



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

*Diagnóstico Citogenético e Molecular das Alterações
Genéticas Recorrentes em Leucemias da Infância,
no Distrito Federal.*

Débora Rabello Mesquita

Orientadora: Profa. Dra. Íris Ferrari
Co-orientador: Prof. Dr. Cezar Martins de Sá

Brasília

2009



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

*Diagnóstico Citogenético e Molecular das Alterações
Genéticas Recorrentes em Leucemias da Infância,
no Distrito Federal.*

Débora Rabello Mesquita

Orientadora: Profa. Dra. Íris Ferrari
Co-orientador: Prof. Dr. Cezar Martins de Sá

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de doutor em Ciências Médicas.

Brasília

2009

A realização deste trabalho foi possível devido:

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília;

Ao Laboratório de Biologia do Gene, do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, onde este trabalho foi desenvolvido, com financiamento do Projeto 380/4 Pronex FAPDF/Cnpq;

Ao Laboratório de Genética Clínica, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, onde foram realizadas as análises cariotípicas;

Ao Núcleo de Genética do Hospital de Apoio de Brasília, onde foram realizadas as análises imunofenotípicas;

À parceria entre a Universidade de Brasília e o Hospital de Apoio de Brasília;

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnológica do Amazonas, pela licença que me concedeu para que eu pudesse realizar este trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, pela concessão da bolsa de estudo durante o período de realização deste trabalho.

Dedico:

Aos meus filhos Mariana e Gabriel, por existirem, por serem o que são e engrandecerem a minha vida.

Aos meus pais, pelo exemplo e indicação do bom caminho e por se fazerem presentes, incondicionalmente, durante todo ele.

AGRADECIMENTOS

Quero aqui deixar meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Acima de tudo, preciso aqui registrar que mais do que me ensinar a pesquisar e a fazer-me crescer como profissional, vocês permaneceram ao meu lado e me mostraram valores que deram um novo sentido ao meu trabalho. Portanto, hoje carrego comigo um olhar cheio de gratidão e a certeza de que a participação de cada um de vocês foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

Quero agradecer de modo especial:

A Deus, que me deu minha família, meus amigos, o dom de viver e o desejo de aprender.

À Profa. Dra. Íris Ferrari, por ter acreditado em mim, pela oportunidade que me concedeu, pelo exemplo de vida e incansável luta, por seu testemunho de coragem e determinação, pelo incentivo constante e orientação.

Ao Prof. Dr. Cezar Martins de Sá, por ter me recebido em seu laboratório, pela confiança e incessante estímulo, pelo exemplo de simplicidade e brilhantismo, pelo apoio incondicional, pelo caminho que me fez percorrer.

Ao Dr. José Carlos Martins Córdoba, pelo testemunho profissional, pela humanidade que carrega, pela referência que se tornou pra mim, por todas as vezes que, em meio ao seu trabalho, acolheu muitas de minhas “dúvidas hematológicas”, pela paciência e inúmeras contribuições a este trabalho.

À Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima, por sua atenção e disponibilidade em me ajudar, pelo estímulo e amizade.

À Dra. Mara Santos Córdoba, pelo apoio e dedicação contínua à análise cariotípica dos casos de leucemia infantil.

Ao Dr. Aguinaldo Gonçalves por suas correções e contribuições no artigo *Molecular and chromosomal mutations among children with B-lineage lymphoblastic leukemia in Brazil's Federal District*.

Ao Diogo Martins de Sá, pela contribuição na tradução do artigo *Molecular and chromosomal mutations among children with B-lineage lymphoblastic leukemia in Brazil's Federal District*.

À Dra. Ísis Quezado Magalhães, por sua incessante dedicação e empenho em projetos como o *Criança e Vida*, que visam a melhoria das condições de tratamento dos casos de leucemia infantil.

Ao Dr. Carlos Alberto e Dr. Alexandre Nonino, pela confiança e contribuição no trabalho de diagnóstico molecular dos casos de leucemia mielóide crônica.

Ao Dr. José Andrés Yunes, Chefe do Laboratório de Biologia Molecular do Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Boldrini, pela oportunidade de estágio e cessão das linhagens celulares utilizadas como controles.

À Ana Luíza e Marcela, do Laboratório de Biologia Molecular do Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Boldrini, pela acolhida e amizade.

Aos meus pais, que me mostraram, com suas vidas, o valor do estudo e do trabalho, pelo exemplo e presença constante. Se cheguei até aqui é porque eles fizeram de mim e por mim mais do que eu poderia fazer. A eles minha eterna gratidão.

Aos meus filhos, Mariana e Gabriel, meus grandes companheiros, por transformarem a minha vida, por todas as alegrias que me proporcionam, pela compreensão em todos os momentos de minha ausência, pelo amor com que me nutrem.

Aos meus irmãos: Raul, Cristina, Zeca e Mariana e cunhados: Lucilene, Michel, Cláudia e Gordo, pelo apoio de sempre e por todas as vezes que fizeram por mim o que eu não pude fazer.

De modo especial, quero agradecer à minha irmã Cristina, hematologista, que, ao relatar sua experiência profissional, despertou em mim o desejo de aprender a Genética das leucemias.

Ao Rodrigo, meu moreno, por sua presença em minha vida, pela companhia e ternura, por todo o bem que me faz.

À Mirtes, Ana Maria, Rinaldo e todos os demais amigos sempre presentes, pela companhia concreta, que me sustenta em todas as horas.

À Patrícia, grande amiga de bancada e de vida, por todas as boas gargalhadas que demos juntas, pelo testemunho de vida e grande amizade que se iniciou.

À Tereza, pela paciência e amizade ao longo deste caminho.

À família Rodrigues Berçot por todas as vezes que acolheu a mim e a meus filhos como família, por fazerem parte de nossas vidas, por todo o carinho e “apoio logístico”.

Aos meus avós: Maria, Ivinha e Geraldo, à tia Terezinha, primas Suzana e Teka e a toda minha família candanga, pelo carinho e acolhida em todos os momentos.

À Líliam Maçaneiro, companheira de laboratório, pelo exemplo de dedicação, pelos momentos de descontração e pela paciência com que me auxiliou no início deste trabalho.

À Lílian Queiroz, pela amizade e por todas as vezes que, juntas, trocamos o sono pela Genética.

Ao Rogério, pela análise imunofenotípica de todos os casos de leucemia infantil, por sua grande disponibilidade em me ajudar em todas as vezes que precisei recorrer ao *Disk Rogério* e pela amizade que se iniciou.

À Aline, por me mostrar os primeiros passos da técnica molecular.

Ao Ricardo, pela companhia no laboratório.

À Marinez, pelos cuidados no preparo do material para análise molecular.

À Rosana, pela amizade e companhia na biblioteca.

À direção do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, pela concessão de minha licença para que eu pudesse realizar este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, pela bolsa concedida.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, que participaram de minha formação científica.

Ao Alessandro e demais membros da equipe da secretaria de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pelo apoio burocrático.

É preciso um grande, enorme, desconunal problema, para que o que antes julgamos ser problema volte à sua dimensão real. Não há problema, se há saúde. Isso, porém, só se descobre quando a saúde ameaça ir embora, ou vai. Tomar consciência de que perdi o direito de ter problemas foi uma das boas coisas que aconteceram na minha vida.

Roberto Nogueira Ferreira
Fundador da ABRACE

RESUMO

Em crianças, as leucemias, predominantemente do tipo aguda, são a forma mais comum de câncer. Informações a respeito das alterações genéticas recorrentes são importantes para a confirmação diagnóstica, caracterização biológica e apresentam grande valor prognóstico nas leucemias. No entanto, no Distrito Federal, não há relatos a respeito de suas frequências. Utilizando-se as técnicas de obtenção de metáfases a partir do cultivo de células de medula óssea e RT-PCR foram pesquisadas as alterações genéticas recorrentes em 133 pacientes pediátricos portadores de leucemia, no período de 2005 a 2007, correspondendo a 78,70% do total registrado no Hospital de Apoio de Brasília.

Observaram-se um total de 88 casos de LLA de linhagem B, 34 de LMA, sete de leucemia aguda bifenotípica e quatro de LMC, correspondendo, respectivamente, a 66,17%, 25,56%, 5,26% e 3,01% do total analisado.

Entre os 79 casos com análise cariotípica completa, 47 apresentaram cariótipo normal e 32 outros evidenciaram alterações cromossômicas, sendo: hiperdiploidia (12), hipodiploidia (7), pseudodiploidia (12) e trissomia do 21 (1).

Transcritos híbridos recorrentes foram identificados em 17 casos de LLA de linhagem B, sendo *BCR/ABL p190* (1), *E2A/PBX1* (5), *TEL/AML1* (10) e *MLL/ENLA1* (1) e em onze de LMA: *AML1/ETO* (5), *PML/RAR α* (3), *CBF β /MYH11* (3). Para os transcritos: *MLL/AF4*, *MLL/AF9*, *MLL/ENLA2* e *MLL/ELL*, nenhuma amplificação foi observada. Para cada transcrito foi verificada variação no valor das frequências obtidas ano a ano. Questões relacionadas à heterogeneidade étnica são discutidas, sugerindo-se influência deste fator na variação encontrada.

Os valores referentes às frequências do transcrito *TEL/AML1* identificados, no presente trabalho, são inferiores à média de 25% relatada em países industrializados. Análise comparativa da frequência do referido transcrito é realizada entre países com diferentes graus de industrialização, identificando-se possível correlação entre este fator e a frequência de *TEL/AML1*, o que leva a considerar a possibilidade de ocorrência de uma etiologia infecciosa para a leucemia infantil.

Não houve concordância entre os resultados obtidos a partir das análises citogenética e molecular. A análise molecular, por RT-PCR, foi considerada como técnica ideal para a detecção de transcritos híbridos, enquanto que a análise citogenética contribuiu para a identificação de alterações cromossômicas numéricas, alterações estruturais não recorrentes e pseudodiploidias sem transcrito correspondente.

O trabalho realizado permitiu a instalação de uma Unidade de Diagnóstico Molecular de Leucemias no Distrito Federal, ao possibilitar a incorporação do exame molecular no grupo de exames realizados ao diagnóstico em todos os pacientes com suspeita de leucemia, registrados no Hospital de Apoio de Brasília.

ABSTRACT

Leukemias, mainly of the acute type, are the most common form of cancer in children. Information about recurrent genetic alterations is important for diagnostic confirmation and biological characterization, and this represents great prognostic value in leukemias. However, in the Federal District there are no reports on their frequency. Using techniques that obtain metaphases from the cultivation of bone marrow cells and RT-PCR, recurrent genetic alterations were studied in 130 pediatric leukemia patients, from 2005 to 2007, corresponding to 78,70% of the total number recorded at the Hospital de Apoio of Brasília.

A total of 88 cases of LLA of B lineage, 34 of LMA, seven of acute biphenotypic leukemia and four of LMC were observed, corresponding, respectively, to 66.17%, 25.56%, 5.26% and 3.01% of the whole group analyzed.

Among the 79 cases with complete karyotypic analysis, 47 presented a normal karyotype and 31 others showed chromosomal alterations, which were divided thus: hyperdiploidy (12), hypodiploidy (7), pseudodiploidy (12) and trisomy-21 (1).

Recurrent hybrid transcripts were identified in 17 cases of LLA of B lineage, and these were *BCR/ABL p190* (1), *E2A/PBX1* (5), *TEL/AML1* (10) and *MLL/ENLA1* (1) and in eleven of LMA: *AML1/ETO* (5), *PML/RAR α* (3), *CBF β /MYH11* (3). For transcripts *MLL/AF4*, *MLL/AF9*, *MLL/ENLA2* and *MLL/ELL*, no amplification was observed. For each transcript there was a variation in the value of frequencies obtained year on year. Questions relating to ethnic heterogeneity are discussed, suggesting that this is a factor in the variation encountered.

The values referring to frequencies in the *TEL/AML1* transcripts identified in the current work are below the average of 25% reported in industrialized countries. Comparative analysis of the frequency of the transcript is carried out among countries with different levels of industrialization, identifying a possible correlation between this factor and the frequency of *TEL/AML1*, which leads one to consider the possibility of there being an infectious etiology for child leukemia.

