

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**Quantificação da Expressão de WT1
nas Leucemias Mielóides Agudas da Infância e sua
correlação com a evolução clínica do paciente**

**Dissertação de Mestrado apresentada no
Instituto de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do título de
Mestre em Genética e Biologia Molecular na
área de Genética Humana e Médica**

Autora: Patrícia Cristina Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Yunes (IB/DGE)

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira (IB/DGE)

2004

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a : Christine Hackel

Prof. Dr.: Stephen Hyslop

Prof. Dr.: José Andrés Yunes

(orientador)

Prof.^a Dr.^a: Maricilda Palandi de Mello

Como não poderia deixar de ser dedico este trabalho a todas as crianças portadoras de leucemia que passaram pelo Boldrini. Esperando do fundo do coração que um dia ele venha a ser útil.

Agradecimentos

Agradeço ao meu amigo e orientador Dr. José Andrés Yunes não só por ter confiado em mim desde a iniciação científica, quando eu ainda nem sabia pipetar direito, mas por muitas vezes ter tido mais confiança em mim do que eu mesma. E por me ter mostrado que o mais importante na ciência e na vida não é o muito fazer, mas fazer bem feito o pouco que se faz. Seu exemplo de humildade e criatividade ficarão marcados no meu coração para sempre, de forma que para mim a melhor maneira de chamá-lo é mesmo “Mestre”.

À minha família: Gerci, Antônio, Renata, Marco Aurélio, Tessa e Letícia, por terem torcido e rezado de longe, na agonia de nada mais poderem fazer e também por terem compreendido calmamente meus longos períodos de ausência.

À minha família espiritual CVX: Sakai, Fernando, Gabriel, Lucy, Élcio, Hugo, Maruja, Anali, Érica e Alessandro por terem me encorajado e suportado em seus ombros sempre disponíveis aos meus desabafos, sendo pródigos em bons conselhos e incentivos.

A Ana Luísa por alguns RNAs extraídos, mas principalmente por ser esta presença maternal no laboratório, sempre zelando pela boa convivência de todos.

A Paulinha pela paciência e por ter me emprestado sua atenção para que eu não trocasse as amostras dos pacientes.

Agradeço as valorosas críticas do Fernando Freitas na correção da primeira versão deste trabalho, lá quando ele era bem um rascunho ainda.

Em fim a todos os colegas do laboratório: Marcela, Fernando, Paula e Ione, pela companhia alegre e compreensiva:

Agradeço aos Drs. Celso E. Benedetti e Edi Sartorato pela presteza nas correções da pré-banca.

Agradeço ao professor Dr. Stephen Hyslop por ter me ensinado a gostar de estatística e também pela atenção com que corrigiu minha tese em pré-banca e banca.

Agradeço à Dra. Christine Hackel pelas proveitosas correções na banca e pelo entusiasmo com que acolheu meu trabalho.

Ao pessoal do CIPOI pela localização e retirada de amostras: Dr. Alexandre Nowill, Gilberto (amigo dos plantões!), Carol e Márcia.

Agradeço ao Dr. Sátiro Oliveira não só pela ajuda no levantamento dos prontuários, mas também por ter me ensinado muito sobre leucemia.

Aos colegas do laboratório do lado: Tio Du, Léo, Dina e Rose, pelas inúmeras dicas e tira-dúvidas de última hora. E também a Cleide e Ione pelos papos e cafezinhos revigorantes no fim da tarde.

À CAPES pela bolsa que permitiu a execução deste trabalho.

À Motorola pelo suporte financeiro.

À Dr^a. Sílvia Brandalise que além do suporte financeiro, confiou e incentivou o meu trabalho, sendo decisiva para nortear o levantamento dos prontuários.

Finalmente eu agradeço a Deus por ter me permitido terminar este trabalho dignamente e por ter colocado em minha vida a pessoa maravilhosa que é o Romaric, meu companheiro; que esteve comigo em todos os momentos. Que tanto me ajudou em aspectos práticos como formatação, uso de softwares, etc., quanto dividiu comigo a vibração dos meus sucessos e foi o meu estímulo quando eu já não confiava mais:

Je te remercie de tout mon cœur!

*“Que meu orgulho torne-se humildade
Podendo ser o mais, que eu seja o menos
Que morra, em mim, a estúpida vaidade
E que eu seja o menor entre os pequenos.”*

[...]

*“Que a minha mão as dores alivie,
E, se luz eu tiver, que aos outros guie.”*

Djalma de Andrade

SUMÁRIO

Lista de figuras	9
Lista de siglas	11
Resumo	12
Abstract	13
Capítulo 1 Introdução	14
1.1 As leucemias agudas	14
1.2 Epidemiologia das LMAs.....	14
1.3 Etiologia das LMAs	15
1.4 O surgimento das leucemias como uma falha na hematopoiese	15
1.5 Subtipos de LMA	17
1.6 Fatores prognósticos e LMA pediátrica.	22
1.7 A descoberta do gene <i>WT1</i> no tumor renal	24
1.8 Aspectos moleculares de <i>WT1</i>	26
1.9 Expressão de <i>WT1</i> ao diagnóstico como fator prognóstico na leucemia.....	27
1.10 Expressão de <i>WT1</i> nas leucemias da infância	28
Capítulo 2 Objetivos	29
Capítulo 3 Materiais e Métodos	31
3.1 Casuística	31
3.2 Potenciais variáveis prognósticas analisadas	32
3.3 Análise estatística	33
3.4 Separação de células das amostras de medula óssea	34
3.5 Extração do RNA e síntese de cDNA	34
3.6 Reação de PCR.....	34
3.7 Eletroforese e quantificação.....	35

Capítulo 4 Resultados e discussão.....	36
4.1 Padronização de um “dúplex-PCR” semi-quantitativo para a análise dos níveis de transcrito WT1.....	36
4.1.1 Bases teóricas para o uso do “dúplex PCR”	36
4.1.2 Escolha de um novo controle interno	37
4.1.3 Condições da reação de PCR.....	39
4.2 Análise dos níveis de transcrito WT1 em amostras de LMA da infância.....	47
4.2.1 Amostra, extração de RNA e síntese do cDNA.....	47
4.2.2 Testando a Qualidade dos cDNAs sintetizados : PCR Multi-Controle	48
4.2.3 Dúplex PCR e cálculo da razão da intensidade das bandas WT1/PBGD	49
4.2.4 Níveis de WT1, normalizados em função dos níveis de PBGD e relativos ao nível de WT1 na linhagem celular K562.....	51
4.3 Análise da variabilidade da técnica utilizada	53
4.4 Análise prognóstica de variáveis aferidas ao diagnóstico.....	57
4.4.1 Associação dos níveis de WT1 com variáveis aferidas ao diagnóstico	57
4.4.2 Associação dos níveis de WT1 com evolução clínica dos pacientes....	60
4.5 O papel de WT1 nas leucemias: supressor de tumores ou oncogene?.....	66
Bibliografia	71
Anexo I	78

Lista de figuras

Figura 1: *Etapas da Hematopoiese.*

Figura 2: *Etapas da Diferenciação Mielóide Humana.*

Figura 3: *Esquema de estratificação dos pacientes em grupos de risco de falha terapêutica*

Figura 4: *Representação esquemática do produto do gene WT1*

Figura 5: *Comparação da similaridade de amplificação dos controles testados para a quantificação de WT1.*

Figura 6: *“Dúplex” RT-PCR de WT1/PBGD testando dois diferentes tempos de extensão e um maior tempo de annealing.*

Figura 7: *Obtenção do Número ótimo de ciclos para as proporções 25/22,5pmol; 25/25pmol, 25/27,5 de oligo WT1/PBGD*

Figura 8: *Obtenção do Número ótimo de ciclos para as proporções 20/25pmol; 25/30 pmol de WT1/PBGD.*

Figura 9: *Teste da sensibilidade do PCR nas proporções 25pmolWt1/27,5 pmolPBGD e 25pmol de WT1/30pmol de PBGD.*

Figura 10: *PCR Multi-controle de pacientes.*

Figura 11: *Amplificação de Dúplex RT-PCR para Curva de K562 e alguns pacientes.*

Figura 12: *Estatística descritiva comparando a variação das repetições de PCR de um mesmo cDNA.*

Figura 13: *A variação dos grupos de expressão de WT1.*

Figura 14: *Expressão de WT1 nos sete subtipos de LMA.*

Figura 15: *Distribuição da expressão de WT1 nos 56 pacientes analisados quanto a sobrevida.*

Figura 16: *Análise de sobrevida global Kaplan-Meier.*

Figura 17: *Análise de sobrevida livre de eventos Kaplan-Meier.*

Figura 18: *Análise de sobrevida livre de leucemia Kaplan-Meier.*

Lista de siglas

AML	Acute myeloid leukemia
ATRA	Ácido trans-retinóico
BFM-83	Protocolo de tratamento Berlin-Frankfurt-Munster-83
D15	Décimo quinto dia do tratamento
FAB	French-American-British Comitee
K562	Linhagem leucêmica mielóide crônica em crise blástica
LA	Leucemias agudas
LLA	Leucemia linfóide aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda
LPA	Leucemia promielocítica aguda
M0	Leucemia mielóide minimamente diferenciada
M1	Leucemia mielóide sem maturação
M2	Leucemia mielóide com maturação
M3	Leucemia promielocítica (LPA)
M4	Leucemia mielomonocítica
M5	Leucemia monocítica
M6	Eritroleuceumia
M7	Leucemia megacarioblástica
M.O	Medula óssea
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SG	Sobrevida global
SLE	Sobrevida livre de eventos
SLL	Sobrevida livre de leucemia
S.N.C.	Sistema nervoso central
S.P.	Sangue periférico
R.C.	Remissão clínica
R. C. C.	Remissão clínica completa
RT-PCR	Trancrição reversa seguida de amplificação por PCR

Resumo

A expressão anormalmente alta do gene supressor de tumores *WT1* (Wilms tumor gene) tem sido observada em leucemias agudas, sugerindo uma possível atuação deste gene na gênese da leucemia. Trabalhos realizados com amostras de leucemia mielóide aguda (LMA) de pacientes adultos sugerem que alta expressão de *WT1* está associada a pior prognóstico, tendo portanto este gene função mais compatível com a de um oncogene. Porém, nas LMAs da infância, o papel de *WT1* ainda não está bem estabelecido. O objetivo deste trabalho foi verificar a possibilidade de utilização dos níveis de expressão de *WT1* como fator prognóstico nas LMAs infantis. Para tal padronizou-se um método de RT-PCR “dúplex” semiquantitativo utilizando-se o controle endógeno PBGD (porphobilinogen deaminase) e a linhagem celular K562, onde o nível de expressão de *WT1* foi definido como 1,0. Foram analisados 82 casos de LMAs infantis representando todos os oito subtipos de LMA (M0 a M7) e sendo 26 deles, casos de LMA M3. O subtipo LMA M6 apresentou os menores níveis de expressão de *WT1* ($P=0,004$) e o subtipo LMA M3 apresentou os maiores níveis de expressão do gene ($P=0,0003$). Pacientes cujos níveis de expressão de *WT1* foram menores ou iguais a 0,4 tiveram menor sobrevida global ($P=0,005$), menor sobrevida livre de eventos ($P=0,011$) e menor sobrevida livre de leucemia ($P=0,0008$). Estes resultados indicam que pacientes com baixa expressão de *WT1* estão associados a um pior prognóstico, apoiando a atuação de *WT1* como gene supressor de tumores não só no rim mas também nas leucemias infantis.

Abstract

Overexpression of the tumor suppressor gene *WT1* (Wilms' tumor gene) has been reported in acute leukemias, and may play a role in leukemogenesis. In adult patients with acute myeloid leukemia (AML) a high expression of *WT1* has been associated with a worse prognosis, which suggests that this gene acts as an oncogene. However the role of *WT1* in childhood leukemia has not been established. The aim of this work was to investigate whether the level of *WT1* could be predictive of prognosis in childhood AML. To routinely quantify *WT1* mRNA levels, we developed a duplex RT-PCR assay with PBGD (porphobilinogen deaminase) as an internal control and K562 cells as a positive control. The level of *WT1* expression in k562 cells was defined as 1,0. We analyzed 82 children with AML, representing all of the eight subtypes of AML (M0 to M7), being 26 of this cases of M3. The subtype M6 showed the lowest expression of *WT1* ($P= 0,004$) and the subtype M3 had the highest levels ($P=0,0003$). Patients with the expression levels $< 0,4$ had a lower overall survival ($P=0,005$), a lower events free survival ($P=0,011$) and lower leukemia free survival ($P=0,0008$). These results indicated that a lower expression of *WT1* was associated with a worse prognosis, and supported the idea that *WT1* can act as a tumor suppressor gene not only in the kidney, but also in childhood AML .

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 As leucemias agudas

As leucemias agudas são um grupo de doenças muito variadas e que de forma geral podem ser caracterizadas por proliferação celular neoplásica das células progenitoras do sangue. A célula na qual a transformação leucêmica ocorre pode ser tanto um precursor linfóide, dando origem as leucemias linfoblásticas agudas (LLAs), quanto um precursor mielóide, dando origem as leucemias mielóides agudas (LMAs), que são estudadas no presente trabalho (Bain, 1990).

1.2 Epidemiologia das LMAs

A leucemia aguda é o tipo de câncer mais freqüente na infância e adolescência, representando aproximadamente 31% de todos os cânceres pediátricos, e as LMAs correspondem a 20% das Leucemias Agudas nesta faixa etária (Frei e Holland, 2000)

A incidência de LMA em crianças é de 1 caso /100.000 por ano, sendo mais freqüente em adultos (10/100.000 por ano), porém sua taxa de mortalidade é alta: 0,5/100.000 em crianças menores de 10 anos (Bain, 1990).

1.3 Etiologia das LMAs

Muito pouco é conhecido sobre as origens das LMAs infantis, mas sabe-se que portadores de certas desordens constitucionais como síndrome de Down, síndrome mielodisplásica, anemia Fanconi e neurofibromatose têm risco muito maior de desenvolver a doença. A ocorrência de múltiplos casos de LMA numa mesma família é um evento raro, mostrando que a maioria das LMAs parece ser um evento esporádico.

Fatores ambientais têm sido associados ao desenvolvimento das LMAs, como no caso de exposição química a benzeno, quimioterápicos ou à radiação ionizante. O uso materno de drogas, cigarro ou álcool também têm sido fracamente associados a maior incidência da doença (Frei e Holland, 2000).

1.4 O surgimento das leucemias como uma falha na hematopoiese

A hematopoiese, processo pelo qual se forma o sangue, inicia-se a partir de células tronco hematopoiéticas ou “stem cells” que constituem uma população rara de células (<0,1% das células nucleadas da medula óssea), que sob estímulos ainda pouco conhecidos podem “optar” por sua auto-renovação replicativa ou por sua diferenciação em precursores imaturos das três linhagens constituintes do sangue: os leucócitos, as hemácias e as plaquetas (Till et al., 1980; Ogawa et al., 1993), como mostra a **figura 1**

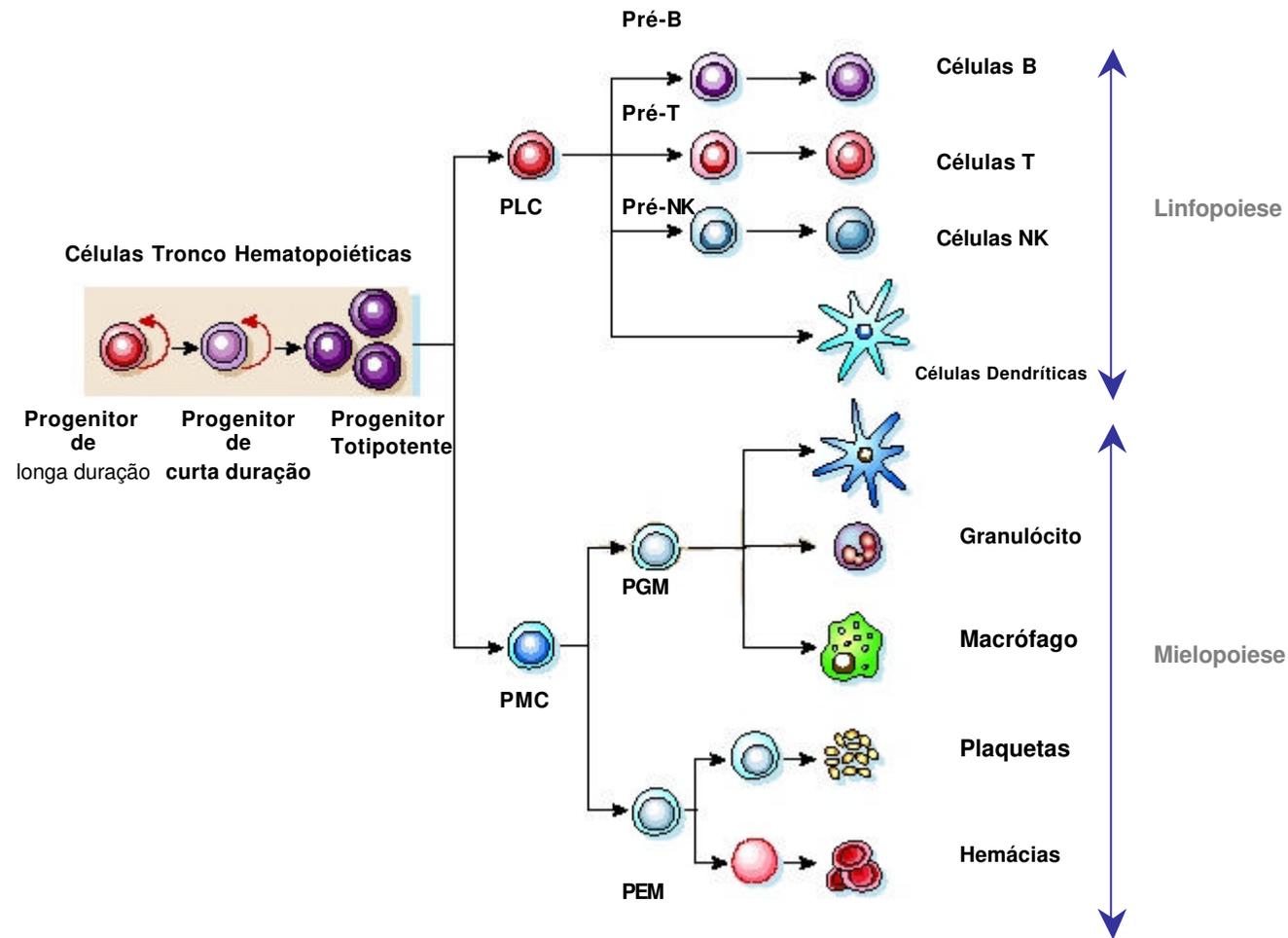


Figura 1: Etapas da Hematopoiese. As células tronco podem ser subdivididas em células auto-renovadoras de longa duração, curta duração e células totipotentes. As setas vermelhas indicam capacidade de auto-renovação. Os progenitores totipotentes são capazes de se diferenciar tanto num progenitor linfóide ou num progenitor mielóide comuns (**PLC e PMC**) que por sua vez são progenitores de todas as células linfóides (**Pré-B, Pré-T, ou Pré-NK**) e mielóides (precursor macrófago-granulocítico (**PMG**) e precursor eritro-megacariocítico (**PEM**)). Figura modificada de Reya et al. (2001).

