Versele M *et al*, 2005).



**Figura 2.** Estrutura das septinas humanas. Estão representadas as isoformas mais longas de cada uma das 14 septinas, o comprimento em número de resíduos aminoacídicos e a respectiva localização cromossômica. PRD – domínio rico em resíduos de prolina, PB – região polibásica, GTP – domínio de ligação ao GTP, SUD – região específica de septinas, CC – domínio *coiled-coil* (Adaptado de Russell SE *et al*, 2005).

**Tabela 4.** Família das Septinas humanas.\*

Septina humana	GenBank	Sinónimos	Localização cromossômica	CC	Interações	Fusão MLL
SEPT1	NM_052838	LARP, SEP1, DIFF6, PNUTL3, MGC20394	16p11.1	1		-
SEPT2	NM_004404	DIFF6, NEDD5, Pnutl3, hNedd5, KIAA0158	2q37.3	1	SEPT4, SEPT5, SEPT6, SEPT7, Anilina, Actina, GLAST, BORG3, s100A4, complexo exocisto	Sim
SEPT3	NM_145733	SEP3, MGC133218, bK250D10.3	22q13.2	0	EIF6	-
SEPT4	NM_004574	H5, ARTS, MART, SEP4, CE5B3, PNUTL2, hucep-7, Bradeion, hCDCrel-2	17q23	1	PIP2, SEPT2, CRMP/CRA, XIAP, Sinucleina, SEPT5	-
SEPT5	NM_002688	H5, CDCREL, PNUTL1, hCDCrel-1	22q11.2	1	Parkin, Sintaxina, SEPT8, SEPT4	Sim
SEPT6	NM_145799	RP5-876A24.2, KIAA0128, MGC16619, MGC20339, Sept2	Xq24	1	SEPT3, SEPT7, S100A4, BORG3, Anilina	Sim
SEPT7	NM_001788	hCDC10, CDC3, Nbla02942, SEPT7A	7p14.2	1	SEPT2, SEPT5, SEPT6, BORG3, S100A4, Anilina	-
SEPT8	XM_034872	KIAA0202, SEP2	5q31	1	SEPT5, hPFTAIRE	-
SEPT9	AF189713	AF17q25, FLJ75490, KIAA0991, MSF, MSF1, NAPB, PNUTL4, SINT1, SeptD1	17q25.3	0	SEPT2, SEPT6, SEPT7, SEPT11, Microtubulos, Actina	Sim
SEPT10	AF146760	FLJ11619, Sep1-like	8q11.23	1		-
SEPT11	NM_018243	FLJ10849	4q21	1	SEPT9	Sim
SEPT12	NM_144605	FLJ25410	16p13.3	0		-
SEPT13	Q9H5B2	SEPT7B	7p13	1		-
SEPT14	NM_207366	FLJ44060	7p11.2	1		-

CC – domínio *coiled-coil*

\* Adaptado de Hall PA et al, 2004.



Todas as septinas apresentam um domínio comum de ligação ao GTP, contudo outros domínios e motivos estão ainda pouco definidos. Estas proteínas variam bastante em termos de comprimento e nas extremidades carboxilo (C-) e amino (N-). Várias septinas apresentam um domínio *coiled-coil* na extremidade carboxilo, tipicamente 50 a 100 resíduos de comprimento, que corresponde a um domínio de ligação proteína-proteína (Hall PA *et al*, 2004). Como já foi referido, a extremidade N-tem diversidade variável entre as várias septinas, das mais longas (SEPT4, SEPT8 e SEPT9) às mais curtas (SEPT1). Estas regiões são ricas em resíduos de prolina, possivelmente indicativo da existência de um motivo de ligação -SH3 (como por exemplo PxPxxP), no entanto até à data não existe evidência experimental deste facto. As septinas SEPT4, SEPT8 e SEPT9 contêm também longas regiões sem estruturas secundárias, constituindo regiões bastante flexíveis capazes de actuar como *steric switches* (Hall PA *et al*, 2004).

Quanto à extremidade C-, as septinas humanas descritas podem ser divididas em três grupos distintos com homologia considerável dentro de cada grupo. As septinas 6, 7, 8, 10 e 11 possuem uma longa cadeia alfa-hélice *coiled-coil*. Em contraste, as septinas 1, 2, 4, 5, 13 e 14 são muito similares entre si e possuem uma curta região *coiled-coil*. Por último, o grupo constituído pelas septinas 3, 9 e 12 não demonstrou evidência de um domínio *coiled-coil* na extremidade C-. Supõem-se que os domínios *coiled-coil* na extremidade C- estão relacionados com a capacidade de oligomerização das septinas. Muitas das septinas humanas (1, 2, 5, 7, 9, 11 e 12) mostraram evidência da existência de uma segunda região *coiled-coil* associada à região central de ligação ao GTP. Esta região encontra-se muito bem conservada ao longo da filogenia (Hall PA *et al*, 2004).

Têm sido descritos vários fenómenos de *splicing* alternativo nos genes que codificam as septinas, originando diversas isoformas. McIlhatton e colaboradores descreveram este processo no gene *SEPT9*, identificando 18 transcritos alternativos, que por sua vez originam 15 polipeptídeos diferentes. A capacidade do gene *SEPT9* em originar transcritos de diferentes comprimentos, e consequentemente diferentes isoformas, deverá ter um significado bioquímico, contudo ainda não compreendido (McIlhatton MA *et al*, 2001; Burrows JF *et al*, 2003). De um modo similar, este fenómeno foi também observado para os genes *SEPT4*, *SEPT6* e *SEPT8*, o que poderá reflectir aspectos de regulação ao nível da estabilidade do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) ou da eficiência da tradução do RNA (Blaser S *et al*, 2003; Hall PA *et al*, 2004). O gene *SEPT4* origina pelo menos 4 isoformas distintas. Estudos funcionais das diferentes isoformas da *SEPT4* sugerem uma diferenciação funcional

entre estas. Por exemplo, a isoforma ARTS é truncada, perdendo o *p-loop* e apresenta localização mitocondrial (Larish S *et al*, 2000; Tanaka M *et al*, 2001).

Estudos recentes descrevem a capacidade de oligomerização e formação de filamentos destas proteínas. De facto, as septinas têm capacidade de polimerizar, formando estruturas homo- ou hetero-oligoméricas, podendo originar filamentos *in vivo* e *in vitro*, ocorrendo a ligação através dos domínios *coiled-coil* ou de ligação ao GTP (Hall PA *et al*, 2004).

As septinas apresentam capacidade de auto-regulação (Hall PA *et al*, 2004). O mecanismo que está na base deste fenómeno permanece desconhecido, contudo alguns estudos sugerem uma base similar à estabilidade proteica observada com as queratinas, quando a ausência de uma queratina acídica leva à instabilidade e consequente degradação do parceiro (Lu X *et al*, 1990). Sabe-se hoje que alterações na expressão de uma septina podem conduzir à alteração na expressão de outros membros da mesma família (Hall PA *et al*, 2004).

As modificações pós-tradução permitem à célula um enorme conjunto de possibilidades para a regulação de várias funções. Em particular, a fosforilação e a sumoilação são utilizadas em vários mecanismos de alteração das funções proteicas, ao que as septinas não são excepção (Hall PA *et al*, 2004). Em leveduras, as funções das septinas são fortemente afectadas por mecanismos de fosforilação. As septinas possuem muitos locais potenciais de fosforilação, vários destes conservados, e potenciais locais de ligação ao cdc2 e cdk5 (Smith D *et al*, 2003). Pouco se conhece sobre a fosforilação das septinas em mamíferos mas alguns progressos têm sido feitos (Xue J *et al*, 2000; She YM *et al*, 2004).

Diversos processos celulares, incluindo exocitose e endocitose, crescimento e divisão celulares, estabelecimento e manutenção da polaridade celular, requerem a regulação do transporte membranar através de vesículas e dos mecanismos inerentes a este fenómeno (*docking* e coordenação com o citoesqueleto) (Hall PA *et al*, 2004). Neste sentido é necessário um complexo de proteínas conservadas, chamado complexo sec6/sec8, envolvidas no recrutamento específico de vesículas para as membranas. Este processo é regulado por eventos de sinalização e interacção com elementos do citoesqueleto, a actina e a tubulina (Hsu SC *et al*, 1999).

Vários estudos em septinas de leveduras e mamíferos indicam a associação a aspectos da dinâmica membranar e tráfego através de vesículas. Alguns estudos observaram a co-precipitação dos complexos sec6/8 com as septinas 2, 4, 6 e 7 (Hsu SC *et al*, 1998); da SEPT2 e syntaxina (Vega IE *et al*, 2003); da SEPT2 e GLAST (Kinoshita N *et al*, 2004); da SEPT5 e syntaxina (Beites CL *et al*, 2001) e SEPT4 e sinucleína (Ihara M *et al*, 2003). Hsu e colaboradores mostraram que o gene *SEPT5*

está envolvido no transporte através de vesículas e na exocitose. Este autores observaram também que a proteína SEPT5 está ainda envolvida na exocitose em plaquetas e regula a dinâmica das vesículas sinápticas nos neurónios (Hsu SC *et al*, 1998). Outros autores verificaram que, para além da contribuição da proteína SEPT5, também as proteínas SEPT4 e SEPT8 estão envolvidas na biologia das plaquetas, uma vez que, após activação das plaquetas, estas proteínas são translocadas para a superfície destas (Blaser S *et al*, 2004).

## 5.2. Septinas e Cancro

### 5.2.1. Translocações cromossómicas equilibradas com o gene *MLL*

O estudo do gene *MLL* presente no braço longo do cromossoma 11, banda q23, tem contribuído de forma significativa para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à génese da leucemia. A incidência de translocações cromossómicas que envolvem o gene *MLL* em LMA é de cerca de 3-4% (Daser A and Rabbitts TH, 2005), contudo em LMA em crianças com menos de um ano a incidência de casos com rearranjos é de 80% (Satake N *et al*, 1999; Steffen B *et al*, 2005; Burmeister T *et al*, 2006; Strick R *et al*, 2006). Adicionalmente, translocações envolvendo a banda 11q23 estão presentes numa proporção de doentes com t-LLA e t-LMA, após tratamento com inibidores da enzima DNA topoisomerase II (Topo II), como as antraciclinas e epipodofilotoxinas (Pui and Relling, 2000).

As translocações cromossómicas envolvendo a banda 11q23 resultam na formação de genes de fusão nos quais a região 5' do gene *MLL* é fundida com a região 3' de um outro gene, denominado gene parceiro de fusão (GPF). Estes genes de fusão são oncogenes e codificam proteínas quiméricas que contêm a extremidade amino da proteína *MLL* fundida com a extremidade carboxilo do GPF (Daser A and Rabbitts TH, 2005). Existe uma grande diversidade de GPF do gene *MLL*, dos quais mais de 90 translocações cromossómicas foram descritas (Meyer C *et al*, 2006).

A importância dos domínios da proteína *MLL* que são perdidos ou mantidos nos genes de fusão, assim como as contribuições dos diferentes GPF para o mecanismo de transformação leucemogénica poderá contribuir para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na transformação neoplásica das células hematológicas malignas (Steffen B *et al*, 2005). Por exemplo, a maioria dos modelos funcionais do gene *MLL*, requerem que o GPF actue como um motivo de dimerização, uma vez que a oligomerização dos genes de fusão envolvendo o gene *MLL* facilita a desregulação da actividade deste com o recrutamento de activadores de transcrição.

A primeira evidência da contribuição dos genes da família das septinas para as doenças humanas ocorreu com a descoberta do envolvimento destes genes em translocações cromossómicas equilibradas com o *locus* do gene *MLL*, originando proteínas de fusão quiméricas em doentes com leucemia aguda. Em 1998, Megonigal e colaboradores identificaram pela primeira vez a translocação cromossómica equilibrada t(11;22)(q23;q11.2), envolvendo os genes *MLL* e *SEPT5*, associada ao desenvolvimento de LMA em duas crianças gémeas (Megonigal MD *et al*, 1998).

Em 1999, Osaka e colaboradores identificaram o envolvimento do gene *SEPT9* numa translocação cromossómica equilibrada envolvendo o gene *MLL* numa criança

de 10 anos com LMA secundária após terapia com agentes quimioterápicos para o tratamento de Linfoma de Hodgkin. A translocação t(11;17)(q23;q25) origina uma proteína quimérica que, à semelhança dos outros casos, funde a extremidade N- da proteína MLL com a quase totalidade da SEPT9 exceptuando os primeiros 7 aminoácidos (Osaka M *et al*, 1999).

Em 2001, foi identificada pela primeira vez a inserção ins(X;11)(q24;q23) numa criança com LMA-M2. Este rearranjo cromossómico causava a fusão entre o gene *MLL* presente na banda 11q23 e o gene *SEPT6* presente na banda Xq24, originando a proteína quimérica MLL-SEPT6 (Borkhardt A *et al*, 2001). Vários outros casos de LMA com rearranjo *MLL-SEPT6* foram posteriormente identificados (Cerveira N *et al*, 2008a). A nossa equipa de investigação identificou recentemente um novo transcrito do gene de fusão *MLL-SEPT6* (exão 6 do gene *MLL* com o exão 2 do gene *SEPT6*), resultado da translocação t(X;11)(q24;q23) (Cerveira N *et al*, 2008a).

Outro gene pertencente à família das Septinas humanas, também envolvido em translocações equilibradas com o gene *MLL*, é o *SEPT11*. Kojima e colaboradores identificaram em 2004, em amostras de sangue periférico de uma doente de 63 anos de idade com LMA com t(4;11)(q21;q23), o gene de fusão *MLL-SEPT11* (Kojima K *et al*, 2004).

Recentemente, a nossa equipa de investigação identificou o gene de fusão *MLL-SEPT2* como a alteração molecular subjacente à translocação t(2;11)(q37;q23) num doente com LMA relacionada com a terapia (Cerveira N *et al*, 2006). Subsequentemente, van Binsbergen e colaboradores identificaram outra variante do gene de fusão *MLL-SEPT2* num doente com t-LMA (van Binsbergen E *et al*, 2007). Por fim, a nossa equipa identificou a terceira variante do gene de fusão *MLL-SEPT2* num caso de síndrome mielodisplásico relacionado com a terapia (Cerveira N *et al*, 2008b). Outra evidência da possibilidade da associação entre o gene *SEPT2* e o desenvolvimento neoplásico advém de um estudo recente da nossa equipa, no qual foi observada regulação negativa da expressão do gene *MLL* e do gene *SEPT2* em casos de LMA que apresentam o gene de fusão *MLL-SEPT2* (Cerveira N *et al*, 2009).

Em todos os casos de translocações recíprocas envolvendo o gene *MLL* e as septinas humanas (*MLL-SEPT2*, *MLL-SEPT5*, *MLL-SEPT6*, *MLL-SEPT9* e *MLL-SEPT11*) em doentes com neoplasias mielóides, ocorre a fusão da extremidade N- da proteína MLL com a quase totalidade da grelha de leitura da septina translocada, contendo os três domínios funcionais das septinas (Megonigal MD *et al*, 1998; Osaka M *et al*, 1999; Fu JF *et al*, 2003; Kojima K *et al*, 2004; Cerveira N *et al*, 2006). Esta observação, adicionada ao facto de 5 das 14 septinas humanas conhecidas estarem envolvidas em translocações com o gene *MLL*, sugere a existência de um processo

não aleatório na formação destes genes de fusão. Deste modo, as septinas poderão desempenhar um papel importante no processo neoplásico das leucemias com rearranjos do gene *MLL*. Um facto que apoia esta hipótese é a capacidade de dimerização das septinas, uma vez que a proteína quimérica necessita de activação através deste fenómeno (Cerveira N *et al*, 2008a).