There was no match between the results obtained from cytogenetic and from molecular analyses. Molecular analysis, by RT-PCR, was considered to be the ideal technique to detect hybrid transcripts, while cytogenetic analysis helped to identify numerical chromosomal alterations, non-recurrent structural alterations and pseudodiploidies with no corresponding transcript.

This work allowed a Molecular Leukemia Diagnosis Unit to be installed in the Federal District, making it possible for the molecular test to be incorporated in the group of tests carried out when diagnosing all patients with suspected leukemia, registered at the Hospital de Apoio of Brasília.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de casos analisados, por ano.....	44
Figura 2. Distribuição dos casos analisados, por idade	45
Figura 3. Análise por RT-PCR para a presença do transcrito <i>BCR/ABL</i> p190.....	46
Figura 4. Análise por RT-PCR para a presença do transcrito <i>E2A/PBX1</i>	46
Figura 5. Análise por RT-PCR para a presença do transcrito <i>TEL/AML1</i>	46
Figura 6. Análise por RT-PCR para a presença do transcrito <i>MLL/ENL1</i>	46
Figura 7. Análise por RT-PCR para a presença do transcrito <i>AML1/ETO</i>	47
Figura 8. Análise por RT-PCR para a presença do transcrito <i>CBFB/MYH11</i>	47
Figura 9. Análise por RT-PCR para a presença do transcrito <i>PML/RARA bcr1</i>	47
Figura 10. Análise por RT-PCR para a presença do transcrito <i>PML/RARA bcr3</i>	47
Figura 11. Análise por RT-PCR para a presença do transcrito <i>BCR/ABL</i> p210 b2-a2	48
Figura 12. Análise por RT-PCR para a presença do transcrito <i>BCR/ABL</i> p210 b3-a2	48
Figura 13. Distribuição dos casos de LLA B analisados, por idade	51
Figura 14. Distribuição dos casos de LMA analisados, por idade	54

LISTA DE TABELAS

1. Indicação de pares de <i>primers</i> para amplificação de transcritos gênicos	35
2. Frequência de casos registrados e analisados	44
3. Distribuição de frequências referente aos casos de LLA B segundo citogenética	51
4. Indisponibilidade de material dos casos de LLA B para análise molecular	52
5. Distribuição de frequências de transcritos referente aos casos de LLA B	52
6. Resultados das análises molecular e citogenética referentes aos casos de LLA B.....	52
7. Distribuição de frequências referente aos casos de LMA segundo citogenética.....	54
8. Indisponibilidade de material dos casos de LMA para análise molecular	54
9. Distribuição de frequências de transcritos referente aos casos de LMA.....	55
10. Resultados das análises molecular e citogenética referentes aos casos de LMA	55

LISTA DE LISTAGENS

1. Identificação e caracterização dos 130 casos analisados.....	41
2. Banco de cDNA de amostras positivas	49
3. Frequência do transcrito <i>TEL/AML1</i> por localização geográfica	74

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABL	<i>Abelson leukemia virus</i>
AcMo	anticorpo monoclonal
ATP	adenosina trifosfato
AML1	<i>Acute Myeloid Leukemia</i>
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i> (gene)
bcr	<i>Breakpoint cluster region</i> (região no gene)
CALLA	antígeno da leucemia linfoblástica aguda comum
CBFB	<i>core-binding factor β</i>
cDNA	DNA complementar
cLLA	leucemia linfoblástica aguda comum
DEPC	<i>diethyl pyrocarbonate</i>
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	<i>deoxyribonucleoside triphosphate</i>
DRM	doença residual mínima
DTT	<i>dithiothreitol</i>
EDTA	<i>ethylenediamine-tetraacetic acid</i>
EGIL	Grupo Europeu para Classificação Imunológica de Leucemia
ETO	<i>eight twenty one</i> (translocação t(8;21))
FAB	Grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico
FISH	hibridização por fluorescência <i>in situ</i>
GAPDH	gliceraldeído fosfato desidrogenase
GM-CSF	fator estimulante da colônia de granulócitos e macrófagos
GSTP-1	<i>glutathione S-transferase P-1</i>
HAB	Hospital de Apoio de Brasília
HBSS	<i>Hanks Balance Salt Solution</i>
HOX	<i>homeobox</i> (família de fatores de transcrição)
Ig μ	imunoglobulina
INF- α	interferon α
ICSN	Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LLA	leucemia linfoblástica (linfocítica) aguda
LLC	leucemia linfocítica crônica

LMA	leucemia mielóide aguda
LMC	leucemia mielóide (mielocítica) crônica
RT-M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
mg	miligrama
MLL	<i>mixed lineage leukemia gene</i>
mM	milimolar
MOD	medula óssea em cultura direta
MYH11	<i>smooth muscle myosin heavy chain</i>
NOHP	Núcleo de Oncologia e Hematologia Pediátrica
OMS	Organização mundial de Saúde
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	reação de polimerização em cadeia
Ph	cromossomo Philadelphia
PML	<i>Promyelocitic leukemia</i>
RAR α	receptor α do ácido retinóico
RCBP	Registro de Câncer de Base Populacional
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
RNAr	ácido ribonucléico ribossomal
RNAse <i>out</i>	impede a ação da ribonuclease RNAse
RNA t	ácido ribonucléico transportador
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	transcrição reversa seguida de reação de polimerização em cadeia
SBF	soro bovino fetal
SES/DF	Secretaria de Estado e Saúde do Distrito Federal
SNC	Sistema Nervoso Central
STR	<i>short tandem repeat</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TEB	<i>Tris-EDTA/borate electrophoresis buffer</i>
TEL	translocation ETS leukemia (fator semelhante ao oncogene ETS)
TR	transcriptase reversa
U	unidade (de atividade enzimática)
μ g	micrograma
μ l	microlitro

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS E LISTAGENS	xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	
1.1 As Leucemias	1
1.2 As Leucemias na infância.....	6
1.3 A leucemia Linfoblástica Aguda	7
1.3.1 Genes híbridos	9
1.3.2 Origem molecular das leucemias pediátricas	14
1.3.3 A etiologia infecciosa	16
1.4 A Leucemia Mielóide Aguda	18
1.4.1 Genes híbridos	20
1.5 A leucemia bifenotípica aguda	23
1.6 A Leucemia Mielóide Crônica	24
2. JUSTIFICATIVA	27
3.OBJETIVOS	28
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	29
4.1 Técnicas realizadas	
4.1.1 Gradiente de Ficoll	30
4.1.2 Extração de RNA total.....	31
4.1.3 Eletroforese de RNA	33
4.1.4 Síntese de cDNA	33
4.1.5 Reação em cadeia da polimerase RT-PCR	33
4.1.6 Eletroforese de DNA	35
4.1.7 Obtenção de metáfases	36
4.1.8 Imunofenotipagem.....	37
5. RESULTADOS	39
5.1 Leucemia Linfoblástica Aguda.....	50
5.2 Leucemia Mielóide Aguda	53
5.3 Leucemia Bifenotípica aguda	56
5.4 leucemia Mileóide crônica	56
6. DISCUSSÃO	
6.1 Frequência de ocorrência dos transcritos.....	57
6.2 Instalação de uma unidade para diagnóstico molecular	62
6.3 Comparação entre análise molecular e análise citogenética.....	64
6.4 Etiologia infecciosa para LLA.....	68
7. CONCLUSÕES	75
8. PERSPECTIVAS	77

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
10. APÊNDICES	
10.1 Publicação.....	94
10.2 Modelo de laudo para diagnóstico molecular.....	103
10.3 Amostras analisadas em 2005.....	104
10.4 Amostras analisadas em 2006.....	106
10.5 Amostras analisadas em 2007.....	109
11. ANEXOS	
11.1 Sequência dos <i>primers</i> utilizados	111
11.2 Soluções preparadas	113
11.2.1 PBS 1X	113
11.2.2 MOPS 10X	113
11.2.3 Tampão de amostra para RNA	113
11.2.4 Gel desnaturante de agarose	113
11.2.5 Brometo de etídio	114
11.2.6 TEB 5X.....	114
11.2.7 Tampão de amostra 10X.....	114
11.2.8 Gel de agarose	114
11.2.9 Meio de cultura RPMI.....	115
11.2.10 Tampão fosfato	115
11.2.11 Solução Hipotônica (KCl)	115
11.2.12 Solução de Tripsina	115
11.2.13 Solução de Colchicina – 10X	115
11.2.14 Solução de Giemsa	115
11.2.15 Solução de Hank's Balance Salt Solution (HBSS) – 10X.....	116
11.2.16 Solução de KOH.....	116

1. INTRODUÇÃO

1.1 As leucemias

As neoplasias hematológicas são distúrbios originados a partir de uma célula de linhagem hematopoética que sofreu alterações genéticas em determinada fase ao longo de sua via de diferenciação (Zago *et al*, 2001). Estas neoplasias abrangem as leucemias agudas, as síndromes mieloproliferativas e as linfoproliferações (Oliveira & Neto, 2004).

As leucemias caracterizam-se como um grupo de doenças neoplásicas, onde ocorre proliferação clonal de um precursor linfóide, mielóide ou de uma célula progenitora com capacidade pluripotente e potencial de diferenciação, tanto para a linhagem linfóide como para a linhagem mielóide, resultando em acúmulo destas células na medula óssea (Zago *et al*, 2001). Considera-se que este processo tenha se originado pela mutação somática de uma única célula dentro de uma população menor de células progenitoras (Haferlach *et al*, 2005).

Em relação ao estado de maturidade das células leucêmicas, as leucemias podem ser classificadas em agudas ou crônicas, termos que originalmente se referiam ao tempo de sobrevivência dos pacientes portadores destas doenças quando terapias efetivas não eram disponíveis (Pui,1999). Com o advento de novas abordagens terapêuticas, esta classificação adquiriu novo significado. As leucemias agudas, que compreendem a leucemia mielóide aguda (LMA) e a leucemia linfoblástica aguda (LLA), são doenças progressivas e agressivas caracterizadas por rápida proliferação de células imaturas denominadas blastos. Isto ocorre porque a célula que origina o clone neoplásico é um precursor cuja alteração mutacional causa perda da capacidade maturativa, com conseqüente acúmulo de blastos na medula óssea e no sangue periférico. As leucemias crônicas, leucemia mielóide crônica (LMC) e leucemia linfocítica crônica (LLC), são aquelas caracterizadas por proliferação de células que são relativamente bem diferenciadas. Neste tipo de leucemia, a mutação permite a manutenção da capacidade de diferenciação e maturação celular, havendo um característico aumento no número de células maduras na medula óssea e no sangue periférico. A progressão é lenta, porém seguida de fase acelerada e pode transformar-se, tardiamente, em leucemia aguda (Pui,1999; Oliveira & Neto, 2004).

Sabendo-se que uma leucemia pode emergir em qualquer estágio do desenvolvimento celular na hematopoese, o ponto na via de diferenciação no qual tem início o processo, bem como a extensão da capacidade de maturação desta são determinantes significativos no comportamento e entendimento da evolução clínica de cada subtipo de leucemia (Hoffbrand & Pettit, 2001).

À medida que as células leucêmicas povoam a medula, ocorre substituição progressiva dos elementos hematopoéticos normais por células do clone leucêmico, podendo ocorrer, na maioria dos casos, infiltração destas para o sangue periférico, no qual podem ser observadas alterações quantitativas e qualitativas (Oliveira & Neto, 2004).

De forma geral, as manifestações clínicas nas leucemias decorrem basicamente de dois processos: inibição da hematopoese normal pelas células leucêmicas e os efeitos da infiltração leucêmica de diversos órgãos e sistemas. A inibição do crescimento e diferenciação das células hematopoéticas normais é devido à ocupação física da medula óssea e competição nutricional por parte das células neoplásicas (Oliveira *et al*, 2004). É comum um quadro de anemia, infecções e hemorragias conseqüente da diminuição na produção de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas, respectivamente (Hoffbrand & Pettit, 2001). Hepato e esplenomegalia podem ser detectadas, bem como infiltrações de células neoplásicas em outros órgãos, tais como baço, fígado, linfonodos, testículos (particularmente na LLA) e sistema nervoso central (Oliveira & Neto, 2004).

