



EXPOSIÇÃO DO RUNX1 E CEBPA COMO MARCADORES MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DA LEUCEMIA MIELOÍDE AGUDA

CARLA MOTA DA SILVA; AYSLAN CARVALHO DE MELO

RESUMO

A Leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença caracterizada pela proliferação de células mieloides de forma desordenada, causando heterogeneidade em sua morfologia, podendo acometer a nível molecular também. Tudo isso ocorre devido a um bloqueio na diferenciação celular. A avaliação dos marcadores moleculares tem importância para a identificação do tipo de gene que foi afetado e assim descobrir uma forma de tratamento adequado ao paciente. A incidência de casos em sua maioria ocorre em idosos e crianças, podendo afetar adultos também, porém com uma prevalência menor. Com o decorrer dos anos, os métodos de diagnóstico têm evoluído muito, ficando cada vez mais sofisticados e precisos, porém ainda com valores exorbitantes. **Objetivos:** Analisar marcadores moleculares da LMA e apresentar seus métodos diagnósticos para mostrar sua abrangência e dar ideia para novas metodologias acessível para população. **Metodologia:** Esta é uma revisão bibliográfica de literatura utilizando os seguintes bancos de dados de pesquisa: Sciencedirect e PubMed. A pesquisa foi limitada a artigos publicados entre os anos de 2015 a 2021. **Resultados:** A descoberta dessa neoplasia e qual gene que afeta é necessário, pois através dela pode-se descobrir novos métodos diagnósticos específicos que irão desvendar a mutação a nível molecular. Dessa forma foi visto que em 565 pacientes, foram para análise genética 429 e sendo encontrados mutações para CEBPA (61,1%) e RUNX1(31,3%). Visto que esses pacientes apesar terem melhor diagnóstico tem mais chances de recidiva, sendo mais atenção. Por meio das técnicas moleculares de RT-qPCR, FISH e Sanger pode-se analisar o tipo específico de leucemia ou acompanhar no caso de remissão. As demais técnicas utilizadas, podem verificar a nível de antígeno como o Imunohistoquímico, Imunocitoquímica e Imunofenotipagem. **Conclusão:** Portanto, de acordo com a sensibilidade de cada um desses métodos podem ter uma função importante em diagnósticos de forma específica, enquanto outros necessitam de uma destreza para a interpretação do laudo. Assim, sendo utilizado para auxiliar no acompanhamento do paciente, as técnicas apresentadas visam o diagnostico rápido para um tratamento mais eficaz.

Palavras-chave: Análise molecular, Medula óssea, Mutação, Oncohematologia, Recidiva.

1 INTRODUÇÃO

Segundo os autores Zago *et al.* (2013), segundo autores, a leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença precursora de células hematopoiéticas, cujo causa diversas alterações morfológicas e moleculares, assim causando heterogeneidade delas. Entre as leucemias, é uma das mais agressivas devido ao grande número de células jovens que a medula óssea passa a produzir, causando apoptose das células ou até mesmo o bloqueio da diferenciação celular. Martins e Falcão

(2000) explicam que geralmente a LMA afeta mais os adultos, em cerca de 80%, enquanto em crianças tem uma taxa mais baixa, chegando a 20% dos casos. De acordo com Zago *et al.* (2013), os sintomas mais comuns são: fadiga, fraqueza e palidez, podendo ocorrer devido a anemia que também pode gerar nesse paciente. Porém como essa anemia é devido a um câncer, não afeta os níveis de hemoglobina, pois só afeta diretamente suas células geneticamente. Diante disso existem diversos tipos de LMA que afetam genes diferentes.

Newell e Cook (2021), o fator ambiental como exposição à radiação atômica também pode ser outro fator de risco importante. Moradores de Hiroshima e Nagasaki expostos a radiação e que sobreviveram no final da Segunda guerra mundial, aumentaram os riscos de desenvolvimento da LMA e consequentemente diminuíram sua expectativa de vida. Mesmo após 55 anos, ainda surgem casos da neoplasia relacionados à exposição da bomba nuclear. Para o diagnóstico é utilizado amostras do aspirado de medula óssea, sangue periférico ou biópsia de MO e realiza-se eletroforese capilar PCR semiquantitativa para avaliação genética, enquanto a citometria de fluxo é utilizada após o término do tratamento que será avaliado o nível de remissão da patologia.