As células do câncer possuem várias habilidades em comum com as células totipotentes normais, como auto-renovação e diversos controles gênicos para impedir a apoptose, sugerindo que o câncer seja resultado do desequilíbrio entre os processos de renovação e diferenciação celular causados por possíveis alterações genéticas nas células totipotentes normais (Reya et al., 2001).

A LMA enquadra-se perfeitamente na hipótese acima referida, pois é uma doença caracterizada pela excessiva proliferação de células num estágio prematuro de maturação e resistentes ao controle apoptótico.

1.5 Subtipos de LMA

A LMA decorre de um processo deficiente de diferenciação e proliferação clonal, de algum dos precursores mielóides hematopoiéticos. Denominam-se blastos mielóides as células anômalas decorrentes deste processo. Segundo o estágio da diferenciação e a linhagem do precursor onde houve a falha diferenciativa e a proliferação celular anormal, as LMAs são classificadas em oito subtipos de LMAs (de M0 a M7). A **figura 2** mostra as diferentes origens destes subtipos.

O diagnóstico dos subtipos requer observadores experientes que identifiquem em lâminas de material da medula óssea e do sangue periférico o percentual e o tipo de blastos presentes, segundo os critérios do comitê French-American-British (critérios FAB, Bennett et al., 1976; 1980; 1985): para que seja dado o diagnóstico de leucemia o percentual de blastos deve ser superior a 30% das células nucleadas na medula óssea. Os tipos de blastos são reconhecidos segundo suas características morfológicas,

geralmente avaliadas usando corantes policromáticos (Wright ou Wright-Giemsa) e reações histoquímicas (Bain, 1990; Frei e Holland, 2000)

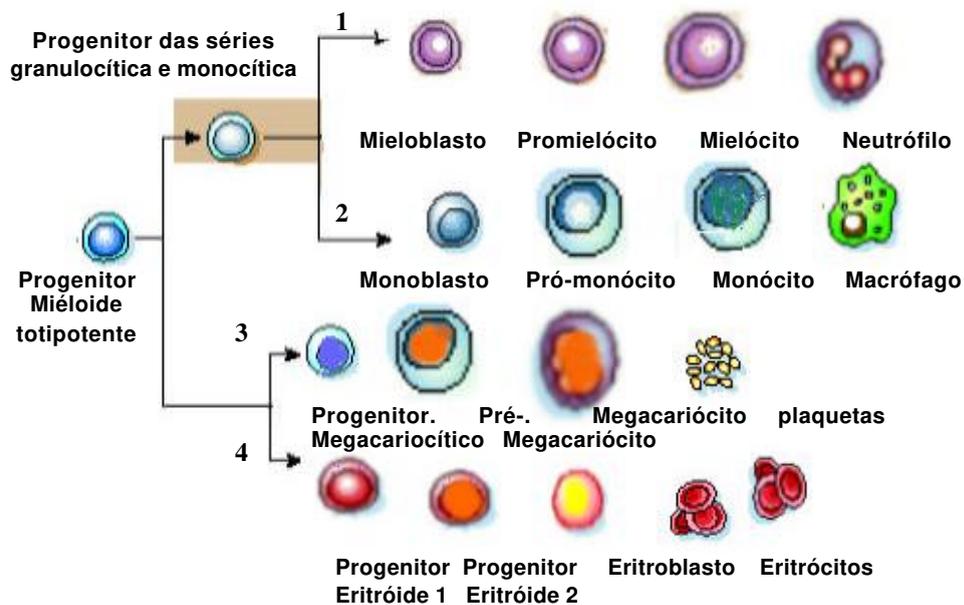


Figura 2: Etapas da Diferenciação Mielóide Humana. Representação do desenvolvimento normal das quatro séries celulares mielóides: (1) série granulocítica, (2) monocítica, (3) plaquetária e (4) eritrocítica. Segundo o tipo celular onde houver a falha diferenciativa, teremos a derivação das células de cada subtipo de leucemia. Figura modificada de Foon et al. (1986).

M0 ou LMA minimamente diferenciada

Este subtipo inclui casos pouco frequentes nos quais observa-se apenas sinais de uma mínima diferenciação mielóide, sem tendência por uma linhagem mielóide específica, o que pode gerar certa confusão com blastos de LLA. Na maioria dos casos é simples distinguir este subtipo de LMA e os subtipos de LLA pois seus blastos são maiores, seu citoplasma é abundante e há maior número de nucléolos, porém o fator mais importante na discriminação deste subtipo é a demonstração da existência de pelo menos 3% dos blastos com origem granulocítica e que se colorem por reação da peroxidase ou Sudan Black B (Bain, 1990; Frei e Holland, 2001).

M1 ou leucemia mielóide sem maturação

O subtipo M1 constitui 15 a 20% das LMAs e tem como célula predominante na medula o mieloblasto representando 90% ou mais de suas células não eritróides, e possui também cerca de 10% ou menos de pró-monócitos. Aproximadamente 50% de seus blastos são peroxidase positivo e suas características morfológicas mais comuns são citoplasma granular, presença de um ou mais nucléolos e esporadicamente presença de bastão de Auer. Os bastões de Auer são estruturas cristalinas que acredita-se serem derivadas da associação de grânulos dentro de vacúolos autofágicos (Bain, 1990; Frei e Holland, 2001).

M2 ou leucemia mielóide com maturação

O subtipo M2 é o mais frequente nas LMAs representando 30% delas. Este subtipo mostra uma maior maturação granulocítica em relação ao subtipo M1: possui

10% ou mais de componentes granulocíticos em maturação, menos de 20% de monoblastos e entre 30 a 89% de mieloblastos. O citoplasma de seus mieloblastos é fortemente granular e a frequência de bastões de Auer é maior que no subtipo M1. Cerca de 20 a 25% dos pacientes do subtipo M2 apresentam a translocação cromossômica t(8;21) (Bain, 1990; Frei e Holland, 2001).

M3 ou leucemia promielocítica

O subtipo M3 corresponde cerca de 10% das LMAs; suas células mais frequentes são promielócitos anormais, hipergranulares e fortemente peroxidase positivos; existe também um percentual de mieloblastos de cerca de 30 % ou menos. A morfologia peculiar dos promielócitos e a presença da translocação cromossômica t(15;17) em quase todos os casos permite fácil diagnóstico deste subtipo (Bain, 1990; Frei e Holland, 2001).

M4 ou leucemia mielomonocítica

O subtipo M4 corresponde a 15 ou 20 % das LMAs e entre suas células não eritróides predomina uma mistura de componentes mieloblásticos (=30%) e monoblásticos (=20%), ou seja, tanto componentes de origem granulocítica como monocítica, enquanto os 3 subtipos anteriores tinham uma predominância de elementos de origem granulocítica (**fig 2**). O citoplasma dos blastos de M4 é fortemente granular e neste subtipo é frequente a presença da inversão do cromossomo 16(inv(16)) (Bain, 1990; Frei e Holland, 2001).

M5 ou leucemia monocítica

O subtipo M5 corresponde a 15% das LMAs e tem predominância de componentes monocíticos (=80%) no conjunto das suas células não eritróides. Seus monócitos são basófilos e se colorem positivamente em presença do corante NASDA (Bain, 1990; Frei e Holland, 2001).

M6 ou eritroleuceumia

O subtipo M6 corresponde a 3 ou 4% dos casos de LMA e tem predominância de eritroblastos representando mais de 50% das células nucleadas da medula, os eritroblastos pertencem à linhagem celular que daria origem às hemácias. Este subtipo de LMA é facilmente reconhecível pela presença de células blásticas anormalmente grandes, multinucleadas ou com fragmentação nuclear (Bain, 1990; Frei e Holland, 2001).

M7 ou leucemia megacarioblástica

O subtipo M7 corresponde a 2 ou 4% das LMAs e tem predominância de megacarioblastos altamente polimórficos; são freqüentes múltiplos e proeminentes nucléolos, assim como basofilia citoplasmática. Possui marcadores imunofenotípicos específicos auxiliando o diagnóstico deste subtipo (Bain, 1990; Frei e Holland, 2001).

Cada um dos 8 subtipos de LMA é originado da falha diferenciativa de um precursor mielóide (**figura 2**), num dado ponto da maturação de uma das linhagens hematopoiéticas, de forma que entre os subtipos vão existir alguns cujo estágio de maturação é maior que outros, como o subtipo M3 em que há predominância de promielócitos em relação aos subtipos M1 e M2, sendo os três derivados de mieloblastos e normalmente dariam origem aos granulócitos; ou o subtipo M5 onde há presença maior de elementos monocíticos do que no subtipo M4, ambos derivados de monoblastos e que normalmente dariam origem aos monócitos e macrófagos. Mas a comparação de maturação evolutiva entre todos os subtipos é discutível uma vez que eles vêm de precursores diferentes.

1.6 Fatores prognósticos e LMA pediátrica

Enquanto para as LLAs em crianças existem fatores prognósticos bem determinados, que permitem a subdivisão da doença em grupos de risco para os quais alterações terapêuticas foram associadas com sucesso, para as LMAs poucos fatores prognósticos foram reconhecidos como sendo eficientes (Wells et al., 2002).

Diversas variáveis observadas ao diagnóstico têm sido testadas quanto a sua importância prognóstica nas LMAs, ou seja, sua capacidade de prever que tipo de evolução clínica terá o paciente. Variáveis como idade, presença de translocação cromossômica, síndrome de Down, contagem de leucócitos no sangue periférico e subtipo FAB têm sido investigadas (Grier et al., 1987; Kalwinsky et al., 1990; Ravindranath et al., 1992).

Embora vários destes fatores prognósticos estejam consistentemente associados a uma pior ou melhor evolução clínica nos casos de LMA em adultos, a

situação para as LMA da infância ainda não está clara, havendo discrepância nos resultados obtidos por diferentes estudos. Entretanto, a classificação dos pacientes em grupos de risco parece ser possível pelo uso combinado de alguns desses fatores prognósticos (Chang et al., 2000; Wheatley et al., 1999), como no modelo sugerido por Creutzig et al. (1999), que utiliza conjuntamente o subtipo FAB, a presença de translocações cromossômicas e de bastões de Auer, e o percentual de blastos encontrados na medula no décimo quinto dia do tratamento (**figura 3**).

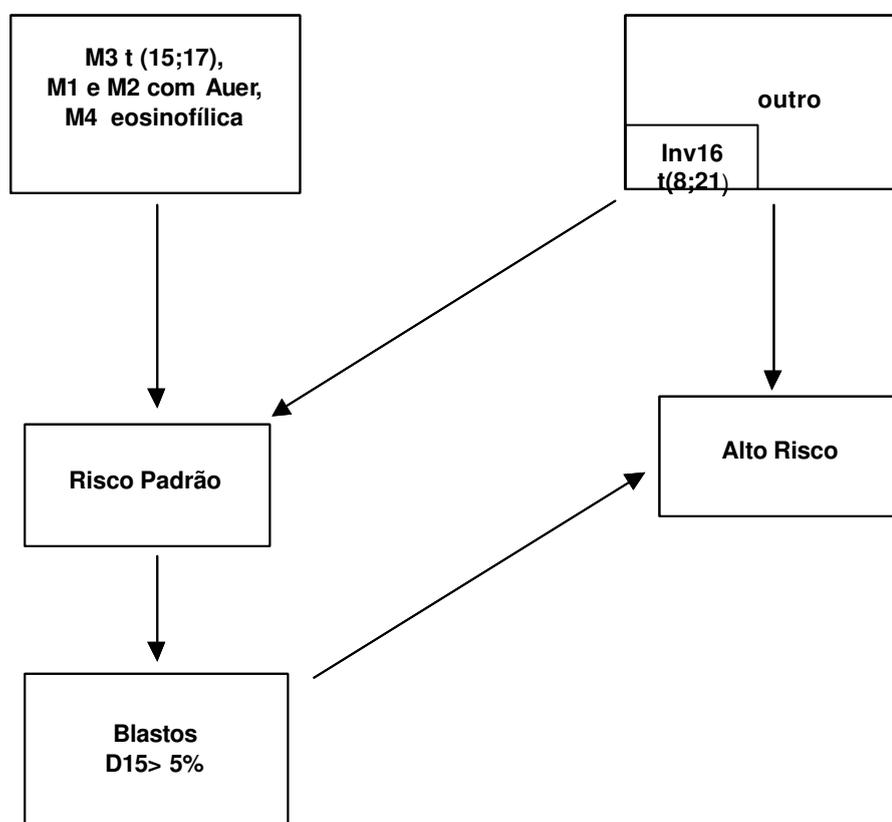


Figura 3: *Esquema de estratificação dos pacientes em grupos de risco de falha terapêutica*, segundo Creutzig et al. (1999). O modelo utiliza o subtipo morfológico FAB, a presença de bastões de Auer e de translocações cromossômicas para determinar quais pacientes pertencem ao grupo de risco padrão e alto.

Este modelo permitiu identificar um grupo correspondente a 30% dos pacientes que apresenta melhor resposta ao tratamento.

Como a LMA é uma doença heterogênea cuja terapêutica ainda não faz nenhuma distinção protocolar aos diversos grupos de pacientes, e considerando-se a atual dificuldade de estratificação dos pacientes em grupos de risco se justifica este estudo e a caracterização de novos fatores prognósticos. É neste contexto que o presente trabalho se insere, na tentativa de verificar se os níveis de expressão do gene *WT1* (Wilms' tumor gene) serviriam como fator prognóstico nas LMAs da infância. O gene *WT1* é expresso em todos os subtipos de LMA independente de idade, sexo, raça ou presença de translocações cromossômicas, desta forma representando um candidato a fator prognóstico de maior abrangência.

1.7 A descoberta do gene *WT1* no tumor renal

O tumor de Wilms ou nefroblastoma é um tipo de câncer renal e um dos mais frequentes tumores sólidos infantis. Embora haja relatos desde 1955 mostrando possível associação hereditária neste câncer, só em 1990 com a caracterização do gene *WT1* e com a posterior detecção de suas mutações é que se pôde associar diretamente um gene ao tumor (Call et al., 1990; Little et al., 1992).

O gene *WT1* ficou então conhecido como um supressor de tumores: genes que produzem proteínas capazes de suprimir divisão celular, impedindo crescimento anormal e a transformação maligna das células, e cuja perda da função de ambos os alelos parece levar a tumorigênese. Porém, posteriormente percebeu-se que para a

manifestação do tumor de Wilms só a mutação de um dos alelos de *WT1* já poderia ser suficiente, tendo esta um caráter dominante negativo (Haber et al., 1992).

Apenas 10% dos pacientes com tumor de Wilms apresentam mutações do gene *WT1*, apesar da maioria dos tumores expressar níveis anormais do seu transcrito selvagem (Little et al., 1992). Estudos sobre a atuação normal do gene *WT1* no rim em modelos animais mostraram que a inativação do gene é letal, causando agenesia renal e desenvolvimento aberrante de estruturas mesoteliais (Kreidberg et al., 1993). A falha na organogênese dos ratos nocautes de *WT1* é atribuída a uma apoptose generalizada de células tronco renais, evidenciando a necessidade de *WT1* para a sobrevivência destas células indiferenciadas.

Em estágios posteriores da diferenciação renal, que não são alcançados pelo nocaute, a expressão de *WT1* atinge seu nível mais alto nos precursores específicos do glomérulo, diminuindo depois da diferenciação destes e restringindo-se aos podócitos no rim adulto, sugerindo uma expressão celular estágio específica e também um papel de *WT1* na diferenciação celular renal (Kreidberg et al., 1993).

Atualmente sabe-se que o gene *WT1* é expresso durante a embriogênese em vários outros tecidos como o sistema nervoso central, gônadas e nas linhagens mesoteliais que dão origem a órgãos viscerais como coração, pulmão, intestino, fígado e baço. Enquanto em vários órgãos a expressão de *WT1* é transiente, nas gônadas e no mesotelio a expressão é contínua até a vida adulta (Pelletier et al., 1991; Park et al., 1993)

Também uma variedade de tecidos anômalos expressam mRNA de *WT1*, como o próprio tumor de Wilms, câncer de ovário, mesotelioma, melanoma, linhagens de

células de câncer pulmonar, câncer de mama (Loeb et al., 2001) e as leucemias agudas (Menssen et al., 1997).

1.8 Aspectos moleculares de WT1

O gene *WT1* está localizado no cromossomo 11p13, e é composto de 10 éxons (**fig 4**), sendo que quatro deles codificam domínios de ligação ao DNA do tipo “zinc-fingers C2H2”. Devido a esta capacidade de ligação ao DNA, *WT1* foi classificado como fator de transcrição (Call et al., 1990; Madden et al., 1991).

As quatro isoformas mais conhecidas do gene *WT1* são as geradas pelo splicing alternativo do éxon 5 (que codifica 17 aminoácidos) e/ou splicing de um pedaço do éxon 9. Este segundo sítio de splicing alternativo (éxon 9), gera proteínas diferentes em apenas três aminoácidos, leucina, treonina e serina (K,T, e S), sendo conhecidas por isoforma +KTS e -KTS. Cada uma destas quatro isoformas do gene é sintetizada e expressa numa razão estável, dependendo do estágio de desenvolvimento e do tecido em questão (Haber et al., 1991). Mas outras isoformas de *WT1* já foram descritas como as resultantes de edição do seu RNA ou as provenientes do uso de diferentes códon de iniciação da transcrição (Lee e Haber, 2001).