Adicionalmente, num artigo recentemente publicado pela nossa equipa, observamos que os 13 doentes identificados com LMA com rearranjos *MLL-SEPT6* eram crianças (com idades compreendidas entre os 0 e os 29 meses) (Cerveira N *et al*, 2008a). Dado que a maioria (65%) das leucemias pediátricas com rearranjos envolvendo o gene *MLL* são LAL, os domínios da proteína SEPT6 presentes na proteína quimérica *MLL-SEPT6* deverão contribuir para a leucemogénese mieloblástica na criança. De facto, as fusões das restantes septinas (*SEPT2*, *SEPT5*, *SEPT9* e *SEPT11*) com o gene *MLL* estão também preferencialmente associadas à leucemogénese mieloblástica (Cerveira N *et al*, 2008a).

### 5.2.2. Alteração da expressão das septinas em neoplasias

Para além do envolvimento do gene *SEPT9* em translocações com o gene *MLL*, este gene foi também associado a outras neoplasias por outros estudos. Sorensen e colaboradores isolaram e determinaram as sequências dos locais de integração províricas em 20 tumores induzidos pelo SL3-3 MLV (*murine leukemia viruses*), através de metodologias de PCR (Sørensen AB *et al*, 2000). Com este estudo verificaram em 2 tumores independentes a inserção provírica na mesma região. Dado que a integração retrovírica ocorre ao acaso, o facto de se terem encontrado duas inserções independentes no mesmo local numa série de 20 tumores, era indicativo da existência de um importante gene nessa mesma região, estando este possivelmente envolvido no processo de tumorigénese. Esta região, denominada por SL3-3 integration site (*Sint1*), foi mapeada com o objectivo de identificar os genes envolvidos. *SINT1* codifica uma proteína homóloga à SEPT9. Estes autores sugerem que o gene *SEPT9* será um proto-oncogene envolvido na linfomogénese de células T em ratinhos. O papel deste gene no desenvolvimento da leucemia é fortemente apoiado pelo facto do mesmo estar envolvido em translocações com o gene *MLL* em LMA (Sørensen AB *et al*, 2000).

Apesar de ainda não terem sido identificadas mutações na grelha de leitura do gene *SEPT9*, existe hoje em dia um vasto leque de trabalhos que demonstram alterações de expressão do gene *SEPT9* em tumores do ovário (Burrows JF *et al*,

2003) e mama (Montagna C *et al*, 2003). Montagna e colaboradores observaram um aumento de expressão da *SEPT9* em diversos modelos tumorais de ratinhos, assim como em linhas celulares de cancro da mama humano. Estes autores co-relacionaram o aumento de expressão da *SEPT9* com a inibição da resposta apoptótica mediada pelos genes *BAX* e *THSP1* (Montagna C *et al*, 2003). Estudos de expressão dos diferentes variantes do gene *SEPT9* em tumores de ovário demonstraram que determinados transcritos *SEPT9* são subexpressos por metilação em linhas celulares tumorais de ovário (Burrows JF *et al*, 2003). Scott e colaboradores realizaram um extenso estudo de expressão por *microarrays* do gene *SEPT9* em diferentes tecidos tumorais e linhas celulares humanas, observando a subexpressão deste gene em vários tumores incluindo, tumores da mama, do SNC, do endométrio, do rim, do fígado, do pulmão, linfóides, do esófago, do ovário, do pâncreas, da pele, do tecido conjuntivo e da tiróide (Scott M *et al*, 2005). De salientar ainda a alteração de expressão de transcritos específicos de *SEPT9*, mais concretamente do transcrito *SEPT9\_v4\**, subexpresso em tumores do ovário (Scott M *et al*, 2006). Num trabalho recente, Gonzalez e colaboradores, demonstraram um aumento da expressão do transcrito *SEPT9\_v1* em linhas celulares humanas de cancro da mama e a sua associação ao fenótipo oncogénico (Gonzalez ME *et al*, 2007).

Várias linhas de evidência têm sugerido o envolvimento do gene *SEPT4* em neoplasias humanas. Tanaka e colaboradores identificaram duas variantes de *splice* alternativo do gene *SEPT4* (Tanaka M *et al*, 2001). Apesar da expressão destes transcritos estar geralmente restricta a tecidos cerebrais, foi observada a expressão ectópica em tumores colorectais e melanoma maligno (Tanaka M *et al*, 2001). Além disso, estes autores verificaram que a regulação negativa destes transcritos poderia inibir o crescimento e tumorigénese dos tumores colorectais *in vivo* e *in vitro* (Tanaka M *et al*, 2002). Independentemente, Larisch e colaboradores observaram que o transcrito *SEPT4* poderia promover a apoptose mediada pelo *TGFβ* (Larisch S *et al*, 2000). A apoptose é controlada pela acção de activadores e inibidores de caspases. A família de inibidores de caspases mais estudada é a dos IAPs (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*). Todos os IAPs contêm 1 a 3 domínios de repetição BIR. Estes domínios, podem actuar directamente com as caspases e inibir a actividade apoptótica. Entre os vários IAPs, o melhor estudado é o XIAP. Este contêm 3 domínios BIR e inibe directamente as caspases 3, 7 e 9 (Gottfried Y *et al*, 2004). Uma das isoformas codificada pelo gene *SEPT4* transcrito liga-se ao XIAP, modulando a sua função e promovendo assim a apoptose (Gottfried Y *et al*, 2004). Estudos subsequentes sugeriram que a expressão do transcrito *SEPT4* deverá funcionar como um supressor

tumoral, uma vez que a expressão é perdida na maioria dos casos de LLA da criança (Elhasid R *et al*, 2004).

Outras septinas têm também sido associadas a fenómenos neoplásicos. Foi demonstrado que o gene *SEPT2* é necessário para a citocinese e para a ligação à actina e associação com moléculas de adesão (Spiliotis ET *et al*, 2005). Trabalhos recentes sugerem que uma das isoformas originadas pelo gene *SEPT2* tem um papel importante na compactação e segregação dos cromossomas e que a expressão alterada desta isoforma promove alterações neste processos, conduzindo à destabilização da dinâmica cromossómica (Spiliotis ET *et al*, 2005).

Aparentemente, a subexpressão do gene *SEPT2* é relevante em LMA (Cerveira N *et al*, 2009). Assim, o estudo do padrão de expressão dos restantes genes da família das septinas humanas nestas neoplasias poderão confirmar a hipótese da existência de alterações dos níveis de expressão das diversas septinas em LMA.



## **OBJECTIVOS**

Neste trabalho pretendemos estudar, através da técnica de *Real Time* PCR, o padrão de expressão dos genes pertencentes à família das Septinas (*SEPT1* a *SEPT14*) e do gene *MLL* em diferentes subgrupos genéticos de leucemia mielóide aguda, incluindo LMA com rearranjo *CBFB-MYH11*, LMA com rearranjo *AML1-ETO*, LMA com rearranjo *PML-RARA*, LMA sem alterações citogenéticas, LMA com gene de fusão *MLL-SEPT2*, *MLL-SEPT6* ou *MLL-SEPT9* e LMA com outras translocações envolvendo o gene *MLL* (11q23).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 1. Material

Foram seleccionadas para o estudo 67 amostras de medula óssea (2 ml) colhidas no diagnóstico de doentes com leucemia mielóide aguda (idades compreendidas entre 1 e 75 anos), de modo a representar diferentes subgrupos genéticos de LMA: 13 casos com rearranjo *CBFB-MYH11* resultante da  $inv(16)(p13q22)$  ou  $t(16;16)(p13;q22)$ , 12 casos com rearranjo *AML1-ETO* resultante da  $t(8;21)(q22;q22)$ , 12 casos com rearranjo *PML-RARA* resultante da  $t(15;17)(q22;q12)$ , 11 casos com cariótipo normal, 10 casos com alterações na região 11q23 (*MLL*) e 9 casos com rearranjos *MLL-SEPT*, apresentando 3 casos o gene de fusão *MLL-SEPT2*, 4 casos *MLL-SEPT6* e 2 casos *MLL-SEPT9* (Tabela S1 – Anexos). Como grupo controlo foram analisadas 10 amostras de medula óssea obtidas de indivíduos estudados para excluir doença neoplásica. Todos os doentes, excepto os casos 60, 61 e 63 a 67, foram admitidos e seguidos no Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, tendo sido obtida, em todos os casos, medula óssea para a realização de estudos moleculares e citogenéticos. Os doentes 60 e 61 foram seguidos no Amsterdam Academic Medical Center ([van Binsbergen E et al, 2007](#)) e Utrecht University Medical Center ([Snijder S et al, 2008](#)), respectivamente. Os doentes 63 e 67 foram seguidos no Chang Gung Memorial Hospital (Taoyuan, Taiwan) ([Fu JF et al, 2003](#); [Shih LY et al, 2006](#)). Os doentes 64 e 65 foram admitidos no Rikshospitalet Department of Pediatrics (Oslo, Norway) ([Cerveira N et al, 2009](#)) e St Olav University Hospital Department of Pediatrics (Trondheim, Norway) ([Cerveira N et al, 2009](#)). Por fim, o doente 66 foi tratado no St Anna Children's Hospital (Vienna, Austria) ([Strehl S et al, 2001](#)). De todos os casos provenientes do exterior foi obtida uma amostra de cDNA.

A história clínica dos doentes foi obtida através da consulta dos processos clínicos respectivos, encontrando-se descrita na Tabela S1 (Anexos).

## **2. Métodos**

### **2.1. Citogenética clássica e molecular**

As amostras de medula óssea foram cultivadas por 24h em meio RPMI 1640 com GlutaMAX-I (Invitrogen, London, UK) suplementado com 20% de soro fetal de bovino (Invitrogen, London, UK). As preparações cromossómicas foram executadas segundo métodos *standart* e a coloração de bandas através do método de Tripsina-Leishman. Os cariótipos foram descritos de acordo com o Sistema Internacional de Classificação para a Nomenclatura da Citogenética Humana (Shaffer LG *et al*, 2005).

### **2.2. Estudo Molecular**

#### **2.2.1. Processamento das amostras de medula óssea**

Após a colheita das amostras de medula óssea, realizou-se a lise dos eritrócitos através da adição de uma solução hipotónica (AKE:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  [Merck];  $\text{KHCO}_3$  [Merck]; EDTA 0,1 mM; pH – 7,4) a 2 ml de aspirado medular numa proporção de 9 a 10 vezes esse volume, seguida de incubação a 4°C durante 30 minutos. Centrifugou-se a 4°C (2000 rpm, 10 minutos), rejeitou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento de modo a eliminar totalmente a hemoglobina do sedimento. Por fim, o sedimento foi lavado com PBS (*phosphate buffered saline*) e armazenado a -20°C.

#### **2.2.2. Extracção de RNA**

Para todas as amostras procedeu-se à extracção de RNA total das células nucleadas de medula óssea, usando 1 mL de solução monofásica de fenol e guanidina tiocianato (Tripure™, Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

#### **2.2.3. Avaliação da integridade e quantidade do RNA total**

Após a extracção, procedeu-se à avaliação da integridade e quantidade do RNA total através da quantificação espectrofotométrica a 260 nm no espectrofotómetro NanoDrop ND-100 (NanoDrop technologies, Wilmington, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram guardadas a -80°C.

#### 2.2.4. Síntese de cDNA (DNA complementar)

Com base nas amostras referidas no ponto anterior, procedeu-se à síntese de cDNA a partir de 1 µg de RNA total utilizando o kit *Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Carlsbad, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA final foi diluído com 30 µl de *RNAse free water*.

#### 2.2.5. RT-PCR qualitativo

A reacção em cadeia da polimerase transcriptase-reversa para a detecção dos transcritos de fusão *AML1-ETO*, *CBFB-MYH11* e *PML-RARA* foi realizada de acordo com o protocolo BIOMED-1 (Van Dongen JJ *et al*, 1999). Os iniciadores de síntese (*primers*) e as condições da reacção de PCR para a detecção dos rearranjos envolvendo o gene *MLL* foram descritos previamente (Chaplin T *et al*, 1995; Poirel H *et al*, 1996; Osaka M *et al*, 1999; Busson-Le Comiat M *et al*, 1999; Taki T *et al*, 1999; Shih LY *et al*, 2006; Cerveira N *et al*, 2006; Meyer C *et al*, 2006; Cerveira N *et al*, 2008a).

#### 2.2.6. RT-PCR quantitativo

A expressão ao nível do RNA dos genes da família das septinas foi analisada por *Real Time PCR* num ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied BioSystems, Foster City, CA). Os *primers* e sondas para os genes *SEPT1* a *SEPT14* foram desenhados utilizando o *software* Primer Express 2.0 (Applied BioSystems, Foster City, USA) e sintetizados por Metabion (Metabion, Martinsried, deutschland) (Tabela S2 – Anexos). Os *primers* e sondas para o *c-abl oncogene 1 (ABL1)*, utilizado como controlo endógeno, foram previamente descritos (Tabela S2 – Anexos) (Gabert J *et al*, 2003). Os *primers* e sondas foram desenhados de modo a detectar todas as isoformas conhecidas dos genes das septinas.

Para determinar os níveis de expressão relativa de cada gene alvo em cada amostra, a quantidade relativa do gene alvo foi calibrada com a quantidade relativa do gene de referência e expresso em termos de rácio entre alvo/referência multiplicados por 100 para facilitar a análise (gene alvo/*ABL1* x 100).

As reacções da PCR foram realizadas num volume total de reacção de 25 µl contendo 5 µl de cDNA sintetizado, 12,5 µl de TaqMan universal PCR master mix (Applied BioSystems, Foster City, CA), 0,3 µM de cada *primer* e 0,2 µM de cada sonda. A PCR foi realizada em placas separadas para cada conjunto *primer*/sonda e

cada amostra foi estudada em triplicado. Os parâmetros utilizados na PCR foram os seguintes: 2 min. a 50°C, 10 min. a 95°C, seguido de 50 ciclos de 15s a 95°C e 1 min. a 60°C. Cada placa incluiu múltiplos controlos negativos e diluições em série de um controlo positivo para cada gene em estudo para a construção de uma curva padrão.

### **2.2.7. Análise estatística**

Os valores de expressão normalizados para os vários genes foram comparados entre os diferentes grupos utilizando os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis H e Mann-Whitney U. A análise foi realizada através do *software* estatístico SPSS versão 15.0 (SPSS, Chicago, USA). Os valores de  $p$  foram considerados estatisticamente significativos quando inferiores a 0,01.

Quando são comparadas muitas variáveis, tais como a família de genes analisada, pode ser aplicada uma análise estatística multivariada de modo a facilitar a interpretação dos resultados e encontrar relações de semelhança entre as diversas variáveis. A análise de agregação hierárquica (HCA), através de algoritmos estatísticos *standart* organiza os diferentes subgrupos genéticos de LMA e os diversos genes analisados em grupos baseados no seu nível de similaridade, com os resultados expostos em dendograma. A HCA foi efectuada no programa J-Express Pro 2.5.

**RESULTADOS**



O sumário das alterações de expressão estatisticamente significativas dos genes da família das septinas, observadas nos distintos subgrupos genéticos de LMA encontra-se representado na Figura 3. Os níveis de expressão normalizados para o gene *MLL* e para os genes *SEPT1* a *SEPT13* em cada grupo de amostragem estão representados nas Figuras 4 a 17 e na Tabela 5. No caso das septinas 8, 11, e 12 as variações de expressão observadas não foram consideradas estatisticamente significativas. Os níveis de expressão do gene *SEPT2* e *MLL* nos doentes 1 a 61 foram estudados previamente (Cerveira N *et al*, 2009). Não foi observada expressão do gene *SEPT14* em nenhuma das amostras estudadas, nem no grupo controlo.

