

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**

**Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa**

**Mestrado em Genética**

**LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NA INFÂNCIA: IMPORTÂNCIA DO  
DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO CONVENCIONAL COMO FATOR  
PROGNÓSTICO**

**LYSA BERNARDES MINASI**

Goiânia-Go

2009

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**

**Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa**

**Mestrado em Genética**

**LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NA INFÂNCIA: IMPORTÂNCIA DO  
DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO CONVENCIONAL COMO FATOR  
PROGNÓSTICO**

**LYSA BERNARDES MINASI**

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, *PhD*.

Co-orientador: Prof. Msc. Cláudio Carlos da Silva

Dissertação apresentada ao  
Programa de Mestrado em  
Genética da Universidade Católica  
de Goiás, como parte dos  
requisitos para a obtenção do título  
de Mestre em Genética.

Goiânia-Go

2009

M663l    Minasi, Lysa Bernardes.  
          Leucemia linfóide aguda na infância : importância do  
          diagnóstico citogenético convencional como fator prognóstico  
          / Lysa Bernardes Minasi. – 2009.  
          63 f. : il.

          Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Goiás,  
          Mestrado em Genética, 2009.  
          “Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz”  
          “Co-orientador: Prof. Msc. Cláudio Carlos da Silva”.

          1. Leucemia linfóide aguda – criança – diagnóstico. 2.  
          Alteração cromossômica. 3. Genética. I. Título.  
          CDU: 616.155.392-053.2:616-071(043.3)



UNIVERSIDADE  
**Católica**  
DE GOIÁS

PRÓ-REITORIA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário  
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010  
Goiânia • Goiás • Brasil  
Fone: (62) 3946.1071 • Fax: (62) 3946.1073  
www.ucg.br • prope@ucg.br

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA  
DEFENDIDA EM 16 DE MARÇO DE 2009 E APROVADA  
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA

.....10,0. (*Dez inteiros*).....

*Divino*  
.....  
Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD / MGene - UCG  
(presidente orientador)

*Daniela*  
.....  
Dr<sup>a</sup>. Daniela de Melo e Silva – MGene – UCG  
(membro interno)

*Celso da Cunha Bastos*  
.....  
Dr. Celso da Cunha Bastos - UFG  
(membro externo)

A MINHA QUERIDA MÃE,  
Pelo exemplo, incentivo e pelo amor,  
DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível devido à colaboração de diversas pessoas, agradeço:

Ao Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, pela orientação exemplar, apoio, generosidade, amizade e confiança ao longo destes dois anos, sem os quais seria impossível a finalização deste estudo.

Ao Prof. Msc. Cláudio Carlos da Silva, pela co-orientação positiva, generosidade e pelas discussões referentes ao tema deste estudo.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular: Gustavo Silva Pinto, Daniela de Melo e Silva, Thaís Cidália Vieira, Sandra Maria Torres, Fabiano Ribeiro Borges, pela companhia no laboratório, apoio e ensinamentos. Valorosas contribuições ao meu aprendizado.

Aos meus queridos amigos do Núcleo de pesquisa REPLICON: Cristiano Luiz Ribeiro, Emília Oliveira Alves Costa, Jonas Garcia de Almeida, Damiana Miríam da Cruz e Cunha, Eduardo Rocha Pedrosa, pela compreensão e ajuda no desenvolvimento deste estudo.

Ao Dr. Raul Chavarria pelo grande incentivo e apoio para a realização deste estudo.

Ao pessoal do Hospital Araújo Jorge, em especial à Dra. Elisângela Ribeiro, aos colegas dos Setores de Patologia Clínica, de Oncologia Pediátrica e do Arquivo Médico.

Ao pessoal da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia, em especial ao Dr. Everaldo Ruiz Júnior, pela disponibilidade e atenção sempre dispensadas.

A todos os professores do curso de mestrado pela troca de experiências.

À minha mãe, pai (*in memoriam*), irmãs e todos os meus familiares, pelo amor, confiança e por terem sido continuamente meu alicerce, desde o início.

Meu cordial e afetuoso agradecimento a todos vocês.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas	xii
Lista de Figuras	xiii
Lista de Siglas e Abreviaturas	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Hematopoese.....	1
1.2 Biologia das Leucemias Agudas .....	2
1.3 Mecanismos de Alterações Cromossômicas.....	5
1.4 Leucemia Linfóide Aguda.....	7
1.4.1 Fatores Prognósticos.....	8
1.4.2 Aspectos Epidemiológicos.....	11
1.5 Anormalidades Cromossômicas na LLA.....	13
1.5.1 Anormalidades Numéricas.....	15
1.5.2 Anormalidades Estruturais.....	18
2. JUSTIFICATIVA.....	29
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivo Específico.....	30
4. Metodologia e Delineamento do Estudo.....	31
4.1 Delineamento do estudo.....	31
4.2 Grupo Amostral.....	31
4.2.1 Critério de Inclusão.....	31
4.2.2 Critério de Exclusão.....	32
4.3 Coleta de Medula Óssea e Sangue Periférico.....	32
4.4 Citogenética Convencional.....	32
4.4.1 Início da Cultura.....	32
4.4.2 Bloqueio da Cultura.....	33
4.4.3 Preparação das Lâminas.....	33
4.4.4 Bandeamento.....	34
4.5 Análise Citogenética.....	34
4.6 Considerações Éticas.....	34
5. RESULTADOS.....	35
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÕES .....	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ANEXOS.....	59

## RESUMO

A leucemia linfóide aguda é considerada o resultado de anormalidades ocorrendo em uma célula progenitora do sistema linfo-hematopoético. As anormalidades modificam o programa de diferenciação celular, determinando uma vantagem proliferativa do clone leucêmico sobre as demais células do tecido hematopoético. A sobrevida livre de leucemia por mais de cinco anos, que é considerada como critério de cura para a doença, nos últimos anos, tem sido de aproximadamente 80%. Na população infantil a LLA é cinco vezes mais incidente do que a LMA, sendo a causa de aproximadamente 3/4 de todo o diagnóstico de leucemia infantil. Na LLA, entre 60% a 75% dos pacientes apresentam anormalidades numéricas do lote cromossômico, como a hiperdiploidia ou hipodiploidia, ou estruturais, como translocações e deleções. As alterações cariotípicas recorrentes estão associadas a características clínicas e prognósticas específicas. Neste estudo, a avaliação citogenética foi realizada para todos os 22 pacientes incluídos no estudo. Tais pacientes foram diagnosticados no Hospital Araújo Jorge/ACCG e na Santa Casa de Misericórdia de Goiânia, no período de março a dezembro de 2008. As amostras de medula óssea ou sangue periférico foram enviadas ao Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene) da SuLeide/SES/GO para análise citogenética. Na avaliação citogenética 58% dos cariótipos realizados apresentavam-se alterados. Foram observadas a presença de alterações numéricas, como hiperdiploidias, near-haploidia e trissomia do cromossomo 21 e estruturais representadas a seguir:

46,XX,4q+/46,XX,t(q1;q4), 46,XX,t(10;14)(q22;q32),  
46,XY,del(16q22)/46,XY,del(6q26)/Hiperdiploidia, 46,XX/46,XX,del(8)(q21.2-22)/  
Hiperdiploidia  
46,XY,t(7;12)(q34;q22);del(10qter)/46,XY,t(7;12)(q34;q22)/46,XY,t(4;8)(q31.2;q23)/4  
6,XY,t(12;16)(q24.1;q23)/Near-haploidia, 46,XX,del(17q25),  
46,XY,t(7;12)(q35;p11),+21. A remissão morfológica dos pacientes estudados no vigésimo oitavo dia da indução do tratamento (D+28) foi obtida em todos os casos. A Doença Residual Mínima (DRM) foi positiva em 14% dos casos. Os pacientes foram estratificados em dois grupos de risco de recaída de acordo com o protocolo GBTL1 LLA-99: baixo risco de recaída (55%) e alto risco de recaída (45%). A maioria das alterações cromossômicas ainda não foram descritas até o momento, havendo portanto uma certa limitação quanto a definição do prognóstico. A correlação entre os achados



citogenéticos e características clínico-laboratórias foi estabelecida, demonstrando a importância de fazê-la para inferir a respeito do prognóstico.

Palavras chave: leucemia linfóide aguda; alterações cromossômicas; prognóstico.

## ABSTRACT

The acute lymphoblastic leukemia (ALL) is considered the result of abnormalities occurring in a progenitor cell of the lympho hematopoietic system. The abnormalities modify the program of cell differentiation, determining a proliferative advantage of leukemic clone on the other cells of hematopoietic tissue. The leukemia-free survival for more than five years, which is considered as criterion of cure for the disease in recent years has been approximately 80%. In the infant population the ALL is five times more incidents than the LMA, and is the cause of approximately 3/4 of all children diagnosed with leukemia. In ALL, 60% to 75% of patients present numerical abnormalities on the chromosomal batch, such as hiperdiploidia or hipodiploidia, or structural, such as translocations and deletions. Karyotypic changes are associated with recurrent clinical characteristics and prognostic measures. In this study, the cytogenetic evaluation was performed for all 22 patients included in the study. These patients were diagnosed at Hospital Araújo Jorge / ACCG and the Santa Casa de Misericórdia de Goiânia, in the period of March to December of 2008. Samples of bone marrow or peripheral blood were sent to the Laboratory of Human Cytogenetics and Molecular Genetics (Lagen) of SuLeide / SES / GO for cytogenetic analysis. Cytogenetic evaluation in 58% of karyotypes that was carried out had changed. We observed the presence of numerical changes, as hyperdiploid, near-haploid and trisomy of chromosome 21 and structural which are represented as follows:

46,XX,4q+/46,XX,t(q1;q4), 46,XX,t(10;14)(q22;q32),  
46,XY,del(16q22)/46,XY,del(6q26)/Hyperdiploid, 46,XX/46,XX,del(8)(q21.2-22)/  
Hyperdiploid,  
46,XY,t(7;12)(q34;q22);del(10qter)/46,XY,t(7;12)(q34;q22)/46,XY,t(4;8)(q31.2;q23)/4  
6,XY,t(12;16)(q24.1;q23)/Near-haploid, 46,XX,del(17q25),  
46,XY,t(7;12)(q35;p11),+21. The morphologic remission of patients studied in twenty eighth day of induction treatment (D+28) was obtained in all cases. A Minimal Residual Disease (MRD) was positive in 14% of the cases. The patients were stratified into two groups at risk of relapse according to the protocol GBTL1 ALL-99: low risk of relapse (55%) and high risk of relapse (45%). Most of the chromosomal changes have not been described so far, therefore there is a certain limitation on the definition of the prognosis. The correlation between the cytogenetic findings and clinical and laboratory

characteristics was established, demonstrating the importance of doing it to infer about the prognosis.

Key-words: acute lymphoblastic leukemia; chromosomal changes; prognosis.

## LISTA DE TABELAS

	Pag.
1- Fatores de risco associados à leucemia	3
2- Fatores Prognósticos associados à LLA	9
3- Anormalidades cromossômicas numéricas frequentemente associadas à LLA infantil	14
4- Anormalidades cromossômicas estruturais frequentemente descritas para a LLA infantil	15
5- Envio de Casos pelas Instituições de Origem	35
6- Relação entre Sexo e Idade dos pacientes com LLA	35
7- Características clínico-laboratoriais dos pacientes com LLA classificados como risco padrão/baixo risco, segundo critérios do GBTL1 LLA-99	37
8- Características clínico-laboratoriais dos pacientes com LLA classificados como alto risco, segundo critérios do GBTL1 LLA-99	38
9- Distribuição percentual das amostras biológicas estudadas para LLA na infância	39

## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
1- Representação esquemática da diferenciação celular observada durante a hematopoese	1
2- Esquema ideogramático da t(9;22)(q34;q11) com a fusão dos genes <i>BCR</i> e <i>ABL</i>	7
3- Representação esquemática da t(12;21)(p12;q22) com rearranjo <i>TEL-AML1</i> .	21
4- Representação esquemática do gene de fusão BCR/ABL. As setas indicam os principais pontos de quebra do gene BCR e do gene ABL. No gene BCR se destacam as regiões m-bcr, M-bcr e $\mu$ -bcr. A última figura representa o gene de fusão BCR/ABL com reordenamento e1a2.	22
5- Frequência da LLA ordenada segundo critérios de prognóstico para a patologia em conformidade com GBTLI LLA-99	36
6- Distribuição percentual dos imunofenótipos B e T, segundo a classificação EGIL, dos pacientes com LLA.	39

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- $\mu\text{L}$ : Microlitro.
- $^{\circ}\text{C}$ : Graus Celsius.
- CCG: Do inglês “*Childrens Cancer Group*”, traduzido como grupo de crianças com câncer.
- CGH: Do inglês “*Comparative Genomic Hybridization*”, traduzido como hibridização genômica comparativa.
- CTH: Célula Tronco Hematopoética pluripotente.
- CTL: Contagem total de leucócitos.
- DHL: Desidrogenase Láctica.
- DHFR: Dihidrofolato Redutase.
- DNA: Do inglês “*Deoxyribonucleic Acid*”, traduzido como ácido desoxirribonucléico.
- DRM: Doença Residual Mínima.
- FPGS: Folato Poliglutamato Sintetase.
- FAB: Do inglês “*French-American-British*”, Franco-Americano-Britânico.
- FISH: Do inglês “*Fluorescent Hybridization in situ*”, traduzido como hibridização fluorescente *in situ*. Refere-se à técnica citogenética molecular.
- g: Gramas.
- fase G1: Refere-se a fase do ciclo celular. Período entre o final da mitose e começo da replicação do DNA.
- GBTLI LLA-99: Refere-se ao protocolo de tratamento da LLA em crianças.
- g/dL: Gramas por decilitro.
- HAJ: Hospital Araújo Jorge.
- ID: Índice de DNA.
- Ig: Imunoglobulina.
- IGH: Do inglês “*Heavy Chain Immunoglobulin*”, traduzido como imunoglobulina de cadeia pesada.
- kDa: Kilodaltons.
- KCl: Cloreto de Potássio.
- L: Litro.

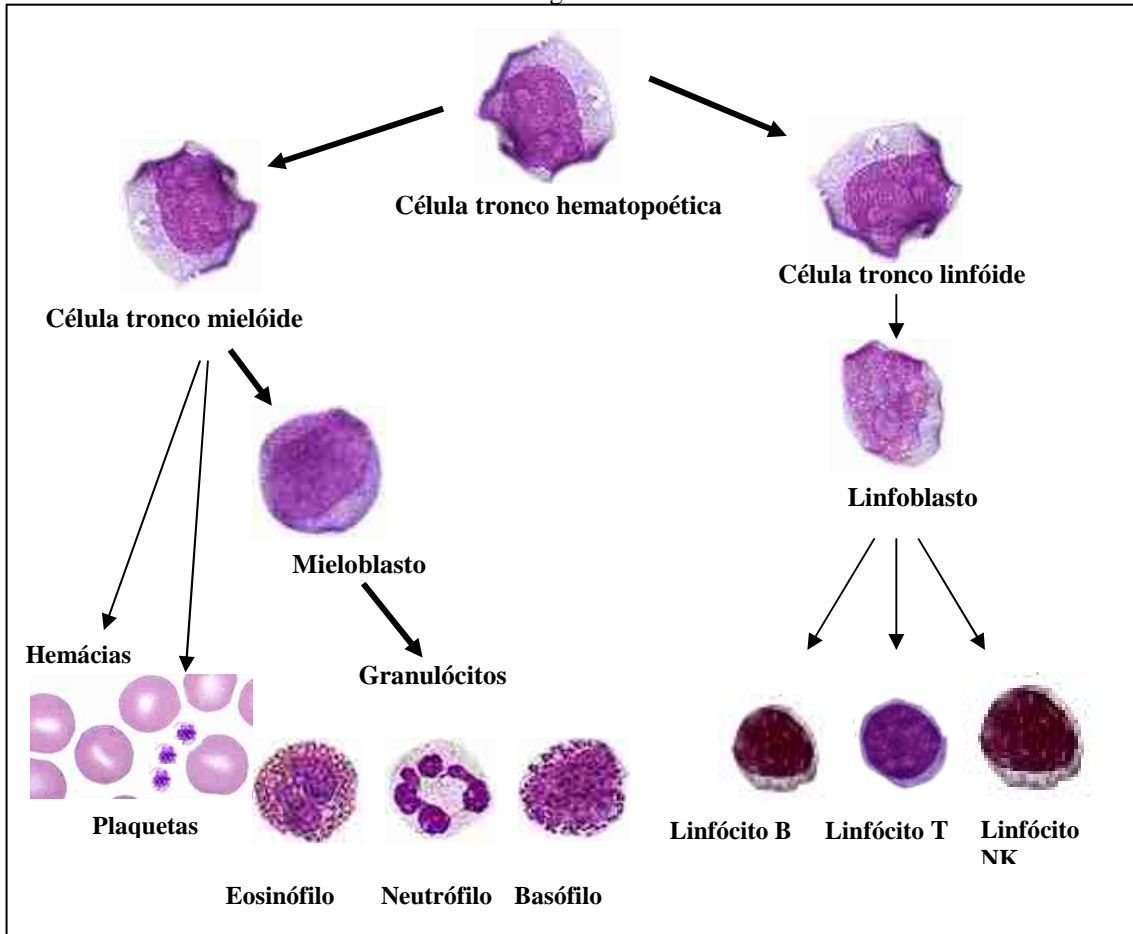
- LLA: Leucemia Linfóide Aguda.
- LLC-T: Leucemia linfocítica crônica de células T.
- LLP-T: Leucemia prolinfocítica de células T.
- LMA: Leucemia Mielóide Aguda.
- LMC: Leucemia Mielóide Crônica.
- M: Molar.
- mL: Mililitro.
- mm<sup>3</sup>: Milímetro cúbico.
- MO: Medula óssea.
- MTXGlu<sub>3</sub>: Resíduo de glutamil poliglutamato metotrexato.
- MTXPG: Poliglutamato metotrexato.
- NCI: Do inglês “*National Cancer Institute*”, traduzido como Instituto Nacional do Câncer.
- p190: Proteína de 190 KDa.
- p210: Proteína de 210 KDa.
- PBS: Do inglês, “*Phosphate Buffer Saline*”, traduzido como tampão salina fosfato.
- POG: Do inglês, *Pediatric Oncology Group*, traduzido como grupo de oncologia pediátrica.
- RNAm: Do inglês “*Messenger Ribonucleic Acid*”, traduzido como ácido ribonucléico mensageiro.
- rpm: rotações por minuto.
- S: Refere-se à fase do ciclo celular na qual ocorre a síntese do DNA.
- SCMG: Santa casa de Misericórdia de Goiânia.
- SLE: Sobrevida livre de eventos.
- SMD: Síndrome mielodisplásica.
- SNC: Sistema nervoso central.
- SP: Sangue periférico.
- TCR: Receptor de células T.
- TCR $\beta$ : Receptor de células T do tipo  $\beta$ .