O perfil de *WT1* como fator de transcrição é bastante complexo, atuando tanto como repressor ou ativador da transcrição, dependendo da seqüência alvo do promotor, assim como do contexto celular em questão. Quando *WT1* é ligado a promotores com seqüência consenso de tipo EGR1 funciona como repressor, como no caso dos genes *IGF-II* (Drummond et al., 1992), *PDGF* (Wang et al., 1993), *N-Myc* (Zhang et al., 1999), do próprio *WT1* (Rupprecht et al., 1994), e da *ciclina E* (Loeb et al., 2002)

enquanto que para genes como *RbAp46* (Guan et al., 1998) e *amfirregulina* (Lee et al., 1999) funciona como ativador da transcrição.

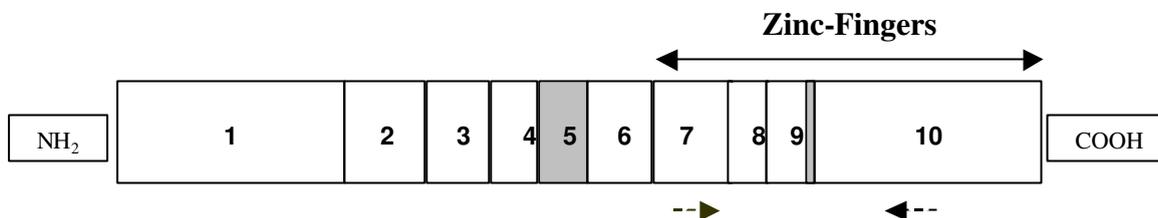


Figura 4: Representação esquemática do produto do gene *WT1*. Os quadros representam os éxons e os dois quadros sombreados estarão presentes ou ausentes no produto final segundo o tipo de splicing. O domínio de ligação ao DNA é mostrado no lado Carboxi-terminal. As setas tracejadas indicam a localização correspondente no DNA na qual foram desenhados os primers utilizados na execução deste trabalho.

1.9 Expressão de *WT1* ao diagnóstico como fator prognóstico na leucemia

Altos níveis de expressão do gene *WT1* em células leucêmicas têm sido associados a baixos níveis de remissão clínica completa (RCC) em adultos (Inoue et al., 1994; Bergmann et al., 1997). Considerando o nível de expressão de *WT1* na linhagem celular K562 sendo igual a 1,0, verificou-se que a expressão basal de *WT1* num indivíduo sadio é aproximadamente 10^{-4} a 10^{-3} na medula óssea, e não detectável nos linfócitos do sangue periférico (Inoue et al., 1994). Estes mesmos autores, estudando diversos casos de leucemia mielóide aguda em adultos, concluíram que pacientes com níveis de expressão relativa de *WT1* menor que 0,6 apresentam uma maior taxa de RCC da doença e também uma maior sobrevida livre de eventos (SLE) que aqueles pacientes cujo nível de expressão relativa é maior ou igual a 0,6. Pacientes com expressão relativa de *WT1* maior que 1,0 não entram em RCC (Inoue et al., 1994).

Bergmann et al. (1997), estudando o nível de expressão de *WT1* em 139 casos de LMA (a maioria casos de LMA em adultos), concluíram que altos níveis de *WT1* estão significativamente associados a uma menor sobrevida livre de eventos, sugerindo que o nível de expressão de *WT1* ao diagnóstico pode ser incluído como fator prognóstico na LMA.

1.10 Expressão de *WT1* nas leucemias da infância

Quanto à expressão de *WT1* nas leucemias da infância, os dados publicados são raros. No caso das leucemias linfóides agudas (LLA) da infância, a expressão de *WT1* foi associada a pacientes classificados como sendo de alto risco e com maior contagem de leucócitos no sangue periférico. Entretanto, nos 50 pacientes analisados, a expressão de *WT1* (análise qualitativa) não apresentou relação significativa com a evolução clínica (Gaiger et al., 1999).

No caso das LMAs da infância, Niegemann et al. (1999) analisaram a expressão de *WT1* em 61 casos de leucemia infantil, entre os quais apenas 13 eram LMAs ao diagnóstico, Im et al. (1999) estudaram a expressão de *WT1* em 53 casos de leucemia infantil, entre os quais apenas 11 eram LMA ao diagnóstico. Pelo número tão reduzido de casos, não foi possível obter conclusão nenhuma quanto à relação da expressão de *WT1* na infância e à evolução clínica.

Recentemente Trka et al (2002), analisando os níveis de *WT1* em 47 crianças com LMA através de PCR quantitativo (“real-time” PCR), encontraram um grupo de pacientes (n=8) com expressão muito baixa ou nula de *WT1* ao diagnóstico, cuja evolução clínica foi excepcionalmente boa: todos os oito pacientes alcançaram remissão e nenhum deles recaiu ou morreu até o momento da avaliação (730 dias).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método rotineiro para a análise semi-quantitativa dos níveis de expressão de *WT1* e a sua aplicação na análise de aproximadamente 100 casos de LMA infantil. Estes dados foram estudados para verificar a relação entre os níveis de *WT1* e a evolução clínica dos pacientes, o que serviria de base para a esquematização de um método de estratificação dos pacientes com maiores riscos de recaída.

Para tanto, fez-se necessário uma rigorosa padronização da técnica de quantificação utilizada, bem como de um cuidadoso levantamento dos prontuários dos pacientes.

- 1) Desenvolvimento de um método de “dúplex”-RT-PCR para a quantificação da expressão de *WT1*:
 - a) Encontrar um controle interno para as células de LMA com níveis de expressão próximos a *WT1*
 - b) Padronizar um “dúplex” PCR semi-quantitativo através de ajustes no programa de PCR, nas concentrações de primers e no número de ciclos.
- 2) Extração de RNA, síntese de cDNA, análise da qualidade do cDNA e quantificação dos níveis de *WT1* através do “dúplex” RT-PCR padronizado no objetivo 1.

3) Levantamento de prontuário dos pacientes cujas amostras foram utilizadas. Análise estatística a fim de identificar associação entre os níveis de expressão de *WT1* e a evolução clínica do paciente.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Depois da aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), foram localizadas entre amostras armazenadas a -70°C , 107 amostras de medula óssea (MO) ao diagnóstico, provenientes de pacientes de LMA do Centro Infantil Boldrini, hospital pediátrico que atende apenas pacientes entre 0 e 18 anos.

As amostras utilizadas foram provenientes de pacientes acolhidos pela instituição entre 1991 e 2001, e das 107 amostras localizadas foram de fato analisados quanto à expressão de WT1 82 casos de leucemia *de novo*, todos diagnosticados segundo os critérios FAB, sem síndrome de Down e que foram diagnosticados e permaneceram sobre o protocolo de terapia BFM-83 no referido hospital, sem intervenção prévia ou posterior de outros protocolos, sendo estes os critérios de exclusão utilizados para descartar as outras 25 amostras.

Dentre as 82 amostras analisadas 26 eram de LMA-M3 (Leucemia Promielocítica Aguda, LPA) e foram excluídas de qualquer análise prognóstica, pois a descoberta da droga ATRA, ácido trans-retinóico (Huang et al., 1987, 1988) veio a alterar o protocolo de tratamento, aumentando significativamente a sobrevida do subgrupo M3. Tais leucemias foram utilizadas somente para a determinação do padrão

de expressão de *WT1* nas LMAs ao diagnóstico e na correlação dos níveis de expressão do gene às demais variáveis aferidas ao diagnóstico.

3.2 Potenciais variáveis prognósticas analisadas

Além da variável experimental *WT1*, foram consideradas as seguintes variáveis clínicas ao diagnóstico:

(i) no sangue periférico: contagem de leucócitos, níveis de hemoglobina, contagem de plaquetas e número de blastos;

(ii) no líquido: presença de blastos (doença no sistema nervoso central), contagem leucocitária, e níveis de proteína;

(iii) nos blastos da medula óssea: seu percentual, subtipo FAB, presença de bastão de Auer, possíveis alterações cromossômicas.

Para análise prognóstica foram consideradas as seguintes datas: diagnóstico, alcance da remissão (remissão clínica), recaída, óbito, perda de seguimento ou data de finalização do estudo, que foi fixada em agosto de 2003, no caso dos sobreviventes. Entendeu-se por remissão clínica (RC) um estado normocelular do aspirado da medula contendo menos que 5% de blastos e mostrando evidências de maturação normal de outros elementos medulares.

Avaliou-se também o percentual de blastos na medula óssea no 15º dia do tratamento (três categorias: <5%, 5 a 15%, >15%), a presença de Cloroma, bem como os fatores demográficos sexo, idade e raça.

3.3 Análise estatística

Os eventos de interesse foram: a resposta ao tratamento (remissão completa, RC), a sobrevida geral (SG) contada a partir do diagnóstico até o último seguimento, a sobrevida livre de eventos (SLE) considerada como o tempo entre o diagnóstico e a recaída ou último seguimento e a sobrevida livre de leucemia (SLL) considerada como o tempo entre a remissão e o último seguimento ou recaída.

Todos os potenciais fatores prognósticos ao diagnóstico (**tabela 3**) foram analisados em relação à remissão através do teste exato de Fisher ou chi quadrado. A relação destas variáveis com sobrevidas (SG, SLE e SLL) foram avaliadas através de curvas de Kaplan-Meier e teste de Log-Rank. Já a análise de WT1 foi feita pelos testes não paramétricos de Mann Whitney, Kruskal-Wallis ou do teste exato de Fisher e chi quadrado, sua relação com as sobrevidas foram avaliadas através de curvas de Kaplan-Meier e teste de Log-Rank. Variáveis contínuas também foram analisadas usando categorias discretas previamente estabelecidas: “cut-offs” crescentes foram atribuídos e usados para a dicotomização da variável e posterior cálculo das curvas de sobrevida. O “cut-off” que rendeu o menor P foi então adotado para a dicotomização da variável em questão. As sobrevidas foram avaliadas através de Curvas de Kaplan-Meier e teste de Log-Rank. Todos os testes da análise univariada foram executados no programa WinStat® for Microsoft® Excel, 2001.1, assim como a estatística descritiva aplicada às réplicas de resultados de PCR e de cDNAs de um mesmo paciente.

O nível de significância considerado foi de 5% ($\alpha=0,05$).

3.4 Separação de células das amostras de medula óssea

As células mononucleadas da MO ao diagnóstico foram separadas por centrifugações em gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Todas as amostras tiveram a predominância de blastos leucêmicos confirmada pela realização do mielograma e análise imunofenotípica. Sendo que 87% dos pacientes tiveram mais que 50% de blastos ao diagnóstico e 50% dos pacientes pertenciam a classe que possuía entre 70% e 90% de blastos ao diagnóstico.

3.5 Extração do RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA foi feita pelo método do guanídeo-tiocianato-fenol-clorofórmio modificado de Chomczynski e Sacchi (1987). A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 0,8% pelo padrão das bandas 18S e 28S.

A síntese do cDNA foi feita utilizando-se o kit ImProm (Promega) ou com o kit First-strand cDNA Synthesis (Pharmacia). Como “primers” foram utilizados 100 ng de “random hexamers”, d(N)₆, por reação. Foram sintetizadas duas amostras de cDNA para cada paciente, a partir de 1 µg de RNA total. A qualidade das réplicas de cDNA foi testada em PCR múlti-controle segundo Lion e Kidd (1998).

3.6 Reação de PCR

Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de *WT1* foram: “primer” da fita senso, éxon 7: 5'-GGCATCTGAGACCAGTGAGAA-3', “primer” da fita anti-senso, éxon 10: 5'-GAGAGTCAGACTTGAAAGCAGT-3' (Inoue et al., 1994a). Para a amplificação do controle interno PBGD desenhou-se os “primers”: da fita senso (éxon 13): 5'-CCA GTA GCC GTG CAT ACA G-3', “primer” da fita anti-senso (éxon 15): -

5'-AGC TGC CGT GCA ACA T3. Os “primers” foram utilizados na concentração de 25 pmol/ul e 30 pmol/ul respectivamente, em 50 uL de volume final da reação. As condições de “dúplex” PCR utilizadas foram um ciclo de desnaturação a 94°C por 30 segundos, e 31 ciclos compostos de: 30 s a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 60°C (anelamento), 1 minuto a 72°C (extensão), seguido de 5 minutos finais a 72°C para extensão. Quando a expressão do gene controle PBGD nos pacientes foi muito baixa, o número de ciclos foi elevado de 32 para 34. Foram feitas pelo menos duas reações de PCR para cada cDNA sintetizado. Tais condições de PCR bem como a escolha do gene controle PBGD foram previamente padronizadas como mostra o item **4.1** dos resultados.

O PCR de controle do cDNA (múlti-controle) seguiu as condições de Lion et al. (1998): 95°C por 8 minutos (hot start/desnaturação) e 35 ciclos compostos de : 30 s a 96°C (desnaturação), 30 s a 55°C (anelamento) e 40 s a 72°C (extensão), e mais sete minutos finais a 72°C para extensão.

3.7 Eletroforese e quantificação

As amostras dos pacientes foram submetidas à eletroforese por 18 minutos num gel de agarose 2%, corado com EtBr (0,5 µg/µl). Os géis foram fotografados com 1,0 segundo de exposição à luz UV. A intensidade das bandas foi quantificada pelo Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290, versão 3.5.4 (Eastman Kodak Company).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Padronização de um “dúplex-PCR” semi-quantitativo para a análise dos níveis de transcrito WT1

4.1.1 Bases teóricas para o uso do “dúplex PCR”

O presente trabalho assume “a priori” que a quantidade de DNA (medida pela intensidade da banda em gel de agarose) resultante de uma reação de RT-PCR na fase exponencial da curva, é indicativa do nível de expressão do gene analisado. Obviamente, pequenas variações na quantidade inicial de RNA “template”, na reação de transcrição reversa e na reação de PCR devem ser de alguma forma controladas. Para tanto, o mesmo cDNA usado na quantificação do gene alvo é analisado quanto à presença/quantidade de um gene controle.

Alguns problemas são encontrados no uso de controles endógenos em RTs-PCRs quantitativos: (i) expressão não necessariamente invariável durante o ciclo de vida celular, (ii) grande diferença na abundância do RNA controle em relação ao RNA alvo, e (iii) diferença natural de estabilidades entre RNAs (Lion et al., 1998).

A quantificação do controle pode ser feita em separado ou conjuntamente à quantificação do gene alvo (no mesmo tubo de PCR). No segundo caso, o PCR é chamado de “dúplex PCR”. As duas formas de quantificação exigem uma rigorosa padronização de condições da reação para que qualquer diferença que venha incidir na

reação de PCR para o gene alvo afete *na mesma intensidade* a reação de PCR do gene controle. Basicamente isso é obtido quando a eficiência da reação de PCR para ambos genes, medida pela quantidade de DNA amplificado, é o mais próxima possível. Se a quantidade de DNA amplificado pelo PCR é medida pela intensidade de banda em gel de agarose, o objetivo da padronização é obter bandas de igual intensidade para o gene alvo e controle. No presente trabalho a intensidade das bandas foi medida a partir de fotografia digitalizada do gel de agarose e quantificação da intensidade de pixels de cada banda.

4.1.2 Escolha de um novo controle interno

Até o momento, a maioria dos trabalhos visando correlacionar a expressão de *WT1* com a evolução clínica da doença por RT-PCR utilizou como controle endógeno, a β -*actina*, cuja atuação como controle tem sido muito questionada.

O uso da β *actina* como controle interno tem sido questionado devido à existência de diversos pseudogenes, cópias sem íntrons no DNA genômico, e também devido a sua expressão ser geralmente muito mais alta que a dos genes alvos (Lion et al., 1998).

Uma vez que a expressão de *WT1* é bem menor que a de β -*actina*, procuraram-se novos controles endógenos, com níveis de expressão mais próximos aos de *WT1*. Os genes escolhidos para serem testados como possíveis controles foram: *BCR*, *PBGD*, *Histona 3,3* e *ABL*. “Primers” para estes genes foram desenhados de forma que possuíssem temperatura de anelamento igual à dos “primers” de *WT1* (60°C), permitindo o desenvolvimento de um “dúplex-PCR”, o qual assegura um controle mais adequado das variações entre tubos do que um PCR normal (Halford et al., 1999).

Tomou-se também o cuidado para que o produto de PCR do controle fosse facilmente separável do de WT1 num gel de agarose.

Utilizando as condições de PCR modificadas de Inoue et al. (1994a) para amplificação de WT1 (desnaturação inicial de 94°C por 30 seg; 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C e 45 seg a 72°C; extensão final de 5 min a 72°C), e variando-se linearmente a concentração de cDNA de K562, o gene PBGD (porphobilinogen deaminase) se apresentou como o melhor controle interno. Vê-se na **Figura 5** que as bandas de PBGD têm intensidades mais próximas às de WT1, particularmente no uso da menor diluição do cDNA (6,25 X).

O cDNA de K562 foi preparado a partir de 1 µg de RNA e a partir do resultado desta síntese foi feita uma série de diluições, reduzindo a concentração inicial do cDNA obtido, tais diluições foram denominadas: 100x, 50x, 25x, 12,5x, 6,25x e assim sucessivamente.

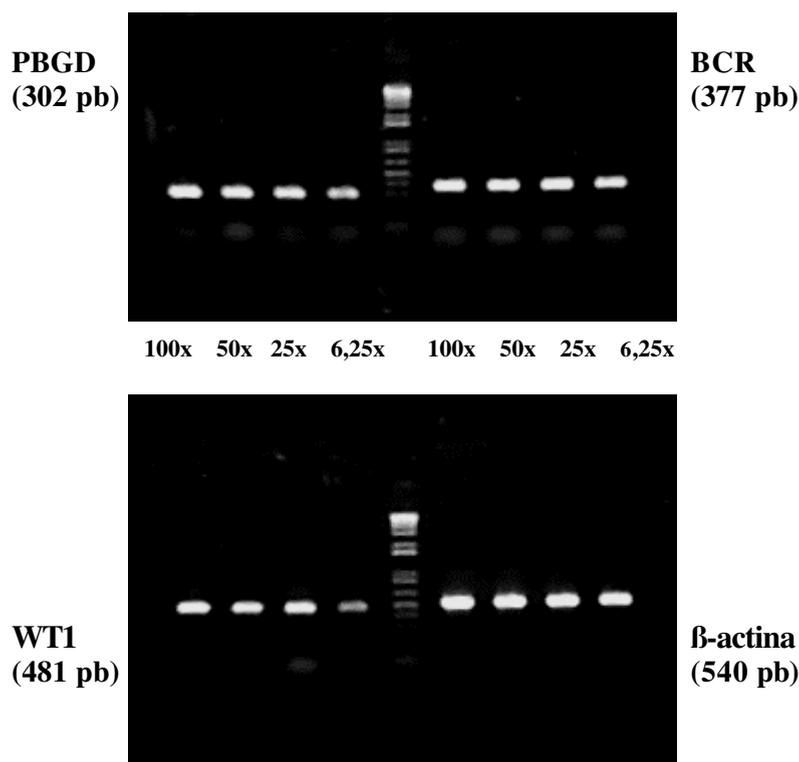


Figura 5: *Comparação da similaridade de amplificação dos controles testados para a quantificação de WT1.* O cDNA de K562 foi preparado a partir de 1 μ g de RNA total e diluído segundo mostra a figura. No meio de cada gel: ladder de 1 kb Plus (Gibco BRL).