Segundo a Swerdlow *et al.* (2017) escritores da OMS, a classificação das neoplasias mieloides se dá através da análise morfológica das células, sendo realizada aspirados de medula óssea ou coleta do sangue periférico, para obter qual a porcentagem de blastos, sua maturação e grau em que o paciente está naquele momento. E o diagnóstico é feito através da imunofenotipagem, imunocitoquímica, citogenético e estudos moleculares para a verificar o tipo de linhagem, qual sua possível progressão. É salientado também que sua variabilidade diagnóstica é muito grande e com isso a forma de tratamento muda de paciente para paciente, menos de 50% dos casos sobrevivem e entre os idosos somente 20% vivem por volta dos dois anos após a descoberta da patologia.

Salvaro *et al.* (2019) de acordo com os autores a média de casos de LMA em idosos é acima dos 60 anos, e segundo eles o sexo masculino teve a maior predominância de casos em relação ao sexo feminino, principalmente logo após os 50 anos de idade. Segundo Schilithz *et al.* (2020), os dados estatísticos do INCA acerca do número de novos casos de leucemia por ano, chegam em torno de 5.920 para homens e 4.890 para mulheres, sendo assim são 5,67 novos casos (homens) e 4,56 (mulheres) a cada 100 mil habitantes. Segundo Infante *et al.* (2017), o diagnóstico LMA ocorre de acordo com a alteração genética, afetando fatores epigenéticos, de poro nuclear ou até fatores da transcrição hematopoiética. O trabalho se destaca por produzir a importância dos marcadores moleculares, levantar informações sobre alguns tipos de biomarcadores genéticos, discutir a importância do diagnóstico precoce e prognóstico da LMA, utilizando dos artigos para revisão de literatura e dos métodos de rastreio dos marcadores moleculares utilizados no tratamento dos pacientes oncológicos.

2 METODOLOGIA

A presente pesquisa foi fundamentalmente produzida a partir de artigos publicados em bancos de dados oficiais, sendo realizada de forma descritiva e independente. Resume-se que foi possível realizar a análises de tópicos sobre as características, epidemiologia, métodos diagnósticos e prognósticos sobre o tema. Os dados metodológicos consistiram em revisão bibliográfica integrativa da literatura, sendo pesquisados através dos bancos de dados do PubMed e ScienceDirect, em seus respectivos descritores foram utilizados em inglês os seguintes termos e o auxílio de operações booleanas (AND): Acute leukemia myeloid, diagnosis, RUNX1, CEBPA, FLT3, NPM1. Os artigos pesquisados são datados entre os anos de 2015 a 2021, aos demais artigos com suas publicações anteriores a esses anos foram utilizados para construção de conceitos sólidos e estabelecidos na literatura científica a respeito dos marcadores moleculares da LMA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Conforme a literatura de Zago *et al.* (2013), a leucemia mieloide aguda (LMA) é uma desordem genética que afeta as células hematopoiéticas na medula óssea, causando a heterogeneidade das células, ou seja, nessa neoplasia ocorre uma proliferação exacerbada de blastos, que são células imaturas sem funcionalidade. Essa disfunção nas células da linhagem mieloide pode causar baixa imunidade e anemia devido serem de mesma linhagem, a medula óssea passa trabalhar de forma descompensada, causando também uma baixa produção de hemácias. Visto que alguns tipos podem causar e pode afetar outros órgãos e tecidos.