# 1. Introdução

## 1.1 Hematopoese

A hematopoese é um processo complexo pelo qual linhagens distintas de células sanguíneas (eritrócitos, linfócitos, granulócitos, monócitos/macrófagos e megacariócitos) são produzidas a partir de uma célula tronco hematopoética pluripotente (CTH). Um esquema resumido do processo pode ser observado na Figura 1. As CTH estão no topo da hierarquia e dão origem as células progenitoras que exibem um potencial de desenvolvimento variável (Wang *et al.*, 1998).

Créditos: Dr. Raul Chavarria/Laboratório de Patologia Clínica HAJ/ACCG



**Figura 1.** Representação esquemática da diferenciação celular observada durante a hematopoese.

A origem e a progressão das leucemias podem ser compreendidas ao se relacionar os mecanismos leucemogênicos às alterações dos mecanismos homeostáticos normais que regulam a produção e a diferenciação das células sanguíneas.



As citocinas e seus receptores promovem sinais que participam direta ou indiretamente na proliferação, diferenciação, ou sobrevivência das CTH e das células progenitoras. Os complexos processos de sinalização celular ainda contam com a participação de diversos fatores de transcrição que estabelecem padrões celulares distintos mediante a expressão gênica e garantem a correta sinalização celular (Wang *et al.*, 1998).

O acúmulo de alterações em genes que regulam o processo de diferenciação, proliferação, reparo e morte celular leva à aquisição de um fenótipo alterado em que as células adquirem vantagem de sobrevivência e deixam de exercer suas funções normais. Estudos recentes sugerem que a transformação maligna ocorre inicialmente em uma célula com um comprometimento mínimo para linhagem linfóide ou mielóide e não na célula tronco pluripotente. De forma subsequente, a célula acumula alterações genéticas resultando na leucemogênese. Consequentemente, a análise de clones leucêmicos fornece informações sobre o momento de iniciação e progressão que resultou na transformação maligna e quais os mecanismos moleculares envolvidos no processo.

## **1.2 Biologia das Leucemias Agudas**

A leucemia foi reconhecida como uma entidade clínico-patológica em 1845 por D. Craigie e John Hughes Bennett e em 1846 por Rudolf Virchow. Estes pesquisadores descreveram uma associação entre o crescimento crônico do baço e a “supuração do sangue”. R. Virchow propôs o nome sangue branco, ou “leucemia” em 1847 e, mais tarde, identificou duas formas, uma caracterizada por esplenomegalia pronunciada e a outra por linfonodomegalia acentuada. A forma aguda da leucemia foi descrita pela primeira vez por N. Friedreich em 1857 e a descrição dos sintomas associados ao quadro leucêmico foi publicado por W. Ebstein em 1899 (Sullivan, 1998).

As leucemias agudas podem ser definidas como a proliferação ou expansão incontrolada de células hematopoéticas, que não retêm a capacidade de se diferenciarem normalmente em células maduras do sangue. A condição é resultante da expansão clonal de uma célula progenitora hematopoética que adquiriu alterações genéticas, as quais se acumulam em um clone celular. Em comum os clones apresentam um bloqueio

na diferenciação celular, causando subversão do crescimento normal com prejuízo do controle proliferativo, e aquisição de resistência aos sinais apoptóticos (Pui, 2004).

As leucemias são classificadas de acordo com o tipo celular envolvido e o grau de maturação celular. Elas ocorrem pela transformação de um progenitor com comprometimento para a linhagem linfóide ou mielóide, sendo então classificadas como linfóides ou mielóides de acordo com critérios morfológicos, citoquímicos e imunofenotípicos. Também podem ser classificadas como agudas ou crônicas, de acordo com a patogenia da doença. Nas agudas, as células leucêmicas pertencem ao compartimento de células progenitoras mais imaturas, enquanto que nas crônicas as células malignas se desenvolvem em estágios de maturação mais tardios (Dos Anjos; Álvares-Silva; Borelli, 2000).

A patogênese das leucemias parece envolver alguns fatores ambientais, genéticos e infecciosos (Tabela I). Alguns destes fatores estão mais estabelecidos, por exemplo, a predisposição genética que ocorre na Síndrome de Down e para o desenvolvimento da Anemia de Fanconi, infecção viral por HTLV-1, radiações ionizantes, agentes químicos (Benzeno) e drogas (inibidores de topoisomerase II). Entretanto, a relação entre os agentes predisponentes e o desenvolvimento das leucemias pode apenas ser demonstrada em uma proporção pequena dos casos permanecendo ainda obscura a resposta da maioria das questões sobre a causa das leucemias (De Oliveira *et al.*, 2004).

**Tabela I.** Fatores de Risco Associados à Leucemia.

<b>Fatores Ambientais</b>
Radioterapia
Exposições nucleares
Exposição intra-uterina à radiação
Uso de drogas inibidoras da topoisomerase II
Exposição a hidrocarbonetos: Benzeno
Pesticidas
Consumo de álcool, cigarros e drogas ilícitas durante a gestação
<b>Fatores Genético/Familiar</b>
Gêmeo de paciente com LLA
Irmão de paciente com LLA

Anemia de Fanconi
Neurofibromatose
Ataxia-teleangectasia
Síndrome de Down
Síndrome de Bloom
Síndrome de Schwachman
Síndrome de Noonan
Síndrome de Willis e Lindahl

Adaptado de Belson *et al.*, 2007 e De Oliveira *et al.*, 2004

Exposição à radiação ionizante tem relacionamento causal com o desenvolvimento de leucemia em crianças, particularmente a leucemia mielóide aguda (LMA). A magnitude do risco depende da dose de radiação absorvida, duração da exposição, e a idade do indivíduo no momento da exposição. No entanto, esse agente físico é um dos poucos fatores cujo riscos relativos são bem estabelecidos para a indução da leucemia na população exposta (Belson *et al.*, 2007).

O benzeno é conhecido como um potente carcinógeno humano. Há uma forte relação entre a exposição individual e leucemia, especialmente a LMA. Foi observado um risco aumentado para Leucemia Linfóide Aguda (LLA) em um estudo caso-controle envolvendo mais de 3500 crianças, cujas mães sofreram exposição ocupacional a solventes e tintas durante a gestação. O risco relativo não se mostrou alterado para a exposição ocupacional materna no período após o nascimento da criança (Belson *et al.*, 2007; Whitworth, Symanski, Coker, 2008).

Genes polimórficos que codificam enzimas do metabolismo de carcinógenos e drogas podem não apenas aumentar o risco de LLA, mas também influenciar o risco de recidiva e, portanto, ajudar a prever a resposta à doença. Por exemplo, o prognóstico de pacientes com variantes de citocromo P4501A1 (CYP1A1) e Quinina Oxirredutase 1 NAD(P)H tem sido pior do que em pacientes com genótipos do tipo selvagem (Belson *et al.*, 2007). Entretanto, os achados envolvendo o polimorfismo genético e suscetibilidade potencial à leucemia precisam ser confirmados por estudos mais amplos com atenção especial para a diversidade étnica e geográfica na frequência dos polimorfismos.

Uma pequena proporção de leucemia em crianças está relacionada com a ocorrência de Síndromes Genéticas. Por exemplo, na Anemia de Fanconi, na Síndrome de Bloom e na Síndrome de Down, a LMA apresenta uma maior incidência durante o período neonatal do que a LLA (Infante-Rivard;Mathonnet;Sinneli, 2000).

A associação entre câncer em crianças e fatores de risco ainda não está bem estabelecida nos casos em que fatores de risco e comportamentais como tabagismo, alcoolismo, tipo de alimentação, prática de atividade física regular, exposição ao sol, entre outros, já estão bem descritos na literatura como associados a vários tipos de neoplasias na população adulta (INCA, 2007).

### **1.3 Mecanismos de Alterações Cromossômicas**

O câncer resulta de anormalidades na seqüência de DNA. Durante a vida, o DNA das células humanas é exposto a mutágenos e sofre erros de replicação, resultando em mudanças progressivas sutis na seqüência do DNA (Futreal *et al.*, 2001). O primeiro estudo sistemático a respeito da divisão celular em tumores malignos foi realizado em 1980 por David von Hanseemann. Ele observou uma ocorrência freqüente de mitoses aberrantes em células cancerosas e sugeriu que este fenômeno poderia ser utilizado como critério para diagnosticar um estágio maligno. Theodori Boveri, em 1914, em seu livro, *Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren*, sugeriu que malignidades poderiam resultar de distúrbios do balanço cromossômico normal, essencial para a função normal da célula. Em 1950, foi confirmada a suspeita de que as células tumorais eram caracterizadas por anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais (Mitelman, 1994).

A descoberta dos mecanismos básicos a respeito da proliferação celular tumoral, foi acompanhada por diversos investigadores incluindo: John Biesele, Theodore Hauschka, Albert Levan e Sajiro Makino. O interesse crescente dos pesquisadores resultou no desenvolvimento de uma área moderna da citogenética, destinada a compreensão dos fatores citogenéticos observados no câncer. Em 1960, Peter Nowell e David Hungerford registraram a ocorrência do cromossomo *Philadelphia* em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica (LMC), evidenciando o primeiro grande exemplo de uma mutação somática em uma *stem cell* hematopoética. Até então, a visão prevalente era que as mudanças cromossômicas eram um epifenômeno que ocorria durante a

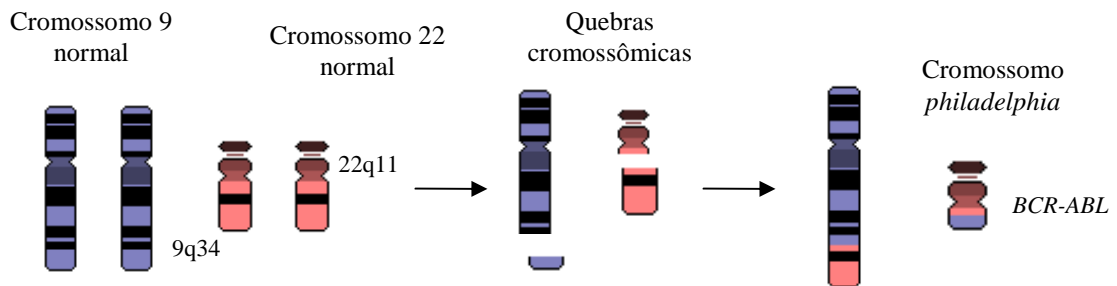
progressão tumoral e conseqüentemente não havia nenhuma significância patogênica. Mas em 1970, Torbjorn Caspersson e Lore Zech introduziram a técnica de bandeamento cromossômico que tornou as descrições cromossômicas mais precisas e conclusivas. O advento das técnicas de biologia molecular, na década de 80, ampliou o entendimento dos mecanismos moleculares operantes nos processos neoplásicos (Mitelman, 1994).

As alterações genéticas afetam diferentes caminhos nas vias que regulam os processos de proliferação, diferenciação e sobrevivência celulares. Frequentemente as alterações genéticas envolvem tanto a amplificação e ativação de proto-oncogenes quanto mutações que levam a perda e/ou à inativação dos alelos de genes supressores de tumor. As alterações genéticas que levam à ativação dos proto-oncogenes conferem uma vantagem de crescimento à célula tumoral. A ativação dos oncogenes pode surgir a partir de uma mutação pontual, amplificação gênica ou rearranjos cromossômicos. Os rearranjos cromossômicos como translocações e inversões são os mais comumente detectados em neoplasias malignas hematológicas do que em tumores sólidos (Silva, 2006).

A ativação de oncogenes decorrente das translocações pode ocorrer por dois mecanismos: ativação transcricional de proto-oncogenes e geração de proteínas de fusão. A ativação transcricional é o resultado dos rearranjos que posicionam o proto-oncogene sob o controle de uma região promotora de outros genes, como resultado um gene que era pouco expresso ou não era expresso na sua posição original quando translocado passa a ser hiperexpresso. Como exemplos deste tipo de situação podem ser citadas as t(14;18), t(8;14) e t(11;14) com a justaposição de regiões do gene da Imunoglobulina de cadeia pesada (IGH) aos genes *BCL2*, *MYC* e *BCL1*, respectivamente, que acontecem com maior frequência na leucemogênese que envolve as linhagens de células B (Hanahan *et al.*, 2000).

A geração de transcritos e proteínas quiméricas com funções alteradas resulta dos rearranjos cromossômicos no quais dois genes diferentes são fundidos. Em geral, as duas regiões dos genes fundidos contribuem para o potencial oncogênico da proteína quimérica (Silva, 2006). Um clássico exemplo deste mecanismo é a proteína de fusão formada a partir da t(9;22)(q34;q11), envolvendo os genes *ABL* e *BCR*, localizados nas regiões 9q34 e 22q11, respectivamente. Na LMC a proteína quimérica ABL com 210

kDa terá sua atividade de tirosina quinase aumentada. Já na LLA o RNAm é menor (70Kb) e conseqüentemente a proteína quimérica ABL também será menor, 190kDa (El-Sissy *et al.*, 2006). A figura 2 representa o processo que resulta na fusão do gene *BCR-ABL*.



**Figura 2.** Esquema ideogramático da  $t(9;22)(q34;q11)$  com a fusão dos genes *BCR* e *ABL*.

#### 1.4 Leucemia Linfóide Aguda

A LLA é considerada o resultado de anormalidades ocorrendo em uma célula progenitora do sistema linfo-hematopoético. As anormalidades modificam o programa de diferenciação celular, determinando uma vantagem proliferativa do clone leucêmico sobre as células do tecido hematopoético (Ribeiro, 2001).

Na LLA os sintomas podem ser insidiosos e lentamente progressivos, ao longo de semanas ou meses, ou podem ser agudos e explosivos. Em geral, quanto mais indolente o surgimento, mais duráveis serão as remissões. Os sinais e sintomas observados na maioria dos casos de LLA resultam de uma insuficiência da medula óssea ou do envolvimento de locais extra medulares. As queixas mais comuns incluem fadiga, letargia acompanhada de febre e dores ósseas e articulares. Em crianças de 12 a 18 meses de idade ou mesmo menores são comuns as anormalidades cariotípicas, especialmente  $t(4;11)$  e outras translocações que envolvem 11q23-25 e 9p21-22 (Lukes, 1998b).

O grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) classificou a LLA em três subtipos morfológicos – L1, L2 e L3 – com base em quatro variáveis observadas ao microscópio ótico, a saber: (1) Diâmetro celular; (2) Forma do núcleo; (3) Número e protuberância

dos nucléolos e (4) Quantidade e aspecto relativos ao citoplasma. Com o desenvolvimento das técnicas de citometria de fluxo, as características imunofenotípicas das células passaram a ser usadas para detectar com bastante precisão, além da linhagem celular, o nível de diferenciação em que se encontra o processo leucêmico.

As células da linhagem B foram divididas em: (1) Pró-B, B precursora ou pré-pré B (5% dos casos pediátricos); (2) Comum (75% dos casos de LLA infantil); (3) Pré-B (15% das crianças) e (4) B-maduro (2% a 5% em crianças). As células da linhagem T dividem-se em três grupos de acordo com os antígenos de diferenciação correspondentes aos níveis de diferenciação intratímica normal: (1) pré-T; (2) T-intermediário e (3) Maduro (Bacal *et al.*, 2003).

#### **1.4.1 Fatores Prognósticos**

Até 1980, a LLA era a causa mais comum de morte em crianças acometidas com câncer. Desde então, com as novas técnicas de tratamento da doença, a mortalidade por leucemia tem diminuído significativamente e progressivamente. A sobrevida livre de leucemia por mais de cinco anos, que é considerada como critério de cura para a doença, em pacientes pediátricos com LLA, nos últimos anos, tem sido de aproximadamente 80% (Gariochea, 2001). O sucesso terapêutico é decorrente da utilização de tecnologias combinadas com o objetivo de estabelecer o diagnóstico preciso e indicativo de prognóstico, baseando-se na análise de fatores clínicos, biológicos, genéticos e moleculares.

A LLA na infância não é uma doença única, mas um grupo de doenças com uma variedade de alterações genéticas nos blastos leucêmicos, levando a um amplo espectro de respostas e apresentações clínicas. A estratificação de pacientes dentro dos grupos de risco para LLA baseado em características prognósticas conhecidas vem permitindo um maior sucesso terapêutico. Pacientes considerados de baixo risco podem ser tratados menos intensivamente, com isso as toxicidades do tratamento são minimizadas, enquanto que pacientes com alto risco podem receber terapias mais agressivas ou diferentes tipos de terapia (Hoelzer *et al.*, 2002).

As primeiras características utilizadas para a classificação de risco incluíram à contagem de leucócitos ao diagnóstico e a idade do paciente. Estas características ainda estão incluídas na avaliação moderna do risco. A Tabela II sintetiza os principais fatores prognósticos associados à LLA.