Os controles *ABL* e *Histona 3,3* também foram testados em relação a *WT1*, mas foram logo descartados por apresentarem níveis de expressão ainda maiores que a *β -actina* (dados não apresentados).

4.1.3 Condições da reação de PCR

Numa reação de dúplex pode acontecer que um dos genes amplifique menos do que normalmente amplificaria se estivesse sozinho. Este fato, teoricamente inesperado, por não existirem limitações na quantidade de reagentes e desde que os dois genes amplificados sejam independentes um do outro (RNAs diferentes), pode ser explicado

pela maior eficiência de um par de oligonucleotídeos em relação ao outro par de oligonucleotídeos. Dois fatores principais podem ser empiricamente testados para alterar a proporção dos produtos de PCR num dúplex: a concentração dos “primers” na reação de PCR e a temperatura de anelamento (Bercovich et al., 1999).

As principais condições do dúplex PCR ajustadas para obter bandas de *WTI* e *PBGD* com intensidades semelhantes, foram: (I) tempo de anelamento e extensão, (II) proporção dos dois pares de oligonucleotídeos, (III) número de ciclos ótimo, e (IV) análise de sensibilidade.

Inicialmente foram testados dois tempos diferentes de extensão (45 seg e 1 min), e um tempo de annealing (1 min) maior que os 30 segundos utilizados anteriormente. As demais condições de PCR foram mantidas. Durante todo o processo de padronização do PCR usou-se uma baixa quantidade de cDNA “template” para garantir alta sensibilidade do método a ser padronizado. O tempo de anelamento e de extensão de 1 minuto mostrou ser o mais adequado. Vê-se na **Figura 6** que usando 1 min anelamento/extensão obtêm-se bandas mais bem definidas e proporcionais em qualquer concentração de oligonucleotídeos utilizada.

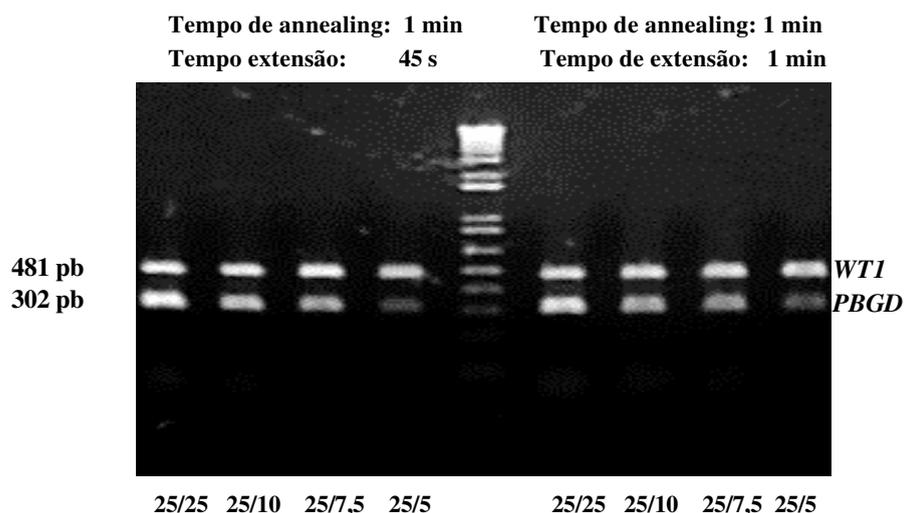


Figura 6: Dúplex RT-PCR de WT1/PBGD testando dois diferentes tempos de extensão e um maior tempo de “annealing”. As proporções de oligonucleotídeos WT1/PBGD utilizadas são mostradas em baixo da figura. A diluição cDNA usada é de 6,25x do cDNA preparado com 1µg de RNA total de K 562

A seguir testaram-se diferentes quantidades dos pares de oligonucleotídeos WT1/PBGD: 25 pmol/22,5 pmol, 25 pmol/25 pmol 25 pmol/27,5 pmol em 50 µL de reação. Para cada proporção de oligonucleotídeos foram feitas 8 reações, que foram retiradas após 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 ou 38 ciclos de amplificação (**figura 7**). A análise da intensidade das bandas resultantes de cada uma das reações, permitiu determinar quais as condições ótimas para obter (i) bandas WT1 e PBGD com intensidade semelhante (ver item 4.1.1), e (ii) que estivessem dentro da fase exponencial da reação de PCR. Pois o rendimento da reação de PCR segue uma curva sigmoideal onde somente na fase exponencial é que a quantidade de produto está diretamente correlacionada com a quantidade inicial de moléculas alvo (Halford et al., 1999).

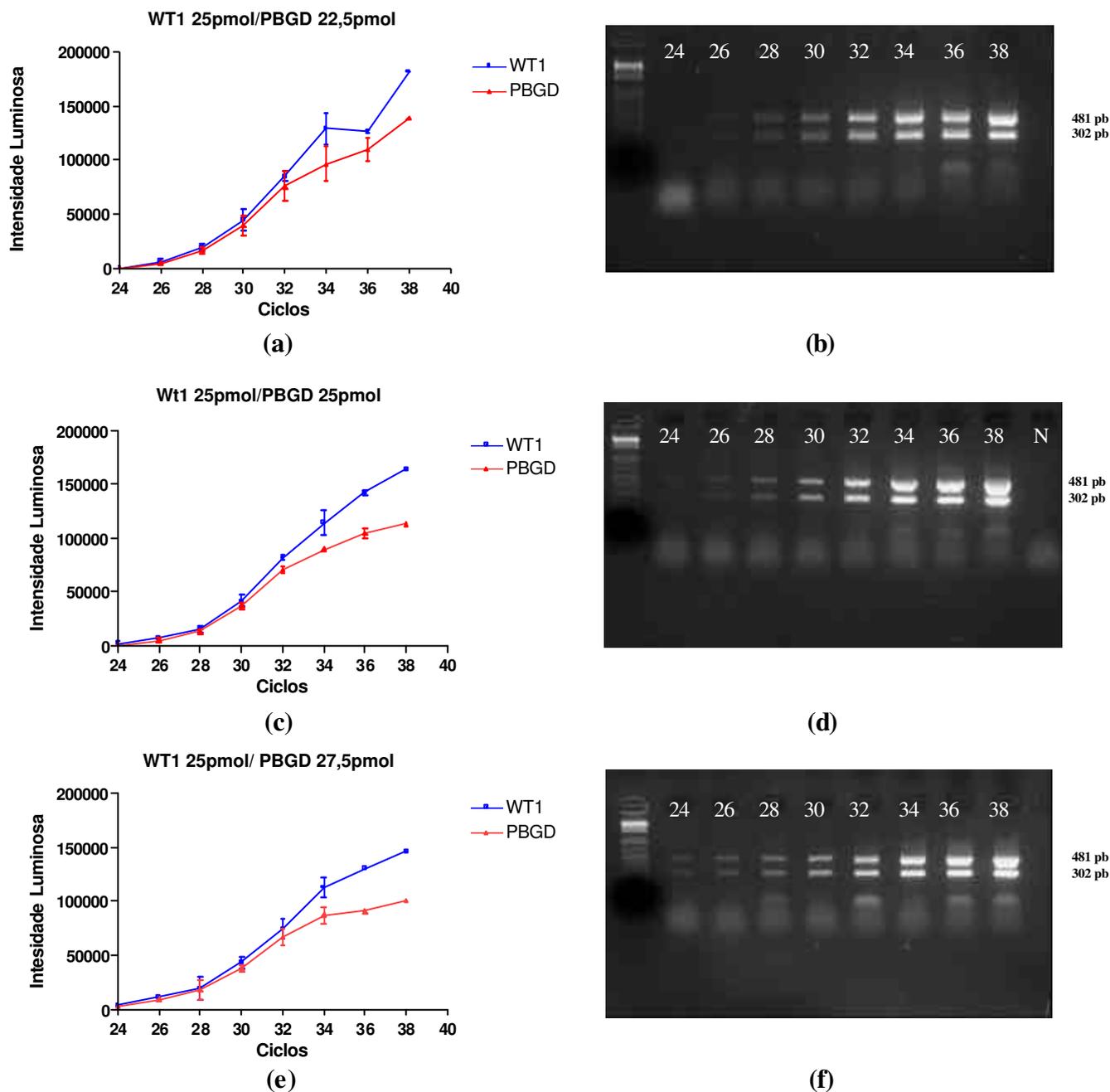
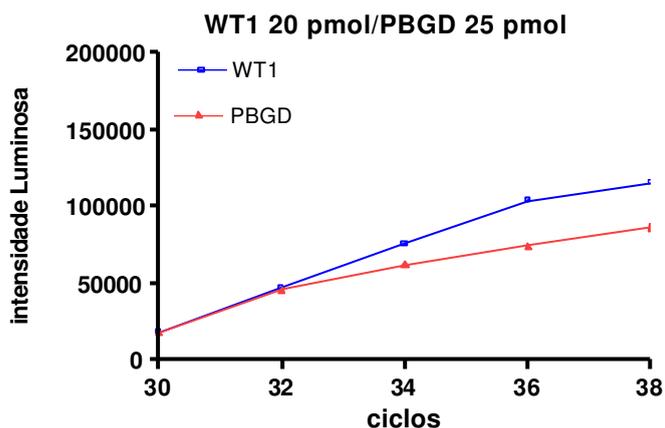
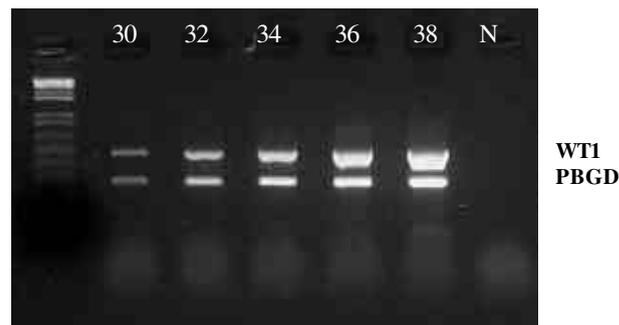


Figura 7: Obtenção do Número ótimo de ciclos para as proporções 25/22,5 pmol; 25/25 pmol e 25/27,5 pmol de oligonucleotídeos WT1/PBGD: Os gráficos (a),(c) e (e) representam a curva de amplificação por PCR das proporções 25/22,5 pmol; 25/25 pmol, 25/27,5 respectivamente. (b),(d) e (f) mostram géis de agarose 2% respectivamente, nas proporções 25/22,5 pmol; 25/25 pmol, 25/27,5 nos ciclos de 24 a 38, precedidos por ladder 1 kb (Gibco). A última canaleta do gel d (N) mostra o controle negativo da reação.

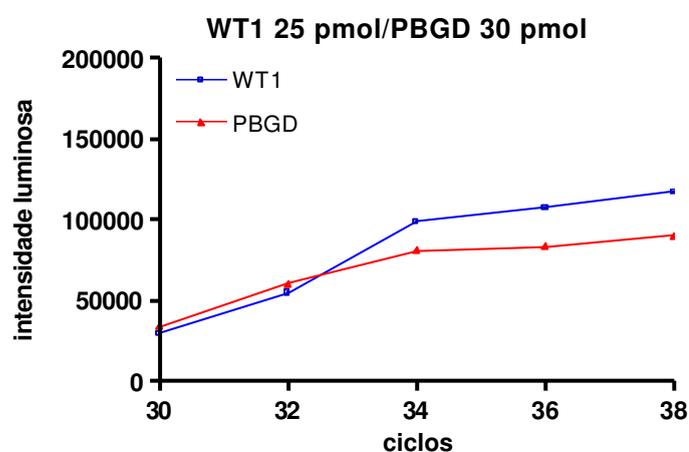
Como pode ser visto na **Figura 7, Gráficos a, c, e** os níveis de amplificação de WT1 sempre foram um pouco maiores que os de PBGD, fato evidenciando principalmente após o ciclo 32. Visando diminuir este efeito foram testadas as quantidades de oligonucleotídeos: WT1/PBGD: 20 pmol/25 pmol e 25 pmol/30 pmol em 50 uL de reação. Como mostra a **Figura 8** no caso de 20 pmol de WT1 para 25 pmol de PBGD, manteve-se ainda a superioridade de amplificação de WT1. Já no caso de 25 pmol de WT1 para 30 pmol de PBGD, a banda de PBGD apresenta maior rendimento para números de ciclos próximos de 33, e seu perfil de proporcionalidade entre bandas WT1 /PBGD é praticamente o inverso do observado para as quantidades 25 pmol/ 27,5 pmol quando acima de 33 ciclos (vide **Figura 7, gráfico e**).



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 8: Obtenção do Número ótimo de ciclos para as proporções 20/25 pmol; 25/30 pmol de WT1/PBGD: Os gráficos (a),(c) representam a curva de amplificação por PCR das proporções 20/25 pmol e 25/30 pmol, respectivamente. (b),(d) mostram géis de agarose 2% respectivamente nas proporções 20/25 pmol; 25/30 pmol nos ciclos de 30 a 38, precedidos por ladder 1 KB (Gibco). A última canaleta do gel do gel b (N) mostra o controle negativo da reação.

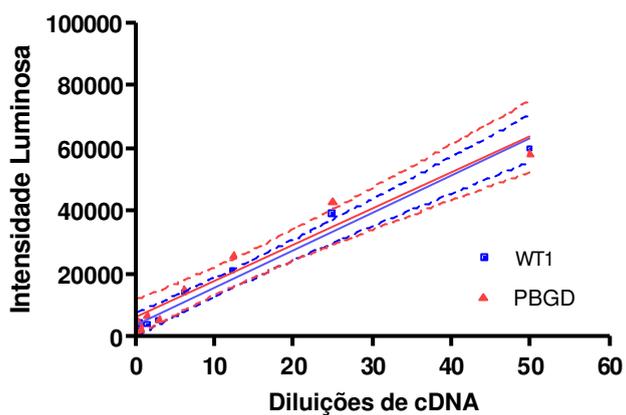
De forma que, optou-se por fazer a análise de sensibilidade (**Figura 9**) com uso das duas proporções WT1/PBGD que tinham o melhor resultado: 25 pmol / 27,5 pmol e 25 pmol / 30 pmol em 50 uL de reação.

A análise de sensibilidade tem por objetivo não somente determinar a quantidade mínima de cDNA necessária, como assegurar que não ocorre nenhum desvio no rendimento das reações de PCR para WT1 e PBGD no caso de amostras cuja pior qualidade do cDNA ou pela biologia da leucemia em si, os níveis de material alvo fossem muito baixos.

Para análise de sensibilidade, quantidades decrescentes de cDNA de K562 foram submetidas a PCR, por 32 ciclos e usando duas diferentes proporções de oligonucleotídeos: WT1/PBGD: 25 pmol / 27,5 pmol e 25 pmol / 30 pmol em 50uL de reação.

Sensibilidade de amplificação do PCR

25 pmol WT1/27,5 pmol PBGD



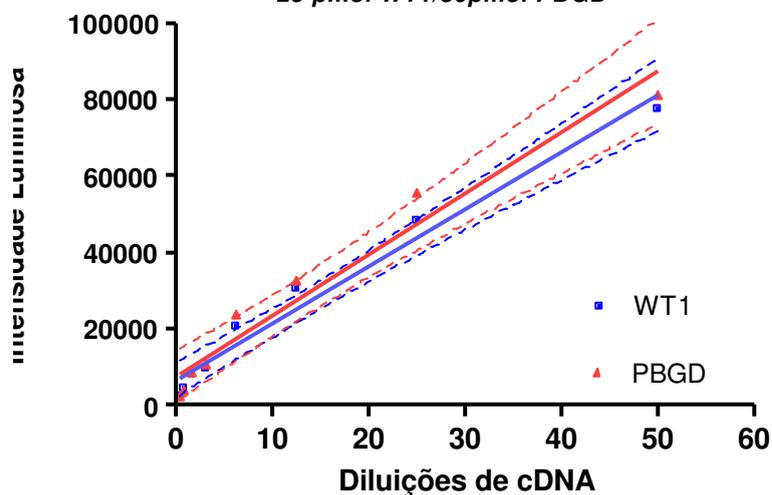
(a)



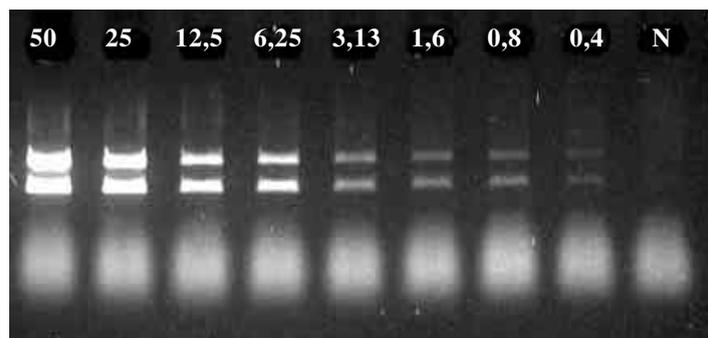
(b)

Sensibilidade de amplificação do PCR

25 pmol WT1/30 pmol PBGD



(c)



(d)

Figura 9: Teste da sensibilidade do PCR nas proporções 25 pmol WT1/27,5 pmol PBGD e 25 pmol de WT1/30 pmol de PBGD. (a) e (c) regressão linear dos valores obtidos para WT1 (em azul) e PBGD (em vermelho) na amplificação das diversas diluições de cDNA (de 50x até 0,4x), e seus intervalos de confiança (95%). Sendo os coeficientes de determinação em (a) $R^2_{WT1}=0,98$ $R^2_{PBGD}=0,95$ e em (c) $R^2_{WT1}=0,98$ $R^2_{PBGD}=0,96$. Em (b) e (d), os géis de agarose 2% mostrando amplificação do cDNA de k562 sintetizado a partir de 1 µg de RNA nas diluições: 50x, 25x, 12,5x, 6,25x, 3,13x, 1,6x, 0,8x e 0,4x da esquerda para direita e (N) mostra o controle negativo da reação.