A realização de hemograma com contagem diferencial e análise morfológica sugere o diagnóstico de leucemia ao detectar células blásticas, no caso de leucemias agudas, e predominância da série granulocítica, na LMC. A confirmação ocorre com análise citomorfológica do mielograma, ao evidenciar achado de 20% ou mais de blastos, no caso das leucemias agudas (Vardiman *et al*, 2002), e hiper celularidade com predomínio de granulócitos, no caso de LMC (Hoffbrand & Pettit, 2001). A análise morfológica contribui para a classificação inicial da maioria dos casos de leucemia.

A heterogeneidade entre as leucemias agudas e diferenças de comportamento biológico entre pacientes motivaram o estabelecimento de classificações. Em 1976 o grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) propôs uma classificação para este grupo de doenças, com base em aspectos morfológicos, grau de maturação e presença de componentes específicos, identificando seis diferentes subtipos de LMA (M1 a M6). Esta classificação foi revisada ao longo do tempo e atualmente oito subtipos de LMA são considerados (M0 a M7) e três de LLA (L1, L2 e L3) (Bennett *et al*, 1976; Bennett *et al*, 1985; Bennett *et al*, 1991).

A partir do aspirado de medula óssea também são realizadas análises citoquímica, imunofenotípica, citogenética e molecular. O uso de colorações citoquímicas básicas auxilia na confirmação da linhagem celular envolvida, enquanto que o exame de imunofenotipagem, que utiliza anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos, além deste dado, permite identificar o grau de maturação do clone neoplásico, complementando o diagnóstico (Jennings & Foon, 1997).

A hematopoese é um complexo processo regulado pela expressão coordenada de vários fatores de transcrição, que são ativados ou inibidos no decorrer da hematopoese. A expressão desregulada desses fatores e o conseqüente desequilíbrio de suas funções parecem preceder a transformação maligna (Tenen, 2003).

Genes envolvidos na proliferação e diferenciação de células normais podem atuar na indução ou progressão de um tumor maligno quando sua estrutura ou expressão é alterada. Deste modo, tanto a ativação quanto a supressão gênica podem fazer parte do processo maligno. Nas neoplasias, as alterações cromossômicas podem modificar a função de genes importantes de forma que passarão a contribuir para a transformação celular maligna (Thompson & Thompson, 2002; Jorde *et al*, 2004).

Os métodos diagnósticos são, com freqüência, baseados em avaliações morfológicas. Em algumas categorias de cânceres assim definidos, a resposta do paciente ao tratamento é bastante heterogênea, originando a possibilidade de que dentro desta categoria morfolologicamente definida existam cânceres molecularmente distintos.

Diferentes tipos de alterações genéticas ocorrem nas leucemias. Aproximadamente 25% das alterações encontradas nas LLAs e 36% nas LMAs são aleatórias, isto é, são observadas em clones leucêmicos de casos isolados (Look, 1997). Porém, várias alterações genéticas são recorrentes, ocorrendo de maneira consistente e repetida (em casos consecutivos). Forte associação entre os diferentes tipos de alterações genéticas e a resposta ao tratamento, evidenciada em vários estudos, conferiu às alterações o mais alto valor prognóstico para a seleção de tratamentos, corroborando a identificação de subgrupos distintos e clinicamente relevantes (Grimwade, 2001). A identificação destas alterações permitiu melhor categorização dos grupos de risco, importante para estratificação terapêutica e monitoramento da resposta do paciente ao protocolo de tratamento (Preiss *et al*, 2006). Considerando a grande relevância da presença destas alterações no curso clínico de cada paciente e a existência de diferenças significativas na resposta ao tratamento dos diversos subtipos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs, em 1997, uma nova classificação para as leucemias agudas, elegendo como critério principal para a categorização da doença a presença e o tipo de alteração genética. Esta classificação é, portanto, mais completa que a FAB, pois inter-relaciona os caracteres morfológicos e citoquímicos aos imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares, identificando, com maior precisão, categorias com prognósticos distintos (Harris *et al*, 1999; Vardiman *et al*, 2002).

Desde a década de 60 tem sido reconhecida a presença de cromossomos marcadores em células neoplásicas, especialmente em linhagem hematopoética (Bottura & Ferrari, 1960;

Rowley, 1973). A natureza de muitas das alterações genéticas presentes nas leucemias tem sido revelada através do exame citogenético de rotina. A análise cromossômica do clone leucêmico tem identificado um grande número de alterações recorrentes, numéricas e/ou estruturais, adicionais e complexas, associadas aos aspectos morfológicos e imunofenotípicos específicos de cada leucemia (Rego & Falcão 2002; Pui *et al.*, 2004). As alterações cariotípicas que estão confinadas aos clones malignos, desaparecem durante a remissão hematológica e reaparecem com a recidiva, algumas vezes demonstrando evidências de novas alterações adicionais ao clone anormal original. Algumas alterações crípticas, não visualizáveis pelo procedimento convencional, podem ser identificadas por técnicas de citogenética molecular, como a hibridização por fluorescência *in situ* (FISH), por meio do uso de sondas específicas direcionadas para as regiões alvo da análise (Pombo-de-Oliveira, 2008).

O uso de abordagens moleculares vem revelando que a citogenética convencional é insuficiente para identificar precisamente algumas das alterações genéticas. Isto se justifica pelo fato de que o uso de técnicas moleculares permite maior sensibilidade diagnóstica. Há alterações cromossômicas de difícil identificação, como é o caso da translocação t(12;21), detectada, por citogenética convencional, em menos que 0,05% dos casos de LLA (Golub *et al.*, 1995). Isto ocorre devido à troca de regiões aparentemente similares entre os cromossomos, resultando em cromossomos derivados citogeneticamente semelhantes aos seus homólogos normais. Considerando que as alterações cromossômicas geram genes híbridos, o uso de técnicas moleculares permitiu identificar a real frequência desta translocação, em cerca de 25%, por meio da detecção da fusão gênica correspondente *TEL/AML1* (Rubnitz & Look, 1999).

O desenvolvimento da técnica de amplificação do DNA utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), no fim da década de 80, ofereceu grandes perspectivas para a análise de genes e desde então vem sendo utilizada nas neoplasias hematológicas, tornando possível a identificação de diferentes alterações, que podem ser detectadas em um clone leucêmico em até 10^4 células normais (van Dongen *et al.*, 1999). Desta forma, além da necessária análise citogenética, a abordagem molecular tem se tornado essencial para a identificação das alterações genéticas presentes nas leucemias (Greaves & Wiemels, 2003; Pui *et al.*, 2004).

Uma variedade de abordagens moleculares está disponível para a identificação de alterações cromossômicas, sendo os métodos mais utilizados: a reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR), a hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) e a análise por *Southern blot* (van Dongen *et al.*, 1999; Pui *et al.*, 2004).

O estudo molecular dos pontos de quebra das alterações genéticas tem levado à identificação de genes envolvidos na patogênese das leucemias, à compreensão dos seus mecanismos de ação e à razão pela qual a disfunção destes, no clone leucêmico, compromete os mecanismos de divisão celular, diferenciação-maturação e apoptose, fazendo com que o clone apresente a vantagem proliferativa que caracteriza a transformação neoplásica (Look, 1997; Roman-Gomez *et al*, 2002; Silva *et al*, 2006).

Na maioria dos casos, dos dois componentes de cada fusão gênica, um é fator transcricional importante para a hematopoese normal, enquanto o outro tem função mais variável, freqüentemente relacionada ao controle do ciclo celular e apoptose. O gene híbrido codifica proteínas de fusão, que retêm a maior parte dos domínios funcionais das proteínas selvagens, interferindo na regulação da transcrição gênica e conferindo vantagem à sobrevivência das células leucêmicas (Alcalay *et al*, 2001). A maioria dos fatores de transcrição afetados pelas alterações cromossômicas associadas às leucemias pode ser agrupada em uma das seguintes famílias: *core binding factor* (CBF), *receptor a do ácido retinóico* (RAR α), *homeobox* (HOX) e *mixed lineage leukemia* (MLL) (Rego, 2002).

Após o diagnóstico e identificação do subtipo da doença, é essencial determinar a que grupo de risco pertence cada paciente. Vários estudos clínicos têm mostrado que as alterações moleculares em leucemias agudas desempenham importante papel na estratificação desses grupos (Pui *et al*, 2004). Desta forma, considerando que as terapias modernas são baseadas nessa categorização, o entendimento biológico dos subtipos de leucemia aguda, assim como a identificação de genes alvos não apenas forneceram conhecimento fundamental para a compreensão a respeito das leucemias, mas permitiram também considerações sobre a variabilidade clínica que é observada entre os pacientes (Haferlach *et al*, 2005). A identificação dos rearranjos híbridos específicos contribui para melhor caracterização da doença e conseqüente previsão da biologia de cada caso, orientando decisões terapêuticas. Ao atuarem como marcadores moleculares possibilitam melhor acompanhamento em relação à resposta do paciente ao protocolo de tratamento, o que pode ser mais dependente da presença ou da ausência de alteração cromossômica específica que de sua aparência morfológica (Greaves & Wiemels, 2003; Pui *et al*, 2004; Haferlach *et al*, 2005).

A análise molecular tem se tornado, portanto, parte essencial da moderna avaliação das leucemias, aumentando a capacidade de decisão clínica do melhor esquema terapêutico, melhorando a sobrevivência dos pacientes (Oliveira *et al*, 2004). Embora avanços nos métodos de diagnóstico e tratamento tenham aumentado a taxa de cura para 80%, alguns subtipos de leucemia permanecem irresponsivos à terapia (Greaves & Wiemels, 2003).

1.2 As leucemias na Infância

Enquanto os tumores nos adultos estão, em geral, relacionados à exposição a vários fatores de risco como o tabagismo, estilos de vida, alimentação, ocupação e agentes carcinógenos específicos, a maior parte das causas dos tumores pediátricos ainda é completamente desconhecida. Sabe-se ainda que, do ponto de vista clínico, os tumores pediátricos apresentam menores períodos de latência, em geral crescem rapidamente e são mais invasivos, porém respondem melhor ao tratamento (Reis *et al*, 2007).

As leucemias acometem adultos e crianças, porém, seus diferentes tipos ocorrem em frequências distintas nestes dois grupos de idade, evidenciando heterogeneidade quanto à patogenia, etiologia, frequência de alterações genéticas, prognóstico e resposta ao tratamento (Pui, 1999). Em crianças, as leucemias, predominantemente do tipo aguda (Mendonça, 2003), são a forma mais comum de câncer, correspondendo a cerca de 30% de todas as doenças malignas em pacientes com menos de 15 anos de idade (Lightfoot & Roman, 2004). Este fato pode estar parcialmente relacionado à intensa atividade da hematopoese, em vertebrados, durante o desenvolvimento fetal e nos primeiros anos de vida (Pui *et al*, 2004). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), com base em informações obtidas a partir do Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP), a leucemia no Brasil também se destaca como a neoplasia mais comum, com frequência de ocorrência variando de 25% a 35% de todas as neoplasias malignas pediátricas e com incidência de até 3,19 por 100.000 habitantes por ano. Segundo estes dados, observou-se ainda maior incidência da doença em crianças entre 1 e 4 anos e entre pacientes do sexo masculino que nas do sexo feminino (Reis *et al*, 2007).

Diferentes faixas etárias são afetadas por cada um dos subtipos de leucemia. A leucemia linfocítica aguda (LLA) é a malignidade mais comum na infância correspondendo a aproximadamente 75% das leucemias agudas nesse grupo etário, contrastando com cerca de 20% dos casos em pacientes mais velhos (Greaves & Wiemels, 2003; Lightfoot & Roman, 2004).

A leucemia mielóide aguda (LMA) é responsável por cerca de 20% dos casos de leucemia em pacientes pediátricos. A incidência da doença aumenta com a idade e corresponde a mais de 80% das leucemias agudas em pacientes adultos (Zago *et al*, 2001; Greaves & Wiemels, 2003). Uma minoria de crianças apresenta fenótipo ambíguo linfóide-mielóide, caracterizando as leucemias bifenotípicas (Matutes & Catovsky, 1994).