Brown *et al.* (2020), argumentam que o RUNX1 e CEBPA são marcadores de mutações plaquetárias e ambos têm uma predisposição para desenvolver uma LMA, os pacientes com média dos 20 anos são os que mais apresentam casos, chegando a cerca de 40%. Os fatores de transcrição são os principais reguladores da hematopoese, o RUNX1 quando codifica um fator de transcrição mieloide chega a apresentar falha e o interrompimento da hematopoese. Kayser e Levis (2019) complementam que o RUNX1 é uma mutação que pode ser exclusiva do CEBPA, NPM1 e RUNX1-RUNX1T1. Os autores relataram que de acordo com a OMS, as mutações monoalélicas e seus padrões distintos com a expressão gênica em casos raros de doença plaquetária tem predisposição a desenvolver LMA, assim salientam que a doença pode acontecer provisoriamente, porém excluindo os casos com mielodisplasia, sendo assim adicionado à sua classificação atual.

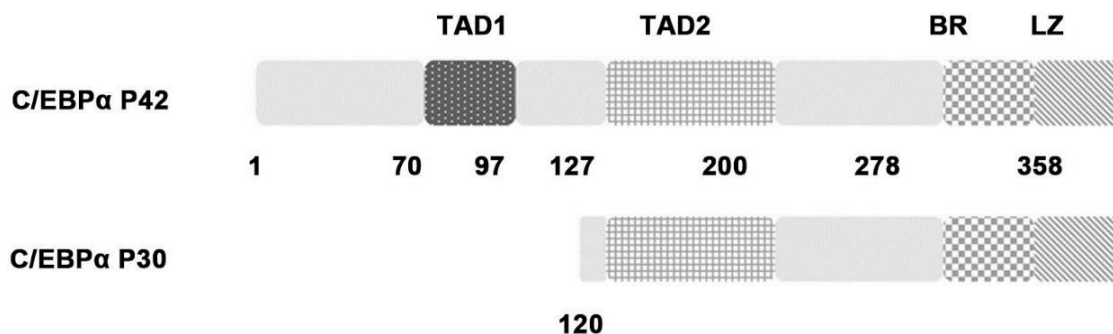
Lachowiez *et al.* (2021) relatam que o RUNX1 (*Runt-related transcription factor 1*) é um codificador da transcrição mielóide que é essencial para o desenvolvimento da diferenciação, ele afeta cerca de 30% dos pacientes com síndrome mielodisplásica em seu histórico familiar e seus entes que desenvolvem chegam de 30% a 40% deles que apresentam essa neoplasia. Essa mutação pode afetar o desenvolvimento plaquetário, é um caso considerado raro, porém pode ocorrer e desenvolver um distúrbio mieloide maligno. Essa mutação é desenvolvida em vias de ativação, alelos alternativos do RUNX1, genes que foram frequentemente mutados ou até mesmo nas mutações somáticas.

Gao *et al.* (2019), corroboram que o RUNX1 se localiza no cromossomo 21q22, é encarregado de codificar a subunidade do complexo do fator de ligação ao núcleo. Existe uma variedade de mutações que podem ser por transativação, deleções ou mutações sem sentido, semelhante ao que ocorre com o CEBPA. Entretanto, a mutação ainda é desconhecida em sua linhagem germinativa. Durante a mutação eles se agrupam na região terminal C causando a interrupção da ligação ao DNA, no terminal C é afetado com menos frequência deixando ligado ao DNA, porém, mantém o domínio de transativação sem função alguma.

Tawana *et al.* (2017), explanam que o CEBPA é uma alfa-proteína com importante função de mediar a maturação granulocítica e pertence à família dos fatores transcrição 6, também faz parceria com outros marcadores a exemplo do RUNX1. A mutação se apresenta em 10 a 15% dos casos, em sua maioria tem seu cariótipo normal. É localizado no cromossomo 19q13.1, tem duas isoformas que são o 30kDa e 42kDa. Os fatores de transcrição têm o poder de potencializar os elementos que são fatores de mudança epigenética, facilitando o acesso a cromatina, desse modo permite a regulação ordenada do gene de transcrição. Mendonza *et al.* (2021), reforçam que a mutação do CEBPA é encontrada em 7 a 16% nos adultos e 4 a 15% em pacientes pediátricos. Gao *et al.* (2019) dissertam que o CEBPA é um gene responsável por codificar a proteína pertencente aos fatores de transcrição do zíper de leucina, essa molécula também é encarregada pela ligação da proteína potenciadora do CCAAT.