Como mostra a **Figura 9**, para ambas as proporções de oligonucleotídeos a intensidade das bandas de *WT1* e *PBGD* se mantêm praticamente igual nas diferentes quantidades de cDNA, fato que demonstra a boa padronização do método. A proporção 25 pmol de *WT1* para 30 pmol de *PBGD* ofereceu maior sensibilidade para as concentrações mais baixas de cDNA (**figura 9 c e d**), e maior nível de rendimento do PCR de uma maneira geral (**figura 9 a e c**), sendo portanto escolhida como a proporção a ser utilizada para quantificação das amostras de pacientes.

4.2 Análise dos níveis de transcrito *WT1* em amostras de LMA da infância

4.2.1 Amostra, extração de RNA e síntese do cDNA

Depois da aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) foram localizadas 107 amostras celulares congeladas, provenientes de MO de pacientes de LMA ao diagnóstico do Centro Infantil Boldrini, hospital pediátrico que atende apenas pacientes entre 0 e 18 anos .

Dentre estes pacientes, acolhidos pela instituição entre 1991 e 2001, foram analisados quanto à expressão de *WT1* somente os casos de leucemia *de novo*, sem síndrome de Down e que foram diagnosticados e permaneceram sobre o protocolo de terapia BFM-83 no referido hospital. Um total de 82 amostras se encaixavam neste perfil e foram usadas para extração de RNA e síntese de cDNA segundo descrição dos Materiais e Métodos.

4.2.2 Testando a Qualidade dos cDNAs sintetizados : PCR Multi-Controle

Apesar de todos os RNAs obtidos terem sido verificados pelo padrão de bandas 18S e 28S em gel de agarose, e do fato do “dúplex” em si já contar com a amplificação de um controle interno (*PBGD*), optou-se por conferir previamente a qualidade dos cDNAs dos pacientes por um outro método, desenvolvido por Lion e Kidd (1998) e que será referido como “PCR multi-controle”.

Sabe-se que uma série de fatores pode influenciar a síntese do cDNA: o nível de degradação do RNA da amostra sanguínea, os diferentes níveis de expressão dos RNAs mensageiros, o excesso de sal na extração do RNA, ou mesmo a eficiência da transcriptase reversa.

A fim de certificar-se da qualidade do cDNA sintetizado Lion e Kidd , (1998), desenvolveram um RT-PCR multiplex onde diversos controles endógenos indicam se a síntese foi bem sucedida e caso contrário, mostra onde ocorreu a falha. O método consiste na amplificação de 4 controles endógenos: *PBGD* (128 pb), *ABL* (193 pb), *β 2Microglobulina* (287 pb) e *BCR* (377 pb), sendo que a ausência de amplificação de *BCR* indica comprometimento na síntese do cDNA de maiores comprimentos. Se além disso houver perda de amplificação de *ABL* ou *β 2-microglobulina* é indicativo de comprometimento da amostra de RNA. Muitas vezes a *β 2-microglobulina* não amplifica em multiplex devido a competição dos oligonucleotídeos pelos reagentes, mas isso não tem relação com a qualidade do cDNA. Finalmente, a ausência de *PBGD* mostra que o cDNA é inadequado para utilização (Lion e Kidd, 1998).

Depois de sintetizar pelo menos duas réplicas de cDNA de cada um dos 82 pacientes, foi feito um controle de qualidade destes cDNAs através do PCR múlti-controle e só foram utilizadas para análise de WT1 (“dúplex” PCR) as amostras que

apresentaram boa amplificação de no mínimo 3 das bandas do múlti-controle (BCR, ABL, PBGD.). A **Figura 10** exemplifica a qualidade dos cDNAs utilizados:

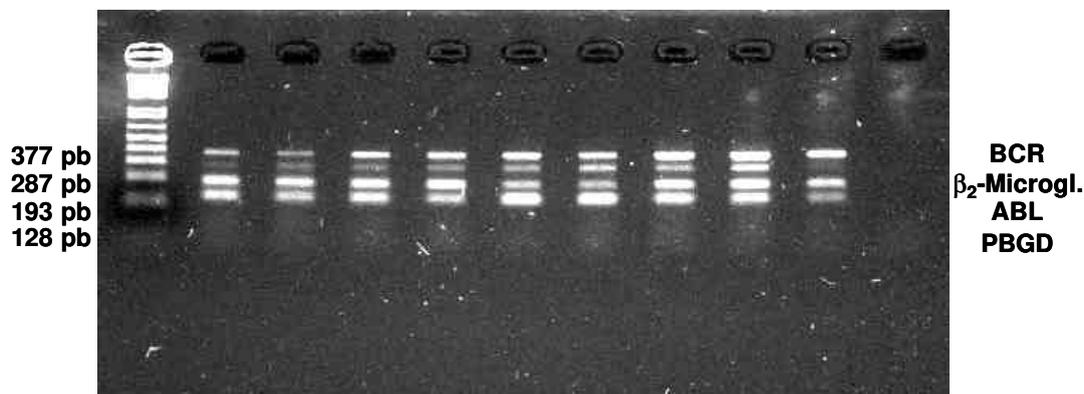


Figura 10: PCR Multi-controle de pacientes. Gel de agarose 2% exemplificando a qualidade dos cDNAs de pacientes utilizados. Na primeira canaleta da esquerda para direita ladder 1 kb plus (Gibco) e nas seguintes canaletas amplificação cDNA de pacientes sintetizado a partir de um1 μ g de RNA e de diluição 25X. A última canaleta mostra o controle negativo da reação.

Foram sintetizados 210 cDNAs, dos quais 180 passaram pelo controle de qualidade do PCR multi-controle. Quando necessário, para obter pelo menos duas repetições de cDNA por paciente, foi descongelada nova amostra de lisado de células, RNA foi extraído e uma nova síntese de cDNA foi feita (30 pacientes).

4.2.3 “Dúplex” PCR e cálculo da razão da intensidade das bandas WT1/PBGD

Após a padronização do “dúplex” RT-PCR e de selecionados os pacientes a serem analisados, iniciou-se a quantificação da expressão de *WT1* nos casos de LMA

(**Figura 11**). Optou-se por amplificar as amostras dos pacientes que tinham cDNA pouco concentrado a 34 ciclos e os demais a 32 ciclos, sendo que ambos os ciclos estão dentro da fase exponencial do PCR (**figura 8 c**).

Os cDNAs dos pacientes foram analisados por PCR em grupos de 30 amostras. Cada um destes grupos contou também com uma curva de quantidades decrescentes de cDNA de K562 (de agora em diante referida simplesmente como “curva de K562”) semelhante a da **figura 9 d**, e um controle negativo. A curva de K562 é incluída na análise com o objetivo de confirmar se a intensidade das bandas de WT1 e PBGD se mantêm semelhante, ou seja, se o valor da razão da intensidade das bandas de WT1/PBGD se mantêm igual a 1 (um). Visando assim controlar pequenas variações de manipulação, de lote de enzima, de alíquotas de oligonucleotídeos, de digitalização e análise das imagens dos géis, etc feitos durante todo o tempo do trabalho. O controle negativo foi feito para verificar simplesmente presença de contaminante.

Um exemplo de resultado do “dúplex” PCR para a curva de K562 e alguns pacientes é apresentado na **Figura 11**. Como pode ser visto, a sensibilidade, linearidade e equivalência de amplificação de ambos genes, WT1 e PBGD é muito boa. Vê-se também a homogeneidade de amplificação do controle interno PBGD nos diferentes pacientes (Banda inferior, Fig. 11), fato esperado e positivo de ser obtido para o controle interno da reação, o qual indica boa qualidade do RNA e pouca variabilidade na eficiência de síntese do c-DNA. Ao mesmo tempo, nos pacientes, o resultado de amplificação de WT1 é variável, fato que denota a variação da expressão deste gene nas diferentes leucemias.

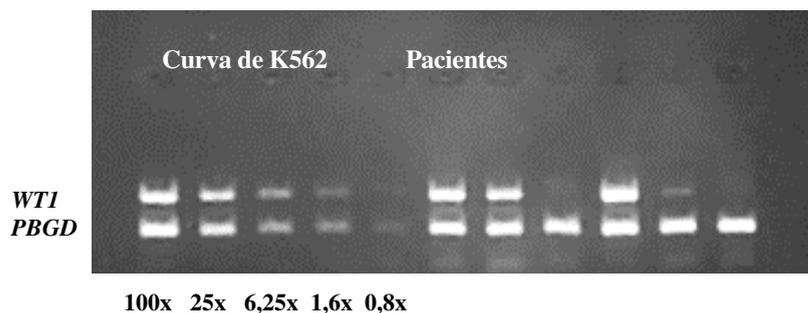


Figura 11: Amplificação de “dúplex” RT-PCR para Curva de K562 e alguns pacientes. As primeiras 5 canaletas contêm c-DNA de K562 nas diluições indicadas na figura, cDNA preparado a partir de 1 μ g de RNA total, e a seguir, o resultado de 6 pacientes. Os cDNAs dos pacientes também se encontram na diluição de 100x.

4.2.4 Níveis de *WT1*, normalizados em função dos níveis de *PBGD* e relativos ao nível de *WT1* na linhagem celular *K562*

As **tabelas 1 e 2** mostram um exemplo dos dados de intensidade das bandas para a curva de K562 e alguns pacientes. Os níveis de *WT1* para cada uma das amostras são calculados pela divisão do valor de intensidade da banda de *WT1* (em pixels) pelo da intensidade da banda do controle interno *PBGD*. Foi assumido “a priori”, baseado em dados da literatura (Lion e Kidd, 1998) como gene constitutivo, e que a expressão do gene *PBGD* seria semelhante nas diversas leucemias. O *PBGD* é um gene que codifica para uma enzima envolvida na síntese de citocromos da cadeia respiratória, cuja expressão, em teoria, não deveria ser variável nos diferentes tipos de LMA. Na prática, todos os casos analisados mostraram expressão de *PBGD*. Além disso, a análise visual da intensidade da banda de *PBGD* no PCR multi-controle, normalizando-se em relação

às bandas de *BCR* e *ABL*, parece indicar que os níveis do *PBGD* são relativamente constante nas diferentes LMAs (dados não apresentados).

O método de “dúplex” PCR desenvolvido neste trabalho foi calibrado com uso de RNA de K562, de forma que a razão das bandas *WT1/PBGD* fosse igual a 1 (um). Assim sendo, pode-se dizer que o nível de expressão de *WT1* de cada um dos pacientes é dado em relação ao nível de expressão da linhagem celular K562 (valor 1). Valores acima de 1 indicam expressão de *WT1* superior àquela encontrada na K562 e vice-versa.

Para simplificar a nomenclatura, o valor da razão de intensidade da banda de *WT1* sobre *PBGD*, será chamado de *valor de WT1*.

Diluição de cDNA	<i>PBGD</i>	<i>WT1</i>	Razão: <i>WT1/PBGD</i>	Dados Normalizados
50,0x	77292	76702	1,01	1,00
25,0x	48051	55575	0,86	0,86
12,5x	30256	32447	0,93	0,93
6,25x	20351	23764	0,86	0,85
3,13x	9841	10689	0,92	0,91
1,6x	8136	8456	0,96	0,96
0,80x	4518	3936	1,15	1,14
0,40x	2519	2127	1,18	1,17

Tabela 1: Análise da Expressão de *WT1* na curva padrão de K562 de RT-PCR “dúplex”

Como a razão *WT1/PBGD* da curva de K562 se manteve próxima de 1 (valor normalizador em negrito), o que se confirmou nas 19 réplicas de PCR (vide **tabela 3**), a razão *WT1/PBGD* dos pacientes não precisou ser normalizada.

Pacientes (50x cDNA)	PBGD	WTI	Razão: WTI/PBGD
P1	24698	11928	0,48
P2	34109	60057	1,76
P3	22772	27952	1,23
P4	28618	24563	0,86
P5	37971	47546	1,25
P6	32476	45090	1,39
P7	46615	60657	1,30
P8	31144	30653	0,98
P9	51438	11875	0,23
P10	40340	49539	1,23
P11	31855	6936	0,22
P12	48995	16204	0,33
P13	74114	10876	0,15
P14	46374	3674	0,08
P15	42643	63566	1,49

Tabela 2 :*Análise da Expressão de WTI em alguns pacientes através de RT-PCR “dúplex”*. A tabela exemplifica como obteve-se o valor de *WTI* resultante de uma das reações de PCR

4.3 Análise da variabilidade da técnica utilizada

Para cada um dos 180 cDNAs aprovados para análise de *WTI* foram feitas no mínimo 2 reações de PCR, em dias diferentes. O valor de *WTI* para cada paciente foi calculado pela média aritmética de todas as repetições feitas. Portanto, o valor *WTI* para um paciente qualquer é a media calculada a partir de pelo menos 4 resultados de “dúplex” PCR (no mínimo 2 PCRs das 2 réplicas de cDNA).

A fim de verificar a repetibilidade da técnica utilizada, calculou-se a variabilidade dos valores de *WTI* obtidos para (i) as diferentes repetições da curva de K562; (ii) as repetições de cada cDNA, e (iii) todas as repetições de um mesmo paciente.

A **Tabela 3** mostra a estatística descritiva das 19 repetições da curva de K562.

A média de *WTI* para cada ponto da curva se manteve próxima de 1, mas com tendência para valores menor do que 1 com o decréscimo da quantidade de cDNA. Notar que a quantidade de cDNA dos pacientes foi correspondente ao ponto 50x. O desvio padrão no pior dos casos chegou a 0,092, ou 11% em relação à média, evidenciando a grande reprodutibilidade do método padronizado.

valor <i>WTI/PBGD</i>	Quantidade de cDNA de K562		
	50 x	25 x	6,25 x
Média	1,04	0,96	0,83
Desvio	0,047	0,067	0,092
Mínimo	0,97	0,83	0,58
Mediana	1,03	0,96	0,86
Máximo	1,14	1,06	0,93

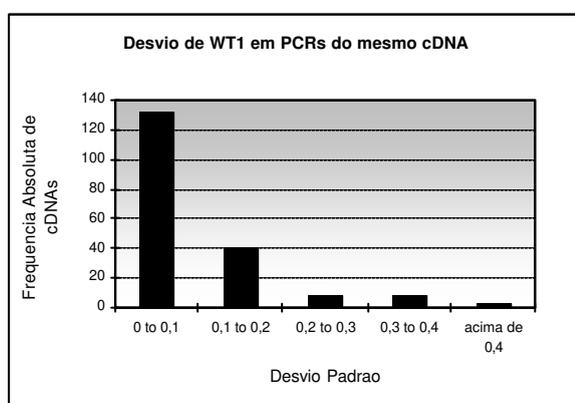
Tabela 3: Estatística Descritiva das Curvas de Calibração. Valores resultantes das 19 reações de PCR realizadas para quantificação das amostras dos pacientes.

Cada cDNA foi ensaiado no mínimo duas vezes, duas repetições do PCR feitas em dias diferentes. A **figura 12 (a)** mostra que o desvio padrão dos diferentes PCRs para um mesmo cDNA é menor que 0,1 em 69% dos casos, e menor que 0,2 em 90% dos casos. O coeficiente de variação relativo não ultrapassa 15% em 85% das amostras de cDNA (**figura 12 c**). Apesar do desvio padrão de apenas duas réplicas experimentais não ser uma boa ferramenta estatística os resultados obtidos nos dão uma idéia da grande repetibilidade das reações de PCR.

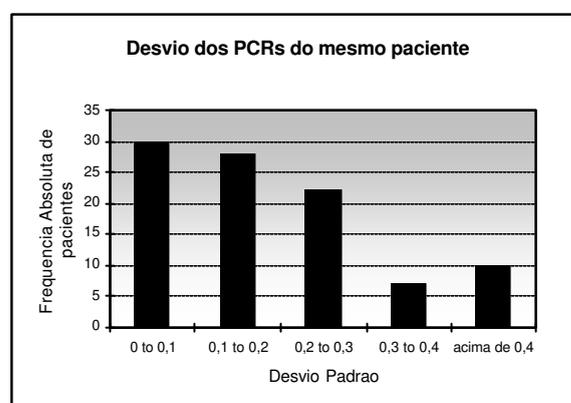
Se para cada paciente foram sintetizados ao menos 2 cDNAs, e como já dito, estes foram ensaiados pelo menos duas vezes, obtivemos ao todo pelo menos 4 resultados de “dúplex” PCR por paciente e a **figura 12b** mostra que o desvio padrão dos

diferentes PCR para um mesmo paciente é menor que 0,2 em 60% dos casos. O coeficiente de variação relativo é menor que 15% em 72% dos pacientes (**Figura 12 d**).

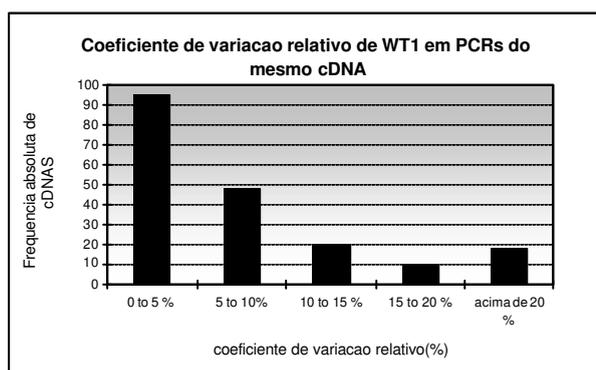
Comparando os dados da **Figura 12a** com os da **Figura 12b** percebe-se, como era de se esperar, que o desvio aumenta ao juntar resultados de dois cDNAs de um mesmo paciente. Tal resultado indica que o erro experimental deriva em maior parte do processo de síntese de cDNA do que do “dúplex” PCR, o que concorda com os resultados de Freeman et al. (1999). De tal erro não escapam nem as técnicas mais modernas de PCR quantitativo, como o “Real-Time PCR”.