Em relação às leucemias crônicas, de ocorrência rara em crianças e adolescentes, apenas a mielóide (LMC) se manifesta, em aproximadamente 2% a 4% de todos os casos

(Head & Pui, 1999; Zago *et al*, 2001; Lightfoot & Roman, 2004). Em adultos, a LMC responde por cerca de 20% dos casos de leucemia. A leucemia linfocítica crônica (LLC) não tem sido relatada na faixa etária pediátrica (Santana *et al*, 2007).

1.3 A Leucemia linfoblástica aguda

A LLA, neoplasia mais comum na infância, caracteriza-se por proliferação clonal de células linfóides indiferenciadas (linfoblastos), que se acumulam em grande quantidade na medula óssea sendo, porém, malignas e então não funcionais (Farias e Castro, 2004). Embora a LLA possa ocorrer em qualquer idade, sua incidência é maior entre crianças de 2 a 5 anos (Pui *et al*, 2008) e é mais comum em crianças brancas do que em negras (1,8:1) e em meninos do que em meninas (1,2:1) (Pedrosa e Lins, 2002).

Os sintomas e sinais iniciais não são específicos, sendo a maioria comum a várias outras doenças: palidez, cansaço, perda de apetite e de peso, sangramentos, dores ósseas, dores de cabeça, vômitos, aparecimento de manchas roxas pelo corpo e inchaço dos gânglios linfáticos. Salienta-se que, por serem sinais também comuns à LMA, não é possível, com base nesses caracteres, distinguir a LLA da LMA (Zago *et al*, 2001). Dependendo do grau de maturação e do tipo de leucemia, a análise morfológica não é suficiente para identificar a linhagem envolvida. Esta distinção apóia-se, em grande parte, nas análises citoquímica, imuno-histoquímica e imunofenotípica. Esta última permite ainda a detecção das sublinhagens linfóides responsáveis pelo processo leucêmico: B ou T. As LLAs da infância são derivadas de células de linhagem B em 80% a 85% dos casos e de linhagem T, em cerca de 15% (Falcão & Rego, 2002).

Em virtude das perdas e ganhos de antígenos pelas células durante o seu processo de diferenciação, o exame imunofenotípico identifica também o grau de maturação da célula leucêmica o que, principalmente, nas LLAs, é de grande importância, uma vez que os blastos da linhagem linfóide, mesmo que em graus maturativos diferentes, apresentam entre si maior similaridade morfológica que na linhagem mielóide. Apesar de casos de LLA poderem ser subclassificados de acordo com o grau de maturação dos linfócitos B ou T, as diferenciações que realmente apresentam importância no que diz respeito à terapêutica, são aquelas que permitem distinguir as leucemias derivadas de precursores de células B, daquelas derivadas de linhagem T ou de linfócitos B maduros (Pui *et al*, 2008).

As leucemias linfóides de linhagem B são classificadas de acordo com os estágios de diferenciação normal dos progenitores B na medula óssea em: pró-B, B comum, pré-B e B madura, ocorrendo, respectivamente, em 5%, 75%, 15% e 5% dos casos pediátricos. As LLAs

de linhagem T dividem-se em três subgrupos, de acordo com os antígenos correspondentes aos níveis de diferenciação intratímica normal: LLA pré-T, T-intermediário e T-maduro (Farias e Castro, 2004).

Até a metade do século passado, as leucemias eram consideradas universalmente uma doença fatal. O desenvolvimento de combinações terapêuticas, utilizando diversas drogas citotóxicas com ou sem transplante de medula óssea e o diagnóstico mais preciso, tem aumentado o percentual de cura de crianças leucêmicas, principalmente daquelas portadoras de leucemia linfóide aguda (Pedrosa e Lins, 2002). Nos últimos 50 anos, esta doença teve um enorme aumento na sobrevivência. Na década de 60, menos de 10% das crianças estavam vivas após cinco anos. Hoje, nos melhores centros de tratamento, 90% das crianças estão vivas e com grandes chances de cura (Zago *et al*, 2001).

A maioria dos regimes terapêuticos modernos para as leucemias agudas compreende uma fase de indução da remissão, seguida das fases de consolidação (intensificação) da remissão e de manutenção. Um programa de tratamento pré-sintomático do sistema nervoso central (SNC) deve ser instituído precocemente. Em alguns casos pode ser necessário o transplante de medula óssea (Pedrosa e Lins, 2002).

A análise citogenética na LLA é uma das mais difíceis entre as neoplasias hematopoéticas devido ao baixo índice mitótico, à aparência pouco nítida dos cromossomos e à complexidade de alguns cariótipos (Pombo de Oliveira, 2008). As alterações genéticas diferem, em relação ao tipo e à frequência de ocorrência, entre LLA de linhagem B e LLA de linhagem T e entre crianças e adultos portadores de LLA (Lightfoot & Roman, 2004).

As principais alterações cromossômicas ocorridas na LLA de linhagem T incluem as translocações: t(1;14)(p32-34;q11), t(8;14)(q24;q21), t(10;14)(q24;q11) e t(11;14)(p13;q11). Dentre elas, a translocação t(11;14)(p13;q11) é a mais comum ocorrendo em cerca de 7% dos casos. Verifica-se, porém, não haver diferença entre os aspectos clínicos dos pacientes com ou sem a referida translocação (Pombo de Oliveira, 2008).

Nas leucemias linfocíticas agudas de linhagem B, em crianças, as alterações cromossômicas mais prevalentes são a translocação t(12;21)(p13;q22), que tem como consequência a fusão gênica *TEL/AML1*, e a hiperdiploidia, cada uma ocorrendo em aproximadamente 25% dos casos (van Dongen *et al*, 1999). Ambas conferem bom prognóstico (Rubnitz & Look, 1999) e têm evidências de origem pré-natal (Wiemels *et al*, 1999). A translocação t(1;19)(q23;p13), que gera o híbrido *E2A/PBX1* e está presente em 5% a 6% dos casos, também confere bom prognóstico (van Dongen *et al*, 1999; Armstrong & Look, 2005)

Os rearranjos recorrentes associados a mau prognóstico na LLA B ocorrem em menor frequência: translocação t(9;22)(q34;q11), que tem como consequência a formação do gene de fusão *BCR/ABL* variante p190 e ocorre em 3% a 5% dos casos (Rubnitz & Look, 1999) e translocação t(4;11)(q21;q23), que origina o rearranjo *MLL/AF4*, detectada em 2% a 5% em casos de LLA B pediátrica e em mais de 60% dos casos de LLA B de lactentes (<12 meses) (Faderl *et al*, 1998; van Dongen *et al*, 1999).

1.3.1 Genes híbridos

Rearranjos com o gene *MLL*

Em lactentes, o gene *MLL*, localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q23), pode estar rearranjado com até 87 diferentes genes (Meyer *et al*, 2006). Alterações citogenéticas em 11q23 são encontradas em 43% a 60% dos lactentes com LLA (Heerema *et al*, 1994). Quando análises moleculares são realizadas, a frequência destes rearranjos responde por cerca de 80% (Hilden *et al*, 2006) de todas as alterações genéticas ocorridas neste grupo.

Geralmente identificados em LLA com fenótipo pró-B, os rearranjos com o gene *MLL* podem também ser observados em casos de LMA (6% a 8% em LMA *de novo*) (Rubnitz & Look, 1999) e em até 85% dos casos de LMA secundária (Downing, 1999). A maioria das alterações tende a estar associada com leucemias de linhagem hematopoética particular. A associação de rearranjos com o gene *MLL* com ambos os tipos de leucemia, favoreceu a denominação *mixed lineage leukemia (MLL)*, para o gene localizado em 11q23 (Armstrong & Look, 2005). A fusão gênica *MLL/AF4* resultante da translocação t(4;11) é o mais freqüente tipo de rearranjo com o gene *MLL* (Pui *et al*, 2003 a). As outras alterações mais freqüentes são a translocação t(9;11)(p22;q23), que gera o híbrido *MLL/AF9*, e a translocação t(11;19)(q23;p13), que pode originar diferentes genes de fusão: *MLL/ENLA1*, *MLL/ENLA2* e *MLL/ELL* (Chen *et al*, 2006).

Em lactentes, qualquer rearranjo com o gene *MLL* confere prognóstico ruim, enquanto que em crianças maiores de um ano, prognóstico ruim está especialmente associado aos rearranjos dos tipos *MLL/AF4* e *MLL/AF9*, mais que aos outros tipos de rearranjo *MLL* (Pui *et al*, 2003 a). Assim, a idade foi identificada como importante fator prognóstico. Além disso, lactentes abaixo de seis meses têm prognóstico pior do que aqueles de 6 a 12 meses (Hilden *et al*, 2006).

Experimentos de *knockout* do gene *MLL* em camundongos resultaram em: abortos, menor tamanho ao nascimento, defeitos de crescimento, anemia, trombocitopenia e falhas na

expressão do gene HOX, indicando que o gene *MLL* desempenha importante função no desenvolvimento e hematopoese normal por meio da manutenção da expressão do gene HOX (Yu *et al*, 1995; Ernst *et al*, 2004). A proteína MLL pode se ligar diretamente aos promotores dos genes HOX e manter seus níveis de expressão por meio da modificação de histonas (Pombo de Oliveira, 2008). Sugere-se, portanto, que rearranjos com o gene *MLL*, ao provocarem perda da função de um alelo *MLL*, bem como ganho de função deste gene devido a fusões, provavelmente alterem sua atuação tanto na hematopoese quanto na leucemogênese devido a conseqüentes mudanças nos níveis de expressão do gene HOX (Rubnitz & Look, 1999; Armstrong & Look, 2005).

A importância do gene *MLL* é também evidenciada por sua ampla expressão em quase todos os tecidos humanos examinados (Butler *et al*, 1997).

Nas células leucêmicas com rearranjos do gene *MLL*, as regiões de ponto de quebra genômica estão em um fragmento que inclui do éxon 5 ao éxon 11, denominada de região de concentração dos pontos-de-quebra (*breakpoint cluster region – bcr*). Nesta região, existem vários motivos que estão relacionados à recombinação do DNA, como os sítios de ligação à topoisomerase II. A presença destas seqüências de predisposição para recombinação na região *bcr* indica que rearranjos do gene *MLL* podem ser resultantes de eventos de quebra e recombinação de DNA (Pombo de Oliveira, 2008).

BCR/ABL p190

Cerca de 5% dos pacientes pediátricos de LLA apresentam a translocação t(9;22)(q23;q11), tendo como conseqüência a formação dos genes híbridos *ABL/BCR*, que parece não ter influência na patogênese da doença, e *BCR/ABL*, no cromossomo 22 (22q-), o qual é denominado de cromossomo Philadelphia (Ph) (Rubnitz & Look, 1999; Zago *et al*, 2001).

O gene *ABL*, localizado no braço longo do cromossomo nove (9q23), apresenta uma única região de concentração dos pontos de quebra (*bcr- breakpoint cluster region*), entre os exons 1b e 2 (também denominado a2), enquanto no gene *BCR*, localizado no cromossomo 22 (22q34), há três diferentes regiões, originando transcritos de fusão de três diferentes tipos de rearranjo *BCR/ABL*: *micro* (μ -*bcr*), entre os exons 19 e 20, *minor* (m-*bcr*), entre os exons 1 (e1) e 2 e *major* (M-*bcr*), entre os exons 13 e 15 (van Dongen *et al*, 1999).

A maioria dos pacientes pediátricos LLA Philadelphia positivos (Harrison & Foroni, 2002) apresenta o transcrito *BCR/ABL* e1-a2 resultante da fusão do *ABL* com o *BCR* em sua região *minor* (m-*bcr*), originando uma proteína de 190 kDa. Em menor freqüência, identifica-

se nestes pacientes o *BCR/ABL* (b3-a2 ou b2-a2) resultante da quebra do gene *BCR* em sua região *major* (*M-bcr*), que se expressa em uma proteína de 210 kDa. É também relatada a ocorrência simultânea dos dois tipos de transcrito, podendo ser resultado de *splicing* alternativo (Suryanarayan *et al*, 1991; Schlieben *et al*, 1996). O terceiro tipo de transcrito *BCR/ABL* (c3-a2), resultante da cisão no gene *BCR* em sua região micro (μ -*bcr*) origina uma proteína de 230 kDa, que não é observada em LLA pediátrica (van Dongen *et al*, 1999).