**Tabela II.** Fatores Prognósticos associados à LLA.

<b>Aspectos Clínicos</b>	<b>Favoráveis</b>	<b>Desfavoráveis</b>
Leucometria global	< 50.000/mm <sup>3</sup>	≥ 50.000/mm <sup>3</sup>
Idade (anos)	1 a 9	< 1 ano e > 9
Sexo	Feminino	Masculino
Origem	Caucasiano, Asiático	Africano, Americano
Tempo para remissão	< 14 dias	> 14 dias
Crescimento de linfodos, fígado e baço	Ausente	Maciço
Massa mediastinal	Ausente	Presente
Infiltração do SNC	Ausente	Presente
Aspectos morfológicos FAB	L1	L2, L3
Hemoglobina	< 7,0g/dL	> 10,0g/dL
Plaquetas	> 100 x 10 <sup>9</sup> /L	< 30 x 10 <sup>9</sup> /L
Imunoglobulinas séricas	Normais	Diminuídas
Imunofenótipo	Linfócito pré B primitivo	Linfócito T, Linfócito B e Linhagem mista
DNA total	>1.16	≤ 1.16
Ploidia*	>50	<45
Citogenética	Trissomia 4 e 10	t(4;11) e t(9;22)
Genética Molecular	<i>TEL-AML1</i>	<i>MLL-AF4</i> e <i>BCR-ABL</i>

\*ploidia: número de cromossomos por célula

Quando todas as variáveis possíveis são consideradas, o tratamento surge como o determinante mais importante da resposta, o que explica porque muitos fatores de risco clínicos e biológicos perdem sua força prognóstica quando mudanças maiores no tratamento são feitas (Pui, 2004). Segundo o *National Cancer Institute (NCI) / Rome*, os critérios de estratificação dos pacientes, com imunofenótipo B, são baseados na idade, 1 a 9anos, e/ou leucócitos <50.000/mm<sup>3</sup> (risco padrão), ou idade inferior a 1 ano e ≥9anos e/ou leucócitos ≥50.000/mm<sup>3</sup> (alto risco) (Carroll *et al.*, 2003). Idade inferior a 1 ano confere um prognóstico desfavorável. A influência da idade é independente de outros fatores de risco (Aramburu, 2006).

O sexo masculino tem sido geralmente associado com pior prognóstico. Na tentativa de reduzir a diferença da resposta ao tratamento entre os dois sexos, a duração do tratamento de manutenção tem sido aumentada em algumas triagens para meninos.



Entretanto, o impacto prognóstico adverso para o sexo masculino tem sido abolido em algumas triagens clínicas cuja razão da Sobrevida Livre de Evento (SLE) seja de 80% ou mais (Pui *et al.*, 2004b).

Pacientes com LLA precursor de células B, idade de 1 a 9 anos e baixa contagem de leucócitos ( $<50.000/\text{mm}^3$ ), apresentam um prognóstico favorável e geralmente são considerados como de risco padrão. A LLA de células T é geralmente considerada de risco alto ou muito alto, dependendo da resposta do paciente a terapia de indução. Para LLA de células T a idade e contagem de leucócitos têm pouca significância clínica. Entretanto, a contagem de leucócitos  $>100.000/\text{mm}^3$  ao diagnóstico é uma indicação para terapia direcionada mais intensa ao Sistema Nervoso Central (Pui *et al.*, 2004b). A presença de doença no SNC ao diagnóstico é também um fator prognóstico adverso apesar da intensificação do tratamento com terapia intratecal adicional e irradiações do SNC (Carroll *et al.*, 2003).

As diversas respostas clínicas associadas com os vários subtipos de LLA podem ser atribuídas à sensibilidade ou resistência as drogas por parte dos blastos leucêmicos que possuem anormalidades genéticas específicas. São considerados fatores de alto risco a hipodiploidia, a  $t(4;11)$  com reordenamento do gene *MLL*, a  $t(9;22)$  que apresenta o gene de fusão *BCR/ABL*. São indicativos de bom prognóstico a hiperdiploidia com 50 ou mais cromossomos, em particular as que incluem as trissomias dos cromossomos 4,7 e 10, e a  $t(12;21)$  com gene de fusão *TEL/AML1* (Friedmann *et al.*, 2000).

Em estudos mais antigos a  $t(1;19)(q23;q13)$  apresentava um impacto prognóstico adverso mas, a recente intensificação da terapia demonstrou uma melhora na sobrevida para as crianças, próxima de 90%. Estudos têm demonstrado que a  $t(4;11)(q21;q23)$ , que é mais freqüente em menores de 1 ano, em crianças mais velhas, o impacto negativo do rearranjo 11q23 é menor, mas continua sendo enquadrada no subgrupo de alto risco. Na LLA com cromossomo Ph positivo o prognóstico é geralmente desfavorável para adolescentes, mas é relativamente favorável em crianças com 1 a 9 anos de idade com baixa contagem de leucócitos ao diagnóstico (Carroll *et al.*, 2003 ; Pui *et al.*, 2004b ).

Células blásticas com o marcador CD10 negativo estão correlacionadas fortemente com rearranjos MLL/11q23. Lactentes sem a expressão de CD10 têm um SLE por 4 a 6 anos de 21% a 40% e a presença do CD10 proporciona uma SLE por 4 a 6 anos de 45% a 73%. A positividade do CD10 nas células leucêmicas está correlacionada com boa resposta ao tratamento (Hilden *et al.*, 2006).

A qualidade e rapidez da resposta ao tratamento é um dos mais importantes fatores prognósticos. Os critérios utilizados podem ser: persistência igual ou superior a 1.000 blastos circulantes/ $\mu$ L após 7 dias do tratamento com prednisona e administração de metotrexato; persistência de blastos na medula óssea no 15º dia do tratamento, a presença de 10% ou mais é indicativo de alto risco para recidiva; presença de 5% ou mais de blastos na medula óssea após 5 semanas do tratamento é indicativo de um prognóstico muito ruim (Aramburu, 2006). Pesquisadores do *St. Jude Children's Research Hospital* demonstraram que a presença de blastos no sangue periférico após uma semana da quimioterapia de indução convencional é também uma característica prognóstica adversa (Carroll *et al.*, 2003).

Passado duas décadas, o tratamento quimioterápico para LLA em crianças tem permanecido praticamente sem mudanças, o aumento da SLE é principalmente devido à otimização das medicações já existentes. Na tentativa de diminuir a toxicidade da terapia, foi necessário aumentar o conhecimento sobre os mecanismos celulares antileucêmicos e sobre a base biológica dos diferentes subtipos de LLA, e assim, entender melhor os diferentes fatores prognósticos envolvidos na resposta ao tratamento. Estudos farmacogenéticos dos agentes quimioterápicos e sua associação com fatores prognósticos já estão sendo desenvolvidos, sendo possível obter um melhoramento dos regimes quimioterápicos entre os diferentes grupos de pacientes.

#### **1.4.2 Aspectos Epidemiológicos**

O câncer em crianças corresponde a um grupo de várias doenças que têm em comum a proliferação descontrolada de células anormais e que pode ocorrer em qualquer local do organismo. As neoplasias mais frequentes na infância são as leucemias, tumores do sistema nervoso central e linfomas (INCA, 2007). A leucemia é o tipo mais frequente de câncer na infância, correspondendo a 30% de todos os cânceres diagnosticados em crianças menores que 15 anos. Na população infantil, LLA é cinco

vezes mais incidente do que a LMA, sendo a causa de aproximadamente 3/4 de todo o diagnóstico de leucemia em crianças (Belson *et al.*, 2007). A LLA representa aproximadamente 15% de todas as neoplasias malignas em indivíduos com 1 a 15 anos de idade, 5% entre 15 a 19 anos e <10% em maiores de 20 anos (Sallan *et al.*, 2006).

Do ponto de vista clínico, os tumores em crianças apresentam menores períodos de latência, em geral crescem rapidamente e são mais invasivos, porém respondem melhor ao tratamento e são considerados de bom prognóstico. A sobrevida média cumulativa em cinco anos é considerada razoavelmente boa nos Estados Unidos, onde a taxa da sobrevida é cerca de 77%. Na Europa, a sobrevida observada é semelhante à dos Estados Unidos, variando de 77% (no norte europeu) a 62% (no leste). O câncer pediátrico representa entre 0,5% a 3% de todas as neoplasias na maioria das populações. Em geral, a incidência total de tumores malignos na infância é maior no sexo masculino (INCA,2007).

Embora a LLA possa ocorrer em qualquer idade, sua incidência é maior entre crianças de 2 a 5 anos, numa proporção de cerca de 70% dos casos. A incidência diminui com o avanço da idade. Entre adolescentes e adultos jovens, a incidência das leucemias agudas é de cerca de 20%, voltando a aumentar após a sexagésima década de vida (Farias *et al.*, 2004).

Nos Estados Unidos, a taxa de incidência da LLA na infância é de 3 a 4 novos casos por ano por 100.000 crianças menores de 15 anos, com pico de incidência de aproximadamente 2-5 anos de idade (Belson *et al.*, 2007). Segundo as estimativas de incidência de câncer no Brasil para o ano de 2006, publicadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), as leucemias atingiram 5.330 homens e 4.220 mulheres. E em Goiás ocorreram 270 novos casos de leucemia em 2005 (INCA, 2005).

Estimou-se que, para o Brasil, no ano de 2008, a ocorrência de 351.720 casos novos de câncer, à exceção dos tumores de pele não melanoma. Portanto, espera-se a ocorrência de cerca de 9.890 casos novos de câncer em crianças e adolescentes até os 18 anos de idade (INCA,2007).

Um estudo realizado com 263 casos de câncer em Goiânia (1988 a 1996), envolvendo crianças menores de 15 anos, avaliou as tendências de incidências de mortalidade por neoplasias infantis. Os resultados indicaram que os tumores hematológicos (leucemias e linfomas) ocorreram em 45,3% dos casos. As leucemias representaram as neoplasias mais comuns, correspondendo a 27% de todos os casos de câncer infantil em Goiânia. Em seguida os linfomas e os tumores do sistema nervoso central que contabilizaram 18,3% dos casos. No grupo das leucemias, o tipo mais predominante foi o da leucemia linfóide aguda (LLA), correspondendo a 66,2% de todos os casos registrados. Em relação aos casos de mortalidade por câncer infantil em Goiânia no período de 1978 a 1996, 371 crianças menores de 15 anos morreram de neoplasias malignas, representando 2,3% a mortalidade geral das crianças durante o período referido. A maioria dos óbitos ocorreu em meninos menores de 5 anos (Curado *et al.*, 2000).

### **1.5 Anormalidades Cromossômicas na LLA**

A aplicação das ferramentas da citogenética para auxiliar no diagnóstico clínico iniciou-se com a descoberta em 1960 do cromossomo Philadelphia (Ph), um marcador cromossômico da LMC. Atualmente, os estudos cariotípicos das leucemias têm permitido a detecção de alterações cromossômicas que contribuem para o diagnóstico e o prognóstico dos pacientes. Adicionalmente, a classificação citogenética das neoplasias hematológicas, a caracterização de diferentes estágios do desenvolvimento neoplásico, a avaliação da remissão, agudização e do prognóstico dessas enfermidades e de diversos genes envolvidos na leucemogênese são possíveis graças ao desenvolvimento técnico e tecnológico na área da citogenética (Fett-Conte *et al.*, 2000).

As leucemias se destacam como um exemplo de doenças que apresentam alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais altamente consistentes e específicas, envolvendo genes que, uma vez alterados qualitativa ou quantitativamente, atuam como fatores de iniciação e progressão neoplásica (Fett-Conte *et al.*, 2000). Em geral, as anormalidades cariotípicas estão confinadas aos clones malignos, Portanto elas desaparecem durante a remissão hematológica e reaparecem com a recidiva. Algumas vezes, no entanto, há evidências de novas alterações superpostas ao clone anormal original (Lukes, 1998a).

Na LLA, entre 60% a 75% dos pacientes apresentam anormalidades numéricas do lote cromossômico, como a hiperdiploidia ou hipodiploidia, ou estruturais, como translocações e deleções. As alterações cariotípicas recorrentes estão associadas a características clínicas e prognósticas específicas (Artigas *et al.*, 2006). As Tabelas III e IV representam um resumo das principais alterações cromossômicas numéricas e estruturais, respectivamente, mais frequentemente observadas na LLA.

**Tabela III.** Anormalidades cromossômicas numéricas freqüentemente associadas à LLA infantil.

<b>Anormalidades cromossômicas numéricas</b>	<b>Imunofenótipo</b>	<b>Morfologia típica</b>	<b>Prognóstico</b>	<b>Freqüência</b>	<b>Comentários</b>
Hiperdiploidia (≥50 cromossomos)	Precursor LLA B	L1/L2	Bom	25-30%	- Ganhos mais freqüentes dos cromossomos 4, 6, 10, 14, 18 e 21.
Hiperdiploidia (49-50 cromossomos)	ND*	ND	Intermediário	10-15%	- Sem comentários
<i>Near</i> -haploidia	ND	L1/L2	Ruim	Raro	- Perdas mais freqüentes dos cromossomos 6, 8, 10, 14, 18, 21 e sexuais. - ≤30 cromossomos e usualmente com metáfases contendo de 23 a 28 cromossomos.
Hipodiploidia severa	ND	ND	Ruim	Raro	- Perdas mais freqüentes dos cromossomos 1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 18, 19, 21, 22 e sexuais.

\*Não descrito na literatura.

**Tabela IV.** Anormalidades Cromossômicas Estruturais frequentemente descritas para a LLA infantil.

Imunofenótipo	Anormalidades cromossômicas numéricas	Genes envolvidos	Morfologia típica	Prognóstico	Frequência	Comentários
LLA pró B	t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL/AF4</i>	L1/L2	Ruim	5-10%	- Contagem de leucócitos e blastos aumentada. - Translocação mais comum em lactentes.
LLA pré B	t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A/PBX1</i>	L1/L2	Intermediário	5-6%	- Leucometria elevada e índice de DNA <1,16.
LLA comum	del (6q)	ND*	ND	Bom	5-10%	- Parece ser marcador para as malignidades linfóides
	del / t (12p)	ND	L1/L2		10%	- Sem comentários
	t(12;21) (p12;q22)	<i>TEL/AML1</i>	ND	Bom	25%	- Anormalidades associadas mais frequentes: rearranjos 12p e trissomia 12
Variável: LLA pró B, LLA comum e LLA pré B	t(9;22) (q34;q11)	<i>BCR/ABL</i>	L1/L2	Ruim	3-5%	- >30% da translocação ocorre em um cariótipo hiperdiploide
LLA - T	t ou del (9p)	ND	L1/L2	Ruim	ND	- Sem comentários
	t(10;14) (q24;q11)	<i>TCR δ</i>	L1/L2	Ruim	ND	- Sem comentários
	t(11;14) (p13;q11)	<i>TCR α/δ</i>	L1/L2	Ruim	ND	- Sem comentários
	t(8;14) (q24;q11)	<i>TCR α</i>	L1/L2	Ruim	ND	- Sem comentários

\*Não descrito na literatura.

### 1.5.1 Anormalidades Numéricas

#### Hiperdiploidia

Ploidia ou nível de ploidia pode ser definido como o número de conjuntos cromossômicos. Pode ser determinada pelo estudo cariotípico ou pela análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo. É um fator prognóstico forte e independente. Está especialmente associado a um bom prognóstico com o fenótipo de linhagem B, principalmente em um imunofenótipo de células B comum (Kaspers *et al.*, 1995).

As células leucêmicas podem ser hiperdiploides. Aproximadamente 10% a 15% dos casos de LLA apresentam  $n = 47-50$  cromossomos e 25% a 30% dos casos apresentam um  $n \geq 50$  cromossomos e índice de DNA (ID)  $>1,16$ . Crianças com LLA que possuem uma hiperdiploidia elevada ( $n = 51$  a  $65$  cromossomos) respondem bem ao regime quimioterápico padrão e têm demonstrado um melhor resultado quando comparadas com os casos que não apresentam hiperdiploidia. Aproximadamente 85%

das crianças com este tipo de ploidia podem ser curados com tratamentos quimioterápicos (Farias *et al.*, 2004; Raimondi *et al.*, 1992; Moorman *et al.*, 2003).

A razão para esta significância prognóstica da hiperdiploidia em LLA na infância não está muito bem esclarecida. Algumas possibilidades podem ser consideradas. Casos hiperdiplóides têm relativamente alta porcentagem de células na fase S, resultando em uma maior sensibilidade as drogas que atuam especificamente no ciclo celular (Vincristina, 6-Mercaptopurina e Metotrexato). Em outra situação, os blastos hiperdiplóides acumulam significativamente altos níveis de Poliglutamato Metotrexato do que células com uma ploidia menor (Ito *et al.*, 1999).

O Metotrexato é um dos principais componentes dos protocolos terapêuticos contemporâneos para o tratamento da LLA em crianças. É um substrato para a enzima Folato Poliglutamato Sintetase (FPGS), que converte folatos em folato poliglutamato, que é a forma da coenzima natural do ácido fólico. Enquanto que o folato poliglutamato natural contém 5 a 7 resíduos de glutamyl nas células, o poliglutamato metotrexato (MTXPG) em células não leucêmicas contém 3 resíduos de glutamyl (MTXGlu<sub>3</sub>). Os linfoblastos de crianças com LLA acumulam predominantemente MTXPG com 5 resíduos de glutamyl (MTXGlu<sub>5</sub>). O MTXPG com mais do que 3 resíduos são retidos nas células por longos intervalos, inibindo a síntese de DNA. Além de acumular na célula conferindo citotoxicidade, também inibe algumas outras enzimas como a Dihidrofolato Redutase (DHFR), a Timidilato Sintetase e as Transformilases, que são necessárias para a síntese das purinas, e não são inibidas pelo MTX (Whitehead *et al.*, 1992). Portanto, neste contexto, a habilidade das células leucêmicas acumularem MTXPG constitui um determinante do efeito antileucêmico da droga.

Mais de 97% dos blastos hiperdiplóides apresentam três ou quatro cópias do cromossomo 21, que abriga um gene que codifica o transportador de metotrexato dentro da célula. Este aumento do transportador folato resultante de um aumento na dosagem do gene pode ser em parte responsável pelo acúmulo excessivo de poliglutamato metotrexato nas células leucêmicas hiperdiplóides (Pui *et al.*, 2004a).

O ganho de alguns cromossomos específicos, +6, +4, +10 e +17, e cariótipos com hiperdiploidia muito elevada ( $n \geq 50$  cromossomos) podem melhorar o prognóstico de crianças com LLA, enquanto os cariótipos com ganho do cromossomo 5 podem estar

associados com um pior prognóstico. Segundo estudo realizado por Moorman e colaboradores (2003), apenas as trissomias dos cromossomos 4,10 e 18 demonstraram algum efeito significativo com relação ao prognóstico. Pacientes com estas trissomias tiveram um melhor prognóstico. A trissomia do 18 conferiu um menor risco de recidiva e uma sobrevida global aumentada, enquanto pacientes com a trissomia do cromossomo 4 tiveram uma sobrevida global aumentada, mas sem promover redução no risco de recidiva.

Segundo estudo realizado por dois grupos POG (do inglês, *Pediatric Oncology Group*) e CCG (do inglês, *Childrens Cancer Group*) a presença das trissomias simultâneas (trissomias “triplas”) dos cromossomos 4, 10 e 17 conferiu um excelente prognóstico aos portadores, com uma SLE de 5 anos entre 89,3% e 91,5% (Schultz *et al.*, 2007).