Song *et al.* (2015), complementam que durante as mutações de deslocamento ocorre a separação do N-terminal da proteína p42 e preserva a p30, na região C-terminal ocorre deleções ou

inserções nessa estrutura, isso é o suficiente para romper a ligação ao DNA devido ao rompimento da região básica da estrutura do zíper. Gao *et al.* (2019), complementam que seus domínios de transativação, o TAD1 que é responsável pela ligação ao DNA e o TAD2 é região de dimerização (faz ligação covalente entre timinas adjacentes) no zíper de leucina. E reforça que a região N-terminal quando ocorre mutação sem sentido, causam separação da proteína 42kDa de tipo selvagem, formando uma isoforma da 30kDa mutada que não possui a região do TAD1, somente



o TAD2. Assim, deixando as inserções ou deleções da região Terminal C em sua estrutura causar rompimento do zíper e danificar a dimerização do DNA, como mostrado na figura 1.

Figura 1: Apresentação das duas isoformas do CEBPA. Fonte: Song *et al.* (2015)

Narayanam e Weinberg (2019) corroboram que é de suma importância a identificação de anormalidades moleculares tanto para o diagnóstico quanto para o prognóstico, pelo fato de a LMA ter várias classificações, como o RUNX1 e CEBPA que é sua detecção pode estar associado a uma predisposição hereditária e por isso é necessário um rastreamento genético de seus familiares também dessa análise. Ainda discorrem que para o diagnóstico da LMA é necessário de $\geq 20\%$ de blastos ou através da detecção de anormalidades citogenéticas. No caso dos blastos é utilizado a contagem diferencial para verificação da morfologia, podendo ser encontrados blastos monoblástico ou promonocítico, megacarioblastos e até mesmo eritroblastos (que é encontrado em LMA com diferenciação monocítica ou na leucemia eritroblástica pura). A OMS classifica as LMA através da análise das anormalidades citogenéticas e suas mutações, sendo utilizado dos estudos através do FISH, painéis genéticos e Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa que é utilizada para identificar subtipos de LMA através da transcrição das proteínas de fusão.

Narayanam e Weinberg (2019), os materiais utilizados são aspirados e biópsia de medula óssea (MO) e amostras de sangue periférico. No caso de coleta inadequada ou insuficiente de material é solicitado uma biópsia ou aspirado de medula óssea. A imunofenotipagem é muito utilizada para identificação da linhagem dos blastos, para essa técnica são manipuladas a amostras de aspirado ou biópsia da MO. Na citometria de fluxo pode ser utilizado o sangue periférico se não for suficiente o aspirado de medula óssea, esse estudo ajuda a verificar a porcentagem que a MO tem se envolvido para desenvolver a LMA. Ele também é empregado no acompanhamento dos pacientes, para verificar a evolução da neoplasia. E seu diagnóstico será mais favorável principalmente para o gene RUNX1, pois ele é adequado para o estudo de translocação de proteínas de fusão. Silva *et al.* (2018) complementam que no aspirado de medula óssea podem ser encontrados diferentes linhagens dos blastos, se apresentam normocíticas granulocíticas e com megacariócitos hipocelulares, micromegacariócitos hipobulados apresentando localização anormal de seus precursores imaturos, no geral a contagem de blastos chega a 2,4%. Na citometria de fluxo são analisadas as linhagens granulocíticas, é revelado nela uma dispersão lateral da expressão dos antígenos CD16, CD13 e CD10, apresentando expressão anormal do CD56, CD7 na

subpopulação positiva do CD117.

Narayanam e Weinberg (2019), o RT-PCR será necessário para analisar o tipo de LMA de forma tanto quantitativa, quanto qualitativa. Será utilizado para avaliação da transcrição das proteínas de fusão e terá utilidade para avaliar a translocação RUNX1- RUNX1T1. Kayser e Levis (2019), acrescentam que a incidência de pacientes com LMA citogeneticamente normais tem uma porcentagem de 8% em jovens e 16% em pacientes mais velhos, esse diagnóstico vai aumentando em pacientes com idade mais avançada. Nos casos de mutação com risco citogenético intermediário, a prevalência vai de 5,6% a 13,2%. George e Bajel (2021), explanam que o diagnóstico do RUNX1 é feito através das análises do aspirado de medula óssea, podendo ser encontrado uma grande aglomeração de blastos, no Imunohistoquímico não apresenta displasia o apresenta normalidade no CD34. Na figura 2 está a representação dos subtipos da LMA e os exames necessários para cada diagnóstico.