A proteína *ABL* normal é regulada por condições fisiológicas e tem atividade tirosina-quinase, isto é, transfere grupos fosfato de adenosina trifosfato (ATP) para aminoácidos tirosina em outras proteínas. As fosforilações atuam como transdutores de sinais, importantes nos processos celulares básicos como proliferação, aderência e apoptose (Oliveira & Neto, 2004). Em condições normais, a proteína *BCR* tem função relacionada à regulação do ciclo celular (Bergantini *et al*, 2005). A transcrição do DNA quimérico (*BCR/ABL*) resulta em atividade tirosina-quinase altamente potencializada, se comparada ao produto normal. Esta proteína tem ainda capacidade autônoma de ativação, não respondendo aos mecanismos celulares normais, que controlam a atividade de *ABL* (Zago *et al*, 2001). Desta forma, *BCR/ABL* é uma proteína chave na indução da transformação leucêmica por sinalizar positivamente a proliferação celular, ativando vias de sinal mitogênico, interferindo com a morte celular programada das células e com a adesão de células leucêmicas ao estroma da medula óssea (Hoffbrand & Pettit, 2001; Oliveira & Neto, 2004).

E2A/PBX1

O gene *E2A*, localizado no cromossomo 19, codifica dois fatores de transcrição, E12 e E47, necessários para a linfopoese normal e regulação do desenvolvimento de células B. Este gene possui dois domínios de transativação transcricional (AD1 e AD2) e um domínio *basic helix-loop-helix* (bHLH), responsável pela ligação da proteína à sequência específica de DNA. Experimentos de *knockout* do gene *E2A* em camundongos evidenciam defeitos no desenvolvimento linfóide (Rubnitz & Look, 1999; Harrison & Feroni, 2002; Armstrong & Look, 2005).

O gene *PBX1*, localizado no cromossomo um, codifica uma proteína atípica HOX, com sítio de ligação ao DNA. Em geral, as proteínas HOX compreendem uma família de fatores de transcrição que mostram um motivo de ligação ao DNA, o homeodomínio.

A translocação t(1;19)(q23;p13) resulta na fusão destes dois genes, unindo a parte de *E2A*, que contém os domínios de transativação transcricional à parte do *PBX1* que contém a região de ligação ao DNA (*homeobox DNA-binding domain* -HD). Ambos os genes

apresentam uma única região de concentração dos pontos de quebra, sendo no gene E2A, entre os exons 13 e 14 e no PBX1, entre os exons um e dois. A proteína híbrida originada tem potencial maligno, induzindo a expressão aberrante de genes, pois se liga ao DNA, de maneira específica, em cooperação com outras proteínas HOX tendo forte atividade de transativação transcricional (Rubnitz & Look, 1999; Curry *et al*, 2001). Além disso, a translocação t(1;19), ao prejudicar a expressão de um alelo E2A e contribuir para a perda de sua função, deve favorecer a leucemogênese (Rubnitz & Look, 1999).

Dados da literatura indicam que esta translocação pode ser encontrada na forma balanceada (25%) ou desbalanceada (75%), descrita como: -19,+der(19)t(1;19), na qual dois cromossomos normais estão presentes (van Dongen *et al*, 1999).

Em pequeno número de casos nos quais foi demonstrada a translocação t(1;19) na análise citogenética, não foi evidenciada por RT-PCR a fusão gênica, sugerindo uma quebra alternativa, fora de E2A (Harrison & Foroni, 2002).

TEL/AML1

A maioria dos pacientes positivos para a fusão *TEL/AML1* tem entre um e doze anos de idade, com um pico entre dois e cinco anos (van Dongen *et al*, 1999), e apresenta deleção do alelo *TEL* não comprometido com a translocação. Na maioria das vezes o gene inteiro é deletado, há, entretanto, relatos, baseados em técnicas de citogenética, hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) e perda de heterozigotidade (LOH), que mostram que a extensão desta deleção pode variar desde deleções intra-gênicas, sendo somente detectadas com o uso de sondas diretas a exons específicos, até deleção detectável por citogenética convencional (Harrison & Foroni, 2002). A observação de que a perda do alelo *TEL* normal frequentemente acompanha a fusão *TEL/AML1*, sugere que o efeito leucemogênico desta fusão deva ser mediado, pelo menos em parte, pela perda da função da proteína *TEL* normal (Armstrong & Look, 2005).

A fusão gênica *TEL/AML1* nunca foi identificada em lactentes com leucemia, nem em casos de LLA-T ou LMA. Sua frequência em pacientes leucêmicos adultos é baixa (<2%) (van Dongen *et al*, 1999).

O gene *translocation-Ets-leukaemia (TEL)*, também denominado *Ets-type variant 6 (ETV6)*, é um fator de transcrição, membro da família de fatores transcricionais Ets, necessário para muitos processos de desenvolvimento e importante na resposta das células aos estímulos extracelulares (Sawinska & Ladón, 2004). A proteína TEL tem um domínio Ets conservado, que é responsável pela ligação ao DNA, e um domínio *helix-loop-helix* (HLH),

que modula sua ativação transcricional, provavelmente por meio da interação proteína-proteína (Romana *et al*, 1995). Diferentes mecanismos são exigidos para garantir a proliferação, diferenciação e sobrevivência das células progenitoras hematopoéticas. O gene *TEL* é essencial para a hematopoese de todas as linhagens na medula, pois ele controla o início da angiogênese no saco embrionário e a migração das células hematopoéticas do fígado e baço fetais para a medula (Wang *et al*, 1997). Apesar de não ser exigido para crescimento ou diferenciação das células hematopoéticas, a perda de função do gene *TEL* conseqüente da formação do gene de fusão *TEL/AML1* compromete a efetiva hematopoese ao causar desequilíbrio da adesão e colonização de células progenitoras no microambiente da medula óssea provocando o aparecimento de células leucêmicas progenitores prematuras no sangue periférico (Wang *et al*, 1998).

O gene *acute myeloid leukemia 1 gene (AML1)*, também denominado *core-binding factor (CBFA2)*, é expresso em uma proteína que atua como fator de transcrição juntamente com a proteína *core-binding factor β (CBFβ)* formando um complexo denominado *human core-binding factor (CBF)*, cuja atividade é essencial durante a expressão de genes específicos para a hematopoese, como os genes *HOX* (Roulston *et al*, 1998; Rubnitz & Look, 1999). O gene *AML1* é normalmente expresso em todas as linhagens hematopoéticas e atua regulando a expressão de vários genes (Penther *et al*, 2002). A importância do gene *AML1* na patogênese da leucemia é reforçada pela identificação de mutações herdadas ou adquiridas neste gene em casos de LMA e pela presença de ampliações genômicas no locus *AML1* em LLA pediátrica (Armstrong & Look, 2005). Esse gene apresenta um domínio *Runt*, que interage com o DNA, e um domínio de transativação (TA).

A translocação t(12;21)(p13;q22) origina o gene de fusão *TEL/AML1*. Ambos os genes apresentam uma única região de ponto de quebra, entre os exons cinco e seis, no gene *TEL* e entre os exons um e três, no gene *AML1*. Neste último, a quebra ocorre mais freqüentemente no intron um, resultando, na maioria dos casos, transcrito no qual está incluído o exon dois do gene *AML1* (van Dongen *et al*, 1999).

A proteína híbrida contém o domínio HLH do gene *TEL* e os domínios *Runt* e TA do *AML1*. As estruturas HLH e TA, simultaneamente presentes, conferem alta afinidade a proteínas co-repressoras como a N-CoR (*component of the nuclear receptor corepressor complex*) e mSin3, aumentando a estabilidade dos complexos *TEL/AML1-N-CoR* ou *TEL/AML1-mSin3*, que passam a atuar como repressores de outros genes (Sawinska & Ladón, 2004).

1.3.2 Origem molecular das leucemias pediátricas

É interessante notar que os mesmos rearranjos genéticos ocorrem em diferentes frequências entre adultos e crianças com LLA B e ainda, entre as crianças as diferenças são também evidentes entre lactentes e crianças maiores que um ano. Parece ocorrer uma associação seletiva de acordo com o grupo etário (Greaves, 1999). No lactente predominam fusões do gene *MLL* (Pui *et al*, 1995). Entre crianças de dois a cinco anos de idade ocorre o pico de LLA comum, onde os subgrupos de hiperdiploidia ou com presença da fusão gênica *TEL/AML1* são os mais prevalentes (Raimond, 1993). Na LLA do adulto, é muito raro o encontro das alterações moleculares comuns nos casos pediátricos e o cromossomo Philadelphia é a alteração genética mais comum (Secker-Walker *et al*, 1991). A seletividade das alterações cromossômicas pode estar associada aos mecanismos de leucemogênese (Greaves, 1999).

Considera-se ainda a existência de combinações específicas de alterações genéticas com subtipos distintos de leucemia definidos pela linhagem, tipo celular ou grau de diferenciação. Lactentes com LLA e rearranjo no gene *MLL* apresentam marcadores indicativos de LLA pró-B; LLA comum com fusão gênica *TEL/AML1* ou hiperdiploidia parece ser originada de célula progenitora precursora de linhagem B, enquanto que a fusão *BCR/ABL* frequentemente se origina de célula progenitora linfóide-mielóide (Barr, 1998).

Parece haver, portanto, associação entre o provável impacto de uma alteração molecular e a fase do desenvolvimento e o contexto celular em que ela ocorre. Sugere-se que a LLA seja biológica e clinicamente diferente quando ocorre no lactente, na criança e no adulto, caracterizando-se, provavelmente, como subtipos etiologicamente distintos nestes grupos etários, o que pode ter importantes implicações no tratamento, prognóstico e curabilidade (Pui *et al*, 2004).

Existem alguns fatores ambientais relacionados ao aparecimento da leucemia, tais como exposição à radiação ionizante, quimioterápicos, ao benzeno e seus derivados, e em cerca de menos de 5% dos casos, há doenças genéticas conhecidas por aumentar a predisposição à doença, como síndrome de Down, síndrome de Bloom, ataxia-telangiectasia, neurofibromatose tipo I e anemia de Fanconi, cujos genes envolvidos relacionam-se a estabilidade genômica e reparo do DNA. No entanto, a etiologia, na grande maioria dos casos de leucemia, é desconhecida (Greaves, 1997; Deschler & Lübbert, 2006).

Sendo a leucemia uma doença biologicamente heterogênea é improvável que exista um único mecanismo causal. Diferentes estudos têm revelado histórias naturais distintas para as leucemias agudas infantis e pediátricas (Wiemels, 1999; Ford *et al*, 2001; Greaves, 2006).

Na leucemia linfoblástica aguda de lactentes, é freqüente o rearranjo genético com o gene *MLL*. O lactente que apresenta este tipo de alteração desenvolve o quadro clínico de leucemia nos primeiros 18 meses de vida, ou seja, nos primeiros seis meses de vida pós-natal. Considerando a comprovada origem pré-natal deste tipo de alteração (Gale *et al*, 1997) e o curto período de latência, sugere-se que as translocações nas quais está comprometido o gene *MLL* são, provavelmente, sozinhas suficientes para desencadear o processo de vantagem proliferativa, não necessitando de eventos adicionais para a transformação leucêmica (Pui *et al*, 1995; Greaves & Wiemels, 2003). Provavelmente as exposições tenham ocorrido intra-útero, durante a gestação.