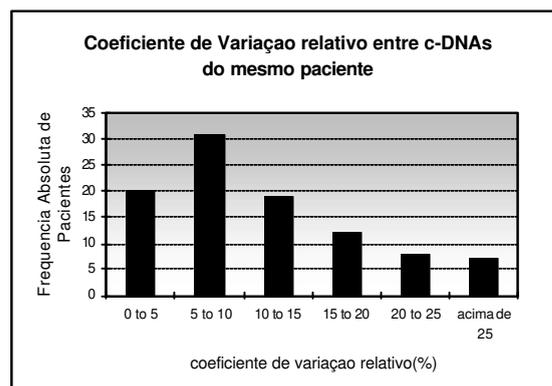
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 12: Estatística descritiva comparando a variação das repetições de PCR de um mesmo cDNA. (a) e (c) com as variações entre cDNAs de um mesmo paciente (b) e (d). Os gráficos (a) e (b) mostram a frequência absoluta do desvio padrão encontrado. Os gráficos (c) e (d) mostram a frequência absoluta do coeficiente de variação relativo.

Dividindo-se a população de pacientes em 3 grupos de acordo com o nível de expressão de *WT1*: nível baixo (até 0,4), nível médio (entre 0,4 e 1,7), nível alto (acima de 1,7), segundo os “cut-offs” que foram usados na análise prognóstica (item a seguir) e analisando a distribuição destes grupos em função do coeficiente de variação (**figura 13 a**), percebe-se que os maiores coeficientes de variação correspondem ao grupo de pacientes com médias abaixo de 0,4. Isto indica que o coeficiente de variação, quando alto, é mais associado ao fato da média ser baixa do que a um alto desvio, pois como se vê é o grupo de baixa expressão que tem o menor desvio (**figura 13 b**).

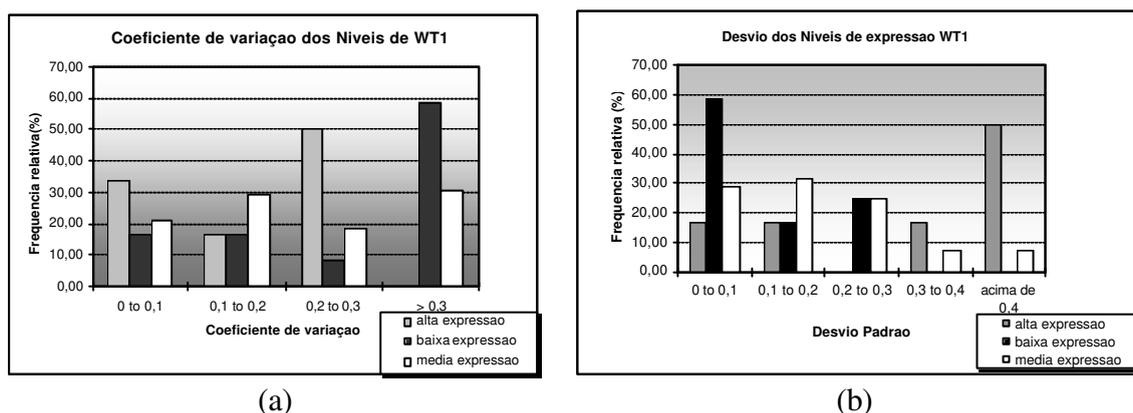


Figura 13: A variação dos grupos de expressão de *WT1*. (a) Gráfico mostrando os coeficientes de variação das 3 classes de expressão de *WT1* nas classes de coeficiente de 0 a 0.1, de 0.1 a 0.2, 0.2 a 0.3 e acima de 0.3; em cinza alta expressão, em preto baixa expressão e em branco média expressão (b) Gráfico mostrando os desvios das 3 classes de expressão de *WT1* nas classes de desvio 0 a 0.1, de 0.1 a 0.2, 0.2 a 0.3 , de 0,3 a 0,4 e acima de 0,4; em cinza alta expressão, em preto baixa expressão e em branco média expressão.

4.4 Análise prognóstica de variáveis aferidas ao diagnóstico

Tendo confirmado a repetibilidade do método desenvolvido para quantificação da expressão de *WT1*, iniciou-se análise estatística para verificar associação dos níveis de *WT1* com (i) variáveis aferidas ao diagnóstico e com a (ii) evolução clínica dos pacientes.

4.4.1 Associação dos níveis de *WT1* com variáveis aferidas ao diagnóstico.

Somente foram incluídos na análise pacientes de leucemia de novo, sem síndrome de Down, que não sofreram intervenção prévia.

Foram consideradas as seguintes variáveis clínicas ao diagnóstico: Dados demográficos (sexo, idade ao diagnóstico, raça), dados clínicos (contagem de glóbulos brancos no sangue, hemoglobina, plaquetas, número de blastos no sangue, % de blastos na medula, presença de cloroma, presença de leucemia no sistema nervoso central, número de leucócitos no líquido, proteína no líquido, presença de bastões de Auer nos blastos, ocorrência de síndrome mielodisplásica), classificação FAB, translocação cromossômica, grupo de risco (Alto risco ou Standard de acordo com Creutzig et al. (1999)).

A relação de *WT1* com as demais variáveis aferidas ao diagnóstico foi feita considerando-se *WT1* como variável contínua (testes de Mann–Whitney, Kruskal–Wallis ou correlação de Spearman) ou como variável dicotômica (teste exato de Fisher) usando “cut-off” de 0,4 (vide item a seguir).

De todas as variáveis analisadas, somente o subtipo FAB, a presença de translocações cromossômicas e a contagem plaquetária ao diagnóstico foram

significativamente associadas ao nível de expressão de *WT1*. A expressão de *WT1* na amostragem em função do subtipo FAB é ilustrada pela **Figura 14**:

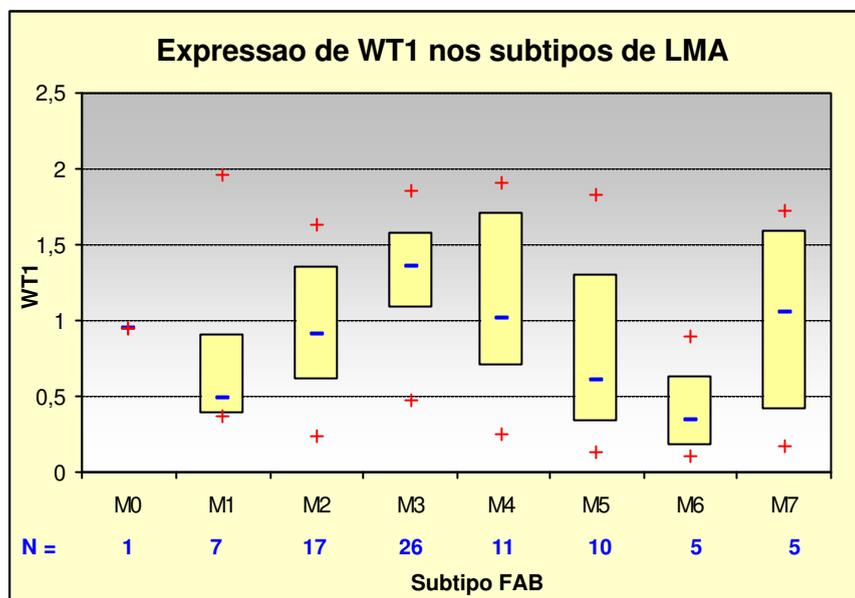


Figura 14: *Expressão de WT1 nos sete subtipos de LMA*. Cada “caixa” do “Whisker-plot” mostra a distribuição da expressão de *WT1* num subtipo FAB. As bases das “caixas” representam o valor do 25º percentil e o topo das “caixas” representam 75º percentil. O traço no meio das “caixas” representa a mediana. Os pontos de máximo e mínimo de cada subtipo são representados por cruces. O número de pacientes por subtipo é mostrado abaixo de cada um deles (N=). O subtipo M6 tem expressão significativamente menor que os demais subtipos ($p=0,004$) e o subtipo M3 tem expressão significativamente maior ($p=0,0003$).

A expressão de *WT1* nos subtipos não foi aleatória (Kruskal Wallis, $p=0,0025$), sendo que os menores níveis de expressão de *WT1* foram no subtipo M6 (Mann-Whitney $P=0,004$) e os maiores no subtipo M3 (Mann-Whitney, $P=0,0003$)

A alta expressão de *WT1* no subtipo M3 e o fato deste subtipo representar ~30% da população em estudo (26 pacientes) poderia mascarar a influência de alguma das outras variáveis, de forma que a análise estatística foi também feita excluindo o subtipo M3, deixando-nos um total de 56 pacientes cuja distribuição da expressão de *WT1* pode ser vista na **Figura 15**.

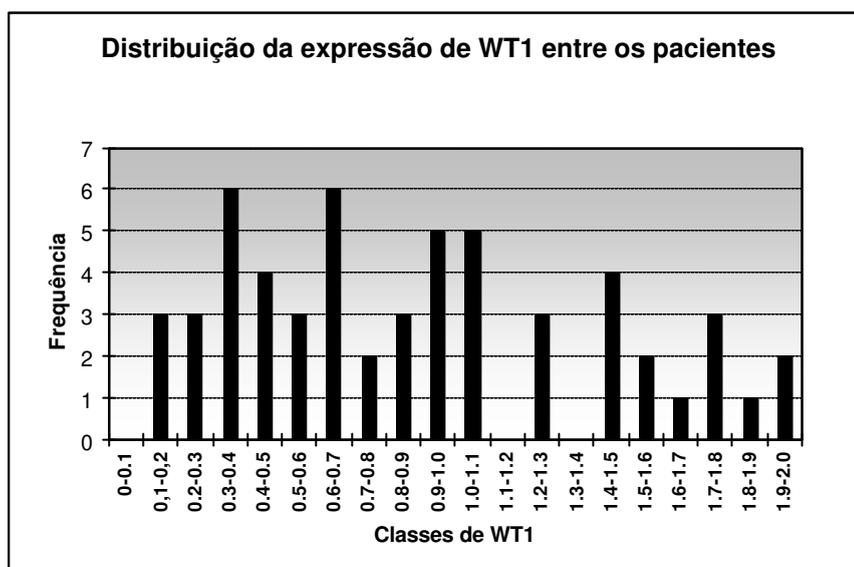


Figura 15: Distribuição da expressão *WT1* nos 56 pacientes analisados quanto à sobrevida. A expressão de *WT1* variou de 0,1 a 2,0 e foi dividida em 20 classes de intervalo 0,1.

A presença do rearranjo cromossômico $t(8;21)$ ou $inv(16)$ que ocorreu em 17 dos 56 casos analisados quanto as translocações disponíveis, foi significativamente associada a maiores níveis de *WT1* (média= $1,14 \pm 0,49$, $P= 0,014$, teste Kruskal-Wallis).

Quanto as demais variáveis clínicas, encontrou-se relação de *WTI* apenas com a contagem plaquetária: pacientes com número de plaquetas menor que 20.000 possuem níveis de *WTI* um pouco mais elevados (média=1,2±0,5, P= 0,027, teste Mann-Whitney) que os restantes (média= 0,83±0,49).

4.4.2 Associação dos níveis de *WTI* com evolução clínica dos pacientes.

Só foram analisados pacientes que seguiram o protocolo BFM-83 e que não sofreram intervenção prévia ou posterior de outros protocolos.

Dentre as 82 amostras analisadas 26 eram de LMA-M3 (Leucemia Promielocítica Aguda, LPA) e foram excluídas de qualquer análise prognóstica, pois a descoberta da droga ATRA (Huang et al., 1987, 1988) veio a alterar o protocolo de tratamento, aumentando significativamente a sobrevida do subgrupo M3.

A evolução clínica foi aferida pela resposta à indução e pela sobrevida. A resposta à indução foi avaliada pelo % blastos na medula no dia 15 (D15) e o alcance de remissão completa no final da indução (RC). A sobrevida foi avaliada de três maneiras: pela sobrevida global (SG) tempo do diagnóstico até o último seguimento; pela sobrevida livre de eventos (SLE) tempo entre o diagnóstico e a recaída ou último seguimento; pela sobrevida livre de leucemia (SLL) tempo entre a remissão até o último seguimento ou recaída.

Os pacientes foram divididos em 2 (ou 3) grupos de acordo com valores aleatórios de “cut-off” para *WTI*. A associação de *WTI* com a resposta à indução medida pela % blastos na medula do dia 15 e taxa de remissão foi analisada através de teste χ^2 e/ou exato de Fisher. A análise de sobrevida foi feita pelo método de Kaplan-Meier seguido de teste Log-Rank (Cox-Mantel) (vide Anexo I).

Não há associação entre níveis de *WT1* e resposta à indução, sendo esta última avaliada pela medula no dia 15 e a taxa de remissão. Por outro lado, pacientes com *WT1* menor que 0,4 (n=10) apresentam uma pior sobrevida, como pode ser visto nas **Figuras 16, 17 e 18**.

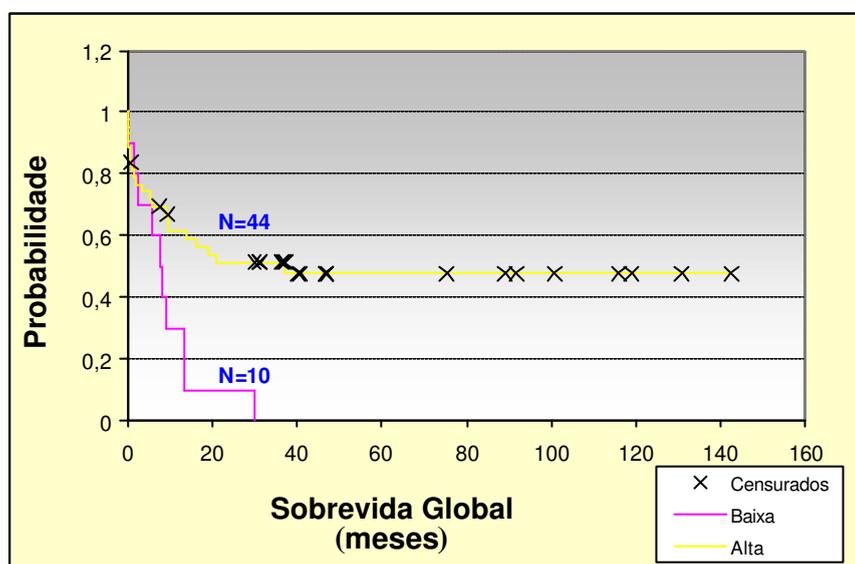


Figura 16: Análise de sobrevida global Kaplan-Meier. Análise de sobrevida global nos subgrupos de baixa expressão de *WT1* (em rosa) e alta expressão de *WT1* (em amarelo), definidos com um “cut-off” de 0,4. Os x mostram os pacientes censurados, representando tanto os pacientes que concluíram o tratamento durante o tempo do estudo e deixaram o hospital, quanto os pacientes que perderam seguimento. O número de pacientes por subgrupo é mostrado em azul.

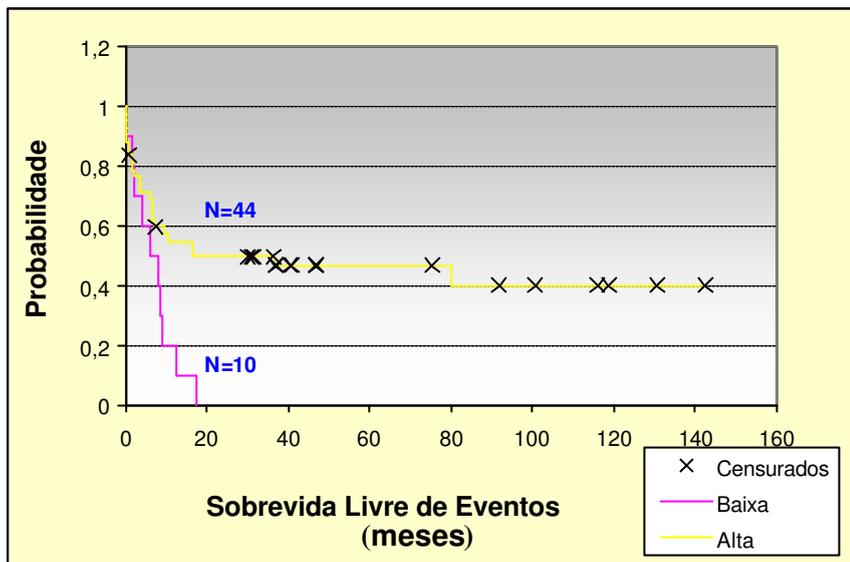


Figura 17: Análise de sobrevida livre de eventos Kaplan-Meier. Análise de sobrevida livre de eventos nos subgrupos de baixa expressão de *WT1* (em rosa) e alta expressão de *WT1* (em amarelo), definidos com um “cut-off” 0,4. Os x mostram os pacientes censurados, representando tanto os pacientes que concluíram o tratamento durante o tempo do estudo e deixaram o hospital, quanto os pacientes que perderam seguimento. O número de pacientes por subgrupo é mostrado em azul.

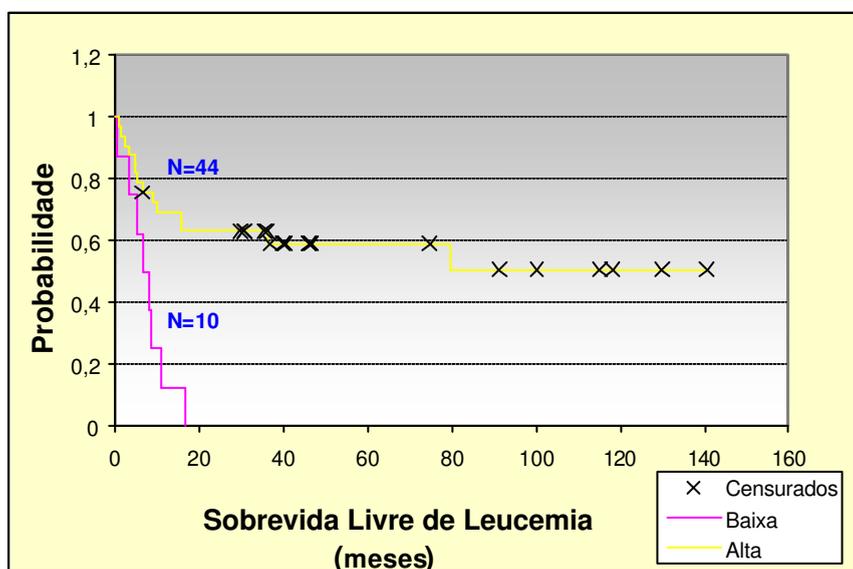


Figura 18: Análise de sobrevida livre de leucemia Kaplan-Meier. Análise de sobrevida livre de leucemia nos subgrupos de baixa expressão de *WT1* (em rosa) e alta expressão de *WT1* (em amarelo), definidos com um “cut-off” de 0,4. Os **x** mostram os pacientes censurados, representando tanto os pacientes que concluíram o tratamento durante o tempo do estudo e deixaram o hospital, quanto os pacientes que perderam seguimento. O número de pacientes por subgrupo é mostrado em azul.