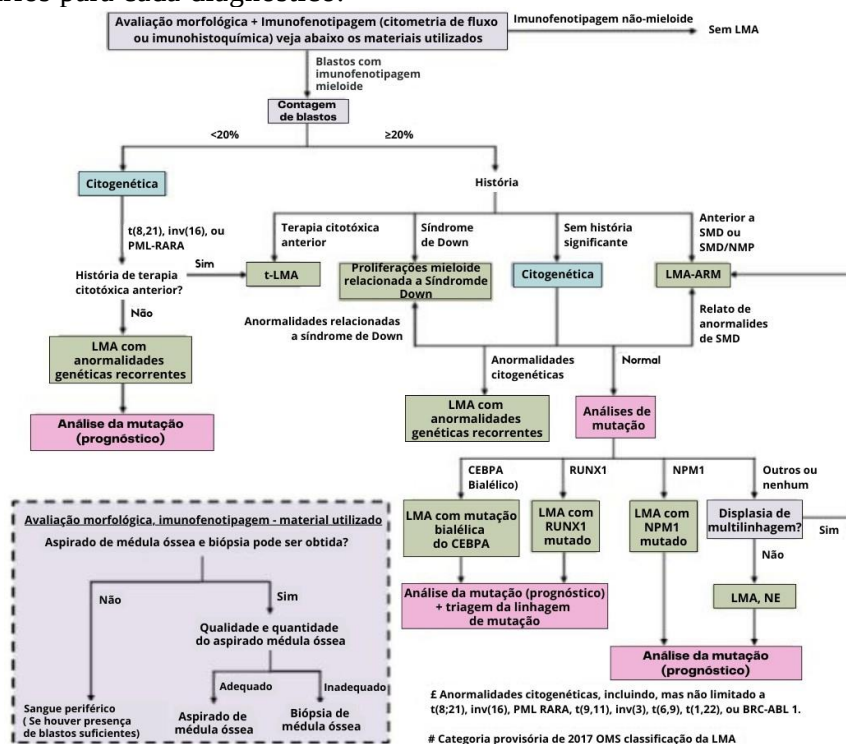


Figura 2: Apresentação dos subtipos de LMA. Fonte: Narayanam e Weinberg (2019)

Pollyea *et al.* (2020), segundo eles foram analisadas amostras de 565 pacientes, dentre eles 429 foram reportados para análises genética, sendo utilizado sangue periférico e aspirado de medula óssea para realização de citometria de fluxo, cariótipo convencional e FISH. Desses pacientes, 89 foram analisados no sangue periférico e 346 ficaram para análises da medula óssea. Dessa quantidade de amostras analisadas o CEBPA esteve presente em 61,1% e o RUNX1 31,3% dos resultados, dados esses que são consistentes segundo o National Comprehensive Network. E de 278 pacientes analisados sem anormalidades mielodisplásica citogenética, leucemia promielocítica aguda ou CBF-AML.

Narayanam e Weinberg (2019) segundo eles o diagnóstico mais favorável para o RUNX1 é a citometria de fluxo, pois ele é perfeito para o estudo de translocação de proteínas de fusão. Xueyan Chen e Sindhu Cherian (2017), discorrem que o RUNX1-RUNX1T1 é o gene que apresenta características para exibir seu perfil na citometria de fluxo, os blastos podem mostrar uma alta

expressão de CD34 e HLA-DR, enquanto ocorre uma baixíssima expressão de CD13 e CD33 através de sua mieloperoxidase. Em cerca de também 60% a 80% dos casos o CD56 é expresso na LMA com t(8,21). Pouquíssimos estudos mostram que a expressão dele teve correlação da expressão do CD56 com o prognóstico adverso.