Os rearranjos com o gene *MLL*, alterações genéticas características da leucemia do lactente, têm sido também observados em leucemias secundárias ao uso de quimioterápicos inibidores de topoisomerase-II (Andersen *et al*, 2001). Nas leucemias secundárias, o tempo de latência é também muito curto, em média de 18 meses (Strick *et al*, 2000). Além disso, a distribuição dos pontos de quebra no gene *MLL* observada em casos de leucemia secundária é a mesma que ocorre em leucemias do lactente (Cimino *et al*, 1997). Tem sido sugerido que exposição, no período gestacional, a inibidores de topoisomerase-II naturais ou medicinais possa estar relacionada à etiologia da leucemia do lactente com rearranjo com o gene *MLL* (Ross, 1999). Estudo internacional caso-controle de leucemia do lactente evidenciou associação significativa com exposição a pesticidas e o uso de dipirona na gestação (Alexander *et al*, 2001). Estudo conduzido no Brasil não confirmou resultados em relação à dipirona, entretanto, constatou alta associação de leucemia do lactente com exposição a pesticidas e a terapia hormonal materna (Pombo de Oliveira *et al*, 2009).

As alterações genéticas mais freqüentes em crianças que desenvolvem LLA com um pico de incidência entre dois e cinco anos, são a hiperdiploidia e a translocação t(12;21). O relato do caso de duas irmãs gêmeas com LLA e fusão *TEL/AML1*, uma diagnosticada com cinco anos e a outra com catorze, nas quais foi identificada seqüência genômica idêntica da fusão, indicando origem única e, portanto, *in utero* desta fusão, reforça a hipótese de que a fusão *TEL/AML1* possa ser um evento molecular precoce e, provavelmente, seja a mutação inicial nas LLA precursoras B. O espaço de tempo entre o diagnóstico das duas irmãs, indica que existe um período de latência variável e, às vezes longo, seguindo-se ao evento inicial pré-natal (Wiemels *et al*, 1999). Da mesma forma, Maia e colaboradores, ao analisarem irmãs gêmeas com LLA e cariótipo hiperdiploide, concluíram a origem pré-natal desta alteração em um feto e provável transmissão via anastomose intraplacentar para o outro feto (Maia *et al*, 2003).

Pode-se dizer que, na LLA pediátrica, eventos genéticos secundários são necessários, na vida pós-natal, para o desenvolvimento clínico da leucemia e, por isso, o período de latência é maior, quando comparado com o que ocorre em pacientes com a lesão em 11q23. O modelo “*two-step*” para a leucemia linfocítica aguda pediátrica (que surge após o primeiro ano de vida) é concordante com o fato de que a taxa de ocorrência desta doença é cerca de cem vezes menor que a taxa de ocorrência do transcrito *TEL/AML1* ao nascimento (Greaves & Wiemels, 2003). Em outros tipos de cânceres infantis, como tumor de Wilms e neuroblastoma, são também observadas taxas similares, indicando que o início pré-natal do câncer pediátrico deve ser muito comum, mas sua transição para o estado doente deve ser rara (Mori *et al*, 2002). Diante deste fato, é válido o questionamento a respeito de que tipos de exposição são provavelmente relevantes para o aparecimento da referida doença.

1.3.3 A etiologia infecciosa

A incerteza a respeito das causas para as leucemias promoveu o surgimento de diferentes idéias.

Há décadas, as infecções já foram consideradas como a causa mais provável para as leucemias pediátricas. A primeira razão para isso foi a constatação do fato de que a idade de ocorrência das leucemias era similar àquela das doenças infecciosas comuns da infância (Kellelt, 1937; Gilham *et al*, 2005). No entanto, a evidência de que a leucemia não ocorre em surtos epidêmicos e não apresenta transmissão clássica infecciosa de indivíduo para indivíduo, contribuiu para o esquecimento da idéia (Ward, 1917 *appud* Gilham *et al*, 2005).

Posteriormente, o conhecimento de que a leucemia em gados, gatos e galinhas tem origem viral e a gradativa identificação de diferentes mecanismos etiológicos ligados a subtipos de câncer hematológico tanto em adultos como em crianças, contribuiu para resgatar a idéia de que a infecção, possivelmente viral, possa ser um agente causal para leucemia infantil (Gilham *et al*, 2005).

Em 1988, duas hipóteses específicas foram propostas considerando o processo infeccioso como agente causal para a leucemia pediátrica. Kinlen propôs que o influxo populacional (*population mixing*) em comunidades isoladas poderia gerar um excesso de casos de leucemia infantil por causar mini-epidemias de uma ou mais infecções às quais a leucemia poderia ser uma das respostas, mesmo que de forma rara (Kinlen & Doll, 2004). Greaves propôs que a menor exposição a agentes infecciosos nos primeiros meses de vida e a subsequente infecção tardia (*delayed infection*), ao favorecer a ocorrência da segunda mutação, seriam fatores causais no desenvolvimento de um subtipo específico de LLA, a LLA

comum (cLLA) (Greaves, 1988). Em 1997, Smith propôs que o pico de LLA em crianças em populações sócio-economicamente desenvolvidas é devido à exposição *in utero* a infecções (Smith *et al*, 1998).

A leucemia linfocítica aguda (LLA) de maior incidência na infância, tendo pico entre dois e cinco anos, é conhecida como LLA comum (cLLA). Esta leucemia é de linhagem precursora B e expressa o antígeno CD10, também conhecido como CALLA (antígeno leucocitário de leucemia aguda comum) (Greaves, 2006).

Na leucemia pediátrica geralmente os clones leucêmicos têm origem pré-natal, freqüentemente por translocações cromossômicas, seguidas por eventos pós-natais, mutação secundária e estabelecimento da doença. O período de latência pode variar de poucos meses a quinze anos (Greaves, 1999; Greaves, 2006).

Segundo Greaves, a ausência ou diminuição da ocorrência de infecções durante o primeiro ano de vida, apesar de benéfica, predispõe o sistema imune a respostas anômalas quando da ocorrência de uma infecção tardia (após o primeiro ano) (Greaves & Wielmes, 2003). Neste sentido, uma criança com estado pré-leucêmico já existente pelo fato de, durante a hematopoese fetal, ter adquirido a primeira mutação, geralmente a translocação t(12;21) ou hiperdiploidia, quando submetida à condição de “isolamento social” no primeiro ano de vida, estaria mais sujeita a um estresse imunológico causado por uma infecção adquirida tardiamente. Na exposição tardia a infecções comuns, pode ocorrer resposta desregulada das células T, resultando em potente resposta inflamatória e conseqüente estresse apoptótico ou proliferativo. Nesse contexto, o clone pré-leucêmico deve ter uma sobrevivência distinta ou vantagem proliferativa. O processo expandido de regeneração destas células deve favorecer o aparecimento da segunda mutação (podendo esta ser a deleção do segundo alelo *TEL* normal ou mutação no gene *FLT3*) necessária à transformação maligna do clone pré-leucêmico em estado leucêmico constituído (Greaves & Wielmes, 2003; Greaves, 2006).

Deste modo, a exposição precoce de crianças a infecções prepararia melhor seu sistema imunológico para posteriores infecções comuns, deixando-as menos suscetíveis ao estresse imunológico de uma exposição tardia à infecção que daria o “gatilho” para eventos moleculares subseqüentes ao existente desde o período neonatal, produzindo os passos da leucemogênese (Greaves, 1999; Greaves, 2006).

É, entretanto, importante atentar para o fato de que, sendo verdadeira esta hipótese, as infecções relevantes ao processo de leucemogênese, podem ou não promover o aparecimento de sinais e sintomas, podendo permanecer sub-clínicas, não resultando em diagnóstico documentado (Greaves, 2006).

Diferentes fatores como: aleitamento materno, o fato de ter irmãos mais velhos no primeiro ano de vida (Infante-Rivard *et al*, 2000), o uso de creches (Gilham, 2005), o peso ao nascimento (Koifman *et al*, 2008), as condições de higiene, entre outros, parecem exercer efeito protetor em relação ao risco de desenvolvimento da LLA pediátrica.

Em recente estudo observou-se em crianças de dois a cinco anos diagnosticadas com LLA, aumento significativo de episódios infecciosos clinicamente diagnosticados na infância, quando comparadas aos controles. Apesar deste achado, e de os autores admitirem que os resultados não apóiam a hipótese de Greaves, eles concluem que a resposta imune anormal, responsável pela promoção da LLA, pode resultar tanto da ausência de exposição na infância quanto da resposta imune influenciada geneticamente, que pode ser independente do tempo de exposição à infecção (Roman *et al*, 2007).

Atualmente, estudos sugerem que o modo como o indivíduo reconhece antígenos estranhos, responde a eles, reconhece e repara os danos ao DNA e metaboliza os produtos químicos deve estar relacionado ao desenvolvimento da leucemia. A susceptibilidade individual deve ter grande associação com o risco de desenvolver a doença (Taylor *et al*, 2002; McNally & Eden, 2004).

1.4 A Leucemia mielóide aguda

A LMA se caracteriza pela proliferação clonal de mieloblastos, que se acumulam na medula óssea e inibem a atividade hematopoética normal (Peloso *et al*, 2003). É uma neoplasia hematológica heterogênea, constituindo um enorme desafio diagnóstico e terapêutico (Bittencourt *et al*, 2003). A LMA ocorre predominantemente em adultos acima de 60 anos, com incidência aumentando progressivamente com a idade, é mais comum no sexo masculino e apresenta prognóstico pobre, especialmente em pacientes idosos (Deschler & Lübbert, 2006; Silva *et al*, 2006).

A alteração que desencadeia o processo neoplásico pode ocorrer em qualquer das diferentes linhagens celulares: eritróide, granulocítica, monocítica ou megacariocítica, originando os vários tipos de LMA atualmente conhecidos (Oliveira *et al*, 2004). Considerando a classificação FAB, os oito tipos caracterizados morfolologicamente são: M0- LMA minimamente diferenciada; M1- LMA sem maturação; M2- LMA com maturação; M3- leucemia promielocítica aguda; M4- leucemia mielomonocítica aguda; M5- leucemia monoblástica aguda; M6- leucemia eritroblástica aguda e M7- leucemia megacarioblástica aguda (Bennett *et al*, 1976; Bennett *et al*, 1985; Bennett *et al*, 1991).

Em contraste com a forma linfoblástica, onde a principal preocupação reside em manter os bons resultados já alcançados, na LMA, apesar dos avanços, os progressos em relação à cura ainda são limitados (Viana *et al*, 2003; Oliveira *et al*, 2004).

Por outro lado, nas últimas décadas, melhoria significativa no prognóstico das LMAs, vem sendo observada em virtude da estratificação mais precisa dos grupos de risco associada ao uso de agentes anti-leucêmicos mais efetivos e aprimoramento do tratamento de suporte aos pacientes (Zanichelli *et al*, 2006; Kaspers & Zwaan, 2007).

As diferenças encontradas nos exames de citomorfologia, imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular legitimaram a existência de muitos tipos de leucemia mielóide aguda, explicando o baixo sucesso de tratamentos padronizados para uma única doença (Bittencourt *et al*, 2003). Considerando que as alterações genéticas têm maior valor prognóstico que as características morfológicas ou mesmo imnofenotípicas da doença, a classificação precisa das LMAs e a correta categorização de grupos prognósticos são essenciais para a escolha adequada do tratamento (Mendonça, 2003).

Embora a etiologia das LMAs não seja conhecida, algumas alterações genéticas estão implicadas no seu desenvolvimento (Look, 1997).

Atualmente a classificação dos pacientes em grupos de risco é principalmente baseada na presença de tipos de alterações genéticas que, associada a outras informações, fornece dados a respeito da possível resposta específica dos diferentes grupos em relação ao tratamento (Kaspers & Zwaan, 2007).

As alterações cromossômicas comumente identificadas nas leucemias mielóides agudas são: translocação t(8;21)(q22;q22); translocação t(15;17)(q22;q21); inversão inv(16)(p13;q22) ou translocação t(16;16)(p13;q22) e translocação t(9;11)(p22;q23) (Hoffbrand & Pettit, 2001). As translocações t(8;21), t(15;17) e a inversão inv(16) conferem bom prognóstico, enquanto que mau prognóstico está associado à translocação t(9;11), presença de deleção total ou parcial dos cromossomos 5 ou 7 (-5, 5q-, -7, 7q-) e à trissomia do cromossomo 8 (+8), (van Dongen *et al*, 1999; Greaves & Wiemels, 2003; Pui *et al*, 2004).