As probabilidades de que estes resultados tenham sido encontrados ao acaso são: para Sobrevida Global $p=0,005$, para Sobrevida Livre de Eventos $p=0,011$, para sobrevida Livre de leucemia $p=0,0008$. Tais resultados mostram que níveis de *WT1* menor que 0,4 sejam indicativos de mau prognóstico.

Excluindo os casos com *WT1* menor que 0,4, e atribuindo novos “cut-off” para *WT1* (vide tabela, Anexo I), é possível destacar um grupo pequeno de 6 pacientes com níveis de *WT1* maior que 1,7 que apresentam uma maior sobrevida (dados não apresentados). Um número maior de pacientes seria necessário para confirmar este resultado. Interessante notar que os casos M3, que são na maioria de bom prognóstico têm nível médio alto de *WT1* ($1,33 \pm 0,34$).

As demais variáveis aferidas ao diagnóstico e sua relação com a taxa de remissão (RC) e com a sobrevida global (SG) estão sintetizadas na **tabela 4**. Tais variáveis não serão discutidas no presente trabalho, pois inicialmente elas não eram o objetivo principal do presente trabalho e por estarmos ainda fazendo o levantamento dos prontuários de um número muito maior de pacientes para que a análise seja de maior relevância.

	Remissão Completa					Sobrevida Global			
	n	(%)	RC (%)	P (chi quadrado)	Fisher	n	SG (%)	Erro Padrão	P
Sexo	51								
Feminino	24	47	79	0.835	0.713	26	34	10	0.251
Masculino	27	53	81			27	43	10	
Idade (anos)	51								
0-2	7	14	43	0.011		8	0	0	0.000
2-10	20	39	95			21	43	11	
10-18	24	47	79			24	47	11	
Raça	50								
Não branco	8	16	75	0.574	0.856	8	30	18	0.750
Branco	42	84	83			44	40	8	
WBC (mm3)	51								
<60000	35	69	89	0.030	0.039	37	47	8	0.029
>60000	16	31	63			16	13	11	
Hgl (g/dl)	51								
<9	32	63	94	0.002	0.003	32	42	9	0.188
>9	19	37	58			21	33	10	
Plaquetas (mm3)	51								
<50000	32	63	88	0.097	0.099	32	51	9	0.021
>50000	19	37	68			21	20	9	
Blastos SP	50								
<70	34	68	92	0.014	0.022	12	41	9	0.631
>70	16	32	79			40	36	12	
Blastos M. O.	50								
<80	24	48	96	0.007	0.008	24	40	10	0.301
>80	26	52	65			28	35	10	
Cloroma	48								
sim	5	10	80	0.833	0.811	5	20	18	0.325
não	43	90	84			45	40	8	
Doença S.N.C.	49								
sim	14	29	86	0.641	0.493	15	43	13	0.765
não	35	71	80			36	35	9	
Bastão de Auer	50								
sim	17	34	82	0.963	0.642	17	55	13	0.046
nao	33	66	82			35	31	8	
Leucorraquia	49								
<1	14	29	86	0.641	0.493	14	0	0	0.450
>1	35	71	80			37	44	8	
Proteinorraquia (mg/dl)	45								
<12	15	33	80	0.561	0.846	16	14	9	0.012
>12	30	67	87			31	49	9	
Alterações cromossômicas	50								
inv(16)	5	10	100	0.304		5	----	----	0.019
t(8,21)	11	22	91			11	61	15	
outras	5	10	60			5	30	24	
sem translocação	29	58	76			30	21	9	
com translocação	16	31	94	0.104	0.103	16	74	11	0.002
sem translocação	35	69	74			37	21	8	
Subtipos FAB	51								
M0	1	2	0	0.484		7	18	16	0.148
M1	5	10	100			17	44	13	
M2	17	33	82			10	69	15	
M3	0	0	----			9	44	17	
M4	10	20	80			4	0	0	
M5	9	18	78			5	20	18	
M6	4	8	75						
M7	5	10	80						
Blastos M. O. no dia 15	42								
0	20	48	100	0.049		21	64	11	0.007
<15%	16	38	81			16	41	13	
>15%	6	14	67			6	0	0	

Tabela 4: Relação das variáveis ao diagnóstico e o alcance de remissão ou Sobrevida global. A primeira coluna mostra o número total de pacientes analisados para cada variável e a segunda o seu percentual total na amostra. A terceira coluna evidencia o percentual de pacientes em cada variável que alcançaram remissão. A quarta e quinta coluna mostram a probabilidade da diferença ter se dado ao acaso pelo teste χ^2 e pelo teste exato de Fisher. A sexta coluna mostra o número total de pacientes analisados para sobrevida global em cada variável, a sétima coluna mostra o percentual de pacientes vivos e a oitava seu erro padrão. A última coluna mostra a probabilidade da diferença de sobrevida ter se dado ao acaso

Síntese das conclusões

* A expressão de WT1 depende do subtipo leucêmico ($p = 0,003$):

- O subtipo M3 tem níveis de expressão de WT1 significativamente mais altos que os demais subtipos ($p = 0,0003$)
- O subtipo M6 tem níveis de expressão de WT1 significativamente mais baixos que os demais subtipos ($p = 0,004$)

* Pacientes com número de plaquetas menor 20.000 têm maior expressão de WT1 ($p = 0,027$)

* Pacientes com tranlocações cromossômicas têm maior expressão de WT1 ($p = 0,014$)

* A expressão de WT1 não está associada ao alcance de remissão, porém :

Nossos resultados indicam que a baixa expressão de WT1 evidencia mau prognóstico nas LMAS pediátricas (expressão = 0,4 foi associada com) :

* Menor sobrevida global $p = 0,005$

* Menor sobrevida livre de eventos $p = 0,011$

* Menor sobrevida livre de leucemia $p = 0,0008$

4.5 O papel de *WT1* nas leucemias: supressor de tumores ou oncogene?

O papel exato de *WT1* nas leucemias e na hematopoiese normal ainda é fonte de muita controvérsia. Mas o fato de *WT1* estar aberrantemente expresso nas leucemias e de ser um fator de transcrição importante no desenvolvimento embrionário, também associado a diversos outros tipos de câncer sugere que *WT1* pode ter um papel importante na gênese e/ou progressão da leucemia e na hematopoiese normal.

Alguns estudos, onde a maioria dos pacientes eram adultos com LMA, associaram altos níveis de expressão do gene *WT1* em células leucêmicas a baixos níveis de remissão clínica completa (RCC) e a menor sobrevida livre de eventos (SLE) (Inoue et al., 1994; Bergmann et al., 1997). No nosso trabalho, em LMA da infância, encontramos que baixos níveis de *WT1* (e não altos níveis) estão associados com pior prognóstico.

Bergmann et al. (1997) reportaram a interação da proteína *WT1* selvagem com o proto-oncogene *BCL-2*, inibindo a morte celular em linhagens celulares de leucemias. Conclusão convergente a essa foi obtida por Yamagami et al. (1996) ao demonstrar que a inibição da síntese da proteína *WT1* inibe a proliferação de linhagens leucêmicas, de forma que baseados em resultados como estes, obtidos com técnicas de RNA anti-sense ou seleção de colônias estáveis transfectadas com *WT1*, alguns autores sugerem que *WT1* seria um regulador positivo da proliferação celular tendo portanto função de **oncogene**. Se isto é verdade, níveis altos de *WT1* poderiam mesmo estar associados a leucemias mais proliferativas e agressivas, de pior prognóstico.

Outros autores questionam as técnicas utilizadas na obtenção destes resultados dizendo que elas não são adequadas para detecção imediata de proliferação associada à expressão do gene e não permitem saber qual é o funcionamento normal de *WT1* uma vez que os experimentos sempre foram feitos com linhagens leucêmicas (Elissen et al., 2001)

Alguns estudos não acharam correlação entre a expressão de *WT1* e prognóstico (Gaiger et al., 1998, 1999), sugerindo que a alta expressão de *WT1* nas leucemias não passaria de reflexo do estágio maturacional dos clones leucêmicos uma vez que células imaturas normais (células progenitoras CD34⁺) também expressam o gene (Baird et al., 1997). Nesta hipótese *WT1* não teria papel algum no surgimento ou progressão da leucemia, mas seria um marcador molecular de células leucêmicas mais imaturas.

Por outro lado, o papel de *WT1* no tumor de Wilms é o de **supressor de tumores**. De forma semelhante ao que ocorre no desenvolvimento renal, no desenvolvimento normal da hematopoiese verifica-se que a diminuição da expressão de *WT1* em precursores hematopoiéticos é acompanhada de diferenciação celular (Sekyia et al., 1994; Maurer et al., 1997, Baird e Simmons, 1997).

Se *WT1* é um gene **supressor de tumor** também nas leucemias, seria contraditório que ele estimulasse a proliferação celular. De fato há muitos trabalhos apontando o gene *WT1* como indutor da diferenciação celular nas leucemias (Smith et al., 1998, 2000) e também em progenitores mielóides (Loeb et al., 2003).

Também em favor da teoria de *WT1* como gene **supressor de tumor**, Ellisen e et al (2001) demonstraram que células das linhagens leucêmicas HL-60 e U937 ou

células progenitoras normais CD34+ sob superexpressão de *WT1* têm uma parada de crescimento na fase G₁ e um aumento de diferenciação celular.

WT1 também parece estar envolvido na regulação negativa de vários fatores de crescimento celular como *PDGF* (Wang et al., 1993), na regulação de *IGF* (Drummond et al., 1992), e seu papel como repressor na regulação da *ciclina E* foi descrito, impedindo a progressão do ciclo celular (Loeb et al., 2002).

Desta maneira poderia se explicar que os baixos níveis de expressão de *WT1* estejam associados a pior sobrevida, como o presente trabalho corrobora. As discrepâncias em relação a trabalhos anteriores seriam decorrência de diferença populacional. No caso dos trabalhos de Inoue et al. (1994) e Bergman et al. (1997) a população estudada foi na sua grande maioria composta de adultos.

Pouco se sabe sobre as diferenças entre o câncer em adultos e em crianças, mas é notória a diferença de resposta ao tratamento deste dois grupos, sendo que as crianças portadoras de LMAs respondem melhor ao tratamento e têm maior sobrevida livre de eventos do que os pacientes adultos (Frei e Holland, 2001).

Existem diversas hipóteses tentando explicar esta evidência relacionando tanto à natureza vascular da medula quanto à biologia celular da leucemia. Uma das hipóteses sugere que a resposta ao tratamento estaria associada à grande capacidade de vascularização da leucemia infantil, permitindo boa penetração de quimioterápicos e evitando hipóxia, a qual diminui a eficácia da radio e quimioterapia. Outra hipótese está baseada no fato das leucemias infantis se originarem de células sanguíneas já “preparadas” para morrer e serem substituídas por outras mais maduras, isso facilitaria a atuação dos quimioterápicos no desencadeamento de caminhos normais da apoptose infantil (Kersey, 1997).

Sabe-se também que o padrão de expressão de muitos genes muda com estado fisiológico ou metabólico, e não seria a primeira vez que se notifica um gene com padrão de expressão diferente na infância e na vida adulta, como exemplifica o caso do gene *MDR1* cujos níveis de expressão parecem funcionar como fator de mau prognóstico nas LMAs de adultos, o mesmo não ocorrendo nas leucemias infantis (Steinbach et al., 2002).

Apenas um trabalho foi feito até hoje utilizando unicamente amostras infantis para determinar a capacidade de *WT1* como fator prognóstico nas LMAs (Trka et al., 2002). Porém, estes resultados são difíceis de serem comparados com os nossos por vários motivos.

Inicialmente, o protocolo de tratamento utilizado neste trabalho era diferente do nosso pois analisamos pacientes submetidos apenas ao protocolo BFM 83, enquanto o trabalho citado avaliou simultaneamente pacientes sujeitos a dois protocolos (o BFM 93 e o BFM 98). Sabe-se, porém, que um dado fator prognóstico pode só fazer sentido dentro do protocolo em que foi analisado, sendo dependente deste, como demonstram os trabalhos de Creutzig et al. (1990) e Wells et al. (2002).

Observa-se também que os resultados de Trka et al. (2001) são diferentes dos resultados obtidos por Inoue et al. (1994) e por Bergman et al. (1997), pois estes últimos reportaram que altos níveis de *WT1* estão associados a pior prognóstico nas LMA de adulto, enquanto que Trka et al apresenta um excelente prognóstico para 8 casos de LMA infantil com baixos níveis de *WT1*.

E para finalizar o trabalho de Trka et al. (2002) possuía um N total de 47 pacientes, e não dispunha de representantes do subgrupo M6, sendo este subgrupo

diretamente relacionado com a baixa expressão de *WT1*, segundo nossos resultados.

Esta ausência pode ter influenciado os resultados obtidos no trabalho citado.

BIBLIOGRAFIA

- Bain, Barbara J. Leukemia Diagnosis : a guide to FAB groups.1st ed: London:Gower Medical Publishing,1990. p.1-44.
- Baird, P.N., and Simmons, P.J. (1997).Expression of the Wilms'tumor gene (*WT1*) in normal hemopoiesis. *Exp. Hematol.* 25: 312-320
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., Sultan C. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML MO)Br J Haematol. 1991 Jul;78(3):325-9.
- Bennett, J.M., Catovsky, D. , Daniel, M. T. , Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976 Aug;33(4):451-458.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., Sultan C. A. Variant form of hypergranular promyelocytic leukaemia (M3). *Br J Haematol.* 1980 Jan;44(1):169-70
- Bennett, J.M., Catovsky D., Daniel, M.T., Flandrin G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia a report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med.* 1985 Oct;103(4):620-5.
- Bercovich, D., Regev, Z., Ratz T., Luder A. , Plotsky Y., Gruenbaum Y. (1999). Quantitative ratio of primer pairs and annealing temperatures affecting PCR products in dúplex amplification. *Biotechniques* 27: 762-770.
- Bergmann, L., Miething, C., Maurer, U., Brieger, J., Karakas, T., Weidmann, E., Hoelzer, D. (1997). High levels of Wilms' tumor gene (*WT1*) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood* 90: 1217-25.
- Brieger, J., Weidmann, E., Fenchel, K., Mitrou, P.S., Hoelzer, D., Bergmann, L.(1994). The expression of the Wilms' tumor gene in acute myelocytic leukemias as a possible marker for leukemic blast cells. *Leukemia* 8: 2138-43.
- Brieger, J., Weidmann, E., Maurer, U., Hoelzer, D., Mitrou, P.S., Bergmann L. (1995). The Wilms' tumor gene is frequently expressed in acute leukemias and may provide a marker for residual blast cells detectable by PCR. *Ann. Oncol.* 6: 811-6.
- Buckler, A.J., Pelletier, J., Haber D.A., Glaser, T., Housman, D.E. (1991). Isolation , characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (*WT1*) during kidney development. *Mol Cell Biol* 11:1707.
- Call, K.M., Glaser, T., Ito, C.Y., Buckler, A.J., Pelletier, J., Haber, D.A., Rose, E.A., Kral, A., Yeager, H., Lewis, W.H. (1990). Isolation and characterization of a zinc-

- finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60:509-520.
- Carapeti, M., Goldman, J.M., Cross, N.C.P. (1997). Dominant-negative mutations of the Wilm's tumour predisposing gene (*WT1*) are infrequent in CML blast crisis and de novo acute leukaemia. *Eur J Haematol* 58:346-349.
- Carrington, D. and Algar, E. (2000). Overexpression of murine *WT1* + / + and - / - isoforms has no effect on chemoresistance but delays differentiation in the K562 leukemia cell line. *Leuk Res* 24:927-36.
- Chang, M., Raimondi, S.C., Ravindranath, Y., Carroll, A.J., Camitta, B., Gresik, M.V., Steuber C.P., Weinstein H. Prognostic factors in children and adolescents with acute myeloid leukemia (excluding children with Down syndrome and acute promyelocytic leukemia): univariate and recursive partitioning analysis of patients treated on Pediatric Oncology Group (POG) Study 8821. *Leukemia*. 2000 Jul;14(7):1201-7.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid uanine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Cox, R. A. . 1968. The use of guanidine chloride in the isolation of nucleic acids. *Methods Enzymol.* 12:120-129.
- Creutzig, U., Ritter, J. and Schellong, G. Identification of two risk groups in childhood acute myelogenous leukemia after therapy intensification in study AML-BFM-83 as compared with study AML-BFM-78. AML-BFM Study Group. *Blood*. 1990 May 15;75(10):1932-40.
- Creutzig, U., Zimmermann, M., Ritter, J., Henze, G., Graf, N., Loffler, H., Schellong, G. Definition of a standard-risk group in children with AML. *Br J Haematol*. 1999 Mar;104(3):630-9.
- Drummond, I.A., Madden, S.L., Rohwer-Nutter, P., Bell, G.I., Sukhatme, V.P., Rauscher, F.J. 3rd. Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor *WT1*. *Science*. 1992 Jul 31;257(5070):674-8
- Ferrant, A. (1998). Therapeutic approach to acute myeloid leukemia. *Bull Mem Acad. R. Med. Belg.* 153:161.
- Dehbi, M. and Pelletier, J. (1996) PAX8-mediated activation of the *WT1* tumor suppressor gene *The EMBO journal*. Vol. 15 16:4297-4306.
- Ellisen, L.W., Carlesso, N., Cheng, T., Scadden, D.T., Haber, D.A. The Wilms tumor suppressor *WT1* directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *EMBO J*. 2001 Apr 17;20(8):1897-909
- Fraizer, G.C., Wu, Y.J., Hewitt, S.M., Maity, T., Ton, C.C., Huff, V., Saunders, G.F. (1994) Transcriptional regulation of the human Wilm's tumor gene (*WT1*). Cell type-specific enhancer and promiscuous promoter. *The journal of biological chemistry* 269:12:8892-8900.
- Frei, E.; Holland, J.F., Bast, R.,C., Kufe, D.W.; Pollock, R.E.; Weichselbaum, R.R. *Cancer Medicine*. 5th ed. Hamilton (Canada): BC Decker Inc; 2000, chapter 36.