#### LMA com rearranjo *MLL-SEPT2*

Os valores de expressão dos genes *SEPT2* e *MLL* no subgrupo de LMA com *MLL-SEPT2* (doentes 59 a 61) foram estudados previamente (Cerveira N *et al*, 2009). Foi observada uma redução de expressão significativa de ambos os genes *MLL* [12,5 vezes (x) inferior à expressão observada no grupo controlo] e *SEPT2* (12,8x inferior). Adicionalmente, foram observadas reduções estatisticamente significativas na expressão do gene *SEPT5* (30,8x; p=0,007), quando comparado com o grupo controlo. Devido à pouca quantidade de amostra de cDNA disponível, não nos foi possível quantificar os níveis de expressão do gene *SEPT12* neste grupo.

#### LMA com rearranjo *MLL-SEPT6*

Foi observada uma redução significativa na expressão de ambos os genes *SEPT6* (1,7x p=0,002) e *MLL* (6,4x; p=0,008) no subgrupo de LMA com *MLL-SEPT6*. Foram ainda observadas reduções estatisticamente significativas na expressão dos genes *SEPT1* (20,5x; p=0,004), *SEPT4* (16,0x; p=0,007) e *SEPT5* (194,0x; p=0,002) nos doentes 62 a 65, quando comparados com o grupo controlo. A expressão quantitativa dos genes *SEPT3* e *SEPT12* não foi avaliada dada a pouca quantidade de amostra de cDNA disponível.

#### LMA com rearranjo *MLL-SEPT9*

No subgrupo de LMA com *MLL-SEPT9* (doentes 66 e 67), como resultado da pouca quantidade de amostra disponível, apenas foi estudada a expressão quantitativa dos genes *MLL*, *SEPT1*, *SEPT2*, *SEPT5*, *SEPT6*, *SEPT9* e *SEPT11*. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos genes analisados, quando comparados com o grupo controlo.

#### LMA com rearranjo *CBFB-MYH11*

No subgrupo de leucemias com rearranjo *CBFB-MYH11* foram observadas reduções estatisticamente significativas na expressão de vários genes da família das septinas estudados: *SEPT1* (6,2x; p=0,001), *SEPT3* (2,8x; p=0,003), *SEPT5* (10,5x; p<0,001) e *SEPT10* (20,5x; p=0,003), quando comparados com o grupo controle. Por outro lado, observamos uma sobre-expressão estatisticamente significativa do gene *SEPT6* (1,8x; p=0,004).

#### LMA com rearranjo *AML1-ETO*

No subgrupo de leucemias com rearranjo *AML1-ETO* foram observadas reduções estatisticamente significativas na expressão dos genes *SEPT1* (4,5x; p<0,001), *SEPT3* (8,5x; p<0,001), *SEPT4* (11,7x; p<0,001), *SEPT5* (11,3x; p=0,001), *SEPT9* (3,2x; p=0,002) e *SEPT10* (9,3x; p<0,001).

#### LMA com rearranjo *PML-RARA*

No subgrupo de leucemias com rearranjo *PML-RARA* foram observadas reduções estatisticamente significativas na expressão da maioria dos genes analisados, com a exceção dos genes *SEPT6*, *SEPT8*, *SEPT11* e *SEPT12*, quando comparados com o grupo controle: *SEPT1* (17,7x; p<0,001), *SEPT2* (2,4x; p=0,001), *SEPT3* (11,6x; p<0,001), *SEPT4* (15,9x; p<0,001), *SEPT5* (16,9x; p<0,001), *SEPT7* (1,5x; p<0,001), *SEPT9* (7,7x; p<0,001), *SEPT10* (32,8x; p<0,001) e *SEPT13* (2,6x; p=0,003).

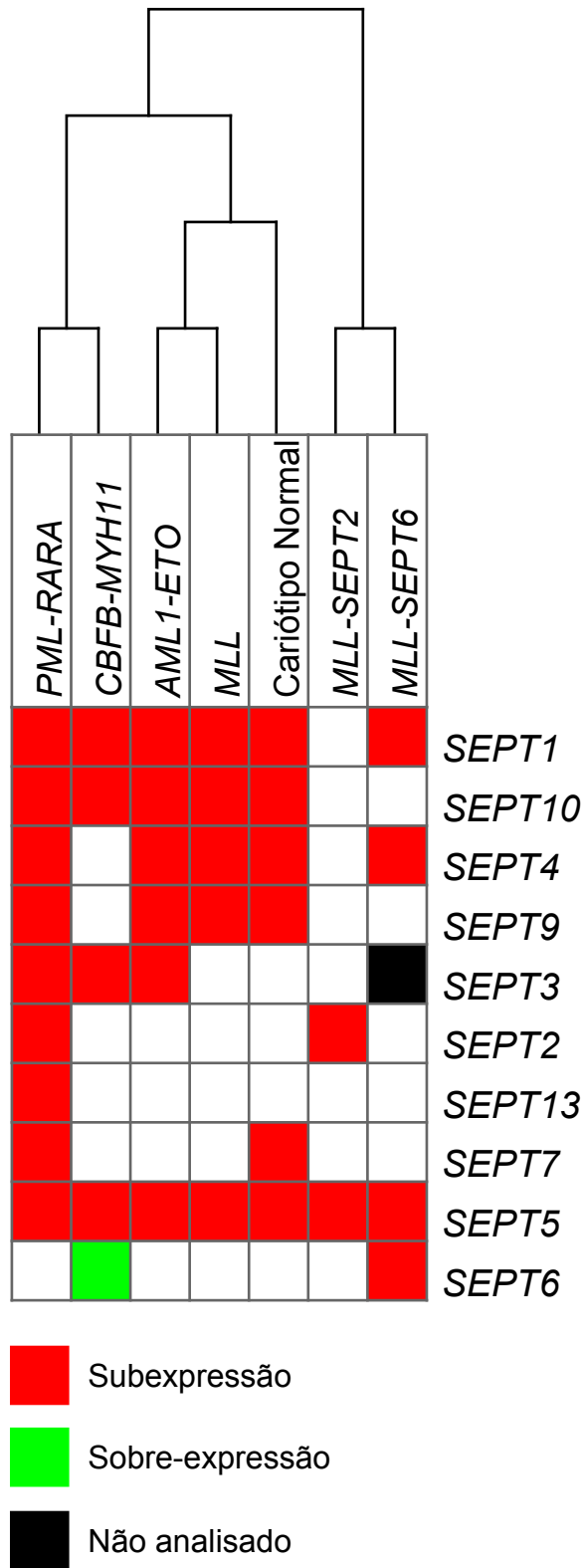
#### LMA com cariótipo normal

No subgrupo de leucemias com cariótipo normal, foram observadas reduções estatisticamente significativas na expressão dos genes *SEPT1* (6,5x; p<0,001), *SEPT4* (5,2x; p=0,004), *SEPT5* (17,8x; p<0,001), *SEPT7* (1,7x; p<0,001), *SEPT9* (4,6x; p<0,001) e *SEPT10* (5,5x; p=0,001).

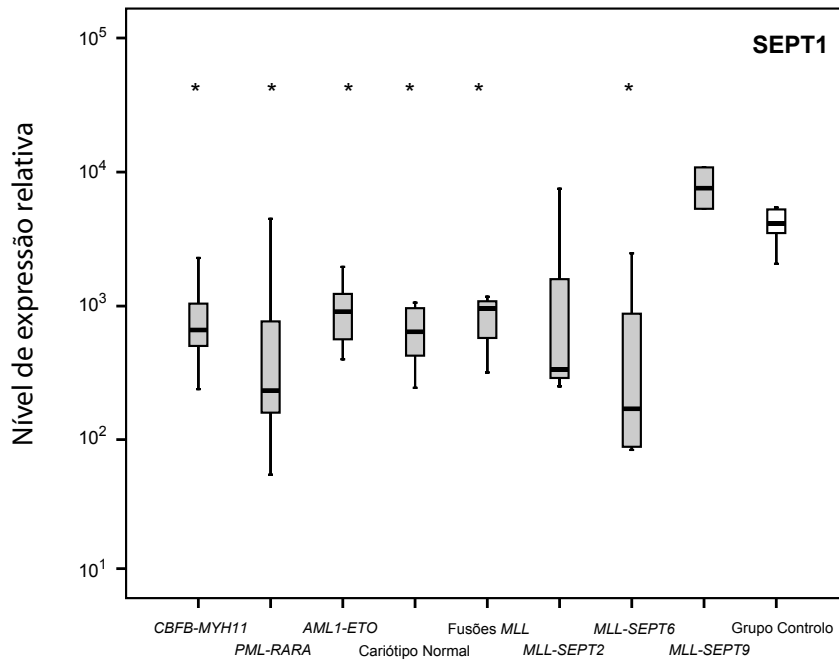
#### LMA com outros rearranjos do gene *MLL*

No subgrupo de leucemias com rearranjos do gene *MLL* com outros parceiros para além das septinas, foram observadas reduções estatisticamente significativas na expressão dos genes *SEPT1* (4,3x; p<0,001), *SEPT4* (5,8x; p<0,001), *SEPT5* (3,5x; p=0,001), *SEPT9* (3,6x; p<0,001) e *SEPT10* (3,3x; p<0,001), quando comparados com o grupo controle. Também o gene *MLL* parece estar subexpresso neste grupo, apresentando um redução da expressão normal de 1,9 vezes (p=0,023). Para determinar se a observação da subexpressão poderia estar associada ao predomínio

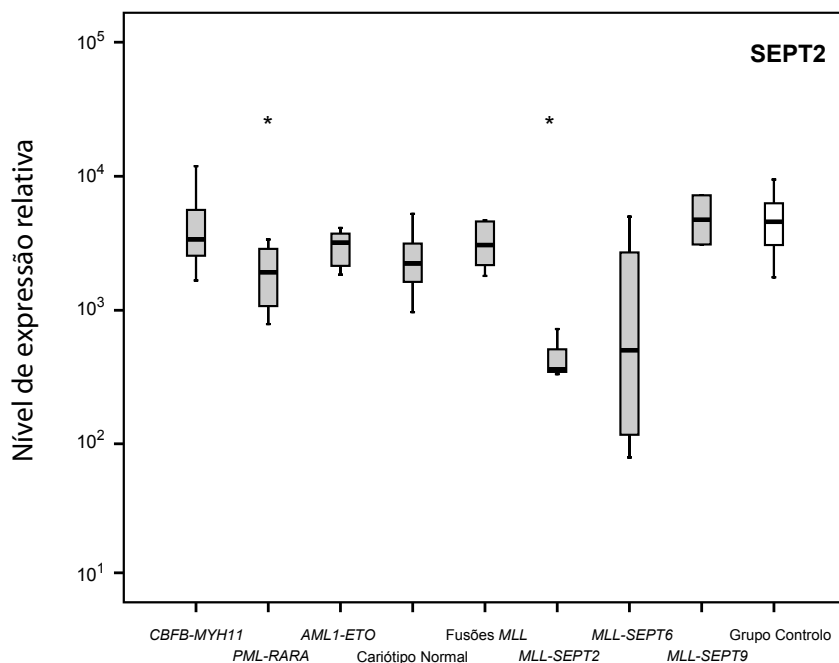
de casos com o rearranjo *MLL-AF9* (5 casos de um total de 10), foi realizada a análise estatística independente através da comparação do grupo dos doentes com gene de fusão *MLL-AF9* com os grupos dos doentes *MLL-SEPT2*, *MLL-SEPT6* e doentes com outras fusões do gene *MLL*. Deste modo, no grupo de casos com gene de fusão *MLL-AF9* observamos a redução estatisticamente significativa da expressão combinada do alelo normal e fundido do gene *MLL* (3,48 vezes;  $p=0,005$ ). A sub-expressão do gene *MLL* não foi contudo observada no subgrupo de doentes com outras fusões do gene *MLL* (Tabela 6).



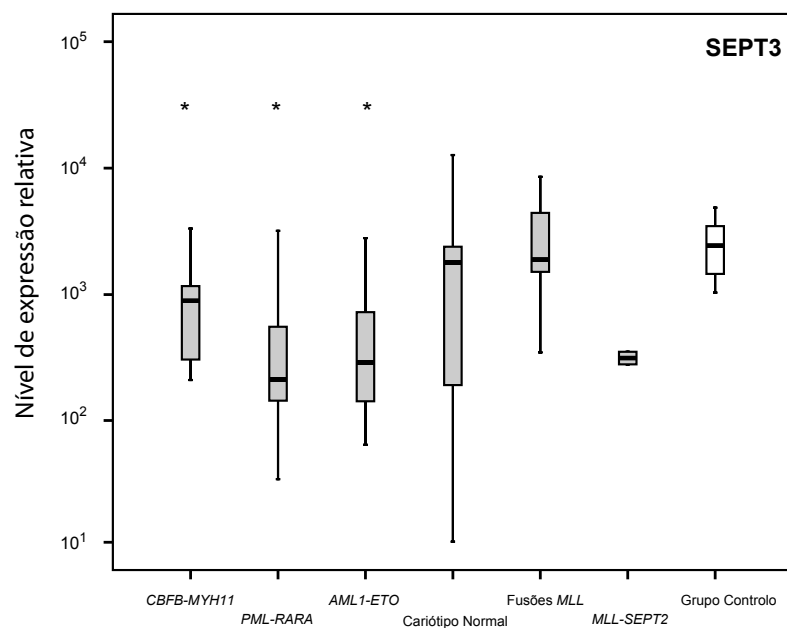
**Figura 3.** Análise de agregação hierárquica das alterações de expressão estatisticamente significativas ( $p < 0.01$ ) das septinas, observadas nos distintos subgrupos genéticos de LMA.



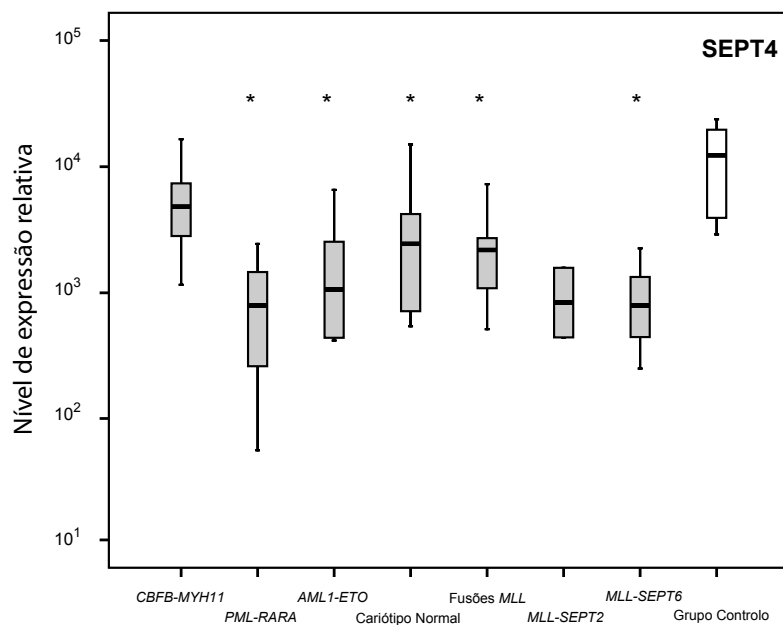
**Figura 4.** Box-plot representativo dos valores de expressão normalizados para o gene *SEPT1* nos diferentes subgrupos genéticos de LMA e no grupo controlo. Os asteriscos representam diferenças significativas de expressão relativamente ao grupo controlo (ver Tabela 5 para os valores de significância).