Em alguns casos, tais como: leucemia com maturação (M2), leucemia promielocítica (M3) e leucemia mielomonocítica (M4), as características morfológicas prevêm as alterações genéticas, sugerindo correlação entre subtipos FAB específicos e certas alterações (Vardiman *et al*, 2002; Oliveira *et al*, 2004). Por exemplo, a ocorrência da translocação t(8;21) em cerca de 30% dos casos de M2, a translocação t(15;17) em até 98% dos casos de M3 e inversão inv(16) ou translocação t(16;16) em quase 100% dos casos de M4 com eosinófilos anormais (Rego, 2002). Entretanto, correlações genético-morfológicas nem sempre são corretas e as

alterações genéticas devem prever o prognóstico e as propriedades biológicas da leucemia mais consistentemente que a morfologia. Além disso, em muitos casos, esta correlação não existe ou as alterações são subjacentes, não podendo ser identificadas. Então, embora a classificação FAB reconheça a heterogeneidade morfológica da LMA, ela nem sempre reflete a diversidade genética ou clínica da doença (Vardiman *et al*, 2002). Os estudos de citogenética e biologia molecular tornaram-se parte essencial das rotinas de diagnóstico em pacientes com LMA (Oliveira *et al*, 2004).

De acordo com a classificação da OMS, quatro subgrupos são identificados: (1) LMA com alterações genéticas recorrentes, (2) LMA com displasia de múltiplas linhagens, (3) LMA e Síndromes Mielodisplásicas relacionadas com terapia e (4) LMA não classificada nas categorias anteriores. Considerando o primeiro subgrupo, são identificados quatro tipos de LMA: 1- LMA com translocação t(8;21)(q22;q22), (*AML1/ETO*); 2- LMA com eosinófilos anormais e inversão inv(16)(p13;q22) ou translocação t(16;16)(p13;q22), (*CBFβ/MYH11*); 3- leucemia promielocítica aguda com translocação t(15;17)(q22;q21), (*PML/RARα*) e variantes e 4- LMA com alterações em 11q23 (*MLL*) (Vardiman *et al*, 2002).

1.4.1 Genes híbridos

AML1/ETO

O gene *acute myeloid leukemia 1 gene* (*AML1*), também denominado *core binding factor subunit α2* (*CBFα2*), codifica uma proteína que compõe um complexo, juntamente com subunidades CBFβ, que reconhece e se liga à região promotora de vários genes importantes na diferenciação mielóide normal, como por exemplo, a interleucina-3 (IL-3) e fator estimulante da colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), atuando como fator de transcrição essencial para a hematopoese (Rego, 2002). Relata-se também a importância deste gene no desenvolvimento embrionário normal (Yergeau *et al*, 1997).

O gene *eight-twenty-one* (*ETO*), também denominado *myeloid translocation gene on chromosome 8* (*MTG8*), apresenta homologia ao gene *nervy* de *Drosophila*, na qual parece comprometido com o desenvolvimento do sistema nervoso central (Feinstein *et al*, 1995). Esta proteína parece ser importante no desenvolvimento de elementos do sangue, mas dispensável em células mais diferenciadas (Licht, 2001).

Como consequência da translocação t(8;21)(q22;q22) ocorre a fusão gênica *AML1/ETO*. Em ambos os genes, uma única região de concentração dos pontos de quebra está presente, sendo no gene *AML1* entre os exons cinco e seis e, no *ETO*, entre os exons um e dois (van Dongen *et al*, 1999).

A formação da proteína de fusão, portanto, interrompe a função normal das proteínas AML1 e ETO. Evidências sustentam que a proteína AML1/ETO atue inibindo a expressão de genes que são induzidos pelo gene *AML1* normal (Okuda *et al*, 1998). De fato, o fenótipo de camundongos *AML1/ETO knock-in* é idêntico àqueles de camundongos *AML1 knock-out* (Castilla *et al*, 1996; Yergeau *et al*, 1997).

A proteína de fusão expressa contém importantes domínios funcionais de ambas as proteínas parentais: o domínio de ligação ao DNA (Runt DBD) do gene AML1 e quase todo o gene ETO, incluindo os domínios TAF110 (região que mostra homologia com proteínas TAF), HHR (*heptad repeat of hidrofobic amino acids*) e NERVY (região que apresenta homologia com a proteína *nervy* de *Drosophila*) (Petrie & Zelent, 2007).

A proteína de fusão AML1/ETO atua como repressor transcricional interferindo em diferentes vias de transdução de sinais, bloqueando a atuação de fatores que promoveriam a diferenciação hematopoética e que atuariam como supressores de tumor em várias etapas deste processo (Elagib & Goldfarb, 2007). Sabe-se atualmente que essa proteína recruta fatores (epigenéticos) que atuam negativamente bloqueando a atividade do complexo RXR/RAR α , via que regula positivamente a diferenciação mielomonocítica (Fazi *et al*, 2007).

CBF β /MYH11

A família CBF é um grupo de fatores de transcrição composta pelas subunidades α e β (Ogawa *et al*, 1993). Existe três tipos de subunidades α em mamíferos: *CBF α 1*, *CBF α 2* (AML1) e *CBF α 3*, codificados por três diferentes genes (Wang *et al*, 1993) e existe uma única subunidade β , codificada pelo gene *core-binding factor β* (CBF β) (Liu *et al*, 1993). A proteína CBF β se liga às proteínas CBF α e estabiliza a interação destas com o DNA (Tahirov *et al*, 2001). Ambos os genes *CBF α 2* e *CBF β* são essenciais para a angiogênese embriológica (Namba *et al*, 2000), bem como para o estágio inicial da hematopoese (Kundu *et al*, 2002). O gene *myosin heavy chain 11* (MYH11) codifica uma proteína que constitui a cadeia pesada da miosina de fibra muscular lisa (Downing, 1999).

A inversão pericêntrica inv(16)(q22;p13) resulta na fusão do gene *CBF β* , em 16q22, à parte do gene *MYH11*, em 16p13. A estrutura genômica do gene *CBF β* ainda não foi publicada. Com base na homologia que este gene apresenta com *CBF β* de murino, estima-se que a maioria dos pontos de quebra esteja localizada entre os exons quatro e seis. No gene *MYH11*, a região de concentração dos pontos de quebra situa-se entre os exons seis e treze. Deste modo, diferentes tipos de transcritos gênicos podem ser formados (van Dongen *et al*, 1999).

Normalmente *CBFβ* interage com *CBFα* para formar um complexo nuclear transcricionalmente ativo. O gene de fusão resultante *CBFβ/MYH11* codifica uma proteína que tem afinidade aumentada à proteína *CBFα2* (Shigeseda *et al*, 2004) e que atua inibindo a atividade normal do complexo *AML1(CBFα2)/CBFβ*, interferindo no controle normal da transcrição e diferenciação de células hematopoéticas, progressão do ciclo celular, a resposta apoptótica, promovendo também anormalidades no crescimento e desenvolvimento celular (Downing, 1999; Kundu & Liu, 2001).

Considerando relatos sobre a evidência da ocorrência da inversão do cromossomo 16, inv(16), em células tronco hematopoéticas (Haase *et al*, 1995), é interessante o fato de que esta inversão esteja somente associada à leucemia mielóide. Foi demonstrado que *CBFβ/MYH11* bloqueia o desenvolvimento de células T em vários estágios e reduz a sobrevivência destas células no timo, induzindo-as à apoptose. Este dado contribui para esclarecer o porquê da fusão *CBFβ/MYH11* não ser detectada em células da linhagem T (Zhao *et al*, 2007).

PML/RARA

O gene *promyelocytic leukemia (PML)* codifica uma proteína que atua como supressor de tumor através do controle da apoptose, diferenciação e crescimento celular (Zhong *et al*, 2000).

O gene *retinoic acid receptor-α (RARα)* é expresso em uma proteína que constitui um complexo repressor que atua na inibição da transcrição de genes importantes para a mielopoese (Alcalay *et al*, 1998). Os retinóides, necessários a múltiplos processos biológicos, exercem papel fundamental na diferenciação mielóide e dependem de proteínas que atuam como receptores intracelulares, os receptores do ácido retinóide (RARs) (Germain *et al*, 2006). A proteína *RARα* é essencial neste processo. Em concentrações fisiológicas de ácido trans-retinóico (ATRA), ocorre liberação do complexo repressor e subsequente ativação da transcrição.

A translocação t(15;17)(q22;q21) resulta na formação do gene híbrido *PML/RARα* (Rowley *et al*, 1977). A oncoproteína formada tem sensibilidade diminuída à ação do ácido trans-retinóico (Ruthardt *et al*, 1997), em concentrações fisiológicas, não permitindo a dissociação do complexo repressor, mantendo o bloqueio da transcrição, interrompendo, portanto, a maturação mielóide no estágio de promielócito, inibindo a apoptose e conferindo vantagem à sobrevivência das células leucêmicas. O ácido trans retinóico, administrado em doses

supra fisiológicas, promove a dissociação do complexo *PML/RAR α* , permitindo a progressão da transcrição (Muindi *et al*, 1992).

No gene *RAR α* existe uma única região de concentração de pontos de quebra, entre os éxons dois e três. No gene *PML*, há três regiões de quebra: íntron 6, éxon 6 e íntron 3. Assim sendo, dependendo da região, no gene *PML*, onde ocorra a quebra, três diferentes tipos de transcritos híbridos podem ser formados denominados, respectivamente, *bcr1* (longo), *bcr2* (variante) e *bcr3* (curto). Cada um deles ocorre em frequência distinta sendo em 55%, 5% e 40% dos casos, respectivamente (van Dongen *et al*, 1999).

1.5 A Leucemia bifenotípica aguda

Na maioria dos casos a leucemia pode ser classificada como mielóide ou linfóide por meio de técnicas que permitem análise morfológica, citoquímica e imunofenotípica. Existem, entretanto, alguns casos, cerca de 5% (Bain *et al*, 2002), que são difíceis de classificar, devido à co-expressão em uma mesma célula de antígenos mielóides e linfóides, sendo, por essa razão, designados de leucemias de linhagem mista, híbrida ou leucemia bifenotípica aguda (Matutes *et al*, 1997). Portanto, o diagnóstico destes casos não é baseado na morfologia e sim na expressão imunofenotípica das células malignas (Pombo de Oliveira, 2008).

A inexistência de critérios diagnósticos consistentes e padronizados e o uso de diferentes painéis de anticorpos monoclonais, dificultam a compreensão deste grupo de casos como uma entidade clínica e biologicamente distinta (Matutes *et al*, 1997) e contribuem para relatos de diferentes frequências de ocorrência da doença (Hanson *et al*, 2008).

Alguns casos têm sido descritos na literatura como leucemia linfoblástica aguda positiva para antígeno mielóide (My+ LLA) e leucemia mielóide aguda positiva para antígeno linfóide (Ly+ LMA) (Killick *et al*, 1999). No entanto, é importante que se faça uma distinção entre leucemia bifenotípica aguda e os casos de LLA e LMA com expressão aberrante de marcadores de outras linhagens, devido às diferenças de condutas terapêuticas (Emerenciano *et al*, 2004). Assim, é recomendável que ao analisar casos com marcadores aberrantes, sejam utilizados múltiplos anticorpos monoclonais e que seja considerado o sistema de pontuação sugerido pelo Grupo Europeu para a Classificação Imunológica de Leucemias (EGIL) (Bene *et al*, 1998).

O imunofenótipo mais comum é aquele onde ocorre co-expressão de marcadores mielóides e linfóides do tipo B e, menos frequentemente, marcadores mielóides e linfóides do tipo T. Casos com fenótipo linfóide B e T ou com linfóides B e T e mielóide são raros.

Considera-se a leucemia bifenotípica aguda como um tipo incomum de leucemia, que provavelmente se origina de uma célula progenitora multipotente (Matutes *et al*, 1997).

Não existe uma única alteração cromossômica exclusivamente associada à leucemia bifenotípica aguda. São freqüentes alterações cromossômicas estruturais e alta incidência do cromossomo Philadelphia, resultante da translocação t(9;22)(q34;q11), observado em cerca de um terço dos casos (Cuero *et al*, 1996), bem como rearranjos com o gene MLL e alterações citogenéticas complexas (Matutes *et al*, 1997).