- Freeman, W.M.; Walker, J. S and Kent, E. V. (1999). Quatitative RT-PCR: Pittfalls and potential.. *BioTechniques* 26:112-125.
- Foon, KA, Todd, R.F. 3rd. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood*. 1986 Jul;68(1):1-31
- Gaiger, A., Schmid, D., Heinze, G., Linnerth, B., Greinix, H., Kalhs, P., Tisljar, K., Priglinger, S., Laczika, K., Mitterbauer, M., Novak, M., Mitterbauer, G., Mannhalter, C., Haas, O.A., Lechner, K., Jager, U.. (1998). Detection of the *WT1* transcript by RT-PCR in complete remission has no prognostic relevance in de novo Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia* 12:1886-1894
- Gaiger, A. , Linnerth, B., Mann, G., Schmid, D., Heinze, G., Tisljar, K., Haas, O.A., Gadner, H., Lion, T. (1999). Wilms' tumour gene (*WT1*) expression at diagnosis has no prognostic relevance in childhood acute lymphoblastic leukaemia treated by an intensive chemotherapy protocol. *Eur J Haematol.* 63:86-93.
- Grier, H.E., Gelber, R.D., Camitta, B.M., Delorey, M.J., Link, M.P., Price, K.N., Leavitt, P.R., Weinstein, H.J. Prognostic factors in childhood acute myelogenous leukemia. *J Clin Oncol.* 1987 Jul;5(7):1026-32
- Guan, L.S., Rauchman, M. and Wang, Z.Y. (1998). Induction of Rb-associated protein (RbAp46) by wilms'tumor supressor gene WT1 mediates growth inhibition. *J. Biol. Chem.* 273:27047-27050
- Haber, D.A., Buckler, A.J., Glaser, T., Call, K.M., Pelletier, J., Sohn, R.L., Douglass, E.C., Housman, D.E.. (1990) An internal deletion within na 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor .*Cell* 61:1257-1269
- Haber, D.A., Sohn, R.L., Buckler, A.J., Pelletier, J., Call, K.M., Housman, D.E. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene *WT1*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Nov 1;88(21):9618-22
- Haber, D.A. and Buckler, A.J. (1992). A novel tumor suppressor gene inactivated in Wilms' tumor. *New Biol.* 4: 97.
- Halford, W.P. (1999). The essential prerequisites for quantitative RT-PCR. *Nature Biotechnonology* 17:835.
- Hewitt S.M., Hamada S, McDonnell TJ, Rauscher FJ 3rd, Saunders G.F. (1995). Regulation of the proto-oncogenes *bcl-2* and *c-myc* by the Wilms' tumor suppressor gene *WT1*. *Cancer Res.* 55: 5386.
- Hofmann, W., Royer, H., Drechsler, M., Schneider, S. & Royer-Pokora, B. (1993) Characterization of the transcriptional regulatory region of the human *WT1* gene. *Oncogene.* 8:3123-3132.
- Huang, M.E., Ye, Y.C, Zhao, L. Treatment of acute promyelocytic leukemia by retinoic acid with or without low dose cytosine arabinoside: report of 4 cases *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 1987 Jun;26(6):330-2, 380.
- Huang, M.E., Ye, Y.C., Chen, S.R., Chai, J.R., Lu, J.X., Zhoa, L., Gu, L.J., Wang ZY. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 1988 Aug;72(2):567-72
- Im, H.J., Kong, G., Lee, H. (1999). Expression of Wilms tumor gene (*WT1*) in children with acute leukemia. *Pediatr Hematol Oncol.* 16:109-18.

- Inoue, K., Ogawa, H., Sonoda, Y., Kimura, T., Sakabe, H., Oka, Y., Miyake, S., Tamaki, H., Oji, Y., Yamagami, T., Tatekawa, T., Soma, T., Kishimoto, T., Sugiyama, H., Inoue, K., Ogawa, H., Sonada, Y. et al. (1997). Aberrant overexpression of the Wilms' tumor gene (*WT1*) in human leukemia. *Blood* 89: 1405-12
- Inoue K, Ogawa H, Yamagami T, Soma T, Tani Y, Tatekawa T, Oji Y, Tamaki H, Kyo T, Dohy H, Hiraoka A. , Masaoka T, Kishimoto T, Sugiyama H.(1996). Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring *WT1* (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood* 88: 2267.
- Inoue, K., Sugiyama, H., Ogawa, H., Nakagawa, M., Yamagami, T., Miwa, H., Kita, K., Hiraoka, A., Masaoka, T., Nasu, K., (1994a). *WT1* as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 84: 3071.
- Inoue K., Sugiyama H., Ogawa H., Yamagami T., Azuma T., Oka Y., Miwa H., Kita K., Hiraoka A., Masaoka, T. (1994b). Expression of the interleukin-6 (IL-6), IL-6 receptor, and gp130 genes in acute leukemia. *Blood* 84: 2672.
- Kalwinsky, D.K., Raimondi, S.C., Schell, M.J., Mirro, J. Jr., Santana, V.M., Behm, F., Dahl, G.V., Williams, D. Prognostic importance of cytogenetic subgroups in de novo pediatric acute nonlymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 1990 Jan;8(1):75-83.
- Kaplan, E.L. and Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 53: 457-481.
- King-Underwood, L., Renshaw, J. and Pritchard-Jones, K. (1996). Mutations in the Wilms' tumor gene *WT1* in leukemias. *Blood* 87: 2171.
- Kitchin, P.A., Szotyori, Z., Fromholz, C. and Almond, N. (1990). Avoidance of false positives. *Nature* 344: 201.
- Kersey, J.H. Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. *Blood.* 1997 Dec 1;90(11):4243-51.
- Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman D., Jaenisch, R. *WT-1* is required for early kidney development. *Cell.* 1993 Aug 27;74(4):679-91
- Lee, S.B., Huang, K., Palmer, R., Truong, V.B., Herzlinger, D., Kolquist, K.A., Wong, J., Paulding, C., Yoon, S.K., Gerald, W., Oliner, J.D., Haber, D.A.(1999) The Wilms tumor suppressor *WT1* encodes a transcriptional activator of *amphiregulin*. *Cell* 98:663-673.
- Lee, S.B. and Haber D.A. (2001) Wilms tumor and the *WT1* gene. *Experimental Cell Research* 264: 74 - 99
- Lion, T. Kidd, V. (1998) Appropriate controls for RT-PCR. *Leukemia* 12:1893-1993.
- Little, M.H., Prosser, J., Condie, A., Smith, P.J., Van Heyningen, V., Hastie, N.D.(1992). Zinc Fingerpoint mutations within the *WT1* gene in Wilms tumor patients. *Proc.Natl.Acad.Sci.*89:4791-4795.
- Little, M., Holmes, G. and Walsh, P. *WT1*: what has the last decade told us? *Bioessays.* 1999 Mar;21(3):191-202.

- Loeb, D.M., Korz, D., Katsnelson, M., Burwell, E.A., Friedman, A.D., Sukumar, S. Cyclin E is a target of WT1 transcriptional repression. *J Biol Chem.* 2002 May 31;277(22):19627-32
- Loeb, D.M., Summers, J.L., Burwell, E.A., Korz, D., Friedman, A.D, Sukumar, S. An isoform of the Wilms' tumor suppressor gene potentiates granulocytic differentiation. *Leukemia.* 2003 May;17(5):965-71
- Mantel, N. (1966). Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother. Rep.* 50: 163-170.
- Maurer, U., Brieger, J., Weidmann, E., Mitrou, P.S., Hoelzer, D., Bergmann, L. (1997). The Wilms' tumor gene is expressed in a subset of CD34+ progenitors and downregulated early in course of differentiation in vitro. *Exp. Hematol.* 25: 945.
- Menssen, H.D., Renkl, H.J., Rodeck, U., Maurer, J., Notter, M., Schwartz, S., Reinhardt, R., Thiel, E. (1995). Presence of the Wilms' tumor gene (*WT1*) transcripts and the *WT1* nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* 9: 1060.
- Menssen, H.D., Renkl, H.J., Rodeck, U., Maurer, J., Notter, M., Schwartz, S., Reinhardt, R., Thiel, E. (1997). Detection by monoclonal antibodies of the Wilms' tumor (*WT1*) nuclear protein in patients with acute leukemia. *Int. J. Cancer* 70: 518.
- Nara, N. (1998). Proliferation and differentiation of leukemic cells in acute myelocitic leukemia. *Rinsho Byori* .46:424.
- Niegemann, E., Wehner, S., Kornhuber, B., Schwabe, D., Ebener, U. (1999). *wt1* gene expression in childhood leukemias. *Acta Haematol.* 102:72-6.
- Ogawa, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.* 1993 Jun 1;81(11):2844-53.
- Ozgen, U., Anak, S., Ozbek, U., Sarper, N., Eryilmaz, E., Agaoglu, L., Devecioglu, O., Yalman, N., Gedikoglu, G. (2000). *wt1* gene expression in childhood acute leukemias. *Acta Haematol.* 103:229-30.
- Park, S., Schalling, M., Bernard, A., Maheswaran, S., Shipley, G.C., Roberts, D., Fletcher, J., Shipman, R, Rheinwald, J., Demetri, G., et al. The Wilms tumour gene WT1 is expressed in murine mesoderm-derived tissues and mutated in a human mesothelioma. *Nat Genet.* 1993 Aug;4(4):415-20
- Pelletier, J., Schalling, M., Buckler, A.J., Rogers, A., Haber, D.A., Housman, D. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev.* 1991 Aug;5(8):1345-56
- Peto, R., Pike, M.C., Armitage, P., Breslow, N.E., Cox, D.R., Howard, S.V., Mantel, N., McPherson, K., Peto, J., Smith, P.G. (1977). Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. Analysis and examples. *Br. J. Cancer* 35: 1-39.
- Pui, C.-H. (1995). Childhood leukemias. *N Engl. J. Med.* 332: 1618.
- Ravindranath, Y., Abella, E., Krischer, J.P., Wiley, J., Inoue, S., Harris, M., Chauvenet, A., Alvarado, C.S., Dubowy, R., Ritchey, A.K., et al Acute myeloid leukemia (AML) in Down's syndrome is highly responsive to chemotherapy: experience on Pediatric Oncology Group AML Study 8498. *Blood.* 1992 Nov 1;80(9):2210-4

- Reddy, J.C. and Licht, J.D. (1996). The Wilms' tumor suppressor gene: How much do we really know? *Biochem. Biophys. Acta* 1287: 1.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):105-11
- Rupprecht, H.D., Drummond, I.A., Madden, S.L., Rauscher, F.J. 3rd, Sukhatme, V.P. The Wilms' tumor suppressor gene WT1 is negatively autoregulated. *J Biol Chem*. 1994 Feb 25;269(8):6198-206.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, ed 2. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Severson, R .K., and Ross, J. A. .The causes of acute leukemia. *Curr Opin Oncol* .11:20.
- Kitchin, P.A., Szotyori, Z., and Fromholz, C. and Almond, N. (1990). Avoidance of false positives. *Nature* 344: 201.
- Singh, R. P., Nie, X., and Singh, M. (2000). Duplex RT-PCR: reagent concentrations at reverse transcription stage affect the PCR performance.
- Smith, S.I., Weil, D., Johnson, G.R., Boyd, W. and Li, CL. (1998). Expression of the Wilm's Tumor suppressor gene, 1, is upregulated by Leukemia Inhibitory factor and induces monocytic differentiation in M1 leukemic cells. *Blood*, vol. 91 3:764-773.
- Smith, S.I., Down, M., Boyd, A.W., Li, C.L. Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, reduces the tumorigenicity of the leukemic cell line M1 in C.B-17 scid/scid mice. *Cancer Res*. 2000 Feb 15;60(4):808-14
- Soutar, R. L., Dillon, J., Ralston, S.H. (1997), Control genes for reverse-transcription-polymerase chain reaction: a comparison of beta actin and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *British Journal of haematology* 97:239-251.
- Spencer, W.E., Christensen, M. J. (1999). Multiplex relative RT-PCR method for verification of differential gene expression . *BioTechniques* 27:1044.
- Steinbach, D., Furchtbar, S., Sell, W., Lengemann, J., Hermann, J., Zintl, F., Sauerbrey, A. Contrary to adult patients, expression of the multidrug resistance gene (MDR1) fails to define a poor prognostic group in childhood AML. *Leukemia*. 2003 Feb;17(2):470-1.
- Till, J.E., McCulloch, E.A. Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 1980 Nov 26;605(4):431-59.
- Trka, J., Kalinova, M., Hrusak, O., Zuna, J., Krejci, O., Madzo, J., Sedlacek, P., Vavra, V., Michalova, K., Jarosova, M., Sary, J.; For Czech Paediatric Haematology Working Group. Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia*. 2002 Jul;16(7):1381-9.
- VonStein, O.D.; Thies, W.G. e Hofmann, M. (1997). A high- throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucl Acids Res*. 25 : 2598-2602.
- Wang, Z.Y., Qiu, Q.Q., Deuel, T.F. The Wilms' tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. *J Biol Chem*. 1993 May 5;268(13):9172-5

- Webb, D.K., Harrison, G., Stevens, R.F., Gibson, B.G., Hann, I.M., Wheatley, K.; MRC Childhood Leukemia Working Party. Relationships between age at diagnosis, clinical features, and outcome of therapy in children treated in the Medical Research Council AML 10 and 12 trials for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001 Sep 15;98(6):1714-20.
- Wells, R.J., Arthur, D.C., Srivastava, A., Heerema, N.A., Le Beau, M., Alonzo, T.A., Buxton, A.B., Woods, W.G., Howells, W.B., Benjamin, D.R., Betcher, D.L., Buckley, J.D., Feig, S.A., Kim, T., Odom, L.F., Ruymann, F.B., Smithson, W.A., Tannous, R., Whitt, J.K., Wolff, L., Tjoa, T., Lampkin, B.C. Prognostic variables in newly diagnosed children and adolescents with acute myeloid leukemia: Children's Cancer Group Study 213. *Leukemia*. 2002 Apr;16(4):601-7.
- Wheatley, K., Burnett, A.K., Goldstone, A.H., Gray, R.G., Hann, I.M., Harrison, C.J., Rees, J.K., Stevens, R.F., Walker, H. A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. *Br J Haematol*. 1999 Oct;107(1):69-79.
- Wu, Y., Fraizer, G.C. and Saunders, G.F. (1995) GATA-1 Transactivates the *WT1* hematopoietic specific enhancer. *Journal of Biological chemistry*. 270:11:5944-5949.
- Yamagami, T., Sugiyama, H., Inoue, K., Ogawa, H., Tatekawa, T., Hirata, M., Kudoh, T., Akiyama, T., Murakami, A., Maekawa, T. (1996). Growth inhibition of human leukemic cells by wt-1 antisense oligodeoxynucleotides: Implications for the involvement of WT-1 in leukemogenesis. *Blood* 87: 2878.
- Zhang, X., Xing, G., Saunders, G.F. Proto-oncogene N-myc promoter is down regulated by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Anticancer Res*. 1999 May-Jun;19(3A):1641-1648.

Anexo I: Tabela de “cut-offs” testados para WT1

Cut-Off de WT1	# Pacientes com baixa expressao	# Pacientes com alta expressao	Chi-Sq		Log-rank test		
			D15 P	CR P	SG P	SLE P	SLL P
0.3	6	50	0.58	0.98	0.04	0.06	0.01
0.4	12	44	0.32	0.97	0.00	0.01	0.00
0.5	16	40	0.77	0.66	0.04	0.08	0.02
0.6	19	37	0.59	0.92	0.05	0.10	0.07
0.7	25	31	0.53	0.93	0.04	0.03	0.02
0.8	27	29	0.57	0.72	0.17	0.15	0.09
0.9	30	26	0.66	0.94	0.14	0.13	0.09
1	35	21	0.57	0.13	0.02	0.03	0.17
1.1	40	16	0.96	0.39	0.05	0.04	0.17
1.2	40	16	0.96	0.39	0.05	0.04	0.17
1.3	43	13	0.73	0.21	0.04	0.02	0.16
1.4	43	13	0.73	0.21	0.04	0.02	0.16
1.5	47	9	0.87	0.10	0.04	0.03	0.29
1.6	49	7	0.94	0.16	0.03	0.02	0.21
1.7	50	6	0.97	0.20	0.02	0.01	0.12
1.8	53	3	0.32	0.38	0.15	0.13	0.66
1.9							
Excluindo os menores de 0,4							
0.7	13	31	0.16	0.90	0.45	0.29	0.32
0.8	15	29	0.17	0.65	0.95	0.74	0.73
0.9	18	26	0.47	0.92	0.72	0.57	0.65
1	23	21	0.62	0.10	0.16	0.14	0.87
1.1	28	16	0.87	0.36	0.24	0.14	0.68
1.2	35	9	0.88	0.09	0.10	0.07	0.72
1.6	37	7	0.87	0.15	0.07	0.05	0.51
1.7	38	6	0.87	0.19	0.04	0.02	0.28
1.8	41	3	0.23	0.38	0.20	0.18	0.95

Dividindo em 3 grupos

Cut-offs	# Pacientes com baixa expressao	# Pacientes com media expressao	# Pacientes com alta expressao					
				D15 P	CR P	SG P	SLE P	SLL P
0 / 0,4 / 1,6 / 2	12	37	7	0.64	0.36	0.01	0.01	0.00
0 / 0,4 / 1,7 / 2	12	38	6	0.65	0.43	0.00	0.01	0.00
0 / 0,4 / 1,8 / 2	12	41	3	0.30	0.68	0.01	0.02	0.00
0 / 0,5 / 1,6 / 2	16	33	7	0.96	0.27	0.03	0.04	0.07
0 / 0,5 / 1,7 / 2	16	34	6	0.95	0.33	0.02	0.03	0.053