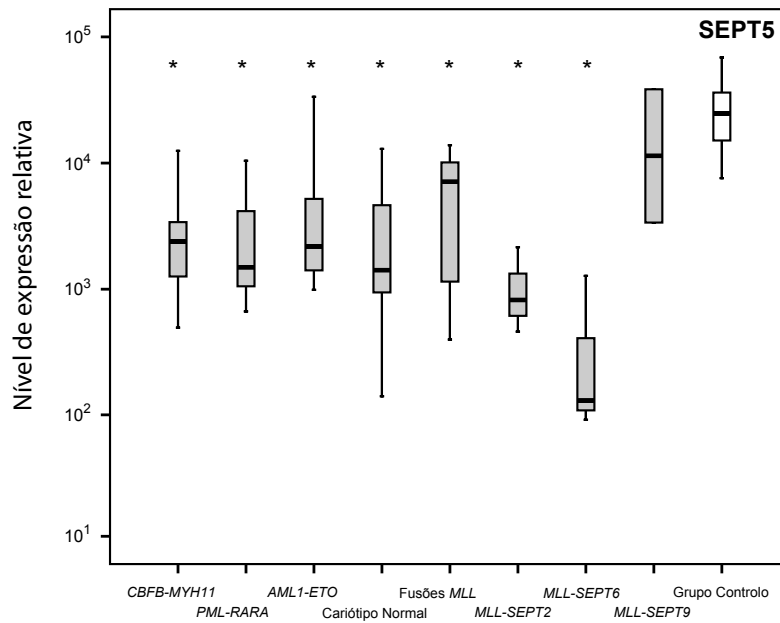
**Figura 5.** Box-plot representativo dos valores de expressão normalizados para o gene *SEPT2* nos diferentes subgrupos genéticos de LMA e no grupo controlo. Os asteriscos representam diferenças significativas de expressão relativamente ao grupo controlo (ver Tabela 5 para os valores de significância).



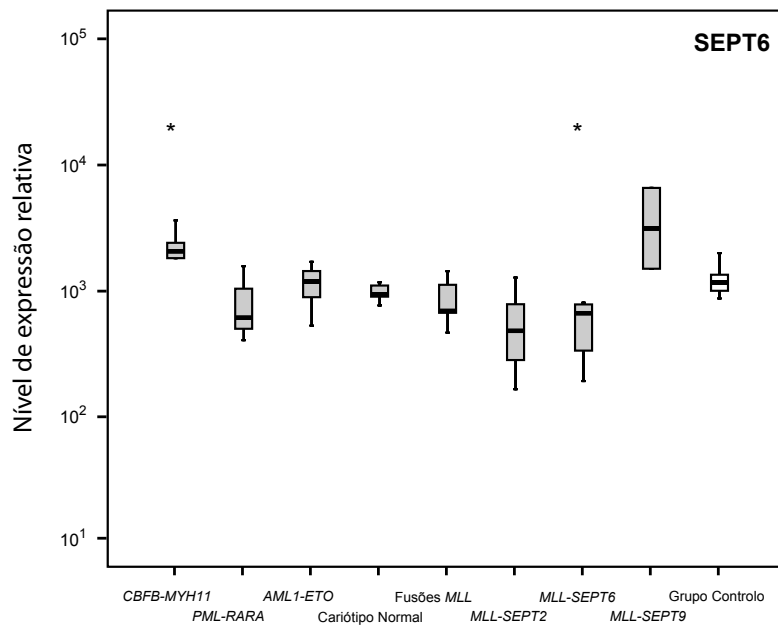
**Figura 6.** *Box-plot* representativo dos valores de expressão normalizados para o gene *SEPT3* nos diferentes subgrupos genéticos de LMA e no grupo controlo. Os asteriscos representam diferenças significativas de expressão relativamente ao grupo controlo (ver Tabela 5 para os valores de significância).



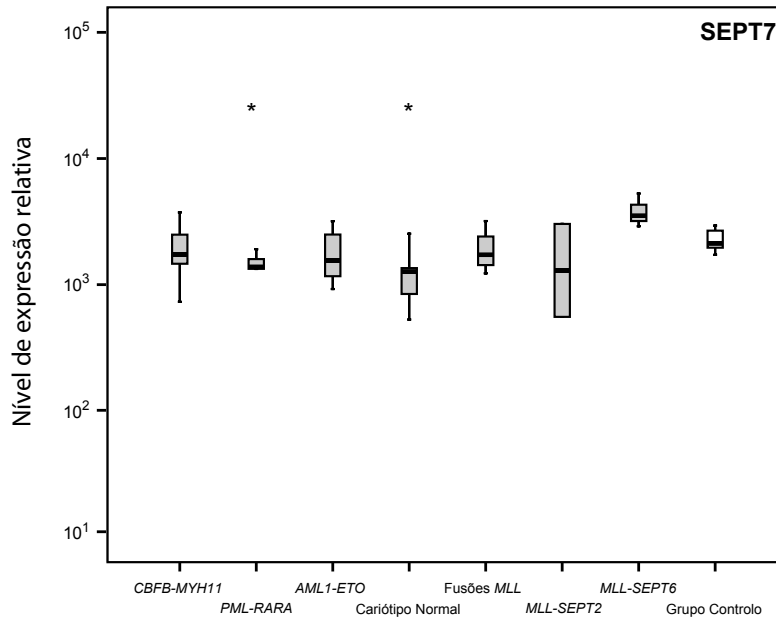
**Figura 7.** *Box-plot* representativo dos valores de expressão normalizados para o gene *SEPT4* nos diferentes subgrupos genéticos de LMA e no grupo controlo. Os asteriscos representam diferenças significativas de expressão relativamente ao grupo controlo (ver Tabela 5 para os valores de significância).



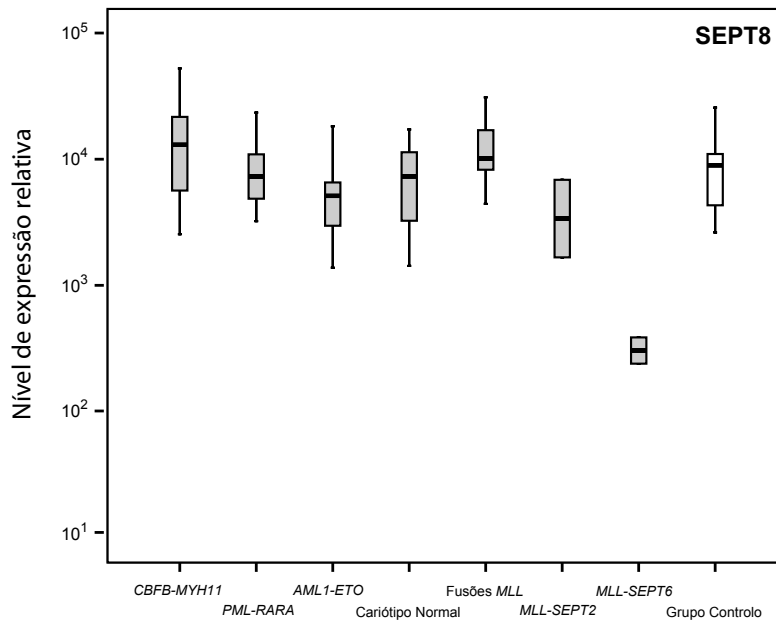
**Figura 8.** *Box-plot* representativo dos valores de expressão normalizados para o gene *SEPT5* nos diferentes subgrupos genéticos de LMA e no grupo controlo. Os asteriscos representam diferenças significativas de expressão relativamente ao grupo controlo (ver Tabela 5 para os valores de significância).



**Figura 9.** *Box-plot* representativo dos valores de expressão normalizados para o gene *SEPT6* nos diferentes subgrupos genéticos de LMA e no grupo controlo. Os asteriscos representam diferenças significativas de expressão relativamente ao grupo controlo (ver Tabela 5 para os valores de significância).

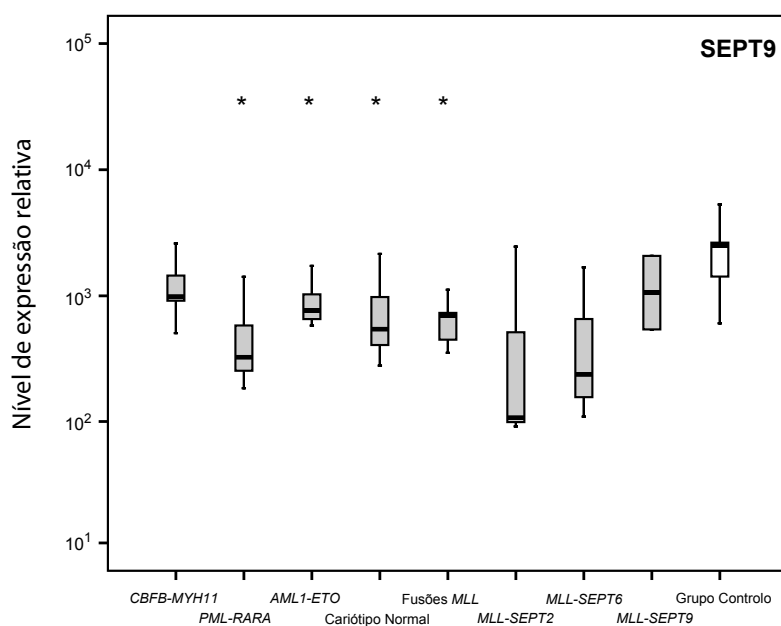


**Figura 10.** Box-plot representativo dos valores de expressão normalizados para o gene *SEPT7* nos diferentes subgrupos genéticos de LMA e no grupo controlo. Os asteriscos representam diferenças significativas de expressão relativamente ao grupo controlo (ver Tabela 5 para os valores de significância).

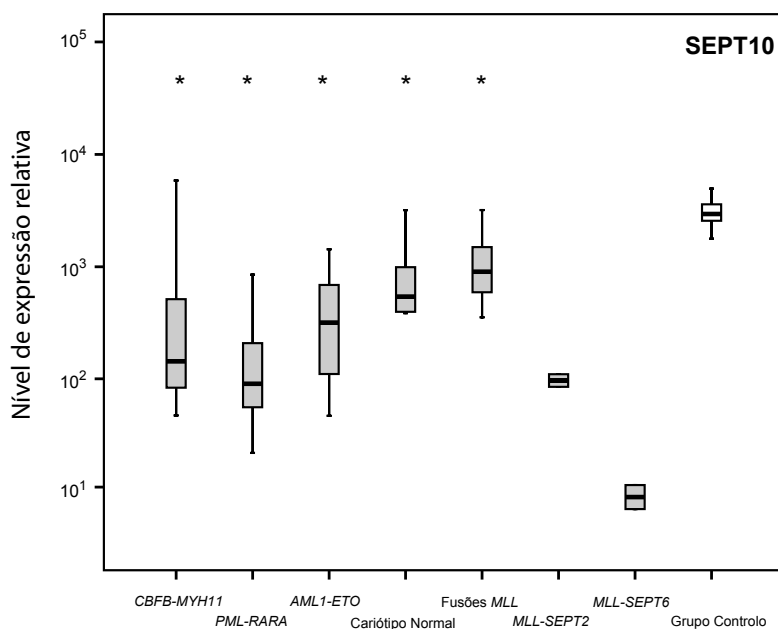


**Figura 11.** Box-plot representativo dos valores de expressão normalizados para o gene *SEPT8* nos diferentes subgrupos genéticos de LMA e no grupo controlo.

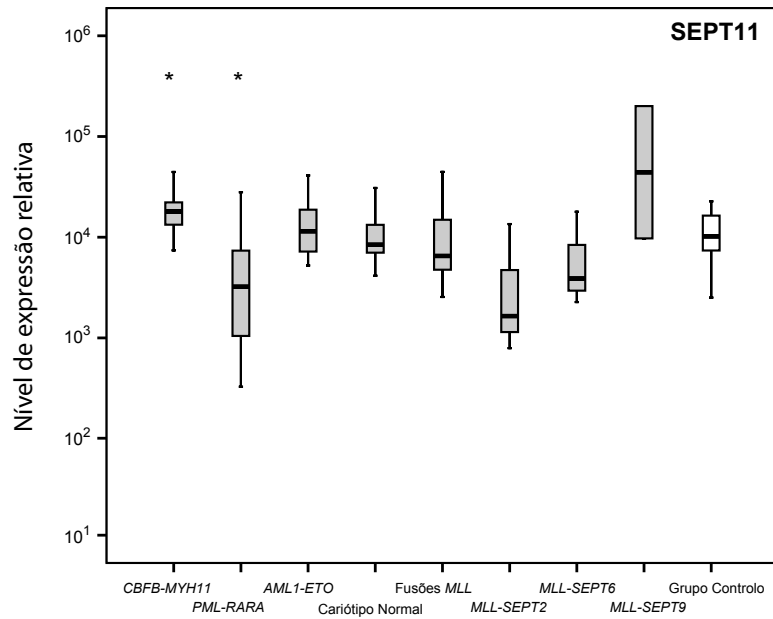




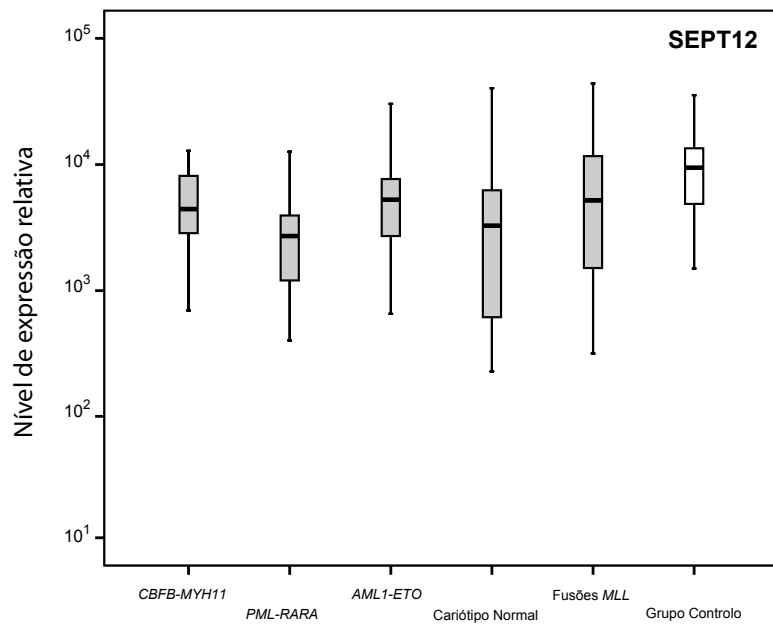
**Figura 12.** Box-plot representativo dos valores de expressão normalizados para o gene *SEPT9* nos diferentes subgrupos genéticos de LMA e no grupo controlo. Os asteriscos representam diferenças significativas de expressão relativamente ao grupo controlo (ver Tabela 5 para os valores de significância).



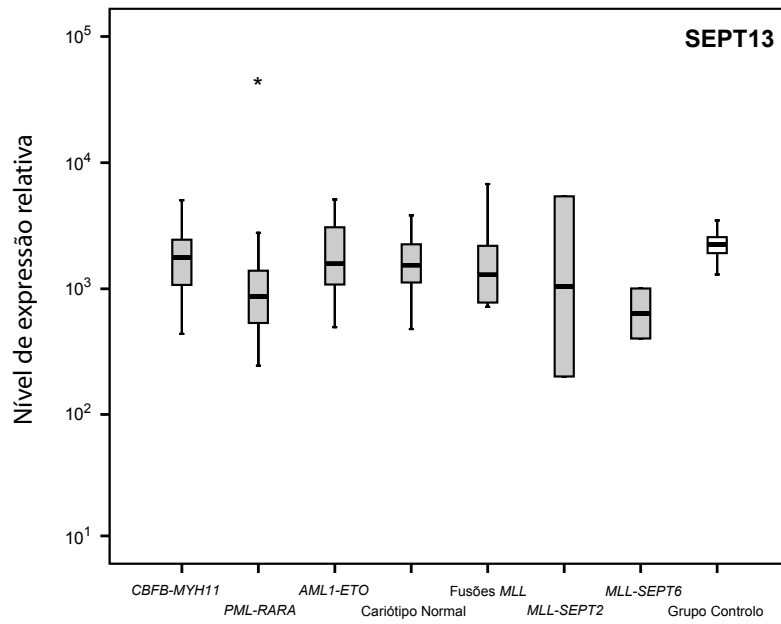
**Figura 13.** Box-plot representativo dos valores de expressão normalizados para o gene *SEPT10* nos diferentes subgrupos genéticos de LMA e no grupo controlo. Os asteriscos representam diferenças significativas de expressão relativamente ao grupo controlo (ver Tabela 5 para os valores de significância).