A LLA infantil foi a primeira malignidade na qual a hiperdiploidia apresentou-se associada a um prognóstico favorável. Posteriormente foi observado que em crianças com Neuroblastoma, o conteúdo de DNA hiperdiploide também poderia predizer uma resposta favorável ao tratamento com Ciclofosfamida e Doxorubicina. Ao contrário, o prognóstico das neoplasias linfoproliferativas e tumores sólidos em adultos tem geralmente sido pior para os casos com índice de DNA hiperdiploide (Look *et al.*, 1985). Portanto, a importância prognóstica relacionada a clones tumorais hiperdiploides não deve estar relacionada apenas como um fator favorável sendo necessário observar o contexto no qual a neoplasia se apresenta.

### **Hipodiploidia**

A hipodiploidia (n= 24 a 36 cromossomos) é uma variante relativamente rara, observada apenas em 6% a 7% dos pacientes com LLA. Aproximadamente 5% dos pacientes com LLA apresentam um cariótipo com 45 cromossomos, enquanto que células blásticas com menos de 45 cromossomos são raramente observadas. Pacientes que apresentam menos de 45 cromossomos têm uma resposta inferior quando tratados com protocolos terapêuticos utilizados para outros grupos de ploidia. Assim, o caráter prognóstico da hipodiploidia na LLA ainda é controverso.



Alguns investigadores sugerem a divisão dos grupos hipodiplóides. A near-haploidia é um subgrupo distinto da LLA hipodiplóide nos quais os blastos têm de 24 a 34 cromossomos e, mais frequentemente, de 26 a 28 cromossomos. Sua incidência é baixa, sendo observada em aproximadamente 0,5% dos pacientes com LLA. Casos hipodiplóides com 35 a 44 cromossomos também são raros, ocorrendo em aproximadamente 0,8% dos casos de LLA (Raimondi *et al.*, 2003).

Segundo um estudo realizado por Pui e colaboradores (1987), os casos hipodiplóides apresentaram idades variando de  $<2$  ou  $\geq 10$  anos, dosagem de Desidrogenase Láctica (DHL) elevada, e translocações cromossômicas. Portanto, a baixa resposta ao tratamento dos casos de LLA hipodiplóides pode ser atribuída, pelo menos, em parte, a sua associação com características clínicas e biológicas de alto risco e também devido à perda de cromossomos que levaria a alteração da expressão de alguns proto-oncogenes e genes supressores de tumor que são importantes para o processo da tumorigênese (Pui *et al.*, 1987).

### **1.5.2 Anormalidades Estruturais**

#### **Rearranjo *TEL/AML1***

A  $t(12;21)(p12;q22)$ , entre o gene *TEL* (*ETV6*) do cromossomo 12 e o gene *AML1* do cromossomo 21, proporciona a formação do transcrito híbrido resultante da fusão *TEL/AML1* (Artigas, 2006). A análise por Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) tem demonstrado que a fusão *TEL/AML1* é a anormalidade genética mais comum da LLA na infância, sendo encontrada em aproximadamente 25% dos casos. A translocação está associada com baixa contagem de leucócitos, idade entre 2 e 10 anos, início precoce da doença, imunofenótipo da linhagem B e bom prognóstico.

Anormalidades citogenéticas extras associadas com  $t(12;21)$  estão freqüentemente presentes. As aberrações estruturais e numéricas mais encontradas são rearranjos 12p e trissomia do 21, respectivamente. Aproximadamente  $\frac{1}{4}$  das alterações cromossômicas são deleções 12p (Martinez-Ramirez *et al.*, 2001). Entretanto, questões sobre a relação entre a  $t(12;21)$  e bom prognóstico tem surgido pelo fato de vários pacientes com a fusão *TEL/AML1* demonstrarem piores resultados clínicos se outros rearranjos gênicos estiverem presentes (Woo *et al.*, 2005).

Além do envolvimento do gene *TEL* na t(12;21)(p13;q22) ele pode estar presente em outras translocações como: t(3;12)(q26;p13), *ETV6-MDS1/EVII*; t(9;12)(q34;p13), *ETV6-ABL*; t(12;22)(p13;q11), *MNI-ETV6*; t(10;12)(q24;p13), *ETV6-?* (Raimondi *et al.*, 1997).

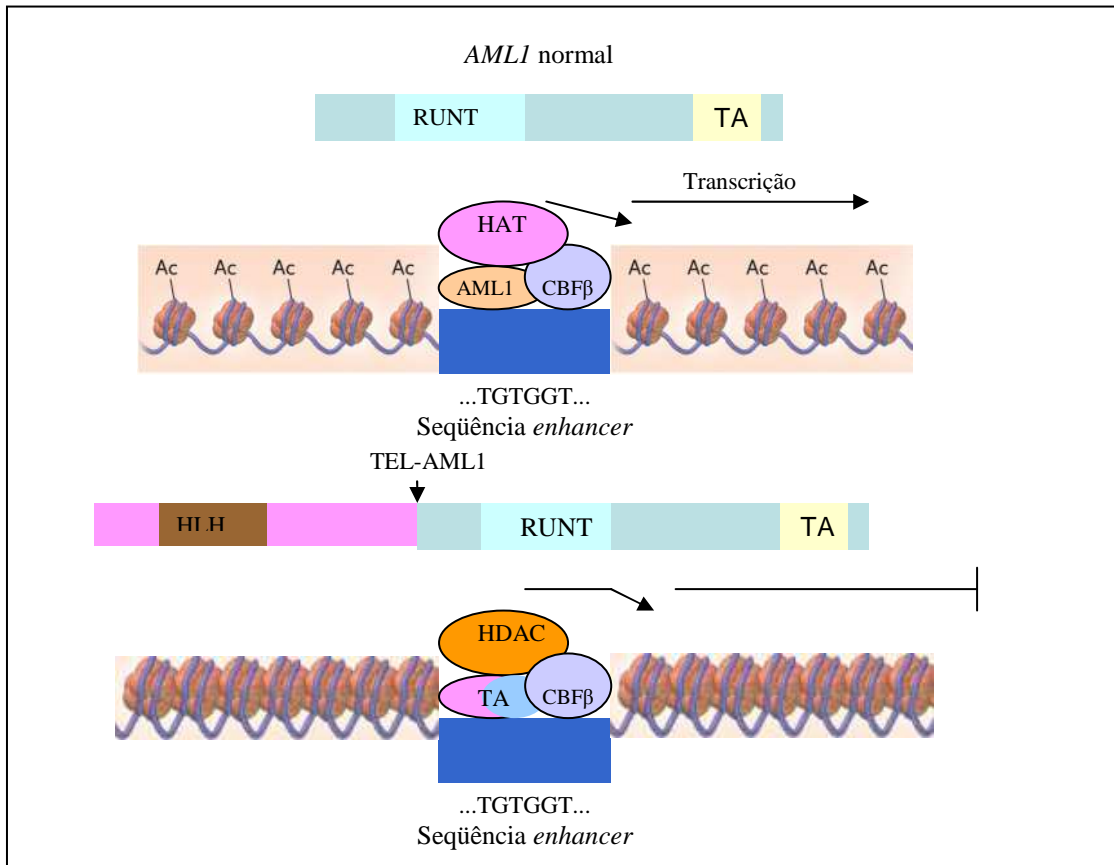
O gene *TEL* (nomeado para Translocação e ETS em Leucemia) é também conhecido como *ETV6* (nomeado para Gene Variante 6 de ETS). Ele foi inicialmente identificado por sua fusão com o *PDGFR $\beta$*  (do inglês, *platelet-derived growth factor receptor beta*) em um caso de Leucemia Mielomonocítica Crônica com a t(15;12)(q33;p13) (Raimondi *et al.*, 1997). O gene codifica um fator de transcrição da família ETS, como outros membros desta família, funciona como um regulador transcricional seqüência específica de ligação ao DNA.

A proteína expressa a partir de *TEL* possui dois domínios funcionais: PNT (do inglês, *N-terminal pointed domain*) responsável pela interação proteína-proteína e o domínio C-terminal correspondendo ao sítio de ligação ao DNA. Embora geralmente presente em malignidades hematopoéticas, o gene *TEL* está normalmente expresso em tecidos hematopoéticos e não hematopoéticos. Estudos *knockout* do gene *TEL* em camundongos sugeriram que ele está envolvido na hematopoese da medula óssea e manutenção da rede vascular. Sendo, portanto, a primeira proteína transcricional necessária para a hematopoese na medula óssea (Rubnitz *et al.*, 1999). Estudos recentes, que relataram rearranjos cromossômicos envolvendo 12p13 observaram associação do gene *TEL* em leucemias de origem mielóide e linfóide (Irvin *et al.*, 2003; Bernal Berveloo *et al.*, 2001) e fibrossarcomas congênitos (Knezevich *et al.*, 1998).

O *AML1*, também conhecido como *CBFA2*, é um homólogo humano do *Core Binding Factor* (CBF), um ativador transcricional da família Runt. Ele codifica um fator de transcrição que se liga a seqüência enhancer TGT/cGGT. A afinidade de ligação ao DNA do *AML1* é aumentada através da heterodimerização com a proteína CBF $\beta$ , formando um complexo chamado *Human Core Binding Factor*. A atividade de ligação ao DNA com o CBF $\beta$  é crítica para a expressão tecido específica de vários genes hematopéticos específicos (Mavrothalassitis *et al.*, 2000; Mikhail *et al.*, 2002).

O *AML1*, em condições normais, se liga a seqüências regulatórias transcricionais do tipo *enhancer* como um heterodímero com o CBF $\beta$ , e juntos recrutam um complexo de ativação transcricional que incluem proteínas com atividade de histonas acetilases. Os resíduos de lisina acetilato destas proteínas nas histonas centrais, abrem à estrutura da cromatina e levam a ativação transcricional do gene *AML1*, que tem um papel central na hematopoese. A presença da proteína de fusão TEL/*AML1* resultante da t(12;21) mantém à habilidade de ligação a seqüência *enhancer* e forma o heterodímero com CBF $\beta$ . Diferentemente da proteína *AML1* normal, ele recruta um correpressor transcricional que inclui proteínas com atividade de desacetilase, que remove os grupos acetil das histonas, resultando no fechamento da cromatina e repressão da transcrição. Estas modificações na cascata de transcrição, mediada pelo *AML1* normal, alteram a capacidade de renovação e diferenciação da *stem cell* hematopoética (Pui *et al.*, 2004a).

A expressão do gene quimérico TEL-*AML1* é dirigida pelo promotor de TEL, e a proteína de fusão funciona diretamente como repressor transcricional. Alguns pacientes com essa fusão podem perder o alelo TEL normal não translocado, sugerindo que a perda do TEL normal contribui diretamente para a progressão da transformação neoplásica (Mikhail *et al.*, 2002). A Figura 34 representa de forma esquemática o mecanismo de repressão transcricional descrito acima.



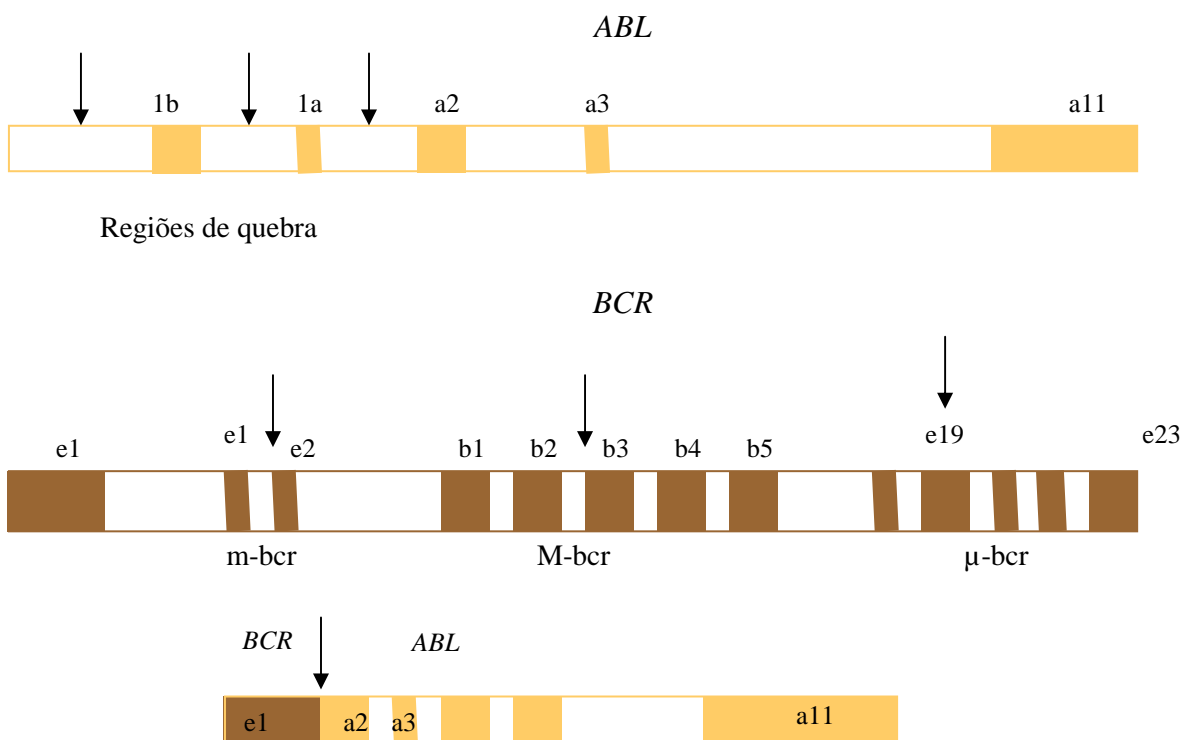
**Figura 3.** Adaptado de Pui *et al.*, 2004a. Representação esquemática da t(12;21)(p12;q22) com rearranjo *TEL-AML1*.

Em 90% dos casos com t(12;21) o segundo alelo *TEL* está deletado. A perda de heterozigidade do alelo *TEL* é também observada em outras leucemias e em alguns tumores sólidos. A perda de heterozigidade sugere um papel como um gene supressor de tumor (Irvin *et al.*, 2003). Neste contexto, pode-se pressupor que as funções da proteína *TEL* normal podem retardar ou bloquear a progressão da leucemia, ou seja, *TEL* teria alguma participação na formação das células sanguíneas (Wang *et al.*, 1998).

### **Rearranjo *BCR/ABL***

A translocação (9;22)(q34;q11) justapõe o proto-oncogene *ABL* ao gene *BCR* (do inglês, *breakpoint cluster region*) gerando um gene quimérico *BCR/ABL*. A quebra no gene *ABL* ocorre principalmente entre os éxons a1 e a2. No cromossomo 22 a quebra mais freqüente e predominante na LLA é na *minor cluster region* (m-bcr) entre os éxons e1 e e2. Porém em 1/3 dos casos de LLA Ph<sup>+</sup>, a quebra ocorre na *major cluster region* (M-bcr) entre os éxons b2 e b3 ou b3 e b4. As proteínas quiméricas p210 e p190 resultam dos rearranjos M-*BCR/ABL* e m-*BCR/ABL*, respectivamente. As células blásticas na LLA tipicamente expressam p190, mas a expressão da p210 tem sido observada em alguns casos, principalmente em adultos. A proteína de fusão promove uma desregulação da atividade de tirosina quinase. Esta fusão está associada com pior

prognóstico e em alguns protocolos é uma indicação para transplante de medula óssea (El-Sissy *et al.*, 2006; Scharappe *et al.*, 1998) (Figura 4).



**Figura 4.** Adaptado Scharappe *et al.*, 1998. Representação esquemática do gene de fusão BCR/ABL. As setas indicam os principais pontos de quebra do gene BCR e do gene ABL. No gene BCR se destacam as regiões m-bcr, M-bcr e μ-bcr. A última figura representa o gene de fusão BCR/ABL com reordenamento e1a2.

Aproximadamente 3 a 5% das crianças com LLA apresentam a  $t(9;22)(q34;q11)$ . A maior frequência é em adultos, cerca de 20 a 40%. É considerada um dos marcadores moleculares associados com um alto risco para a ineficiência do tratamento da LLA. Avanços na cura de crianças com LLA não tem ainda incluído pacientes com Ph+. Apenas em muitos poucos casos tem-se uma quimioterapia com sucesso (Schaffell, Simões, 2008).

As  $t(9;22)(q34;q11)$  e  $t(4;11)(q21;q23)$  estão associadas a um pior prognóstico, e juntamente com idade, contagem de leucócitos e baixa resposta ao tratamento quimioterápico, definem o grupo de pacientes de alto risco. Terapias intensivas de indução e pós-remissão, incluindo transplante, têm melhorado a resposta deste grupo de pacientes (Ribera *et al.*, 2002).

### **Rearranjos *MLL***

As alterações envolvendo 11q23 são observadas em 8 a 10% dos casos de LLA em crianças. A alteração mais freqüente é a t(4;11)(q21;q23), ocorrendo em 36% dos casos de LLA em lactentes, seguida da t(11;19)(q23;p13). O denominador comum de todas essas translocações é a perda de função do gene localizado em 11q23 descrito em 1991 como *MLL* (gene da Leucemia Linfóide-Mielóide), também chamado de *ALL1*, *HRX* e *HTRX1*. Aproximadamente 20 pares de genes tem sido clonados de células leucêmicas com vários tipos de translocações recíprocas em 11q23. (Martin Ramos *et al.*, 2001; Emerenciano, Koifman, Pombo de Oliveira, 2007).

Dependendo do imunofenótipo pode existir uma heterogeneidade de respostas. Por exemplo, alguns pacientes apresentam um excelente prognóstico quando há presença da t(11;19)(q23;p13) e fusão *MLL-ENL* em LLA de linhagem T. Entre os casos com LLA de linhagem B e t(4;11)(q21;q23) ou t(11;19)(q23;p13), em lactentes menores de 12 meses de idade o prognóstico já é ruim. Por outro lado, o mesmo evento mutacional observado em pacientes com 1 a 9 anos de idade resulta em um prognóstico relativamente favorável (Pui *et al.*, 2001).