Mendonza *et al.* (2021) discutem que para o diagnóstico do CEBPA é mais utilizado a reação em cadeia da polimerase multiplex (PCR) com comprimento do fragmento para análise e triagem do gene em mutação e é confirmado com o método de sequenciamento de Sanger. Esse complemento se deve ao motivo do PCR não conseguir distinguir se a duplicação do polimorfismo é de um gene normal ou se é patogênico. O sequenciamento de Sanger é um método mais caro que o PCR e com uma taxa de sensibilidade de 20%, além de ser trabalhoso ele permite uma análise mais detalhada do comprimento do gene. Pelo do método de Sanger ser mais complexo, é necessário ter uma destreza para interpretar o laudo para caso de mutações incomuns e por isso ele é utilizado somente como exame confirmatório e não de triagem.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que sobre o diagnóstico e prognóstico estudo observou-se que nem todos os testes serão efetivos da mesma forma para todos, mostrando que certos genes se sobressaem melhor em alguns exames do que outros. O CEBPA e RUNX1 são considerados mais brandos quando comparado a outras mutações, porém seu índice ainda é muito alto entre os pacientes, tendo preocupado bastante pois se têm maior chance de remissão, em comparação com outras neoplasias.

Embora se note que existem alguns diagnósticos que apesar de sofisticados como é o caso dos testes genéticos RT-PCR, Sanger e FISH, ainda apresentam um custo elevado. No caso do RT-PCR, ele pode descobrir a maior parte das leucemias apresentadas e o auxílio do FISH também pode ser utilizado para identificar melhor anormalidades e até mesmo analisar em gerações futuras. O método Sanger, é utilizado apenas para casos de recidiva, ainda é um dos exames mais caros e complexos do momento para ser analisado, se fazendo necessário um profissional experiente para executar o teste. Com essas observações nota-se a importância de novos métodos diagnósticos não só eficazes, mas também com preços mais acessíveis para facilitar o acesso da população a uma saúde de qualidade.

REFERÊNCIAS

BROWN, L.A.; HAHN, C.N.; SCOTT, H.S. **Secondary leukemia in patients with germline transcription factor mutations (RUNX1, GATA2, CEBPA).** The American Society of Hematology, Blood Reviews, 2020. 136 (1): 24–35.

CHEN, X.; CHERIAN, S. **Acute Myeloid Leukemia Immunophenotyping by Flow Cytometric Analysis.** Arch Pathol Lab Med—Vol 143, Elsevier, 2017.

GEORGE, TI.; BAJEL, A. **Diagnosis of rare subtypes of acute myeloid leukaemia and related neoplasms.** Royal College of Pathologists of Australasia. Published, Elsevier, 2021. Pages 312-327.

INFANTE, M.S.; PIRIS, M.A.; HERNÁNDEZ-RIVAZ, J.A. **Alteraciones moleculares en leucemia mieloide aguda y sus implicaciones clínicas y terapéuticas.** Med Clin (Barc), Elsevier. 2017. G Model MEDCLI-. .

GAO, J.; GONG, S.; CHEN, Y.H. **Myeloid Neoplasm With Germline Predisposition, A 2016 Update for Pathologists**. Arch Pathol Lab Med - Vol 143, 2019. DOI: 10.5858/arpa.2017-0194-RA.

KAYSER, S.; LEVIS, M.J. **Clinical implications of molecular markers in acute myeloid leukemia**. European journal haematology, Wiley, 2019. 102(1): 20–35.

LACHOWIEZ, C.; BANNON, S.; LOGHAVI, S.; WANG, F.; KANAGAL-SHAMANNA, R.; MEHTA, R.; DAVERS, N.; BORTHAKUR, G.; PEMMARAJU, N.; RAVANDI, F.; PATEL, F.P.; GARCIA-MANERO, G.; TAKAHASHI, K.; KANTARJIAN, H.; BHALLA, K.; DINARDO, C.D. **Clonal evolution and treatment outcomes in hematopoietic neoplasms arising in patients with germline RUNX1 mutations**. Courtney D. DiNardo, Departamento de Leucemia, Universidade do Texas: American journal hematology, Wiley, 2017. Pages E313-E315.