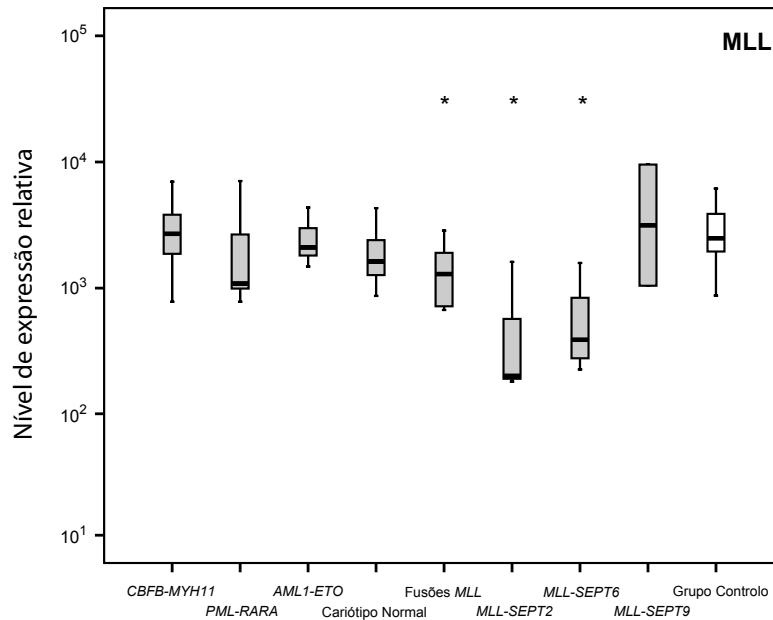
**Figura 14.** Box-plot representativo dos valores de expressão normalizados para o gene *SEPT11* nos diferentes subgrupos genéticos de LMA e no grupo controle.



**Figura 15.** Box-plot representativo dos valores de expressão normalizados para o gene *SEPT12* nos diferentes subgrupos genéticos de LMA e no grupo controle.



**Figura 16.** Box-plot representativo dos valores de expressão normalizados para o gene *SEPT13* nos diferentes subgrupos genéticos de LMA e no grupo controlo. O asterisco representa diferenças significativas de expressão relativamente ao grupo controlo (ver Tabela 5 para os valores de significância).



**Figura 17.** Box-plot representativo dos valores de expressão normalizados para o gene *MLL* nos diferentes subgrupos genéticos de LMA e no grupo controlo. Os asteriscos representam diferenças significativas de expressão relativamente ao grupo controlo (ver Tabela 5 para os valores de significância).

**Tabela 5.** Valores de expressão normalizados de todos os genes analisados (*MLL*, *SEPT1* a *SEPT13*) nos distintos subgrupos genéticos de LMA e no grupo controlo, (-) subexpressão, (+) sobre-expressão e (x) não analisado.

Subgrupo de LMA (número de amostras)	<i>CBFB-MYH11</i> (13)	<i>PML-RARA</i> (12)	<i>AML1-ETO</i> (12)	Cariótipo Normal (11)	<i>MLL</i> (10)	<i>MLL-SEPT2</i> (3)	<i>MLL-SEPT6</i> (4)	<i>MLL-SEPT9</i> (2)	Grupo controlo (10)
<i>SEPT1</i> Mediana (P25-P75)	663 (447-1665)	234 (154-1014)	912 (539-1300)	641 (358-1000)	959 (548-1108)	335 (251-7503)	202 (86-1935)	8074 (5320-10827)	4143 (3405-5307)
Diferença	- 6,2	- 17,7	- 4,5	- 6,5	- 4,3	- 12,4	- 20,5	+ 1,9	1,0
Valor de p	<b>0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,371	<b>0,004</b>	0,182	-
<i>SEPT2</i> Mediana (P25-P75)	3388 (2411-5634)	1957 (1055-2904)	3187 (2100-3760)	2242 (1604-3424)	3069 (2159-4600)	360 (333-724)	817 (102-4108)	5153 (3099-7207)	4599 (2939-6365)
Diferença	- 1,4	- 2,4	- 1,4	- 2,1	- 1,5	- 12,8	- 5,6	+ 1,1	1,0
Valor de p	0,313	<b>0,001</b>	0,069	0,010	0,123	<b>0,007</b>	0,036	0,758	-
<i>SEPT3</i> Mediana (P25-P75)	892 (287-1364)	213 (141-578)	293 (128-792)	1789 (146-2510)	1890 (1322-5455)	316 (280-352)	x	x	2481 (1378-3720)
Diferença	- 2,8	- 11,6	- 8,5	- 1,4	- 1,3	- 7,9			1,0
Valor de p	<b>0,003</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,251	0,912	0,030			-
<i>SEPT4</i> Mediana (P25-P75)	4816 (2497-7608)	795 (240-1636)	1079 (433-3251)	2444 (585-4356)	2187 (999-2753)	1010 (443-1578)	792 (250-2252)	x	12635 (3794-19762)
Diferença	- 2,6	- 15,9	- 11,7	- 5,2	- 5,8	- 12,5	- 16,0		1,0
Valor de p	0,030	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,004</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,030	<b>0,007</b>		-
<i>SEPT5</i> Mediana (P25-P75)	2393 (1241-4365)	1496 (1009-4295)	2239 (1356-5748)	1417 (818-5805)	7126 (1100-10503)	820 (460-2152)	130 (101-989)	20908 (3375-38440)	25220 (13828-39733)
Diferença	- 10,5	- 16,9	- 11,3	- 17,8	- 3,5	- 30,8	- 194,0	- 1,2	1,0
Valor de p	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,007</b>	<b>0,002</b>	0,758	-
<i>SEPT6</i> Mediana (P25-P75)	2073 (1513-2422)	616 (501-1172)	1192 (845-1453)	946 (892-1124)	698 (668-1192)	485 (167-1282)	676 (293-799)	4038 (1507-6570)	1173 (975-1445)
Diferença	+ 1,8	- 1,9	1,0	- 1,2	- 1,7	- 2,4	- 1,7	+ 3,4	1,0
Valor de p	<b>0,004</b>	0,011	0,821	0,099	0,023	0,161	<b>0,002</b>	0,121	-
<i>SEPT7</i> Mediana (P25-P75)	1820 (1518-2811)	1451 (1399-1713)	1634 (1201-2678)	1329 (740-1475)	1813 (1470-2532)	1881 (582-3180)	3685 (3050-5541)		2234 (2055-2882)
Diferença	- 1,2	- 1,5	- 1,4	- 1,7	- 1,2	- 1,2	+ 1,6	x	1,0
Valor de p	0,313	<b>&lt;0,001</b>	0,050	<b>&lt;0,001</b>	0,089	0,909	0,077		-
<i>SEPT8</i> Mediana (P25-P75)	13821 (5433-26554)	7737 (5057-12303)	5452 (2989-7344)	7766 (2969-13163)	10775 (7739-20508)	4524 (1763-7286)	329 (251-407)	x	9525 (4202-15569)
Diferença	- 1,5	- 1,2	- 1,7	- 1,2	+ 1,1	- 2,1	- 29,0		1,0
Valor de p	0,313	0,872	0,069	0,557	0,481	0,182	0,030		-
<i>SEPT9</i> Mediana (P25-P75)	983 (764-1497)	327 (249-622)	765 (640-1160)	544 (395-1106)	698 (447-733)	107 (91-2452)	239 (138-1325)	1307 (541-2072)	2504 (1400-2806)
Diferença	- 2,5	- 7,7	- 3,2	- 4,6	- 3,6	- 23,4	- 10,5	- 1,9	1,0
Valor de p	0,026	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,002</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,077	0,014	0,273	-
<i>SEPT10</i> Mediana (P25-P75)	144 (72-544)	90 (54-226)	317 (103-839)	540 (387-1402)	906 (546-1532)	97 (85-110)	8 (6-10)		2951 (2399-3937)
Diferença	- 20,5	- 32,8	- 9,3	- 5,5	- 3,3	- 30,4	- 368,9	x	1,0
Valor de p	<b>0,003</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,030	0,030		-
<i>SEPT11</i> Mediana (P25-P75)	18024 (12218-30212)	3248 (919-8204)	11561 (7149-18971)	8416 (6267-15145)	6531 (4589-15613)	1649 (791-13509)	3879 (2660-14405)	105115 (9740-200491)	10291 (7213-16915)
Diferença	+ 1,8	- 3,2	+ 1,1	- 1,2	- 1,6	- 6,2	- 2,7	+ 10,2	1,0
Valor de p	0,036	0,021	0,771	0,809	0,393	0,161	0,188	0,364	-
<i>SEPT12</i> Mediana (P25-P75)	4439 (2576-9093)	2713 (1043-4021)	5375 (2635-7882)	3521 (586-7381)	5258 (1260-15722)		x	x	9411 (3187-20022)
Diferença	- 2,1	- 3,5	- 1,8	- 2,7	- 1,8				1,0
Valor de p	0,144	0,023	0,345	0,133	0,604				-
<i>SEPT13</i> Mediana (P25-P75)	1766 (1013-2743)	869 (509-1433)	1580 (1042-3220)	1539 (987-2309)	1312 (775-2235)	2805 (201-5409)	704 (403-1006)		2252 (1764-2797)
Diferença	- 1,3	- 2,6	- 1,4	- 1,5	- 1,7	+ 1,2	- 3,2	x	1,0
Valor de p	0,343	<b>0,003</b>	0,582	0,197	0,105	1,000	0,061		-
<i>MLL</i> Mediana (P25-P75)	2692 (1698-5100)	1083 (971-2699)	2108 (1765-3018)	1621 (1013-2895)	1292 (709-2050)	200 (181-1613)	391 (254-1297)	5290 (1043-9537)	2494 (1749-3929)
Diferença	+ 1,1	- 2,3	- 1,2	- 1,5	- 1,9	- 12,5	- 6,4	+ 2,1	1,0
Valor de p	0,976	0,159	0,539	0,173	0,023	0,028	<b>0,008</b>	0,909	-

**Tabela 6.** Valores de expressão normalizados do gene *MLL* nos grupos *MLL-AF9*, *MLL-SEPT2* e *MLL-SEPT6* e outras fusões com o gene *MLL*, (-) subexpressão.

	<i>MLL-SEPT2</i> (3)	<i>MLL-SEPT6</i> (4)	<i>MLL-AF9</i> (5)	<i>MLL-outros</i> (5)	Grupo controlo (10)
<i>MLL</i> Mediana (P25-P75)	200 (181-1613)	391 (254-1297)	717 (684-982)	1904 (1317-2487)	2494 (1749-3929)
Diferença	- 12,5	- 6,4	- 3,48	- 1,31	1,0
Valor de p	0,028	0,008	0,005	0,371	-

**DISCUSSÃO**

Recentemente, a nossa equipa de investigação (Cerveira N *et al*, 2009) quantificou a expressão dos genes *MLL* e *SEPT2* numa série de amostras de medula óssea de doentes seleccionados de modo a representar os principais subgrupos genéticos de LMA, assim como em todos os três casos de neoplasias mielóides apresentando o rearranjo *MLL-SEPT2* descritos na literatura. No presente trabalho, caracterizamos o padrão de expressão dos restantes 13 membros da família de genes das septinas humanas na mesma série de LMA (incluindo os 3 casos com *MLL-SEPT2*), com o objectivo de definir o padrão de expressão global desta família de genes nesta neoplasia. Adicionalmente, foi quantificada a expressão dos genes da família das septinas e do gene *MLL* em 4 casos de neoplasias mielóides apresentando o gene de fusão *MLL-SEPT6* e em 2 casos com o gene de fusão *MLL-SEPT9*.

Nos 4 casos de LMA com o gene de fusão *MLL-SEPT6*, observamos uma redução de 1,7 vezes da expressão combinada dos alelos normal e quimérico do gene *SEPT6*, acompanhada pela redução de 6,4 vezes da expressão combinada dos alelos normal e quimérico do gene *MLL* (Figuras 9 e 17). Assim, a LMA associada ao *MLL-SEPT6* parece apresentar um padrão de expressão análogo ao observado previamente para os casos com gene de fusão *MLL-SEPT2*, nos quais foi observada uma redução de 12,8 vezes da expressão combinada dos alelos normal e quimérico do gene *SEPT2*, acompanhada também pela redução de 12,5 vezes da expressão dos alelos normal e quimérico do gene *MLL* (Cerveira N *et al*, 2009). Estes dados sugerem que a subexpressão de ambos os genes parceiros poderá ser um evento comum em neoplasias mielóides com rearranjos de fusão *MLL-SEPT*. Contudo, esta hipótese não pode ser corroborada pela análise dos 2 casos com gene de fusão *MLL-SEPT9*, uma vez que não foi detectada subexpressão nestes casos (Figura 12 e 17). No entanto, este resultado poderá ser devido ao reduzido número de casos analisados com esta anomalia (apenas 2), sendo necessários estudos futuros numa série mais alargada de doentes para obter conclusões definitivas para este rearranjo em particular e para fusões do gene *MLL* com outras septinas.

A análise de agregação hierárquica (HCA) permitiu-nos organizar os diferentes subgrupos genéticos de LMA e a expressão dos diversos genes estudados em grupos baseados no seu nível de similaridade. Através da análise do dendograma representado na Figura 3, podemos observar que ambos os subgrupos LMA com *MLL-SEPT2* e LMA com *MLL-SEPT6* constituem um grupo distinto de todos os restantes subgrupos genéticos de LMA, no que respeita à expressão dos genes da família das septinas. Desta forma, podemos observar que quer o gene *SEPT6* quer o gene *SEPT2*, ambos envolvidos em translocações com o gene *MLL*, apenas se encontram subexpressos nos subgrupos LMA com gene de fusão *MLL-SEPT6* e *MLL-SEPT2*,

respectivamente, o que parece sugerir a existência nestes casos de uma via comum que leva à desregulação observada. Uma excepção a este modelo é o facto de ter sido detectada subexpressão do gene *SEPT2* no subgrupo LMA com *PML-RARA*. Contudo, este facto poderá estar associado ao comportamento da proteína de fusão *PML-RARA* como um potente repressor da transcrição, uma vez que este grupo é o que apresenta alterações de expressão no maior número de septinas.

Os genes de fusão *MLL-SEPT2* e *MLL-SEPT6* poderão causar desregulação do gene *MLL*, o que poderá provocar um bloqueio a nível da diferenciação hematopoiética. Por outro lado, a subexpressão dos genes *SEPT2* e *SEPT6* poderá resultar num aumento da proliferação e/ou aquisição de vantagem selectiva das células progenitoras hematopoiéticas. Apoiando estas hipóteses está a observação de que ambas as proteínas, *SEPT2* e *SEPT6*, são membros do complexo proteico *SEPT2-SEPT6-SEPT7*. Este complexo apresenta capacidade de sequestrar moléculas chave de sinalização de resposta a erros de DNA e progressão de ciclo-celular (Kremer BE *et al*, 2005; Kremer BE *et al*, 2007). Assim, a ausência de níveis de expressão normais dos genes acima mencionados poderá perturbar o correcto funcionamento deste complexo. Contudo, estudos adicionais serão necessários de modo a avaliar os efeitos fenotípicos das alterações de expressão observadas para estas septinas.