A t(4;11) promove a formação de um transcrito de fusão *MLL-AF4* e foi relatado ser o maior fator prognóstico descrito para LLA em lactentes. Esta alteração está associada a aspectos de alto risco, notavelmente uma leucometria maior que 10.000/mm<sup>3</sup>, idade inferior a 1 ano ou superior a 15 anos, organomegalias e envolvimento do SNC. As células leucêmicas têm morfologia FAB L2 e imunofenótipo pré-B (CD10-), podem expressar marcadores mielóides precoces, bem como marcadores linfóides da linhagem B, sugerindo que estas possam ser células pluripotentes com capacidade de diferenciação em ambas as linhagens linfóide e mielóide. Com prognóstico ruim, as recaídas são precoces, em menos de 2 anos, sendo o transplante de medula óssea o tratamento de escolha (Lukes, 1998b; Martin Ramos *et al.*, 2001). Resultados demonstram uma SLE entre 22 a 54% em 3 a 6 anos. Lactentes menores de 6 meses de idade ao diagnóstico têm uma SLE de 8 a 40% enquanto que os de 6 a 12 meses de idade ao diagnóstico têm uma SLE de 40 a 71% (Hilden *et al.*, 2006).

O gene *MLL* codifica uma proteína de 3969 aminoácidos contendo dedos de zinco e *AT-hook motifs* que tem homologia com a proteína da *Drosophila trithorax*. Através da regulação ao gene *HOX*, o *MLL* é essencial para o desenvolvimento normal dos mamíferos e da hematopoese. Apesar da função dos vários genes de fusão com *MLL* e suas proteínas ser ainda pouco conhecida, parece que as suas proteínas de fusão alteram a habilidade do gene *MLL* selvagem de regular a expressão do gene *HOX*, levando a leucemogênese (Tsutsumi *et al.*, 2003).

Translocações que envolvem o gene *MLL* resultam em proteínas quiméricas consistindo da porção N-terminal do *MLL* fundida à porção C-terminal de 1 ou mais de 40 pares. A proteína de fusão tem um ganho de função dominante que aumenta sua atividade transcricional. Ela ocorre em mais de 80% em crianças menores de 1 ano na LLA e em muitas leucemias secundárias à quimioterapia pelo uso de inibidores da topoisomerase II. A exposição de fetos a substâncias que afetam a topoisomerase II podem, portanto, ser um evento leucemogênico nas leucemias que expressam esse rearranjo. Uma variedade de compostos sintéticos e naturais, incluindo antibióticos com quinolona, flavonóides em alimentos e bebidas, catequinas, metabólitos do benzeno e alguns estrogênicos podem inibir a topoisomerase II *in vivo* ou *in vitro* (Pui *et al.*, 2004a).

### **Rearranjo *E2A-PBX1***

Esta alteração foi descrita primeiramente por Carroll e colaboradores (1983). O rearranjo foi caracterizado como uma translocação não aleatória associada com LLA pré-B, cujos linfoblastos apresentavam expressão de Ig citoplasmática (Hunger *et al.*, 1991).

Aproximadamente 25 a 30% da LLA de células pré-B em crianças é caracterizada pela presença da t(1;19)(q23;p13). A LLA é geralmente acompanhada de uma baixa resposta a regimes quimioterápicos padrão (Lau *et al.*, 1998). Há uma fusão entre o gene *E2A* do cromossomo 19 e o *PBX1* do cromossomo 1, que resulta na expressão de um fator de transcrição quimérico E2A-PBX1a e E2A-PBX1b sendo que as isoformas são geradas por *splicing* alternativo da porção do *PBX1* do RNAm (Bayly *et al.*, 2006). As características clínicas da LLA pré-B com a t(1;19) incluem idade

média de 5 anos, contagem de leucócitos de 21 a  $28 \times 10^9$ /L, altos valores de DHL e índice de DNA  $< 1,6$  (Martin Ramos *et al.*, 2001).

O evento de fusão resulta na expressão de uma proteína que combina os domínios de transativação do E2A com regiões do homeodomínio de ligação ao DNA de outra proteína, inicialmente chamada de PRL, mas mais tarde renomeada de PBX1. Enquanto o E2A tem muitas funções durante o desenvolvimento de células B, PBX1 não é expresso em tecidos linfóides. Entretanto dois genes proximamente relacionados, *PBX2* e *PBX3*, são transcritos em linfócitos. A função do *PBX1* foi revelada através de estudos genéticos com seu homólogo, gene *extradenticle* (*exd*) da *Drosophila melanogaster*. As porções do PBX1 necessárias para interações com proteínas HOX são o homeodomínio e a região C-terminal, ambos retidos no rearranjo E2A-PBX1 (Aspland *et al.*, 2001).

O locus do *E2A* codifica dois produtos gênicos, E12 e E47, que são produzidos por eventos diferenciais de *splicing*. Ambas as proteínas pertencem a classe I da família de proteínas *helix-loop-helix* básica (bHLH), e contêm dois domínios de ativação, denominados AD1 e AD2. Estas proteínas são expressas amplamente e podem heterodimerizar com uma variedade de proteínas bHLH tecido-específico, incluindo fatores miogênicos e neurogênicos. Em populações de linfócitos B, *E2A* funciona predominantemente como complexos homodiméricos. A importância do *E2A* como um regulador mestre da linfopoiese B foi demonstrada pela sua habilidade em aumentar a transcrição gênica da célula B específica em células não linfóides. Por exemplo, a expressão ectópica de *E2A* em fibroblastos ativa a transcrição de transcritos de Imunoglobulina (Ig) de cadeia pesada em célula B específica. O *E2A* é também um regulador importante no desenvolvimento de células T. Camundongos deficientes em *E2A* demonstraram defeitos em múltiplos estágios de seleção e diferenciação dos tímócitos. A diferenciação e a ativação de linfócitos contribuem para a habilidade do *E2A* em transformar células quando expressado como parte de uma oncoproteína E2A-PBX1 (Aspland *et al.*, 2001).

Proteínas homeodomínio constituem uma classe específica de fatores de transcrição de ligação ao DNA que estão envolvidos em múltiplos genes regulatórios e decisões desenvolvimentais. Embora perturbações na expressão de proteínas



homeodomínio estejam geralmente associadas com defeitos morfológicos, estudos recentes demonstram que sua expressão desregulada pode também contribuir para a transformação neoplásica (Monica *et al.*, 1994).

Existem evidências de que o potencial oncogênico da t(1;19) pode ser devido, em parte, a redução dos níveis de *E2A* tipo selvagem. Níveis reduzidos de *E2A* podem romper a maturação da linhagem linfóide e expandir populações progenitoras não diferenciadas. A evidência mais convincente do *E2A* como um regulador negativo do crescimento celular tumorigênico *in vivo* é o desenvolvimento de timomas em camundongos deficientes (Aspland *et al.*, 2001).

### **Anormalidades que envolvem Linhagem T**

A LLA-T compreende 12 a 15% das crianças com LLA. Ela apresenta características clínicas, bioquímicas, imunológicas e cromossômicas que são distintas da LLA de linhagem B (Schneider *et al.*, 2000). As características clínicas são semelhantes às de linfoma linfoblástico, 50% dos casos apresentam massa mediastinal, hiperleucocitose (valor médio de  $50 \times 10^9/L$ ), freqüente invasão do SNC e maior incidência em maiores de 9 anos de idade. A resposta à quimioterapia e a sobrevida são menores do que em pacientes com LLA-B, atribuído em parte pela alta leucocitose e pela ausência de clones hiperdiplóides (Raimondi *et al.*, 1993).

As anormalidades cariotípicas mais comuns em LLA-T são as t(1;14)(p32;q11), t(10;14)(q24;q11), t(11;14)(p13;q11) e t(7;9)(q34;q32) que originam uma super expressão dos oncogenes *TAL1*, *HOX11*, *RHOM2*, e *TAL2*, respectivamente. A incidência de cariótipos normais oscila entre 30% e 40%, muito maior do que na LLA-B. As células são blastos de tímócitos imaturos com melhor prognóstico do que os que apresentam alterações cromossômicas clonais (Martin Ramos *et al.*, 2001).

A anormalidade do cariótipo mais freqüente em LLA-T, detectada em 7% dos casos, é a t(11;14)(p13;q11). O ponto de quebra localiza-se entre os locus *TCR  $\alpha/\delta$*  no cromossomo 14. No cromossomo 11 a quebra ocorre no gene *TTG1* (do inglês, *T-cell translocation gene 1*) ou *RBTN1* (do inglês, *rhombotin 1*), ele codifica uma proteína nuclear cuja estrutura tem sido altamente conservada entre as espécies, sugerindo um importante papel na ontogenia. Outro gene relacionado o *RBTN2* (do inglês, *rhombotin*

2) foi encontrado próximo a região 11p13. Membros do gene *rhombotin* podem ser uma classe de fatores de transcrição com relevância particular nas neoplasias de células T (Raimondi, 1993).

Entre 5% a 10% dos pacientes com LLA-T e linfomas apresentam a  $t(10;14)(q24;q11)$ . Ocorre no locus *TCR $\delta$*  do cromossomo 14 e na região de agrupamento do cromossomo 10. A translocação pode resultar em uma desregulação do gene homeobox, nomeado *HOX11*. Este demonstra homologia com outros genes homeobox que normalmente codificam proteínas de ligação ao DNA sequência específica e quando expressada de forma anormal pode contribuir para a leucemogênese (Raimondi, 1993).

A  $t(1;14)(p32-34;q11)$  tem sido observada em 3% dos casos de pacientes com LLA-T. O gene *TALI* (*SCL1/TCL5*) é justaposto ao locus da cadeia *TCR $\alpha/\delta$*  no cromossomo 14. A expressão do *TALI* inclui seqüências contendo cerne hélice-alfa-hélice, um domínio de ligação ao DNA presente em uma família de proteínas envolvidas no controle do crescimento e diferenciação celular. Alterações do *TALI* sejam por tradução ou outros rearranjos, representam à alteração genética mais comum associada com LLA-T (Raimondi, 1993).

Um estudo realizado por Schneider e colaboradores (2000) com objetivo de definir as diferenças citogenéticas entre LLA-B e LLA-T e determinar o valor prognóstico das alterações citogenéticas em LLA em crianças, sugeriu que há claramente diferenças cariotípicas entre as duas linhagens e ainda diferenças de sobrevida associadas aos blastos do tipo T. O estudo apontou uma melhor sobrevida associada aos cariótipos normais e com  $t(10;14)$  (Schneider *et al.*, 2000).

Algumas mutações gênicas podem provavelmente auxiliar na alteração dos mecanismos de proliferação e diferenciação celular juntamente com os rearranjos cromossômicos. A expressão aumentada do *FLT-3* um receptor de tirosina kinase importante no desenvolvimento da hematopoese, ocorre em casos de LLA com rearranjos do gene *MLL* ou casos hiperdiplóides envolvendo mais de 50 cromossomos. Apesar da raridade de mutações de inativação ou deleções do gene *RB* em LLA, a inativação funcional do caminho do *RB* através da deleção ou silenciamento epigenético

do p16 e p15 ocorrem em quase todos os casos de LLA-T e em poucos casos de LLA-B. Alterações destes inibidores de cinase dependente de Ciclina D ocorrem com menor extensão em LLA-T em adulto. Assim, como o gene *RB*, o gene *TP53*, raramente está alterado na LLA, entretanto componentes da via *p53* estão frequentemente mutados. Deleção ou silenciamento transcricional de p14, assim como a expressão aumentada de HDM2 ou silenciamento de p21, um alvo transcricional de p53, ocorre em aproximadamente 50% dos casos de LLA. Os produtos p16 e p14 são codificados por molduras de tradução alternativas em um mesmo locus. A alta frequência de deleções homocigóticas em p16 e p14 sugere que as alterações dos caminhos dos genes *RB* e *TP53* colaboram com a patogênese da LLA (Pui *et al.*, 2004a).

## **2. Justificativa**

A presença das alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais na LLA representam uma importante informação no que diz respeito ao prognóstico da doença, bem como pode orientar o tipo do tratamento quimioterápico a ser utilizado.

No Estado de Goiás, até o momento, nenhum estudo foi conduzido visando correlacionar os achados cariotípicos e LLA. Portanto, os dados obtidos a partir do presente estudo poderão contribuir para orientação quanto à abordagem terapêutica, para a definição do diagnóstico e prognóstico do paciente. Adicionalmente, a diversidade dos marcadores citogenéticos associados à LLA contribui para se compreender a fisiopatologia desta complexa doença.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Geral**

1. Avaliar as alterações citogenéticas nas Leucemias Linfóides Agudas em crianças de 0 a 15 anos utilizando a citogenética convencional.
2. Correlacionar os achados citogenéticos com o prognóstico.

#### **3.2. Específicos**

- Determinar a frequência das alterações citogenéticas em pacientes com LLA.
- Avaliar o prognóstico da LLA a partir dos achados citogenéticos.
- Correlacionar os resultados citogenéticos obtidos com aspectos clínicos e laboratoriais.
- Capacitar recursos humanos para o desenvolvimento do pensamento crítico-analítico e para a realização de testes laboratoriais em citogenética.
- Estabelecer possível co-relação entre resposta ao tratamento e os achados citogenéticos.

## **4. Metodologia e Delineamento do Estudo**

### **4.1. Delineamento do estudo**

Foi realizado um estudo prospectivo no Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) da Universidade Católica de Goiás em mútua parceria com o Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene) da Superintendência Leide das Neves Ferreira /Secretaria de Estado da Saúde / Governo do Estado de Goiás. Os casos foram obtidos junto ao Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital Araújo Jorge (HAJ) e do Serviço de Oncologia Pediátrica da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia (SCMG).

### **4.2. Grupo amostral**

Foram avaliados aproximadamente 25 amostras de medula óssea ou sangue periférico para LLA na infância, com idade variando de 0 a 15 anos, sendo que as amostras foram obtidas previamente ao início da quimioterapia dos pacientes atendidos no HAJ e SCMG. A participação individual no estudo e a doação das amostras biológicas foram voluntárias. Antes do início da coleta das amostras a pesquisadora responsável pelo projeto fez os esclarecimentos necessários para o entendimento e posterior adesão ao estudo que foi obtida mediante o preenchimento e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

#### **4.2.1 Critério de inclusão**

- Crianças de 0 a 15 anos de idade com diagnóstico de LLA.
- Amostras obtidas antes do início da quimioterapia.
- Tumor primário.
- Crianças cujo responsável assinou o TCLE.

#### **4.2.2 Critério de exclusão**

- Crianças que já tenham iniciado o tratamento.
- Amostra de adultos.

#### **4.3. Coleta de Medula Óssea e Sangue Periférico**

O Setor de Oncologia Pediátrica do HAJ/ACCG e o Setor de Pediatria da SCMG, a época do diagnóstico da LLA, realizaram a coleta de medula óssea para estudo morfológico e/ou imunofenotípico. Da amostra de medula óssea foi retirado 2,0 mL para o estudo citogenético. O responsável técnico de enfermagem de cada setor coletou 2,0 mL de sangue periférico para o estudo citogenético.

O anticoagulante de uso foi a heparina. As amostras foram transportadas refrigeradas (4 a 8°C) para o LaGene/NPR e processadas no período máximo de até 2 horas após a coleta do material biológico.

#### **4.4. Citogenética convencional**

##### **4.4.1 Início da Cultura**

- Verificou-se a qualidade do conteúdo dos frascos de cultura com meio incompleto (RPMI 1640-GIBCO®).

- Etiquetou-se os frascos de cultura, com o código de identificação das amostras dos pacientes.

- Nos tubos com meio de cultura incompleto foram acrescentados, 1,0 mL de Soro Fetal Bovino, 100µL de L – Glutamina. Um total de 100 µL de Fito-hemoaglutinina foi utilizada somente nas culturas com sangue periférico.

- Adicionou-se 1,0 mL da amostra de medula óssea e sangue periférico nos respectivos tubos contendo o meio de cultura.

- Homogeneizou-se a suspensão celular lentamente e por movimentos circulares.

-As culturas foram incubadas a 37°C por 48h/72h.

#### **4.4.2 Bloqueio da Cultura**

- Um volume de 75µL de colchicina (10µg/mL) foi acrescido à suspensão celular após 23 horas, para cultura com medula óssea, ou 47 horas para cultura com sangue periférico, do início da cultura. A amostra foi incubada a 37°C por 30 minutos.

- O volume do frasco de cultura foi transferido para um tubo cônico de 15 mL devidamente identificado e centrifugado a 1000 rpm durante 10 minutos.

- Desprezou-se o sobrenadante, por aspiração, e foi acrescentado, lentamente por gotejamento, 10 mL de Solução Hipotônica de Cloreto de Potássio a 0,075 Molar e incubado por 25 minutos a 37°C.

- Completou-se o volume com 14 mL de solução fixadora de Carnoy (3 partes de álcool metílico para 1 parte de ácido acético). A suspensão celular foi homogeneizada lentamente por inversão e deixada a temperatura ambiente por 10 minutos.

- A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 1000 rpm e o sobrenadante aspirado, deixando-se 1,0 mL da solução cobrindo o botão de células.

- Acrescentou-se lentamente, por gotejamento e sob agitação constante, até se completar 14 mL, a solução de Carnoy.

- Os dois últimos procedimentos foram repetidos por duas ou três vezes, até que a solução ficasse com o sobrenadante limpo.

- Centrifugou-se por 10 minutos a 1000 rpm e desprezou-se o sobrenadante deixando aproximadamente 1,5 a 2,0 mL de solução de células.

#### **4.4.3 Preparação das Lâminas**

- As lâminas foram limpas com solução de álcool etílico a 70%.

- No mínimo, cinco laminas foram preparadas.

- As lâminas com o código correspondente a cada caso foram identificadas.



- No momento de uso, as lâminas foram mergulhadas em água destilada e colocadas em vapor de banho-maria a 60°C.

- A suspensão de células foi homogeneizada e gotejada, utilizando-se micropipeta de 250µL. Em cada lâmina foram dispensadas 3 gotas da suspensão.

- As lâminas foram secadas à temperatura ambiente e observadas no microscópio invertido para identificação de metáfases viáveis.

#### **4.4.4 Bandeamento**

- Foram preparadas alíquotas de 0,5 mL de Tripsina ( 2,8%).

- Cada alíquota foi completada para uma qsp de 50 mL de tampão PBS.

- A solução de tripsina (0,025%) foi aquecida em banho-maria até atingir 30°C.

As lâminas foram submersas nesta solução por 30 segundos.

- A ação da Tripsina foi interrompida, mergulhando a lâmina em metanol.

- As lâminas foram colocadas em solução de Giemsa a 4% por 3 minutos.