NARAYANAM, D.; WEINBERG, O.K. **How I investigate acute myeloid leukemia**. International journal of laboratory hematology, Wiley. 2020;42:3–15. DOI: 10.1111/ijlh.13135.
NEWELL, L.F.; COOK, R.J. **Advances in acute myeloid leukemia**. British Medical Journal (The BMJ), 2021;375:

POLLYEA, D.A.; GEORGE, T.I.; ABEDI, M.; BEJAR, R.; COGLE, C.R.; FOUCAR, K.; GARCIA-MANERO, G.; GRINBLATT, D.L.; KOMROKJI, R.S.; MACIEJEWSKI, J.P.; REVICKI, D.A.; ROBOZ, G.J.; SAVONA, M.R.; SCOTT, B.T.; SEKERES, M.A.; THOMPSON, M.A.; KURTIN, S.E.; LOUIS, C.U.; NIFENECKER, M.; FLICK, E.D.; SWERN, A.S.; KISELEV, P.; STEENSMA, D.P.; ERBA, H.P. **Diagnostic and molecular testing patterns in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia in the ConnectR MDS/AML Disease Registry**. British Society for Haematology, Wiley. 2020;1:58–68.

PRADA-ARISMENDY, J.; OSPINA, J.A.; ROTH LISBERGER, S. **Molecular Biomarkers in Acute Myeloid Leukemia**. American society of hematology, Blood Reviews, 2016. Jan;31(1):63-76.

SALVARO, M.M.; FRASSETTO, M.D.; JUST, M.S.; FURTADO, J.; MACARINI, V.H.; SCHUCK, F.W.; ROCHA, L.M.; FRASSETTO, M.E.G.; TOMILIN, E.A.; MATTIA, M.R. **Leucemia Mieloide Aguda: Perfil Epidemiológico No Brasil Entre 2009 E 2019**. Hematology, transfusion and cell therapy. Elsevier. 2021;43(S1):S1–S546.

SCHILITZ, A.O.C.; LIMA, F.C.S.; OLIVEIRA, J.F.P.; SANTOS, M.O.; REBELO, M.S. **Estimativa|2020 Incidência de Câncer no Brasil**. INCA, Fox print, 2019. ISBN 978-85-7318-389-4.

SILVA, M.C.A.; KREPISCHI, A.C.V.; KULIKOWSKI, L.D.; ZANARDO, E.A.; NARDINELLI, L.; LEAL, A.M.; COSTA, S.S.; MUTO, N.H.; ROCHA, V.; VELLOSO, E.D.R.P. **Deletion of RUNX1 exons 1 and 2 associated with familial platelet disorder with propensity to acute myeloid leukemia**. Cancer genomics consortium, Elsevier. 2018, 222-223:32-37. PMID: 29666006.

SONG, G.; WANG, L.; BI, K.; JIANG, G. **Regulation of the C/EBP α signaling pathway in**

acute myeloid leukemia (Review). Oncology reports, 2015. Volume 33 Edição 5, Pages: 2099-2106. ISBN: 1791-2431.

SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; PILERI, S.A.; STEIN, H.; THIELE, J.; ARBER, D.A.; HASSERJIAN, R.P.; BEAU, M.M.L.; ORAZI, A.; SIEBERT, R. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.** IARC: Lion 2017, Revised 4th Edition, Volume 2. ISBN-13: 978-92-832-4494-3.

TAWANA, K.; RIO-MACHIN, A.; PREUDHOMME, C.; FITZGIBBON, J. **Familial CEBPA-mutated acute myeloid leukemia.** Seminars in hematology, Elsevier, 2017. Vol 54, Ed. 2, Páginas 87-93.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R.; SPECTOR, N.; COVAS, D.T.; REGO, E.M. **Tratado de hematologia.** São Paulo, Editora Atheneu, 2013. ISBN: 978-85-388-0454-3.