Para além da subexpressão do gene *MLL* observada nos casos de LMA com rearranjos de fusão *MLL-SEPT*, foi também observada a subexpressão deste gene no subgrupo genético de LMA com rearranjos do gene *MLL* com outros parceiros de fusão para além das septinas, sugerindo que a subexpressão deste gene poderá ser um acontecimento frequente em leucemias com rearranjo do gene *MLL*. Uma vez que a proporção de casos com gene de fusão *MLL-AF9* era predominante neste grupo (5 de 10 casos), analisamos separadamente a expressão do gene *MLL* nos casos com *MLL-AF9* e nos casos com outras fusões envolvendo o gene *MLL*. Com esta análise verificamos que a subexpressão do gene *MLL* parece ser exclusiva dos casos com *MLL-AF9*. Esta facto está de acordo com o previamente observado por Whitman e colaboradores, que demonstraram a existência de subexpressão do gene *MLL* em 4 casos de LMA com *MLL-AF9* (Whitman SP *et al*, 2005). Esta observação, apesar de estar em aparente contradição com a função do gene *MLL* como oncogene, pode ser explicada se considerarmos que é o gene de fusão em si e não o seu nível de expressão que é relevante para o processo oncogénico. Deste modo, sugerimos que as proteínas de fusão envolvendo o gene *MLL* poderão ter capacidades leucemogénicas mesmo estando expressas em menor quantidade em comparação



com controlos normais ou outros grupos de LMA não associadas a rearranjos do gene *MLL*.

Através da análise estatística dos dados obtidos, observamos que o gene *SEPT5* parece ser expresso a níveis muito inferiores para todos os subgrupos de LMA estudados, incluindo aqueles que apresentam rearranjos *MLL-SEPT*, quando comparado com o grupo controlo. Esta observação sugere que alterações na expressão deste gene poderão ser generalizadas na LMA, sendo no entanto o seu significado desconhecido. Adicionalmente, quando limitamos a nossa análise ao conjunto dos subgrupos de LMA excluindo as fusões *MLL-SEPT*, observamos que os genes *SEPT1* e *SEPT10* se encontram subexpressos em todos aqueles subgrupos. Além disso, também os genes *SEPT4* e *SEPT9* se encontram subexpressos para todos os subgrupos, excepto LMA com *CBFB-MYH11*. A redução da expressão deste conjunto de genes nos diversos grupos analisados é particularmente interessante. Num trabalho recente, Elhasid e colaboradores, demonstraram a subexpressão de *SEPT4* em leucemia linfoblástica aguda (LLA) da criança, correlacionando a perda de expressão do transcrito *ARTS* (transcrito alternativo do gene *SEPT4*) com a transformação dos linfoblastos malignos (em cerca de 70% das crianças com LLA analisadas), o que levou estes autores a propor que este gene adquire um comportamento semelhante a um gene supressor tumoral na LLA da criança (Elhasid R *et al*, 2004). Através de estudos de ganho e perda de função, várias evidências têm surgido sobre o envolvimento de *ARTS* na apoptose. A expressão de *ARTS* promove a apoptose em resposta a vários estímulos pro-apoptóticos, tais como *Fas*, *TGF-β*, *ara-C*, etoposide e *STS*. O inverso foi também observado em estudos com RNA de interferência dirigido ao *ARTS*. Nestes casos, observou-se que a subexpressão de *ARTS* inibe a apoptose induzida pelo *TGF-β* (Larisch S *et al*, 2000). Sabe-se que a perda de genes pro-apoptóticos é um dos mecanismos conhecidos pelo qual as células transformadas obtêm vantagem selectiva através da redução da susceptibilidade a sinais apoptóticos. A observação da subexpressão de *SEPT4* em vários subgrupos de LMA, quando comparados com o controlo, poderá conferir aos mieloblastos resistência à apoptose. Deste modo, estratégias para o estudo da função da proteína *SEPT4* (assim como para *SEPT1*, *SEPT5*, *SEPT9* e *SEPT10*) poderão auxiliar no conhecimento do papel destas proteínas nas leucemias humanas e também na identificação de novas oportunidades terapêuticas.

Como já foi referido, no subgrupo de LMA com rearranjo *PML-RARA* observou-se a subexpressão de todos os genes estudados, com excepção dos genes *SEPT6*, *SEPT8*, *SEPT12* e *SEPT13*. O gene de fusão *PML-RARA* comporta-se como um potente repressor da transcrição da via de sinalização do ácido retinóico, recrutando

para o efeito co-repressores e a DNA metiltransferase que converte o gene alvo em heterocromatina (Vitoux D *et al*, 2007). A subexpressão observada para a maioria das septinas no subgrupo LMA com *PML-RARA* poderá estar relacionada com o forte poder de inibidor de transcrição adquirido pelo gene de fusão *PML-RARA*. Por outro lado, uma hipótese que deverá ser estudada será a regulação da expressão por via epigenética. As consequências da subexpressão desta família de genes no subgrupo LMA com *PML-RARA* não são conhecidas.

Os subgrupos de LMA com *CBFB-MYH11* e *AML1-ETO* são denominados por leucemias CBF (*core binding factor*), uma vez que as proteínas AML1 e CBFB fazem parte de uma família heterodimérica de factores de transcrição (CBF). Estes factores, associados a outras proteínas, permitem a ligação de factores de regulação de transcrição génica através da estabilização da conformação do DNA (Speck NA *et al*, 2002). Esta similaridade a nível funcional das proteínas CBF não parece no entanto reflectir-se a nível da desregulação da expressão dos genes da família das septinas, já que o subgrupo de LMA com rearranjo *CBFB-MYH11* apresentou subexpressão dos genes *SEPT1*, *SEPT3*, *SEPT5* e *SEPT10* enquanto que o subgrupo de LMA com rearranjo *AML1-ETO* apresentou a subexpressão dos genes *SEPT1*, *SEPT3*, *SEPT4*, *SEPT5*, *SEPT9* e *SEPT10*. Adicionalmente, a subexpressão das septinas *SEPT1*, *SEPT4*, *SEPT5*, *SEPT9*, *SEPT10* é também uma característica dos subgrupos de LMA com rearranjo do gene *MLL* e com cariótipo normal. As razões para as similaridades observadas em termos de expressão de septinas entre estes três grupos clinicamente distintos não são conhecidas e requererem estudos posteriores.

O gene *SEPT6* encontra-se sobre-expresso no subgrupo LMA com *CBFB-MYH11*. O aumento de expressão do gene *SEPT6* poderá contribuir para a progressão maligna em LMA com *CBFB-MYH11*? Num trabalho recente, Gonzalez e colaboradores, demonstraram um aumento da expressão do transcrito *SEPT9\_v1* em linhas celulares humanas de cancro da mama e a sua associação ao fenótipo oncogénico (Gonzalez ME *et al*, 2007). De facto, estes autores observaram amplificação do gene *SEPT9* em 67% das linhas celulares de cancro da mama, assim como elevados níveis de expressão deste gene em 61% das mesmas linhas celulares. O estudo dos diferentes transcritos revelou elevada expressão do transcrito *SEPT9\_v1* em 55% das linhas celulares de cancro da mama. Este resultado foi comprovado em amostras de cancro da mama através de estudos por imunohistoquímica. Estes autores analisaram também os efeitos fenotípicos da elevada expressão do transcrito *SEPT9\_v1* em linhas celulares humanas imortalizadas de epitélio mamário, verificando a aceleração da proliferação, aumento da motilidade celular, capacidade de invasão, aumento da instabilidade genómica com o desenvolvimento de aneuploidia, alterações

morfológicas, defeitos na citocinese e ruptura dos microfilamentos de tubulina (Gonzalez ME *et al*, 2007). Por outro lado, através de técnicas de inserção de RNA de interferência para a inibição do transcrito *SEPT9\_v1* nas linhas celulares de cancro da mama com elevada expressão deste gene, verificaram a inibição das propriedades de crescimento neoplásico destas células (Gonzalez ME *et al*, 2007). Deste modo, a caracterização detalhada da sobre-expressão do gene *SEPT6* e dos seus efeitos fenotípicos poderá auxiliar na compreensão do modo como este gene poderá estar relacionado com o fenótipo neoplásico em particular na LMA associada com *CBFB-MYH11*.

A observação da completa ausência de expressão do gene *SEPT14* nas amostras de doentes, assim como no grupo controlo, está de acordo com dados recentes que demonstraram que este gene é expresso exclusivamente a nível do tecido testicular (Peterson EA *et al*, 2007). Curiosamente, apesar de terem sido observadas diferenças significativas para quase todas as septinas analisadas, os genes *SEPT8*, *SEPT11* e *SEPT12* não apresentam diferenças significativas de expressão para nenhum dos distintos subgrupos genéticos de LMA estudados, o que sugere que alterações na expressão destes genes não parecem ser relevantes para o processo de leucemogénese das LMA.

Qual a origem das alterações de expressão de grande parte dos genes da família das septinas observadas em doentes com LMA? Os mecanismos subjacentes a essas alterações poderão estar relacionados com mecanismos de regulação genética e/ou epigenética. Como as localizações cromossómicas dos vários genes estudados não se encontram em locais de frequente deleção alélica em LMA, a hipótese de redução de expressão associada à deleção do alelo envolvido não é provável. Algumas hipóteses que deverão ser consideradas em estudos futuros estão relacionadas com mecanismos de regulação da transcrição, como por exemplo através de marcadores epigenéticos (Esteller M, 2008). Um dos mecanismos que tem sido sugerido para a subexpressão observada nestes genes é a metilação do DNA a nível do promotor. A maioria dos tumores do sistema hematopoiético são iniciados pela activação de um oncogene (através de translocação cromossómica equilibrada) seguida de alterações em genes supressores tumorais e outros oncogenes. A metilação das ilhas CpG localizadas nas regiões promotoras de um grande número de genes supressores tumorais tem sido considerada como uma etapa epigenética muito importante no processo da carcinogénese. A metilação do DNA a nível da região do promotor de um gene pode resultar na compactação da cromatina, conduzindo deste modo à inibição ou regulação negativa da transcrição desse gene. Deste modo, a metilação aberrante do promotor é responsável pelo silenciamento genético em diversas neoplasias

(Esteller M, 2008). Na LMA, têm sido identificados vários genes silenciados por metilação da região promotora, tais como o *p15*, caderina E, SOCS-1, entre outros (Boultonwood J and Wainscoat JS, 2007). Na família das septinas, a maioria dos genes apresentam ilhas CpG na região promotora, com exceção de *SEPT1*, *SEPT8* e *SEPT12*. Tendo em consideração os resultados obtidos, estudos futuros serão necessários de modo a aferir a hipótese da regulação da transcrição através da metilação do DNA na zona promotora dos genes estudados. No entanto, num estudo anterior nós não detectamos metilação no promotor do gene da *SEPT2* em leucemia associada a *MLL-SEPT2* (Cerveira et al, 2009).

O papel das septinas no desenvolvimento tumoral é bastante complexo e poderá estar relacionado com os níveis relativos de cada um dos membros da família dentro da célula. Contudo, sabe-se hoje que alterações na expressão de uma septina poderá conduzir a alterações na expressão de outros membros da mesma família (Hall PA et al, 2004). Assim, para o estudo e compreensão mais aprofundado desta família de genes, deverá futuramente ser estudada a distribuição espacial destas proteínas, os “pools” sub-celulares, os fenómenos de co-regulação e a formação de complexos. As septinas não se enquadram nos modelos convencionais de oncogenes ou genes supressores tumorais, no entanto têm importância na modulação de processos associados ao fenótipo neoplásico. Serão necessários novos modelos da função de genes em neoplasia para explicar as perturbações extensas do padrão de expressão genética que têm sido reconhecidos em associação a fenómenos neoplásicos e que também observamos neste estudo do padrão de expressão dos genes da família das septinas na LMA. A regulação dos níveis de expressão de septinas poderá estar associada ao seu papel como proteínas de “scaffolding” que recrutam componentes de determinadas vias de sinalização celulares. Assim, a função deste “scaffold” seria particularmente sensível a níveis de determinados monómeros de septinas que oligomerizam para gerar “scaffolds”. A alteração do “scaffold” (por níveis alterados de septinas) poderia perturbar a célula, especialmente se estivesse envolvido em processos chave, tais como endo- ou exocitose, apoptose e formação do citoesqueleto. A melhor compreensão do papel dos genes da família das septinas em neoplasia aguarda pela identificação das diversas combinações entre as diferentes septinas em “scaffolds”, das proteínas que interagem com estas e das vias de sinalização em que estão envolvidas.

**ESTUDOS FUTUROS**

Com este estudo caracterizamos pela primeira vez o padrão global de expressão dos genes da família das septinas humanas em LMA, confirmando a hipótese da existência de alterações dos níveis de expressão das diversas septinas humanas nos diversos subgrupos genéticos estudados. Contudo, diversas questões ressaltam deste trabalho, abrindo novas e variadas linhas investigacionais.

Seria interessante perceber quais os mecanismos inerentes às diversas alterações de expressão observadas. Para tal, várias estratégias deverão ser utilizadas, tais como o estudo dos mecanismos da regulação da transcrição, estudo da metilação na região promotora ou a pesquisa de mutações.

Além disso, seria interessante esclarecer se o aumento de expressão do gene *SEPT6* contribui para a progressão maligna na LMA com *CBFB-MYH11*, tal como acontece com o gene *SEPT9* em tumores da mama e ovário. Deste modo, a caracterização detalhada da sobre-expressão do gene *SEPT6* e dos seus efeitos fenotípicos poderá auxiliar na compreensão do modo como estes genes podem estar relacionados com o fenótipo neoplásico.

Relativamente aos casos de LMA com gene de fusão *MLL-SEPT*, que constituem um grupo distinto de todos os restantes subgrupos genéticos de LMA analisados, seria interessante estudar uma série mais alargada de doentes, para obter conclusões definitivas relativamente a estes rearranjos. Além disso, seria interessante avaliar o padrão de expressão das septinas em casos de neoplasias miéloides com gene de fusão *MLL-SEPT5* e *MLL-SEPT11*.

Adicionalmente, estudos adicionais serão necessários de modo a caracterizar os efeitos fenotípicos das alterações de expressão observadas. Deste modo, estratégias para o estudo da função das septinas poderão auxiliar no conhecimento do papel destas proteínas nas leucemias humanas e também na identificação de novas oportunidades terapêuticas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Amin ND, Zheng YL, Kesavapany S, Kanungo J, Guszczynski T, Sihag RK, Rudrabhatla P, Albers W, Grant P, Pant HC (2008). Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of human septin SEPT5 (hCDCrel-1) modulates exocytosis. *J Neurosci.* 28:3631-43.
- Beites CL, Xie H, Bowser R, Trimble WS (1999). The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nat Neurosci.* 2:434-9.
- Beites CL, Peng XR, Trimble WS (2001). Expression and analysis of properties of septin CDCrel-1 in exocytosis. *Methods Enzymol.* 329: 499–510.
- Bläser S, Jersch K, Hainmann I, Zieger W, Wunderle D, Busse A, Zieger B (2003). Isolation of new splice isoforms, characterization and expression analysis of the human septin SEPT8 (KIAA0202). *Gene.* 312:313-20.
- Bläser S, Horn J, Würmell P, Bauer H, Strümpell S, Nurden P, Pagenstecher A, Busse A, Wunderle D, Hainmann I, Zieger B (2004). The novel human platelet septin SEPT8 is an interaction partner of SEPT4. *Thromb Haemost.* 91:959-66.
- Borkhardt A, Teigler-Schlegel A, Fuchs U, Keller C, König M, Harbott J, Haas AO (2001). An ins(X;11)(q24;q23) fuses the MLL and the Septin 6/KIAA0128 gene in an infant with AML-M2. *Genes Chromosomes Cancer.* 32:82-8.
- Boultonwood J, Wainscoat JS (2007). Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies. *Br J Haematol.* 138:3-11. Review.
- Burmeister T, Marschalek R, Schneider B, Meyer C, Gökbuget N, Schwartz S, Hoelzer D, Thiel E (2006). Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations. *Leukemia* 20:451-7.
- Burrows JF, Chanduloy S, McIlhatton MA, Nagar H, Yeates K, Donaghy P, Price J, Godwin AK, Johnston PG, Russell SE (2003). Altered expression of the septin gene, *SEPT9*, in ovarian neoplasia. *J Pathol.* 201:581-8.
- Busson-Le Coniat M, Salomon-Nguyen F, Hillion J, Bernard OA, Berger R (1999). *MLL-AF1q* fusion resulting from t(1;11) in acute leukemia. *Leukemia.* 13:302-6.