- Por último, a lâmina foi enxaguada em água e secada em seguida.

#### **4.5 Análise Citogenética**

Sistema de microscopia óptica motorizada, interligado a um computador equipado com *Software* específico para análise citogenética (IKAROS<sup>R</sup> *Metasystems Germany*), foi utilizado como ferramenta de apoio para a análise citogenética convencional.

#### **4.6 Considerações Éticas**

O presente estudo recebeu parecer favorável do Comitê de Ética de Pesquisa com seres humanos da Associação de Combate ao Câncer em Goiás e da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia. Os números dos protocolos atribuídos foram 008/08 e 027/008, respectivamente.

## 5. Resultados

Um total de 25 pacientes (0-15 anos) com diagnóstico de LLA foram encaminhadas das instituições de origem (Tabela V), no período de março a dezembro de 2008, ao Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene) da SuLeide/SES/GO para análise citogenética. Três casos foram excluídos do estudo devido à ausência da leucose, confirmada pela realização da imunofenotipagem.

**Tabela V.** Envio de Casos pelas Instituições de Origem.

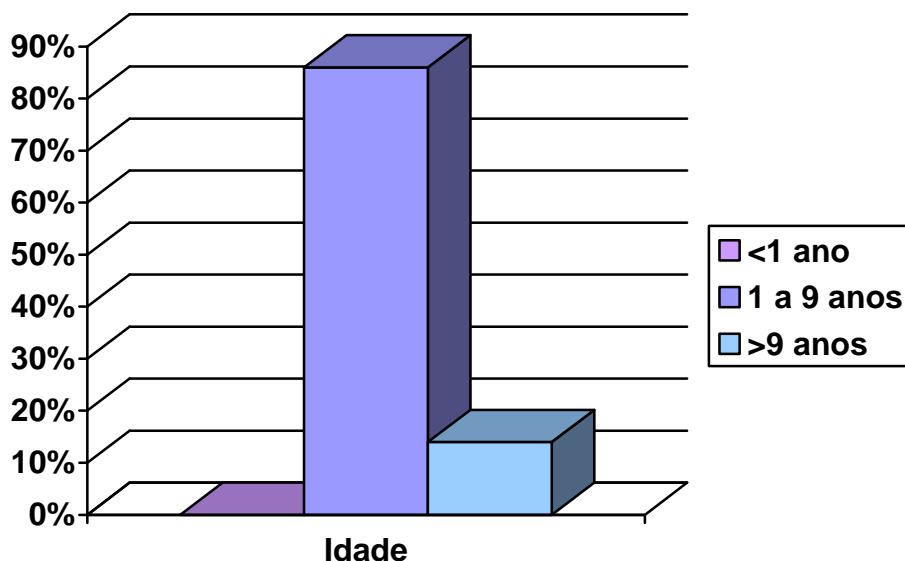
Instituição	Casos Recebidos
HAJ	16
SCMG	6
Total	22

Os critérios FAB e Imunofenotípico foram utilizados para o diagnóstico dos pacientes. Ambas as instituições administram o protocolo de tratamento GBTLI LLA-99, que adotam os mesmos critérios de risco do NCI ao diagnóstico. As informações clínicas e laboratoriais foram obtidas dos prontuários médicos.

Dos 22 pacientes incluídos no estudo, 11 (50%) são do sexo feminino e 11 (50%) são do sexo masculino. A média de idade foi de 5,2 anos (1-12 anos). Não houve nenhum caso menor que 1 ano, a faixa etária mais incidente foi entre 1 e 9 anos de idade, correspondendo a 86% dos casos, seguida de 14% para >9 anos. A determinação da faixa etária para o estudo foi definida segundo o critério adotado pelo GBTLI LLA-99 para estratificação dos grupos etários para avaliação de prognóstico (Figura 5). Sendo que 64% das crianças apresentaram idade variando de 2 a 5 anos. Os indivíduos do sexo masculino apresentaram uma maior distribuição percentual (92%) nas idades variando de 1 a 9 anos em relação ao sexo feminino (Tabela VI).

**Tabela VI.** Relação entre Sexo e Idade dos pacientes com LLA estudados no HAJ e SCMG.

Sexo	Idade	Distribuição Percentual
Masculino	1-9 anos	91%
	> 9 anos	9%
Feminino	1-9 anos	82%
	> 9 anos	18%



**Figura 5.** Frequência da idade dos pacientes com LLA, estudados no HAJ e SCMG, ordenada segundo critérios de prognóstico para a patologia em conformidade com GBTLI LLA-99.

A remissão morfológica no vigésimo oitavo dia da indução (D+28) foi obtida em todos os casos. A Doença Residual Mínima (DRM), determinada por citometria de fluxo (CF), foi positiva em 3 casos (14%). Houve 2 recidivas medulares (casos 6 e 14) e 2 recidivas no SNC (casos 14 e 18). Quatro crianças foram a óbito (14, 15, 16 e 21). O caso 4 apresentou infiltração do SNC ao diagnóstico e DRM positiva, apesar da demora para entrar em remissão o paciente não recidivou e responde ao tratamento quimioterápico. O paciente 14 foi a óbito após a recidiva, os pacientes 15 e 16 foram a óbito após entrarem em remissão medular ambos por parada cardíaca respiratória. O paciente 21 foi a óbito durante a fase de indução do tratamento com sepsis e distúrbio da coagulação.

Os pacientes foram estratificados em dois grupos de risco de recaída de acordo com o protocolo GBTLI LLA-99: baixo risco de recaída (55%) e alto risco de recaída (45%). As características clínicas e laboratoriais de cada paciente estão representadas nas Tabelas VII e VIII.

**Tabela VII.** Características Clínico-laboratoriais dos pacientes com LLA classificados como Risco Padrão/Baixo Risco, segundo critérios do GBTL1 LLA-99.

IP	Sexo	Idade (anos)	CTL	Imunofenótipo	Cariótipo	DRM */RM
1	M	2	3.800	LLA-B II/ CD10+/ CD56+	46,XY	Negativa/Sim
2	F	8	2.000	LLA-B II/ My+/ CD10+/ CD56+	Nhc	Negativa/Sim
3	M	3	7.400	LLA-B II/ CD10+/ CD56+	46,XY	Negativa/Sim
7	M	2	40.200	LLA-B III/ cIgM+/ CD10+/ CD34-/ TdT-	46,XY	Negativa/Sim
11	M	3	9.600	LLA-B III/ CD10+/ mIgM+/ CD34-	Nhc	Positiva/Sim
12	F	3	4.900	LLA-B I/ CD13+/ CD33+	46,XX/46,XX,4q+/46,XX, t(q1;q4)	Na/Sim
16	M	6	27.000	LLA-B II/ CD10+	NHC	Na/Sim
†						
17	F	4	1.470	Na	46,XX/46,XX,t(10;14)(q22;q32)	Negativa/Sim
18	M	3	2.100	Na	Nhc	Na/Sim
20	M	4	20.000	LLA-B III/ cIgM+/ mIgM+/ CD10+/ CD34 <sup>parcial</sup> / CD34 <sup>parcial</sup> / CD56-	Nhc	Na/Sim
21	F	3	22.000	LLA-B II/ CD10+/ CD34+/ CD56+	Nhc	Na
†						
22	F	5	1.330	LLA-B II/ CD10+/ CD2+/ CD33+/ CD56+	Nhc	Negativa/Sim

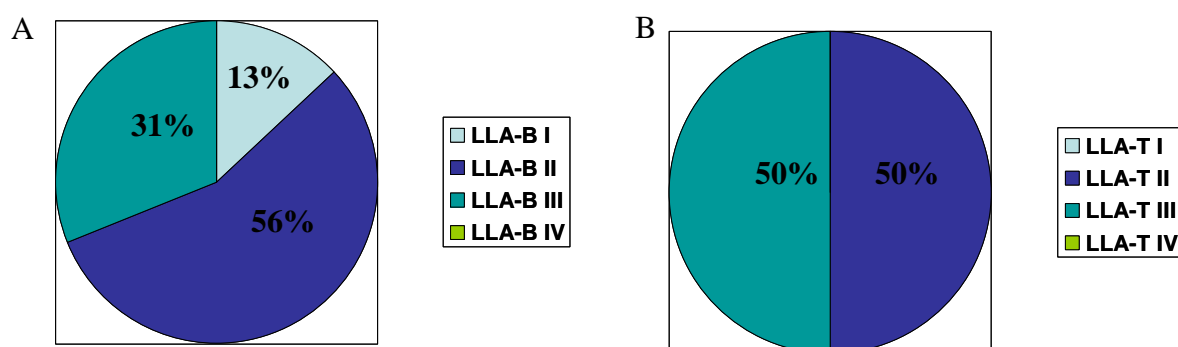
IP: Identificação dos Pacientes, DRM: Doença Residual Mínima, D+28: Vigésimo Oitavo Dia da Remissão, Na: Não Avaliado, †: Óbito, \*DRM avaliada por Citometria de Fluxo. Nhc: Não Houve Crescimento, RM: Remissão Morfológica, CTL: Contagem Total de Leucócitos

**Tabela VIII.** Características Clínico-laboratoriais dos pacientes com LLA classificados como Alto Risco, segundo critérios do GBTL1 LLA-99.

IP	Sexo	Idade (anos)	CTL	Imunofenótipo	Cariótipo	DRM */RM
4	M	4	352.000	LLAT- II/ CD10+/ CD4+/ CD8+	46,XY/46,XY,del(16q22)/46,XY,del(6q26)/ Hiperdiploidia	Positiva/Sim
5	F	12	91.000	LLA-T II/ CD10-/ CD34-/ CD56+/ cCD3-/ mCD3-/ CD4+/ CD8+	46,XX/46,XX,del(8)(q21.2-22)/ Hiperdiploidia	Positiva/Sim
6	M	1	200.300	LLA-B II/ CD10+/ CD34-	46,XY/46,XY,t(7;12)(q34;q22);del(10qter)/ 46,XY,t(7;12)(q34;q22)/ 46,XY,t(4;8)(q31.2;q23)/ 46,XY,t(12;16)(q24.1;q23) / Near-Haploidia	Negativa/Sim
8	F	11	64.000	LLA-B III/ cIgM+/ CD10+	46,XX	Negativa/Sim
9	F	7	496.000	LLA-B I/ CD10-/ CD34-	46,XX	Negativa/Sim
10	F	6	310.000	LLA-B III/ CD10+/ cIgM+/ CD34-/ CD33+	Nhc	Negativa/Sim
13	M	5	49.000	LLA-T III/ CD10+/ CD3+/ CD4+/ CD8+	Nhc	Na/Sim
14	F	9	298.000	LLA-B II/ CD10+	Nhc	Na/Sim
15	F	2	120.000	LLA-T III/ CD10-/ CD79a+	46,XX,del(17q25)	Na/Sim
19	M	11	19.000	LLA-B II/ CD10+/ CD56+/ CD34-	46,XY/46,XY,t(7;12)(q35;p11),+21	Negativa/Sim

IP: Identificação dos Pacientes, DRM: Doença Residual Mínima, D+28: Vigésimo Oitavo Dia da Remissão, Na: Não Avaliado, †: Óbito, \*DRM avaliada por Citometria de Fluxo. Nhc: Não Houve Crescimento, RM: Remissão Morfológica, CTL: Contagem Total de Leucócitos

Foram realizados imunofenotipagem em amostras de 20 pacientes, sendo que 80% corresponderam a LLA B e 20% a LLA T. O imunofenótipo B mais freqüente foi a LLA B-II com 56%, seguida da LLA B-III com 31% e LLA B-I com 13%. Tanto o imunofenótipo LLA T-II quanto o imunofenótipo LLA T-III representaram 50% dos casos T estudados (Figura 6). A expressão do marcador CD10 estava presente em 80% dos casos.



**Figura 6.** Distribuição percentual dos imunofenótipos B e T, segundo a classificação EGIL, dos pacientes com LLA.

Na avaliação citogenética 58% dos cariótipos realizados apresentaram alterados. As translocações e deleções foram as únicas alterações estruturais identificadas. Em apenas três casos (43%) foi observada a presença de alterações numéricas, sendo que em 2 casos ocorreu hiperdiploidia e 1 caso houve near-haploidia.

As amostras de medula óssea representaram 59% do material biológico avaliado enquanto as amostras de sangue periférico totalizaram 41%. Das 22 culturas celulares realizadas obtivemos expansão clonal em apenas 12 (55%). Sendo que 4 (33%) representaram culturas realizadas com medula óssea e 8 (67%) com sangue periférico (Tabela IX).

**Tabela IX.** Distribuição percentual das amostras biológicas estudadas para LLA na infância.

Cultura celular	Medula óssea	Sangue Periférico	Total
Metáfases	4 (33%)	8 (67%)	12
Ausência de Metáfases	9 (90%)	1 (10%)	10
Total	13	9	22

## 6. Discussão

A LLA é o tipo mais comum de leucemia em crianças correspondendo a uma complexa desordem proliferativa do sistema linfo-hematopoético. Desde 1980, com a introdução da fase de intensificação do tratamento, utilizando múltiplas drogas, a LLA deixou de ser considerada uma doença fatal e seus portadores passaram a ter uma sobrevida por um período de cinco anos em aproximadamente 80% dos casos. Todo o avanço observado foi o resultado de intensas pesquisas a respeito dos diversos fatores prognósticos e sua relação com a evolução da doença, o que tem permitido a estratificação dos pacientes em grupos de risco e assim possibilitando um maior direcionamento do tratamento quimioterápico.

Com o avanço do estudo da LLA, os pesquisadores têm apontado para a presença de alterações genéticas que poderiam ser responsáveis pelo o processo de iniciação ou progressão celular. Atualmente, as alterações citogenéticas e moleculares são parâmetros de grande relevância clínica, de importância diagnóstica e ainda permitem informações prognósticas independentes na LLA. Por isso é recomendável investigar todas as possíveis alterações presentes nas células leucêmicas para se caracterizar os fatores biológicos envolvidos na transformação e progressão maligna, e para se definir as terapias alvo-específicas que beneficiarão ainda mais os pacientes com neoplasias.

A LLA, objeto de investigação do presente estudo, geralmente apresenta boa evolução clínica. O prognóstico é bom para os pacientes com melhor resposta a terapia inicial de indução (D+28), idade entre 1 e 9 anos, leucometria <50.000, imunofenótipo B, presença de marcador CD10+, cariótipos hiperdiplóides e presença de trissomias dos cromossomos 4, 7 e 10, e a t(12;21) com gene de fusão *TEL/AML1*. Apesar do conhecimento da presença de diversas alterações cromossômicas presentes neste tipo de leucemia ainda persistem e existem lacunas no tratamento de algumas crianças. Portanto, há necessidade de avaliar novos indicadores que auxiliem e direcionem os clínicos no estudo da evolução destes pacientes.

Por um longo período, a variável sexo foi considerada um fator prognóstico significativo. A ocorrência de LLA em indivíduos do sexo masculino foi

demonstrada por Pui e colaboradores (2004b), como apresentando uma pior resposta às terapias, comparativamente ao sexo oposto. De uma maneira geral, a diferença de resposta entre os sexos poderia estar relacionada com as diferenças imunofenóticas e a ploidia. O imunofenótipo T estaria presente com maior frequência em indivíduos do sexo masculino (Pui *et al.*, 1999). No presente estudo ocorreu uma proporção igual entre os sexos com relação ao imunofenótipo T.

Os resultados estão em desacordo com o sugerido pelo INCA (2005), que mencionou frequência de LLA elevada para os indivíduos do sexo masculino quando comparada com o sexo feminino. Em nosso estudo, a proporção de indivíduos foi a mesma, o que provavelmente pode estar relacionado ao tamanho reduzido do grupo amostral. Como descrito por Farias e colaboradores (2004) e INCA (2007) maior incidência para LLA é esperada para a faixa etária entre 2 a 5 anos de idade, o que contribui com os dados do presente estudo, cuja frequência para esta faixa etária foi de 64%. De acordo com o estudo realizado por de Oliveira e colaboradores (2009), com base no banco de dados do Registro de Câncer de Base Populacional, Goiânia e São Paulo, demonstraram uma taxa elevada para LLA entre indivíduos do sexo masculino na faixa etária de 0 a 4 anos de idade, respectivamente 7.83 e 6.16 para 100.000.

No presente estudo a LLA-B representou 80% dos casos estudados. Segundo Brumpt e colaboradores (2000) a LLA-B foi observada em aproximadamente 85% das LLAs infantil. Conforme a descrição de Bacal e colaboradores (2003) o imunofenótipo B mais frequente é a LLA B-II, confirmando os achados do presente estudo, que encontrou uma frequência de 56%. A expressão do marcador CD10 foi positiva em 80% dos casos, destes apenas o caso 4 não respondeu à terapia de indução da remissão, apesar de ser esperado por apresentar características como imunofenótipo T, leucocitose acima de  $50.000/\text{mm}^3$ , que já o colocava no grupo de alto risco. A estimativa elevada do risco foi reforçada pela presença da alteração cromossômica, que pode também estar envolvida como causa subjacente à resposta desfavorável do paciente.

Como mencionado anteriormente, a LLA é a leucemia que apresenta uma quantidade elevada de alterações cromossômicas, sejam elas numéricas ou estruturais. Neste estudo a maioria dos pacientes (58%) apresentou cariótipo alterado,



correspondendo ao observado por Artigas e colaboradores (2006) que descreveram alterações em 60 a 75% dos casos.

Os resultados não são surpreendentes quanto ao fracasso da expansão clonal na medula óssea, apenas em 4 (33%) culturas realizadas com medula óssea foi obtido sucesso. Observamos maior dificuldade de crescimento em relação à cultura com sangue periférico. Ainda é desconhecido o agente interferente que impede o crescimento celular e conseqüentemente a presença das metáfases quando se utiliza amostras de medula óssea. Os resultados do presente estudo sugerem que provavelmente não há relação com a leucocitose, pois mesmo nos casos de culturas com sangue periférico com leucocitose acima de  $20.000/\text{mm}^3$ , e praticamente 100% de blastos, não houve problema para se observar a expansão clonal. Algumas hipóteses podem ser levantadas sobre os possíveis fatores de inibição de crescimento na medula óssea. Um fator potencialmente implicado poderia ser a quantidade de gordura presente na medula óssea. Embora as amostras de crianças apresentarem um percentual de gordura menor as amostras de MO foram lavadas com RPMI previamente à semeadura. Apesar de ser observado resultados positivos para algumas culturas, o tamanho do grupo amostral não permite inferências sobre a eficiência do procedimento.