- Cerveira N, Correia C, Bizarro S, Pinto C, Lisboa S, Mariz JM, Marques M, Teixeira MR (2006). *SEPT2* is a new fusion partner of *MLL* in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q37;q23). *Oncogene*. 25:6147-52.
- Cerveira N, Micci F, Santos J, Pinheiro M, Correia C, Lisboa S, Bizarro S, Norton L, Glomstein A, Asberg AE, Heim S, Teixeira MR. (2008a). Molecular characterization of the *MLL-SEPT6* fusion gene in acute myeloid leukemia: identification of novel fusion transcripts and cloning of genomic breakpoint junctions. *Haematologica*. 93:1076-80.
- Cerveira N, Santos J, Pinheiro M, Snijder S, van der Lelie H, Mellink CH, Teixeira MR (2008b). A novel *MLL-SEPT2* fusion variant in therapy-related myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*. 185:62-4.
- Cerveira N, Santos J, Bizarro S, Ribeiro FR, Lisboa S, Correia C, Torres L, Vieira J, Snijder S, Mariz, JM, Norton L, Van der Lelie H, Bujis A, Teixeira MR (2009). Both *SEPT2* and *MLL* Expression is down-regulated in *MLL-SEPT2* Acute Myeloid Leukemia. *Submetido*
- Chaplin T, Bernard O, Beverloo HB, Saha V, Hagemeijer A, Berger R, Young BD (1995). The t(10;11) translocation in acute myeloid leukemia (M5) consistently fuses the leucine zipper motif of AF10 onto the HRX gene. *Blood*. 86:2073-76.
- Crans HN, Sakamoto KM (2001). Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukaemia. *Leukemia*. 15:313-31.
- Daser A, Rabbitts TH (2005). The versatile mixed lineage leukaemia gene *MLL* and its many associations in leukaemogenesis. *Semin Cancer Biology*. 15:175-88.
- Deschler B, Lübbert M (2006). Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 107:2099-107.
- Elhasid R, Sahar D, Merling A, Zivony Y, Rotem A, Ben-Arush M, Izraeli S, Bercovich D, Larisch S (2004). Mitochondrial pro-apoptotic ARTS protein is lost in the majority of acute lymphoblastic leukemia patients. *Oncogene*. 23:5468-75.
- Esteller M (2008). Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 358:1148-59.

- Estey E, Dohner H (2006). Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 368:1894-907.
- Faty M, Fink M, Barral Y (2002). Septins: a ring to part mother and daughter. *Curr Genet*. 41:123-31.
- Felix CA (2001). Topoisomerase II inhibitor-related acute myeloblastic leukaemia. *Med. Pediatr. Oncol*. 36:525-35. Review.
- Finger FP, Kopish KR, White JG (2003). A role for septins in cellular and axonal migration in *C. elegans*. *Dev Biol*. 261:220-34.
- Fu JF, Liang DC, Yang CP, Hsu JJ, Shih LY. (2003). Molecular analysis of t(X;11)(q24;q23) in an infant with AML-M4. *Genes Chromosomes Cancer*. 38:253-9.
- Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cavé H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, González M, Viehmann S, Malec M, Saglio G, van Dongen JJ (2003). Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 17:2318-57.
- Gonzalez ME, Peterson EA, Privette LM, Loffreda-Wren JL, Kalikin LM, Petty EM (2007). High SEPT9\_v1 expression in human breast cancer cells is associated with oncogenic phenotypes. *Cancer Res*. 67:8554-64.
- Gottfried Y, Rotem A, Lotan R, Steller H, Larisch S (2004). The mitochondrial ARTS protein promotes apoptosis through targeting XIAP. *EMBO J*. 23:1627-35.
- Haferlach T, Kern W, Schoch C, Schnittger S, Sauerland MC, Heinecke A, Buchner T, Hiddemann W; German AML Cooperative Group (2004). A new prognostic score for patients with acute myeloid leukemia based on cytogenetics and early blast clearance in trials of the German AML Cooperative Group. *Haematologica*. 89:408-18.

- Haferlach T, Kern W, Schnittger S, Schoch C. (2005). Modern diagnostics in acute leukemias. *Crit Rev Oncol Hematol.* 56:223-34.
- Hall PA, Russell SE (2004). The pathobiology of the septin gene family. *J Pathol.* 204:489-505.
- Hartwell LH (1974). *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Rev.* 38:164-98.
- Hsu SC, Hazuka CD, Roth R, Foletti DL, Heuser J, Scheller RH (1998). Subunit composition, protein interactions and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron.* 20:1111-22.
- Hsu SC, Hazuka CD, Foletti DL, Scheller RH (1999). Targeting vesicles to specific sites on the cell membrane: the role of the sec6/8 complex. *Trends Cell Biol.* 9:150-3.
- Ihara M, Tomimoto H, Kitayama H, Morioka Y, Akiguchi I, Shibasaki H, Noda M, Kinoshita M (2003). Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *J Biol Chem.* 278:24095-102.
- Kalikin LM, Sims HL, Petty EM (2000). Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. *Genomics.* 63:165-72.
- Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, Wierda W, Faderl S, Garcia-Manero G, Issa JP, Estey E, Keating M, Freireich EJ (2008). Therapeutic advances in leukemia and myelodysplastic syndrome over the past 40 years. *Cancer.* 113:1933-52. Review.
- Kartmann B, Roth D (2001). Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *J Cell Sci.* 114:839-44.
- Kinoshita M, Kumar S, Mizoguchi A, Ide C, Kinoshita A, Haraguchi T, Hiraoka Y, Noda M (1997). Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev.* 11:1535-47.

- Kinoshita N, Kimura K, Matsumoto N, Watanabe M, Fukaya M, Ide C (2004). Mammalian septin Sept2 modulates the activity of GLAST, a glutamate transporter in astrocytes. *Genes Cells*. 9:1-14.
- Kojima K, Sakai I, Hasegawa A, Niiya H, Azuma T, Matsuo Y, Fujii N, Tanimoto M, Fujita S (2004). FLJ10849, a septin family gene, fuses MLL in a novel leukemia cell line CNLBC1 derived from chronic neutrophilic leukemia in transformation with t(4;11)(q21;q23). *Leukemia*. 18:998-1005.
- Kolitz JE (2006). Current therapeutic strategies for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 134:555-72.
- Kremer BE, Haystead T, Macara IG. (2005). Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4. *Mol Biol Cell* 16:4648-59.
- Kremer BE, Haystead T, Macara IG (2007). Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of NCK mediated by SOCS7. *Cell* 130:777-79.
- Larisch S, Yi Y, Lotan R, Kerner H, Eimerl S, Tony Parks W, Gottfried Y, Birkey Reffey S, de Caestecker MP, Danielpour D, Book-Melamed N, Timberg R, Duckett CS, Lechleider RJ, Steller H, Orly J, Kim SJ, Roberts AB (2000). A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat Cell Biol*. 2:915-21.
- Larson RA, Le Beau MM (2005). Therapy-related myeloid leukaemia: a model for leukemogenesis in humans. *Chem Biol Interact*. 154:187-95.
- Lu X, Lane EB (1990). Retrovirus-mediated transgenic keratin expression in cultured fibroblasts: specific domain functions in keratin stabilization and filament formation. *Cell*. 62:681-96.
- Macara IG, Baldarelli R, Field CM, Glotzer M, Hayashi Y, Hsu SC, Kennedy MB, Kinoshita M, Longtine M, Low C, Maltais LJ, McKenzie L, Mitchison TJ, Nishikawa T, Noda M, Petty EM, Peifer M, Pringle JR, Robinson PJ, Roth D, Russell SE, Stuhlmann H, Tanaka M, Tanaka T, Trimble WS, Ware J, Zeleznik-

Le NJ, Zieger B (2002). Mammalian septins nomenclature. *Mol Biol Cell*. 13:4111-3.

McIlhatton MA, Burrows JF, Donaghy PG, Chanduloy S, Johnston PG, Russell SE (2001). Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3. *Oncogene*. 20:5930-9.

Megonigal MD, Rappaport EF, Jones DH, Williams TM, Lovett BD, Kelly KM, Lerou PH, Moulton T, Budarf ML, Felix CA (1998). t(11;22)(q23;q11.2) in acute myeloid leukemia of infant twins fuses MLL with hCDCrel, a cell division cycle gene in the genomic region of deletion in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:6413-8.

Meyer C, Schneider B, Jakob S, Strehl S, Attarbaschi A, Schnittger S, Schoch C, Jansen MW, van Dongen JJ, den Boer ML, Pieters R, Ennas MG, Angelucci E, Koehl U, Greil J, Griesinger F, Zur Stadt U, Eckert C, Szczepański T, Niggli FK, Schäfer BW, Kempfski H, Brady HJ, Zuna J, Trka J, Nigro LL, Biondi A, Delabesse E, Macintyre E, Stanulla M, Schrappe M, Haas OA, Burmeister T, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R (2006). The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*. 20:777-84.

Montagna C, Lyu MS, Hunter K, Lukes L, Lowther W, Reppert T, Hissong B, Weaver Z, Ried T (2003). The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines. *Cancer Res*. 63:2179-87.

Mrózek K, Heerema A, Bloomfield D (2004). Cytogenetics in acute leukaemia. *Blood Reviews*. 18:115-36.

Nagata K, Kawajiri A, Matsui S, Takagishi M, Shiromizu T, Saitoh N, Izawa I, Kiyono T, Itoh TJ, Hotani H, Inagaki M (2003). Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules. *J Biol Chem*. 278:18538-43.

Osaka M, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ (1999). MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25). *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:6428-33.

- Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J (2008). Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia--a review. *Br J Haematol.* 140:123-32.
- Peterson EA, Kalikin LM, Steels JD, Estey MP, Trimble WS, Petty EM (2007). Characterization of a SEPT9 interacting protein, SEPT14, a novel testis-specific septin. *Mamm Genome.* 18:796-807.
- Poirel H, Rack K, Delabesse E, Radford-Weiss I, Troussard X, Debert C, Leboeuf D, Bastard C, Picard F, Veil-Buzyn A, Flandrin G, Bernard O, Macintyre E (1996). Incidence and characterization of *MLL* gene (11q23) rearrangements in acute myeloid leukemia M1 and M5. *Blood.* 87:2496-505.
- Pui C, Behm FG, Downing JR, Hancock ML, Shurtleff SA, Ribeiro RC, Head DR, Mahmoud HH, Sandlund JT, Furman WL, Roberts WM, Crist WM, Raimondi SC (1994). 11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 12:909-15.
- Pui CH, Relling MV (2000). Topoisomerase II inhibitor-related acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 109:13-23.
- Russell SE, McIlhatton MA, Burrows JF, Donaghy PG, Chanduloy S, Petty EM, Kalikin LM, Church SW, McIlroy S, Harkin DP, Keilty GW, Cranston AN, Weissenbach J, Hickey I, Johnston PG (2000). Isolation and mapping of a human septin gene to a region on chromosome 17q, commonly deleted in sporadic epithelial ovarian tumors. *Cancer Res.* 60:4729-34.
- Russell SE, Hall PA (2005). Do septins have a role in cancer? *Br J Cancer.* 93:499-503.
- Satake N, Maseki N, Nishiyama M, Kobayashi H, Sakurai M, Inaba H, Katano N, Horikoshi Y, Eguchi H, Miyake M, Seto M, Kaneko Y (1999). Chromosome abnormalities and *MLL* rearrangements in acute myeloid leukemia of infants. *Leukemia.* 13:1013-17.
- Scheinberg DA, Maslak P, Weiss M (2001). Acute Leukemias. In De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology.* Philadelphia: Lippincott JB:2404-32.

- Scott M, Hyland PL, McGregor G, Hillan KJ, Russell SE, Hall PA (2005). Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours. *Oncogene*. 24:4688-700.
- Scott M, McCluggage WG, Hillan KJ, Hall PA, Russell SE (2006). Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis. *Int J Cancer*. 118:1325-9.
- Shaffer LG, Tommerup N ISCN 2005 An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, Switzerland: Karger 2005.
- She YM, Huang YW, Zhang L, Trimble WS (2004). Septin 2 phosphorylation: theoretical and mass spectrometric evidence for the existence of a single phosphorylation site in vivo. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 18:1123-30.
- Shih LY, Liang DC, Fu JF, Wu JH, Wang PN, Lin TL *et al.* (2006). Characterization of fusion partner genes in 114 patients with de novo acute myeloid leukemia and *MLL* rearrangement. *Leukemia*. 20:218-23.
- Smith D (2003). Cdk5 in neuroskeletal dynamics. *Neurosignals*. 12:239-51.
- Smith M, Barnett M, Bassan R, Gatta G, Tondini C, Kern W (2004). Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 50:197-222.
- Snijder S, Mellink CH, van der Lelie H (2008). Translocation (2;11)(q37;q23) in therapy-related myelodysplastic syndrome after treatment for acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 180:149-52.
- Sørensen AB, Lund AH, Ethelberg S, Copeland NG, Jenkins NA, Pedersen FS (2000). Sint1, a common integration site in SL3-3-induced T-cell lymphomas, harbors a putative proto-oncogene with homology to the septin gene family. *J Virol*. 74:2161-8.
- Speck NA, Gilliland DG (2002). Core-binding factors in haematopoiesis and leukemia. *Nat Rev Cancer* 2:502-13.

- Spiliotis ET, Kinoshita M, Nelson WJ (2005). A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation. *Science*. 307:1781-5.
- Steffen B, Muller-Tidow C, Schwable J, Berdel WE, Serve H (2005). The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 56:195-221.
- Strehl S, König M, Mann G, Haas AO (2001). Multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction screening in childhood acute myeloblastic leukemia. *Blood*. 97:805-8.
- Strick R, Zhang Y, Emmanuel N, Strissel L (2006). Common chromatin structures at breakpoint cluster regions may lead to chromosomal translocations found in chronic and acute leukemias. *Hum Genet*. 119:479-95.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon 2000.
- Taki T, Ohnishi H, Shinohara K, Sako M, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y (1999). AF17q25, a putative septin family gene, fuses the MLL gene in acute myeloid leukemia with t(11;17)(q23;q25). *Cancer Res*. 59:4261-5.
- Tanaka M, Tanaka T, Kijima H, Itoh J, Matsuda T, Hori S, Yamamoto M (2001). Characterization of tissue- and cell-type-specific expression of a novel human septin family gene, Bradeion. *Biochem Biophys Res Commun*. 286:547-53.
- Tanaka M, Kijima H, Itoh J, Matsuda T, Tanaka T (2002). Impaired expression of a human septin family gene Bradeion inhibits the growth and tumorigenesis of colorectal cancer in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther*. 9:483-8.
- Van Binsbergen E, de Weerd O, Buijs A (2007). A new subtype of *MLL-SEPT2* fusion transcript in therapy-related acute myeloid leukemia with t(2;11)(q37;q23): a case report and literature review. *Cancer Genet Cytogenet*. 176:72-5.
- Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Díaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A (1999). Standardized RT-PCR analysis of



fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 13:1901-28.

Vega IE, Hsu SC (2003). The septin protein Nedd5 associates with both the exocyst complex and microtubules and disruption of its GTPase activity promotes aberrant neurite sprouting in PC12 cells. *Neuroreport*. 14:31-7.

Versele M, Thorner J (2005). Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biol*. 15:414-24.

Vitoux D, Nasr R, de The H (2007). Acute promyelocytic leukemia: new issues on pathogenesis and treatment response. *Int J Biochem Cell Biol*. 39:1063-70.

Whitman SP, Liu S, Vukosavljevic T, Rush LJ, Yu L, Liu C, Klisovic MI, Maharry K, Guimond M, Strout MP, Becknell B, Dorrance A, Klisovic RB, Plass C, Bloomfield CD, Marcucci G, Caligiuri MA (2005). The MLL partial tandem duplication: evidence for recessive gain-of-function in acute myeloid leukemia identifies a novel patient subgroup for molecular-targeted therapy. *Blood*. 106:345-52.