Ainda persiste a hipótese de a falta de algum nutriente ou fator que mantenha o ambiente de cultura o mais parecido com o organismo humano e, portanto, deve ser o responsável pelo fracasso da expansão clonal em LLA. Pensamos que, deve existir algo muito complexo associado à presença de blastos linfóides, pois observando outras culturas de MO, de pacientes enviados ao laboratório LAGENE que apresentavam SMD e outros tipos de leucemia LMA, LLC, LMC, o sucesso com as culturas eram superiores e a qualidade das metáfases, em alguns casos também eram melhores

A resposta inicial a terapia de indução da remissão é um dos fatores prognósticos mais importantes na LLA. Pacientes que respondem lentamente ao tratamento tem alto risco para recidiva, enquanto aqueles que atingem a remissão entre 4 a 6 semanas tem prognóstico melhor. Em nosso estudo, foi possível classificar os pacientes em grupos de risco (baixo risco de recaída e alto risco de recaída), e avaliar sua evolução e resposta ao tratamento a partir dos dados de DRM no D+28. Nos casos em que a DRM não foi

realizada foi utilizado-se a remissão morfológica para estabelecer o risco relativo para os pacientes.

No grupo de baixo risco de recaída, apenas o caso 11 apresentou DRM positiva, a sua má resposta a terapia de indução pode estar relacionada ao seu subtipo FAB que é mais agressivo, no caso uma LLA L3. Por não ter evoluído bem, ele foi transferido para o grupo de alto risco. Em nosso estudo os pacientes classificados como sendo de alto risco representaram o grupo com maior número de alterações cromossômicas observadas.

As alterações numéricas e estruturais encontradas no presente estudo seguem especificadas abaixo.

- **Caso 17: 46,XX,t(10;14)(q22;q32)**

Segundo Raimondi (1993), a translocação envolvendo os cromossomos 10 e 14 pode ser encontrada com certa frequência na LLA-T com outros pontos de quebra. No presente estudo houve o envolvimento da região 14q32 que contém o gene *IGH* (imunoglobulina de cadeia pesada). A translocação representa um mecanismo de ativação de diversos proto-oncogenes, envolvidos em diferentes tipos de alteração, presentes na leucemia de células B, as mais descritas são a t(8;14)(q24;q32), t(8;22)(q24;q11), e t(2;8)(p12;q24), que levam a desregulação do oncogene *MYC*, que passa a estar sob a influência de seqüências que estimulam o processo da transcrição no locus da Ig constitucionalmente ativo (Finelli *et al.*, 1999). A região translocada em 14q32 também pode estar presente em diversos outros tipos de leucemia: leucemia linfocítica crônica de células T (LLC-T), leucemia prolinfocítica de células T (LLP-T), linfoma de células T e leucemia de células T em adulto associado a HTLV-I (Mengle-Gaw *et al.*, 1988). Analisando-se os dados disponíveis no genebank, não foi possível definir se há uma associação entre a presença de proto-oncogenes e a outra região de quebra (10q22). Apesar da alteração cromossômica, as condições como idade e leucometria foram favoráveis, o paciente evoluiu bem a terapia de indução como demonstrado pela DRM negativa.

- **Caso 12: 46,XX,4q+/46,XX, t(q1;q4)**

A ausência de relatos na literatura e de dados no Genebank não permitiu inferir a participação desta alteração no processo de leucemogênese. A criança evoluiu bem,

respondendo à terapia inicial de indução com RM positiva, permanecendo até o momento em remissão.

- **Caso 4: 46,XY,del(16q22)/46,XY,del(6q26)/ Hiperdiploidia**

Alterações envolvendo a deleção no cromossomo 16 e LLA ainda não foram observadas. A região 16q22-23 envolve o gene *BRCA1* que é um supressor de tumor. Acredita-se que ele seja um regulador transcricional e que participe no reparo do DNA. *BRCA1* está inativo principalmente em tumores de mama e ovário (Folgueira; Bretani, 2006). Carter e colaboradores (1990) sugeriram que alelos do cromossomo 16q podem conter sítios de genes supressores de tumor importantes na patogênese do câncer de próstata humano. Maw e colaboradores (1992) indicaram que no cromossomo 16q pode estar localizado um gene supressor de tumor responsável pela tumorigênese do Tumor de Wilms.

A deleção no braço longo do cromossomo 6 é uma anormalidade comum na LLA, representando 4% a 13% dos casos, mas seu significado clínico e biológico ainda não foi definido. Tem sido associada com LLA-T e leucemia de células T em adulto (Hayashi, *et al.*, 1990). Alguns estudos sugerem que esta alteração é mais frequente na LLA-T (Schneider *et al.*, 2000; Heerema *et al.*, 1998; Farias *et al.*, 2004). No presente estudo a del(6q26) em um caso de LLA-T, concordando com os autores supracitados. O valor prognóstico da hiperdiploidia foi melhor definido até o momento para LLA de células B e o seu valor prognóstico em uma LLA-T ainda não está bem definido.

Neste caso, a criança não evoluiu bem e apresentou DRM positiva, mesmo tendo recebido terapia mais intensa por estar no grupo de alto risco. Uma vez que os supressores de tumor controlam negativamente a proliferação e sobrevivência celular, mutações deletérias deste gene, mesmo que seja de apenas um alelo, no presente caso o *BRCA1*, podem ter contribuído para o desenvolvimento e a progressão da LLA

- **Caso 6: 46,XY/46,XY,t(7;12)(q34;q22);del(10qter)/46,XY,t(4;8)(q31.2;q23)/46,XY,t(12;16)(q24.1;q23) / Near-Haploidia**

O caso 6 apresentou cariótipo bastante complexo, com múltiplas alterações cromossômicas estruturais e near-haploidia, que provavelmente contribuíram para a

remissão parcial que o paciente apresentou. Até o momento, o paciente permaneceu com ausência da remissão.

A presença da near-haploidia é uma condição rara que caracteriza um prognóstico desfavorável de curta duração do período de remissão, como foi observado em nosso estudo. Pui e colaboradores (1990) descreveram em seu trabalho que a condição de near-haploidia está associada com leucometria elevada e idade mais avançada ao diagnóstico, LLA comum e predominância do sexo feminino. Mas em seu estudo, os casos near-haplóides avaliados não foram exclusivamente do sexo feminino, concordando apenas com os outros fatores descritos. Em nosso estudo apenas as variáveis, leucocitose e sexo correspondem ao que foi sugerido por Pui e colaboradores (1990).

As translocações relacionadas com a região do cromossomo 12, t(7;12)(q34;q22) e t(12;16)(q24.1;q23), podem envolver o gene *IGF1* (do inglês, *Insulin-Like Growth Factor 1*). Este gene tem grande impacto na proliferação celular, diferenciação e apoptose e correspondeu a um potente mitógeno em uma ampla variedade de células. *IGF1* exerce seu efeito mitogênico aumentando a síntese de DNA e estimulando a expressão da ciclina D1, que acelera a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. Além de estimular a progressão do ciclo celular, *IGF1* inibe a apoptose estimulando a expressão da proteína Bcl e suprimindo a expressão do *BAX*. O *IGF1* é um forte mitogênico para uma ampla variedade de linhagens de câncer, incluindo sarcoma, leucemia e cânceres de próstata, mama, pulmão, cólon, estômago, esôfago, fígado, pâncreas, rim, tireóide, cérebro, ovário e útero cervical e endométrio (Yu; Rohan, 2000). Com a t(7;12)(q34;q22) este gene pode estar sendo hiperexpresso por ter sido translocado em uma região onde estão presentes os genes que codificam para os receptores de células T (TCR) que possuem promotores fortes. Por ser um mitógeno potente, a proliferação celular torna-se aumentada, contribuindo para a intensa leucocitose ao diagnóstico e posterior resposta transitória, quando o paciente sempre sai de uma situação de leucopenia para uma intensa leucocitose, após a administração da quimioterapia.

A deleção 10qter pode envolver a perda do gene *FAS*, localizado na região 10q24. A proteína *FASL* (ligante *FAS*) situada em uma célula liga-se a receptores transmembranares *FAS* na superfície de uma célula adjacente. De uma forma geral esta ligação

dispara a cascata da apoptose. A atenuação do FAS pode causar desordens linfoproliferativas e pode acelerar doenças autoimunes, enquanto a ativação excessiva do sistema FAS-FASL pode contribuir para a destruição do tecido (Griffiths *et al.*, 2006).

Como nos casos anteriormente discutidos, a associação dos fatores considerados desfavoráveis (idade, leucocitose >50.0000/mm<sup>3</sup>, cariótipo complexo com near-haploidia) resulta em mau prognóstico, apesar da presença do marcador CD10. A negatividade da expressão do C34, que é marcador de células imaturas em leucemias agudas, não diz muito a respeito de prognóstico, porque existem controversas quanto ao seu papel no prognóstico da LLA (Basso *et al.*, 2001).

- **46,XY,t(7;12)(q35;p11),+21**

Não é de nosso conhecimento a ocorrência de relatos na literatura médica sobre a t(7;12)(q35;p11) associada à LLA B precursora. No entanto, existem relatos na literatura de crianças, menores de 18 meses de idade, com diagnóstico de LMA e que apresentavam translocações envolvendo os cromossomos 7 e 12 em diferentes pontos de quebra, como t(7;12)(q36;p13) e t(7;12)(q32;p13). Segundo os autores esses rearranjos cromossômicos conferem pior prognóstico aos pacientes (Slater *et al.*, 2000, Bernal Bervello *et al.*, 2001).

No caso 19, os pontos de quebra nos cromossomos 7 e 12 envolveram, respectivamente, as famílias dos genes de Receptores de Células T (TCR $\beta$ ) em 7q35 e a região p11, sem genes ligados. O cromossomo 7 derivativo contém as regiões a montante dos genes de TCR $\beta$ , enquanto que a região translocada, correspondente à porção distal do cromossomo 12, contém o oncogene *TEL*.

Em 7q35 encontram-se os genes de TCR $\beta$ , genes responsáveis pela transcrição de proteínas ribossomais 60S e o gene *CREB3L2* (do inglês, *cAMP responsive element binding protein 3-like 2*) que codifica fatores de transcrição como CREB3 e CREB4. Todos os genes em 7q35 apresentam promotores fortes, pois os seus transcritos são importantes nos processos do desenvolvimento celular. Como resultado do rearranjo proveniente da t(7;12)(q35;p11) pensamos que houve uma ativação transcricional dos genes adjacentes à região translocada. Esta ativação gênica incluiu a hiperexpressão do oncogene *TEL* localizado no derivativo 7. Conseqüentemente, o produto *TEL* conferiu

uma vantagem de crescimento ao clone linfoblástico neoplásico identificado no paciente.

A presença da translocação cromossômica t(7;12)(q35;p11) não é suficiente para a diferenciação entre os diferentes subtipos de LLA, apesar das alterações cromossômicas 12p estarem envolvidas em muitos casos da LLA de linhagem B. O oncogene *TEL*, provavelmente, teve participação fundamental no estágio de progressão da LLA, promovendo a expansão clonal das células iniciadas. Assim, a expansão de *TEL* não deve ter sido o evento inicial desencadeador do processo neoplásico, mas contribuiu significativamente para a permanência do clone, por garantir vantagem no seu crescimento.

Em relação à trissomia do 21 presente no clone responsável pela evolução da LLA do presente caso, trata-se da aneuploidia mais freqüentemente observada em adultos e crianças com LLA. Como única anormalidade clonal, +21 representa 2% dos casos de LLA pediátrica e até 1% da LLA em adultos. Em crianças com LLA, a freqüência da trissomia do 21 é aproximadamente de 40% para o grupo com 47 a 50 cromossomos em suas metáfases e de 80% no grupo com mais de 50 cromossomos. A trissomia do 21 como única anormalidade cariotípica tem um prognóstico favorável na LLA. No grupo de casos com 47 a 50 cromossomos, +21 resulta em prognóstico melhor em crianças, quando não existem associações com rearranjos estruturais (Watson *et al.*, 1993).

Até o momento, nosso paciente mostrou boa resposta terapêutica, como observado pela avaliação da remissão morfológica e da DRM. Pelo fato de ser uma alteração cromossômica rara e pouco descrita até o momento, ainda existem dificuldades para se definir seu real impacto prognóstico. Assim, relatos subseqüentes são necessários para se promover melhor compreensão a respeito desta anormalidade e do papel do gene *TEL* na progressão das leucemias.

Com relação aos casos 5 e 15, não foi identificada nenhuma descrição associada a LLA com relação as seguintes alterações: del(8)(q21.2-22) e del(17q25). Ambos os casos corresponderam a uma LLA-T, com marcador CD10 negativo.

A análise citogenética das metáfases cromossômicas por bandeamento G é geralmente mais difícil para realizar na LLA pediátrica do que em outras leucemias. As metáfases são frequentemente de pior qualidade sendo importante ter uma boa resolução do bandeamento G para identificação correta das alterações cromossômicas. Os cariótipos normais em alguns pacientes podem mascarar uma alteração cromossômica que é tão mínima que não pode ser percebida. Por isso o uso de ferramentas moleculares, FISH, PCR em tempo real, CGH, associadas à citogenética convencional poderiam contribuir para a identificação destas possíveis alterações gênicas, permitindo melhor compreensão dos mecanismos da leucemogênese e conseqüentemente uma melhor impressão a respeito do caráter prognóstico das mesmas.

## 7. Conclusões

- Pela avaliação citogenética 58% dos cariótipos apresentaram alterações genéticas nos pacientes estudados
- A maioria das alterações cromossômicas aqui encontradas ainda não foram descritas até o momento, havendo, portanto limitação quanto a definição do prognóstico
- A associação entre resposta terapêutica e achados citogenéticos foi estabelecida de forma descritiva e observacional sendo importante a realização de novos estudos para melhor definição. Em dois casos em especial foi estabelecida de certa forma, a participação de alguns genes no processo da leucemogênese e, portanto, foi possível avaliar a resposta dos pacientes frente as estas alterações. O caso 6 apresentou resposta parcial ao tratamento e o caso 19 apresentou boa resposta ao tratamento.



## 8. Referências Bibliográficas

Aramburu JJO. Em torno a los factores pronósticos em la leucemia linfoblástica aguda del niño. *An Pediatr (barc)*. 2006; 65 (6): 195-7.

Artigas CG, Cabrera ME, Melo A, Paez E, Arriagada M, Astete C, et al. Frecuencia de los genes de fusión TEL/AML1 y BCR/ABL en pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda. *Rev Méd Chile* 2006; 134: 1367-1376.

Aspland SE, Bendall HH, Murre C. The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. *Oncogene*. 2001; 20: 5708-5717.

Bacal NS, Faulhaber MHW. *Aplicação prática em citometria de fluxo*. São Paulo: Ed. Atheneu. 2003; 1: 1-90.

Basso G, Lanza F, Orfao A, Moretti S, Castoldi G. Clinical and biological significance of CD34 expression in acute leukemia. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001; 15: 68-78.

Bayly R, Murase T, Hyndman BD, Savage R, Nurmohamed S; Munro K, et al. Critical role for a single leucine residue in leukemia induction by E2A-PBX1. *Mol. Cell. Biol*. 2006; 26 (17): 6442-6452.

Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect*. 2007; 115 (1): 138-145.

Berna Berveloo H, Panagopoulos I, Isaksson M, Van Wering E, Van Drunen E, De Klein A, et al. Fusion of the homeobox gene HLXB9 and the ETV6 gene in infant acute myeloid leukemias with the t(7;12)(q36;p13). *Cancer Res*. 2001; 61: 5374-7.

Brumpt C, Delabesse E, Beldjord K, Davi F, Cavuela JM, Millien C, et al. The incidence of clonal T-cell receptor rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia varies with age and genotype. *Blood*. 2000; 96 (6): 2254-2261.

Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Raetz E, Relling M, Davies S, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2003; 102-131.

Carter BS, Ewing CM, Steven Ward W, Treiger BF, Aalderst TW, Scahalkent JÁ, et al. Allelic loss of chromosomes 16q and 10q in human prostate cancer. *Proc. Nati. Acad. Sci.* 1990; 87: 8751-5.

Curado MP, Braga PE, Latorre MRDO. Tumores na infância: tendências e análise de sobrevivência em Goiânia (1989-1996). Associação de Combate ao Câncer em Goiás, 2000.

De Oliveira BM, Diniz MS, Viana MB. Leucemias agudas na infância. *Rev Med Minas Gerais.* 2004; 14: 33-9.

De Oliveira MSP, Koifman S, Vasconcelos GM, Emerenciano M, Novaes CO. Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis.* 2009; 42: 121-5.

Dos Anjos AR, Alvares-Silva M, Borelli P. Matriz extracelular e leucemia. *Rev.bras.hematol.hemoter.* 2000; 22(3): 404-412.

El-Sissy A, El-Mashari M, Bassuni W, El-Swaayed. Molecular detection of BCR/ABL fusion gene in Saudi acute lymphoblastic leukemia patients. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2006; 18 (2): 109-116.

Emerenciano M, Koifman S, Pomvo-de-Oliveira MS. Acute leukemia in early childhood. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(6):749-760.

Farias MG, Castro SM. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *J Bras Patol Med Lab.* 2004; 40 (2): 91-8.

Finelli P, Fabris S, Zagano S, Baldini L, Intini D, Nobili L, et al. Detection of t(4;14)(p16.3;q32) chromosomal translocation in multiple myeloma by double-color fluorescent in situ hybridization. *Blood.* 1999; 94 (2): 724-732.

Fett-Conte AC, Vendrame-Goloni CB, Homsy CM, Borim LNB, Zola PA, Ricci O. Estudo cromossômico no sangue periférico de pacientes com diferentes tipos de leucemia do Hospital de Base, São José do Rio Preto-SP. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2000, 22 (3): 374-386.

Folgueira MAAK, Bretani, MM. Câncer de mama. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 29-42.

Friedmann AM, Weinstein HJ. The role of prognostic features in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *The Oncologist*. 2000; 5: 321-8.

Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R, Stratton MR. Cancer and genomics. *Nature*. 2001; 409: 850-2.

Gariochea B, Zago MA. Bases moleculares e citogenéticas. *Oncogenes e Antioncogenes*. Zago MA, Falcao RP, Pasquin R. *Hematologia Fundamentos e Prática*. São Paulo: Ed. Atheneu; 2001. 367-381.

Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Gelbart WM, Suzuki AT, Millerr JH. Regulação genética do número de células: células normais e cancerosas. In: *Introdução à Genética*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.526-550.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.

Hayashi Y, Raimondi SC, Look AT, Behm FG, Kiychingman GR, Pui CH, et al. Abnormalities of the long arm of chromosome 6 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1990; 76 (8): 1626-1630.

Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, Kraft P, Nachman JB, Steinherz PG, et al. Frequency and clinical significance of cytogenetic abnormalities in pediatric T-lineage acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 1270-1280.

Hilden JM, Dinndorf PA, Meerbaum SO, Sather H, Villaluna D, Heerema NA, et al. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. *Blood*. 2006;108 (2): 441-451.

Hoelzer D, Gökbüget N, Ottmann O, Pui CH, Relling MV, Appelbaum FR, et al. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*. 2002:16-192.

Hunger SP, Galili N, Carroll AJ, Crist WM, Link MP, Cleary ML. The t(1;19)(q23;p13) results in consistent fusion of *E2A* and *PBX1* coding sequences in acute lymphoblastic leukemias. *Blood*. 1991; 77(4): 687-693.

Infante-Rivard C, Mathonnet A G, Sinneli D. Risk of Childhood Leukemia Associated with diagnostic irradiation and polymorphisms in DNA repair genes. *Environ Health Perspect*. 2000; 108 (6):495-8.

Irvin BJ, Wood LD, Wang L, Fenrick R, Sansam CG, Packham G, et al. TEL, a putative suppressor, induces apoptosis and represses transcription of *Bcl-X<sub>L</sub>*. *J Biol Chem*. 2003; 278 (47): 46378-46386.

Ito C, Kumagai M, Manabe A, Coustain-Smith E, Raimondi SC, Behm FG, et al. Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 to 65 chromosomes: A distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. *Blood*. 1999; 93 (1): 215-320.

Kaspers GJL, Smets LA, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van Wering ER, Veerman AJP. Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: Results of an in vitro study. *Blood*. 1995; 85 (3): 751-6.

Knezevich SR, McFadden DE, Tao W, Lim JF, Sorensen PHB. A novel ETV6-NTRK3 gene fusion in congenital fibrosarcoma. *Nature Genetics*. 1998; 18: 184-7.

Lau WBM, Hurenkamp J, Berendes P, Touw IP, Clevers HC, Dijk MAV. The gene encoding the granulocyte colony-stimulating factor receptor is a target for deregulation in pre-B ALL by the t(1;19)-specific oncoprotein E2A/Pbx. *Oncogene*. 1998; 17 (4): 503-510.

Lukes JN. Classificação e diferenciação das leucemias agudas. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens J. *Wintrobe Hematologia Clínica*. São Paulo: Manole Ltda; 1998a. 2062-2082.

Lukes JN. Leucemia linfocítica aguda. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens J. Wintrobe Hematologia Clínica. São Paulo: Manole Ltda; 1998b. 2083-2113.

Look AT, Roberson PK, Williams DL, Rivera G, Bowman WP, Pui CH, et al. Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1985; 65 (5): 1079-1086.

Martinez-Ramirez A, Urioste M, Contra T, Cantalejo A, Tavares A, Portero JA, et al. Fluorescence *in situ* hybridization study of TEL/AML1 and AML1 genes. Correlation with cytogenetic findings and prognostic value in children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2001; 86: 1245-1253.

Martin Ramos ML, Fernandez Martinez FJ, Barreiro Miranda E. Alteraciones cromosómicas en la leucemia linfoblástica aguda. *An Esp de Pediatr*. 2001; 55 (1): 45-52.

Mavrothalassitis G, Ghysdael J. Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. *Oncogene*. 2000; 19: 6524 – 6532.

Maw MA, Grundy PE, Millow LJ, Eccles MR, Dunn RS, Smith PJ, et al. A third Wilms' Tumor locus on chromosome 16q. *Cancer Res*. 1992; 52: 3094-8.

Mengle-Gaw L, Albertson DG, Sherrington PD, Rabbitts TH. Analysis of a T-cell tumor-specific breakpoint cluster at human chromosome 14q32. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1988; 85: 9171-5.

Mikail FM, Serry KA, Hatem N, Mourad Z, Farawela HM, El Kaffash DM, et al. *AML1* gene over-expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2002; 16: 658-668.

Ministério da saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2005: 1-98.

Ministério da saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2008: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2007: 1-96.

Mitelman F. Chromosomes, Genes, and Cancer. *Cancer J Clin.* 1994; 44 (3): 133-5.

Monica K, Lebrun DP, Dederda DA, Brown R, Cleary ML. Transformation properties of the E2a-Pbx1 chimeric oncoprotein: Fusion with E2a is essential, but the Pbx1 homeodomain is dispensable. *Mol Cell Bio.* 1994; 14: 8304-8314.

Moorman AV, Richards SM, Martineau M, Cheung KL, Robinson HM, Jalali GR, et al. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2003; 102 (8): 2756-2762.

Pui CH. Recent advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Formos Med Assoc.* 2004; 103 (2): 85-95.

Pui CH, Relling MV, Dowing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2004a; 350: 1535-1548.

Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Blood.* 2004b: 118-145.

Pui CH, Williams DL, Raimondi SC, Rivera GK, Look AT, Dodge RK, et al. Hypodiploidy is associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1987; 70 (1): 247-253.

Pui CH, Bowett JM, Relling MV, Harrison PL, Rivera GK, Behm FG, et al. Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 1999; 17 (3): 818-824.

Pui CH, Sallan S, Relling MV, Masera G, Evans WE. International childhood Acute Lymphoblastic Leukemia workshop: Sausalito, CA, 30 November–1 December 2000. *Leukemia.* 2001; 15: 707-715.

Pui CH, Carroll AJ, Raimondi SC, Land VJ, Crist WM, Shuster JJ, et al. Clinical presentation, karyotypic characterization, and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with a near-haploid or hypodiploid < 45 line. *Blood*. 1990;. 75 (5): 1170-7.

Raimondi SC, Roberson PK, Pui CH, Behm FG, Rivera GK. Hyperploid (47-50) acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood*. 1992; 79 (12): 3245-52.

Raimondi SC, Shurtleff AS, Rubnitz J, Mathew S, Hancock M, Pui CH, et al. 12p abnormalities and the TEL gene (ETV6) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1997; 90 (11): 4559-4566.

Raimondi SC, Zhou Y, Mathew S, Shurtleff AS, Sandlund JT, Rivera JT, et al. Reassessment of the prognostic significance of hypodiploidy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2003; 98 (12): 2715-2722.

Raimondi SC. Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1993; 81 (9): 2237-2251.

Ribera JM, Ortega JJ, Oriol A, Granada I, Hernandez-Rivas JM, Parody R, et al. Prognostic value of karyotypic in children and adults with high-risk acute lymphoblastic leukemia included in the PETHEMA ALL-93 trial. *Haematologica*. 2002; 87: 154-166.

Ribeiro R. Leucemia linfóide aguda na infância e adolescência. In: Zago MA, Falcao RP, Pasquin R. *Hematologia Fundamentos e Prática*. São Paulo: Ed. Atheneu, 2001. p. 487-518.

Rubnitz JE, Pui CH, Downing JR. The role of TEL fusion genes in pediatric leukemias. *Leukemia*. 1999; 13: 6-13.

Sallan SE, Gokbuget N, Pui CH. Myths and lessons from the adult/pediatric interface in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006: 128-132.

Schaffel R, Simões BP. Leucemia linfoblástica aguda filadélfia positiva. *Rev. bras. hematol. hemoter*. 2008; 30(1):52-58.

Schneider NR, Carroll AJ, Shuster JJ, Pullen J, Link MP, Borowitz MJ, et al. New recurring cytogenetic abnormalities and association of blast cell karyotypes with prognosis in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: a pediatric oncology group report of 343 cases. *Blood*. 2000; 96 (7): 2543-9.

Schraper M, Arico M, Harbott J, Biondi A, Zimmermann M, Conter V, et al. Philadelphia chromosome-positive (Ph<sup>+</sup>) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. *Blood*. 1998; 92 (8): 2730-2741.

Schultz KR, Jeanette Pullen D, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood*. 2007; 109 (3): 926-935.

Silva RLA. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu, 2006; 1: 29-42.

Slater RM, v Drunen E, Kroes WG, Olde Weghuis D, van den Berg E, Smit EM, et al. t(7;12)(q36;p13) and t(7;12)(q32;p13)- translocations involving ETV6 in children 18 months of age or younger with myeloid disorders. *Leukemia*. 2001; 15: 915-20.

Sullivan AK. Classificação, patogenese e etiologia das doenças neoplásicas do sistema hematopoético. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens J. *Wintrobe hematologia clínica*. São Paulo: Manole Ltda; 1998. 915-20.

Tsutsumi S, Taketani T, Nishimura K, Ge X, Tomohiko T, Sugita K, et al. Two distinct gene expression signatures in pediatric acute lymphoblastic leukemia with *MLL* rearrangements. *Cancer Res*. 2003; 63: 4882-7

Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, Davidson L, Visvader J, Kuo F, et al. The *TEL/ETV6* gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev*. 1998; 12: 2392-2402.



Watson MS, Carroll AJ, Shuster JJ, Steuber CP, Borowitz MJ, Behm FG, et al. Trisomy 21 in childhood acute lymphoblastic leukemia: A pediatric oncology group study (8602). *Blood*.1993; 82(10): 3098-3102.

Whitehead VM, Vuvhich MJ, Lauer SJ, Mahoney D, Carroll AJ, Shuster JJ, et al Accumulation of high levels of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts from children with hyperdiploid (> 50 chromosomes) B-lineage acute lymphoblastic leukemia: A pediatric oncology group study. *Blood*. 1992; 80 (5): 1316-1323.

Whitworth KW, Symansk Ei, Coke AL. Childhood lymphohematopoietic cancer incidence and hazardous air pollutants in southeast texas, 1995–2004. *Environ Health Perspect*. 2008;116(11):1576-80.

Woo HY, Kim DW, Park H, Seong KW, Koo HH, Kim SH. Molecular cytogenetic analysis of gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Korean Med Sci*. 2005; 20: 36-41.

Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92 (18): 1472-1489.

## **Anexo 1**

### **1. Preparo das Soluções**

#### **1.1 Preparo da solução hipotônica**

- Solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) 0,075M.

KCl ..... 0,055g

Água destilada (qsp)..... 10 mL

- A solução hipotônica foi sempre preparada no dia de uso e deixada na estufa a 37°C até o momento do uso.

#### **1.2 Preparo da solução fixadora álcool-ácida de Carnoy**

- A solução fixadora de Carnoy foi preparada utilizando-se 3 partes de álcool metílico para 1 parte de ácido acético glacial.

Álcool metílico..... 30 mL

Ácido acético glacial..... 10 mL

- A solução fixadora de Carnoy foi sempre preparada momentos antes do uso e deixada no freezer.

#### **1.3 Preparo da solução de Giemsa a 4%**

Giemsa..... 2 mL

Água destilada (qsp).....50 mL

- A solução de Giemsa a 4% foi mantida ao abrigo da luz.

**Universidade Católica de Goiás**  
**Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa**  
**Departamento de Biologia-Mestrado em Genética**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Seu filho(a) está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa científica. Após ser esclarecido(a), pela responsável da pesquisa, sobre as informações a seguir e caso aceite fazer parte do estudo, assine ao final deste documento. Você deverá assinar duas vias, uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Lysa Bernardes Minasi, nos telefones: 3233-7387 ou 8408-7586, ou no momento da entrega do termo de consentimento livre e esclarecido. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge, no telefone: 3243-7050.

**INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ DEVE SABER SOBRE A PESQUISA:**

**Título do projeto: LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NA INFÂNCIA: IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO CONVENCIONAL COMO FATOR PROGNÓSTICO.**

**Responsável pela pesquisa:** Lysa Bernardes Minasi  
**Coordenador Geral:** Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD  
**Telefone para Contato:** 3233-7387/ 8408-7586 (Lysa)

O estudo tem como objetivo avaliar as alterações genéticas nas Leucemias Linfóides Agudas na infância em crianças menores de 15 anos de idade, buscando correlacionar os achados citogenéticos com a evolução do quadro clínico da doença. Este estudo permitirá que os médicos tenham um melhor entendimento sobre a evolução da doença facilitando assim o diagnóstico e a orientação, em alguns casos, no tratamento.

Na época do diagnóstico, antes do início da medicação, o Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital Araújo Jorge realizará a coleta de medula óssea para estudo morfológico e/ou imunofenotípico, desta amostra de medula óssea, será retirado 2,0 mL para o presente estudo. Não haverá nenhum risco para o voluntário apenas um desconforto no momento da coleta, pois a coleta será feita por médicos do setor de pediatria e este procedimento já faz parte da rotina do setor para fazer o diagnóstico da doença, portanto a coleta não será realizada apenas para a pesquisa genética. Será realizada ainda a coleta de 2,0 mL de sangue periférico pela pesquisadora responsável deste projeto, não haverá nenhum risco apenas um desconforto durante a coleta, em alguns casos poderá formar uma mancha roxa no local da coleta, caso não haja

compressão do local após a coleta de sangue, mesmo assim esta mancha desaparecerá após alguns dias não sendo necessário preocupação por parte dos pais.

O participante não terá nenhuma despesa ao concordar em participar do projeto, e não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela participação, ela é voluntária. O responsável pela criança terá o direito de pedir indenização em caso de danos decorrentes durante a participação de seu filho na pesquisa. Os dados pessoais de cada voluntário serão mantidos em absoluto sigilo. Os resultados obtidos serão utilizados somente nesta pesquisa, se publicada em revistas e jornais especializados, igualmente será guardado o sigilo.

O presente estudo deverá ser concluído até o mês de março de 2009.

A equipe médica assegura o tratamento adequado de todos os pacientes, independente de optarem por participar ou não do estudo. Os participantes da pesquisa terão a liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem penalização ou perda do tratamento habitual.

### DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, RG/CPF/ \_\_\_\_\_, declaro ter lido os Termos desse Consentimento Livre e Esclarecido, ter entendido as informações contidas nesse documento, cuja cópia fica em meu poder. Declaro, ainda, que estou de acordo que meu filho(a) participe do estudo que me foi apresentado. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador \_\_\_\_\_ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou prejuízo no tratamento e acompanhamento médico do meu filho.

Local e data: \_\_\_\_\_

Assinatura do responsável (pais, tutor): \_\_\_\_\_

Assinatura Dactiloscópica (quando necessário):



Assinatura do pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas:

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Universidade Católica de Goiás**  
**Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa**  
**Departamento de Biologia-Mestrado em Genética**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Seu filho(a) está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa científica. Após ser esclarecido(a), pela responsável da pesquisa, sobre as informações a seguir e caso aceite fazer parte do estudo, assine ao final deste documento. Você deverá assinar duas vias, uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Lysa Bernardes Minasi, nos telefones: 3233-7387 ou 8408-7586, ou no momento da entrega do termo de consentimento livre e esclarecido. Em caso de dúvidas sobre esclarecimentos éticos desta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia, no telefone: 3254-4161.

**INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ DEVE SABER SOBRE A PESQUISA:**

**Título do projeto: LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NA INFÂNCIA: IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO CONVENCIONAL COMO FATOR PROGNÓSTICO.**

**Responsável pela pesquisa:** Lysa Bernardes Minasi  
**Coordenador Geral:** Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD  
**Telefone para Contato:** 3233-7387/ 8408-7586 (Lysa)

O estudo tem como objetivo avaliar as alterações genéticas nas Leucemias Linfóides Agudas na infância em crianças menores de 15 anos de idade, buscando correlacionar os achados citogenéticos com a evolução do quadro clínico da doença. Este estudo permitirá que os médicos tenham um melhor entendimento sobre a evolução da doença facilitando assim o diagnóstico e a orientação, em alguns casos, no tratamento.

Na época do diagnóstico, antes do início da medicação, o Serviço de Oncologia Pediátrica da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia realizará a coleta de medula óssea para estudo morfológico e/ou imunofenotípico, desta amostra de medula óssea, será retirado 2,0 mL para o presente estudo. Não haverá nenhum risco para o voluntário apenas um desconforto no momento da coleta. A coleta está sob a responsabilidade do Dr. Everaldo Ruiz Júnior e este procedimento já faz parte da rotina do setor para fazer o diagnóstico da doença, portanto a coleta não será realizada apenas para a pesquisa genética. Será realizada ainda a coleta de 2,0 mL de sangue periférico pela técnico(a) de enfermagem do hospital, não haverá nenhum risco apenas um desconforto durante a coleta, em alguns casos poderá formar uma mancha roxa no local da coleta, caso não haja compressão do local após a coleta de sangue, mesmo assim esta mancha

desaparecerá após alguns dias não sendo necessário preocupação por parte dos pais. As amostras após coletadas serão enviadas ao Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene) da SULEIDE/SES/GO localizado na Universidade Católica de Goiás.

O participante não terá nenhuma despesa ao concordar em participar do projeto, e não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela participação, ela é voluntária. O responsável pela criança terá o direito de pedir indenização em caso de danos decorrentes durante a participação de seu filho na pesquisa. Os dados pessoais de cada voluntário serão mantidos em absoluto sigilo. Os resultados obtidos serão utilizados somente nesta pesquisa, se publicada em revistas e jornais especializados, igualmente será guardado o sigilo.

O presente estudo deverá ser concluído até o mês de março de 2009.

A equipe médica assegura o tratamento adequado de todos os pacientes, independente de optarem por participar ou não do estudo. Os participantes da pesquisa terão a liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem penalização ou perda do tratamento habitual.

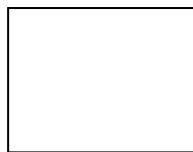
### DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, RG/CPF/ \_\_\_\_\_, declaro ter lido os Termos desse Consentimento Livre e Esclarecido, ter entendido as informações contidas nesse documento, cuja cópia fica em meu poder. Declaro, ainda, que estou de acordo que meu filho(a) participe do estudo que me foi apresentado. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador \_\_\_\_\_ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou prejuízo no tratamento e acompanhamento médico do meu filho.

Local e data: \_\_\_\_\_

Assinatura do responsável (pais, tutor): \_\_\_\_\_

Assinatura Dactiloscópica (quando necessário):



Assinatura do pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas:

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_