Xue J, Wang X, Malladi CS, Kinoshita M, Milburn PJ, Lengyel I, Rostas JA, Robinson PJ (2000). Phosphorylation of a new brain-specific septin, G-septin, by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 275:10047-56.

**ANEXOS**

**Tabela S1.** Estudo molecular, citogenético e sumário clínico dos 67 doentes de LMA analisados.

Doente	Idade (anos)	Sexo	FAB	Transcrito de fusão	FISH	Cariótipo
1	55	M	LMA-M4	<i>CBFB-MYH11</i> tipo A	<i>CBFB</i>	SM
2	58	F	LMA-M4	<i>CBFB-MYH11</i> tipo A	NR	46,XX,inv(16)(p13q22)[6]/47,idem,+21[24]
3	6	M	LMA-M4	<i>CBFB-MYH11</i> tipo A	NR	47,XY,inv(16)(p13q22),+22[8]
4	53	F	LMA-M4	<i>CBFB-MYH11</i> tipo A	NR	46,XX,inv(16)(p13q22)[4]/46,XX[19]
5	20	M	LMA-M4	<i>CBFB-MYH11</i> tipo A	NR	46,XY,t(5;17)(q13,q12),del(7)(q32),inv(16)(p13q22)[30]
6	36	F	LMA-M4	<i>CBFB-MYH11</i> tipo A	<i>CBFB</i>	47,XX, inv(16)(p13q22),+8[10]
7	60	F	LMA-M4	<i>CBFB-MYH11</i> tipo A	NR	48,XX,+8,inv(16)(p13q22),+22[8]/46,XX[3]
8	54	F	LMA-M4	<i>CBFB-MYH11</i> tipo A	NR	47,XX,inv(16)(p13q22),+22[30]
9	16	F	LMA-M4	<i>CBFB-MYH11</i> tipo A	<i>CBFB</i>	46,XX,inv(16)(p13q22)[27]/46,XX[3]
10	32	F	LMA-M4	<i>CBFB-MYH11</i> tipo A	NR	46,XX,inv(16)(p13q22)[20]
11	67	M	LMA-M4	<i>CBFB-MYH11</i> tipo A	NR	46,XY,inv(16)(p13q22)[15]
12	45	F	LMA-M4	<i>CBFB-MYH11</i> tipo E	NR	46,XX,inv(16)(p13q22)[28]/46,XX[2]
13	41	M	LMA-M4	<i>CBFB-MYH11</i> tipo E	NR	46,XY,inv(16)(p13q22)[22]
14	10	F	LMA-M3	<i>PML-RARA</i> bcr 1	NR	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[15]/46,XX[2]
15	62	M	LMA-M3	<i>PML-RARA</i> bcr 1	N	46,XY[30]
16	43	F	LMA-M3	<i>PML-RARA</i> bcr 1	<i>PML-RARA</i>	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[3]/46,XX[14]
17	11	M	LMA-M3	<i>PML-RARA</i> bcr 1	<i>PML-RARA</i>	46,XY,t(6;19)(p21;q13),t(15;17)(q22;q21)[19]
18	41	M	LMA-M3	<i>PML-RARA</i> bcr 1	<i>PML-RARA</i>	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[16]/46,XY[4]
19	33	M	LMA-M3	<i>PML-RARA</i> bcr 1	<i>PML-RARA</i>	SM
20	63	M	LMA-M3	<i>PML-RARA</i> bcr 3	<i>PML-RARA</i>	SM

21	29	M	LMA-M3	<i>PML-RARA</i> bcr 3	NR	47,XY,add(2)(p25),+8,t(15;17)(q22;q21)[23]
22	29	M	LMA-M3	<i>PML-RARA</i> bcr 3	NR	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[12]/46,XY[2]
23	55	M	LMA-M3	<i>PML-RARA</i> bcr 3	<i>PML-RARA</i>	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[30]
24	45	F	LMA-M3	<i>PML-RARA</i> bcr 3	<i>PML-RARA</i>	46,XX,add(12)(p12),t(15;17)(q22;q21)[3]/46,XX[14]
25	49	M	LMA-M3	<i>PML-RARA</i> bcr 3	<i>PML-RARA</i>	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[18]/46,XY[2]
26	44	M	LMA-M2	<i>AML1-ETO</i>	NR	46,XY,t(8;21)(q22;q22)[11]
27	33	F	LMA-M2	<i>AML1-ETO</i>	NR	46,XX,t(8;21)(q22;q22)[27]/46,XX[3]
28	57	F	LMA-M2	<i>AML1-ETO</i>	NR	46,XX,t(8;21)(q22;q22)[28]/46,XX[2]
29	46	F	LMA-M2	<i>AML1-ETO</i>	NR	46,XX,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22q32)[28]/46,XX[2]
30	8	M	LMA-M2	<i>AML1-ETO</i>	NR	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)[30]
31	22	F	LMA-M2	<i>AML1-ETO</i>	NR	46,XX,del(7)(q32),t(8;21)(q22;q22)[16]/46,XX[14]
32	43	F	LMA-M2	<i>AML1-ETO</i>	NR	46,XX,t(8;21)(q22;q22)[5]/46,idem,add(X)(p22)[15]
33	75	M	LMA-M2	<i>AML1-ETO</i>	NR	46,XY,t(8;21)(q22;q22)[27]/46,XY[3]
34	46	F	LMA-M2	<i>AML1-ETO</i>	NR	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22)[19]/46,XX[11]
35	41	F	LMA-M2	<i>AML1-ETO</i>	NR	46,XX,t(8;21)(q22;q22)[11]
36	7	M	LMA-M2	<i>AML1-ETO</i>	<i>AML1-ETO</i>	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)[17]/46,XY[3]
37	66	F	LMA-M2	<i>AML1-ETO</i>	NR	45,X,-X,-2,add(7)(q31),t(8;21)(q22;q22),+mar[6]/46,XX[6]
38	49	F	LMA-M5	Cariótipo Normal	NR	46,XX[30]
39	64	M	LMA-M1	Cariótipo Normal	NR	46,XY[30]
40	40	F	LMA-M1	Cariótipo Normal	NR	46,XX[20]
41	62	M	LMA-M4	Cariótipo Normal	NR	46,XY[20]
42	45	F	LMA-M5	Cariótipo Normal	NR	46,XX[20]

43	58	M	LMA-M5	Cariótipo Normal	NR	46,XY[20]
44	65	M	LMA-M0	Cariótipo Normal	NR	46,XY[20]
45	36	M	LMA-M1	Cariótipo Normal	NR	46,XY[20]
46	70	F	LMA-M2	Cariótipo Normal	NR	46,XX[10]
47	52	F	LMA-M2	Cariótipo Normal	NR	46,XX[20]
48	64	F	LMA-M2	Cariótipo Normal	NR	46,XX[20]
49	40	F	LMA-M5	<i>MLL-AF9</i>	<i>MLL</i>	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[14]/46,XX[16]
50	1	M	LMA	<i>MLL-AF9</i>	<i>MLL</i>	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[23]/46,idem,add(1)(p22)[4]/46,XY[3]
51	53	F	LMA-M5	<i>MLL-AF9</i>	<i>MLL</i>	NR
52	51	M	LMA-M5	<i>MLL-AF9</i>	<i>MLL</i>	SM
53	39	F	LMA-M5	<i>MLL-AF9</i>	<i>MLL</i>	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[30]
54	28	M	LMA-M5	<i>MLL-ELL</i>	<i>MLL</i>	SM
55	47	F	LMA-M5	<i>MLL-ELL</i>	<i>MLL</i>	46,XX,t(11;19)(q23;p13.1)[22]
56	68	M	LMA-M5	<i>MLL-ENL</i>	<i>MLL</i>	47,XY,der(2)t(1;2)(q21;q37),+i(8)(q10),t(11;19)(q23;p13)[28]/47,idem,+8,-i(8)(q10)[3]
57	14	M	LMA-M1	<i>MLL-AF10</i>	<i>MLL</i>	46,XY,t(1;6)(p32;p22),t(3;22)(q13.3;q12),t(10;11)(p12;q23)[18].ish der(10)inv(10)(p12p12)t(10;11)(p12;q23)(5'MLL+,3'MLL+), der(11)t(10;11)(p12;q23)(5'MLL-,3'MLL-)[8]
58	32	M	LMA-M4	<i>MLL-AF1Q</i>	<i>MLL</i>	46,XY,t(1;11)(q21;q23)[18]/46,XY[4]
59	54	F	LMA-M4	<i>MLL-SEPT2</i>	<i>MLL</i>	46,XX,t(2;11)(q37;q23)[30]
60	68	M	LMA-M2	<i>MLL-SEPT2</i>	<i>MLL</i>	46,XY,t(2;11)(q37;q23)[4]/51,idem,+8,+17,+21,+22,+mar[10]/46,XY[5]
61	56	F	SMD/LMA	<i>MLL-SEPT2</i>	<i>MLL</i>	46,X,del(X)(q22q28),t(2;11)(q37;q23),del(7)(q22q36)[2]
62	1	F	AML - M2	<i>MLL-SEPT6</i>	<i>MLL</i>	47,X,add(X)(p11),+6,add(11)(q23)[20]
63	0,7	M	AML - M4	<i>MLL-SEPT6</i>	<i>MLL</i>	46,XY

64	1	M	AML	<i>MLL-SEPT6</i>	<i>MLL</i>	46,Y,t(X;11)(q26;q23)[11]/46,XY[9]
65	0	M	AML	<i>MLL-SEPT6</i>	<i>MLL</i>	46,Y,ins(X;11)(q24;q13q23)[11]
66	8Me	M	AML - M4	<i>MLL-SEPT9</i>	<i>MLL</i>	54,XY,+Y,+6,+7,+8,+8,t(11;17)(q23;q25),+19,+20,+21[20]
67	23	F	AML - M4	<i>MLL-SEPT9</i>	<i>MLL</i>	47,XX,t(11;17)(q22;q12),+19

---

(Me) Meses; (NR) não realizado; (N) negativo; (SM) sem metafases.

**Tabela S2.** Sequências de *primers* e sondas (5'FAM, 3'TAMRA) utilizados neste estudo.

Gene	Exão	Posição	Primer/Sonda	Sequência 5'-3'
<i>ABL1</i>	2	225_255	ABL1-S	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT
<i>ABL1</i>	3	293_320	ABL1-PR	CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT
<i>ABL1</i>	3	328_348	ABL1-AS	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA
<i>MLL</i>	4	3313_3336	MLL-S	CATGGGAAGAACGAGAAAAGATTT
<i>MLL</i>	5	3358_3382	MLL-PR	ACAAGTCATCAATTGCTGGCTCAGA
<i>MLL</i>	5	3385_3405	MLL-AS	GTGGAGCAAGAGGTTTCAGCAT
<i>SEPT1</i>	3	253_275	SEPT1-S	GGGTTTGACTTCACGCTAATGG
<i>SEPT1</i>	4	284_311	SEPT1-PR	AGTCAGGCCTAGGGAAATCCACCCTCA
<i>SEPT1</i>	4	312_333	SEPT1-AS	TTGGTGAGGAAGAGGCTGTTG
<i>SEPT2</i>	3	503_525	SEPT2-S	CACCGAAAATCAGTGAAAAAAGG
<i>SEPT2</i>	3	528_554	SEPT2-PR	TTGAGTTCACACTGATGGTGGTTCGGTG
<i>SEPT2</i>	4	565_589	SEPT2-AS	GCTGTTTATGAGAGTCGATTTTCCT
<i>SEPT3</i>	2	301_323	SEPT3-S	GACCGGTTTCGACTTCAACATC
<i>SEPT3</i>	2	324_344	SEPT3-PR	TGGTCGTTGGCCAGAGTGGA
<i>SEPT3</i>	3	351_371	SEPT3-AS	CGTGTTGACCAGCGTTGATT
<i>SEPT4</i>	5	667_689	SEPT4-S	GGGATGCAGTCAACAACACAGA
<i>SEPT4</i>	5	690_717	SEPT4-PR	TGCTGGAAGCCTGTGGCAGAATACATT
<i>SEPT4</i>	6	726_748	SEPT4-AS	CGTCTCGGAAATACTGCTCAAA
<i>SEPT5</i>	6	715_737	SEPT5-S	CTGACTGTCTTGTCCCCAGTGA
<i>SEPT5</i>	6	738_762	SEPT5-PR	ATCCGGAAGCTGAAGGAGCGGATC
<i>SEPT5</i>	7	768_791	SEPT5-AS	TGGATCCCAAACCTTGTCATCTC
<i>SEPT6</i>	2	377_395	SEPT6-S	GCCAGGGCTTCTGCTTCA
<i>SEPT6</i>	2	396_418	SEPT6-PR	CATCCTGTGCGTGGGAGAGACA
<i>SEPT6</i>	3	419_438	SEPT6-AS	AGGGTGGACTTGCCCAAAC
<i>SEPT7</i>	5	466_493	SEPT7-S	TGTTGTTTATACTTCATTGCTCCTTCA
<i>SEPT7</i>	5	495_523	SEPT7-PR	ACATGGACTTAAACCATTGGATATTGAG
<i>SEPT7</i>	6	526_548	SEPT7-AS	CTTTTTCATGCAAACGCTTCAT
<i>SEPT8</i>	5	896_916	SEPT8-S	AGTTCCCCACGGATGATGAG
<i>SEPT8</i>	5	918_943	SEPT8-PR	TGTTGCAGAGATTAACGCAGTCATG
<i>SEPT8</i>	6	944_963	SEPT8-AS	GCAAAGGGCAGATGTGCAT
<i>SEPT9</i>	4	1768_1790	SEPT9-S	CCATCGAGATCAAGTCCATCAC
<i>SEPT9</i>	5	1793_1818	SEPT9-PR	TGTGTCAATCACTGTCAGCTTCA
<i>SEPT9</i>	5	1819_1842	SEPT9-AS	CGATATTGAGGAGAAAGGCGTCCGG

---

<i>SEPT10</i>	4	373_394	SEPT10-S	CAGTGGGATTTGGTGACCAA
<i>SEPT10</i>	4	395_429	SEPT10-PR	AAATAAAGAAGAGAGCTACCAACCAATAGTTGAC
<i>SEPT10</i>	5	430_453	SEPT10-AS	GGCCTCAAACCTGAGCATCTATGT
<i>SEPT11</i>	4	648_668	SEPT11-S	TCCCTGGATCTGGTCACCAT
<i>SEPT11</i>	4	669_688	SEPT11-PR	AAAAAGCTGGACAGTAAGG
<i>SEPT11</i>	5	689_715	SEPT11-AS	CTTTTGCAATTATTGGAATGATGTTC
<i>SEPT12</i>	7	769_790	SEPT12-S	TGTGCTTTGACGAGGACATCA
<i>SEPT12</i>	7	791_818	SEPT12-PR	TGACAAAATCCTCAACAGCAAGTTACG
<i>SEPT12</i>	8	822_840	SEPT12-AS	CACGGCAAAGGGATTTCG
<i>SEPT13</i>	3	318_344	SEPT13-S	AGGGTGCACTGTTGTTTATACTTCAT
<i>SEPT13</i>	3	352_378	SEPT13-PR	CAGGACATGGACTTAAACCATTGGAT
<i>SEPT13</i>	4	379_403	SEPT13-AS	CATGCAAATGCTTTGTAAACTCAA
<i>SEPT14</i>	2	288_314	SEPT14-S	GGGTATGGTGATCAAATAGACAAAGA
<i>SEPT14</i>	2	316_331	SEPT14-PR	CCAGCTACCAACCAA
<i>SEPT14</i>	3	332_358	SEPT14-AS	CAAATTGGGCATCTATGTAGTCAACT

---