A leucemia bifenotípica aguda acomete adultos e crianças e apresenta prognóstico ruim em ambos os casos, o que pode estar relacionado a alterações cromossômicas subjacentes (Matutes *et al*, 1997).

1.6 A Leucemia mielóide crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma expansão clonal que surge a partir de uma célula tronco hematopoética, pluripotente, que mantém capacidade de diferenciação e amadurecimento, resultando em grande aumento de granulócitos circulantes (Zago *et al*, 2001; Oliveira & Neto, 2004).

As LMCs são encontradas em todas as raças e em ambos os sexos, havendo uma discreta predominância do sexo masculino (Zago *et al*, 2001; Oliveira & Neto, 2004).

Em seu início, a doença é assintomática e, freqüentemente, é descoberta acidentalmente em exame hematológico de rotina (Rapaport, 1990). O clone anômalo se expande e infiltra o parênquima medular de modo lento, mas progressivo, em detrimento da proliferação das células normais. Há predominância da série granulocítica no sangue periférico e medula óssea, de blastos a segmentados (Oliveira & Neto, 2004).

Mais de 95% dos pacientes com caracteres morfológicos específicos da doença em sangue periférico e/ou medula óssea apresentam o cromossomo Philadelphia (Ph), que é resultante de quebras nos cromossomos 9 (q34) e 22 (q11) e conseqüente translocação, entre eles (Hoffbrand & Pettit, 2001; Zago *et al*, 2001), considerada como evento genético central na LMC (Rapaport, 1990; Zago *et al*, 2001). O local de quebra no cromossomo 22 ocorre na região denominada *breakpoint cluster region* (bcr), enquanto que, no cromossomo 9, a quebra ocorre no proto-oncogene *abl*, que é homólogo ao oncogene do vírus da leucemia murina de Abelson (Oliveira & Neto, 2004).

Na região bcr do cromossomo 22 existem dois outros pontos freqüentes de quebra, que podem originar diferentes genes híbridos. No entanto, o gene híbrido predominante na LMC é derivado da cisão do bcr em sua localização denominada M-bcr. Dessa translocação resultam

dois novos genes: *BCR/ABL* no cromossomo 22q⁻, denominado cromossomo Philadelphia e o recíproco *ABL/BCR*, no cromossomo 9q⁺, que parece não ter influência na patogênese da doença (Zago *et al*, 2001).

A proteína ABL normal é regulada por condições fisiológicas e tem atividade tirosina-quinase, isto é, transfere grupos fosfato de adenosina trifosfato (ATP) para aminoácidos tirosina em outras proteínas. Essas fosforilações atuam como transdutores de sinais, importantes nos processos celulares básicos como proliferação, aderência e apoptose (Oliveira & Neto, 2004). Em condições normais, a proteína BCR tem função relacionada à regulação do ciclo celular (Bergantini *et al*, 2005). A transcrição do DNA quimérico (*BCR/ABL*) resulta em ativação constante da atividade tirosina-quinase, tornando-a altamente potencializada, se comparada ao produto normal. Esta proteína tem ainda capacidade autônoma de ativação, não respondendo aos mecanismos celulares normais, que controlam a atividade de ABL (Zago *et al*, 2001). Desta forma, *BCR/ABL* é uma proteína chave na indução da transformação leucêmica por sinalizar positivamente a proliferação celular, ativando vias de sinal mitogênico, interferindo com a morte celular programada das células e com a adesão de células leucêmicas ao estroma da medula óssea (Hoffbrand & Pettit, 2001; Oliveira & Neto, 2004).

Quanto aos 5% dos pacientes de LMC que são Philadelphia negativos, alguns não produzem uma anormalidade citogenética reconhecível, mas por diagnóstico molecular pode-se detectar a positividade para o gene quimérico (*BCR/ABL*). Há ainda outros que são Ph⁻ e *BCR/ABL*⁻, sendo caracterizados como portadores de LMC em sua forma atípica (Rapaport, 1990; Hoffbrand & Pettit, 2001; Oliveira & Neto, 2004).

As manifestações clínicas da LMC dependem da fase da doença. Ela se inicia por uma fase crônica, de duração variável, seguida ou não por uma fase acelerada, onde ocorre agravamento da doença e, finalmente, uma fase de agudização, também chamada de crise blástica, habitualmente fatal (Zago *et al*, 2001; Löffler & Rastetter, 2002).

A LMC é uma doença instável. Em sua fase inicial é uma afecção com superprodução crescente de granulócitos relativamente normais, que respondem prontamente ao controle quimioterápico. O paciente no início da doença está afebril e pode apresentar perda de peso, fadiga, manifestações hemorrágicas discretas e baço palpável. No entanto, durante meses a muitos anos, o clone maligno sofre mais mutações, fazendo com que a doença entre numa fase acelerada. Observa-se, então, progressiva resistência à terapêutica, aumento da esplenomegalia e dores ósseas (Rapaport, 1990; Zago *et al*, 2001). Um número aumentado de granulócitos maduros de aparência displásica pode ser notado no esfregaço de sangue

periférico. A doença se torna cada vez mais resistente à quimioterapia. A citogenética neste momento revela anormalidades cromossômicas adicionais (evolução clonal), que freqüentemente incluem: um segundo cromossomo Philadelphia, trissomia de cromossomos como 8, 9, 19 e 21, isocromossomo 17q e deleção do cromossomo Y (Rapaport, 1990; Löffler & Rastetter, 2002). Como consequência das alterações genéticas, as células perdem a capacidade de diferenciação e maturação e as células imaturas passam a predominar, tornando-se refratárias ao tratamento. Trata-se de um processo agudo, secundário à LMC (Rapaport, 1990; Oliveira & Neto, 2004). Como a alteração inicial ocorre em uma célula tronco pluripotente, a LMC pode agudizar para a linhagem mielóide originando uma leucemia mielóide aguda, que ocorre em mais de 70% dos casos, ou para a linhagem linfóide originando uma leucemia linfóide aguda, que ocorre em cerca de 25% dos casos (Oliveira & Neto, 2004). Esta fase aguda está associada a uma rápida deterioração do paciente e progressiva falência da medula óssea (Hoffbrand & Pettit, 2001).

O tratamento da LMC é recomendado em todos os pacientes com diagnóstico confirmado (Zago *et al*, 2001). Baseia-se no emprego de quimioterápicos capazes de promover mielossupressão, havendo redução da leucocitose e da esplenomegalia. Com o passar dos anos, diferentes recursos terapêuticos foram desenvolvidos e administrados em pacientes com LMC. Agentes citostáticos, como o bussulfan e a hidroxiuréia e drogas antiproliferativas como o interferon- α (INF- α) já foram utilizados.

Atualmente, está em uso o mesilato de imatinib, comercializado com o nome de *Glivec*®. Esta droga atua inibindo a atividade tirosina quinase da proteína BCR/ABL, ao bloquear a região da adenosina trifosfato (Zago *et al*, 2001). Mesmo que respostas positivas tenham sido apresentadas pelas drogas, uma porcentagem de doentes não consegue eliminar os sinais e precisam receber uma nova medula. Até o momento, o transplante de medula óssea constitui-se no método mais eficiente para induzir remissão citogenética e molecular completa, determinando longa sobrevivência e aumentando a chance de cura dos pacientes (Oliveira & Neto, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

Em Brasília, o sistema de saúde é hierarquizado, sendo que 80% da assistência à saúde são prestadas pelo sistema público (SUS), no seu órgão gestor e assistencial que é a Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal (SES/DF). O Hospital de Apoio de Brasília (HAB) faz parte desta rede de assistência e caracteriza-se como centro de referência para diagnóstico e tratamento das leucemias infantis no Distrito Federal.

A identificação de alterações genéticas nas leucemias proporcionou o reconhecimento de subgrupos clinicamente relevantes neste grupo de doenças. Revelou-se assim a grande importância da realização do exame molecular para identificação precisa das alterações, possibilitando melhor estratificação dos grupos de risco e conseqüente abordagem terapêutica diferenciada, adequada a cada paciente. Por esta razão, a análise molecular tem se tornado imprescindível para a completa caracterização da leucemia.

A realização do exame molecular em pacientes leucêmicos permitirá a identificação da frequência de ocorrência das alterações genéticas recorrentes nas leucemias agudas, no Distrito Federal, uma vez que não há, nesta unidade federativa, informações a este respeito. Os dados obtidos no presente trabalho poderão servir de base para o entendimento de fatores etiológicos associados à doença.

Considerando o caráter de referência do Hospital de Apoio, o grande valor prognóstico das alterações moleculares nas leucemias e a conseqüente existência de diferentes grupos de risco, torna-se evidente a necessidade de se realizar o exame molecular para detecção de transcritos de fusão gênica, em pacientes com leucemia atendidos neste hospital, a fim de tornar acessível à população do DF a mais moderna e completa avaliação da doença, de acordo com a recomendação da Organização Mundial da Saúde.

Levando-se em conta todos estes aspectos e considerando a inexistência de profissionais atuantes nesta área no Distrito Federal, verificou-se a urgente necessidade de instalação de uma unidade de diagnóstico molecular para detecção de rearranjos gênicos recorrentes em leucemia. Esta ação beneficiará, em curto prazo, a população do DF ao possibilitar a inclusão, de forma rotineira, do exame molecular no grupo de exames realizados ao diagnóstico em todos os pacientes com suspeita de leucemia admitidos no Núcleo de Oncologia e Hematologia Pediátrica do Hospital de Apoio de Brasília.

3. OBJETIVOS

1. Identificar a frequência de ocorrência de transcritos híbridos recorrentes em pacientes pediátricos com registro hospitalar e diagnóstico de leucemia no Hospital de Apoio de Brasília, no período de 2005 a 2007.
 - a. Adaptar, à realidade local, protocolo para as técnicas necessárias à realização do exame molecular, por RT-PCR, para transcritos híbridos recorrentes em leucemias, possibilitando a instalação de uma unidade de diagnóstico molecular de leucemias, no Distrito Federal.
 - b. Avaliar comparativamente a eficácia das análises molecular e citogenética na detecção de alterações genéticas recorrentes em leucemias pediátricas.
 - c. Comparar os resultados com estudos semelhantes em países industrializados e não industrializados frente à hipótese da etiologia infecciosa para LLA.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Grupo humano de referência e de estudo

O grupo humano de referência do presente estudo foi constituído por todas as crianças e adolescentes, com idades inferiores a 18 anos e com diagnóstico de leucemia, consecutivamente admitidos pela equipe do Núcleo de Oncologia e Hematologia Pediátrica da Secretaria de Estado e Saúde do Distrito Federal (NOHP-SESDF), sediado no Hospital de Apoio de Brasília, no período compreendido entre janeiro de 2005 e dezembro de 2007. De um total de 169 pacientes pediátricos, com diagnóstico inicial clínico-laboratorial de leucemia, registrado no período, 36 não foram analisados em virtude de: 1) quantidade insuficiente de material para análise molecular (20), 2) casos de LLA T (12) e 3) degradação do RNA (04). Considerando que de oito pacientes mais de uma amostra foram analisadas, tendo um deles três amostras, o grupo de pesquisa foi constituído por 142 amostras referentes a 133 pacientes.

Nos casos de LLA de linhagem T não foi realizada pesquisa para identificação de transcritos híbridos, considerando que as alterações recorrentes, neste caso, não modificam o valor prognóstico da doença.

Tratando-se de centro regional de referência em Saúde Pública para tratamento das leucemias infantis, o Hospital de Apoio de Brasília reúne a integralidade dos casos de leucemias atendidos na rede pública do Distrito Federal, que corresponde a pacientes pediátricos procedentes do Distrito Federal e Entorno. Este serviço conta ainda, em sua casuística, com pacientes pediátricos provenientes de outras unidades federais, como Bahia, Goiás, Roraima, Minas Gerais, entre outras, em aproximadamente 36% no caso da onco-hematologia pediátrica.

Amostras e Técnicas

Para a análise molecular, cuja finalidade foi detectar transcritos híbridos e identificar a frequência de ocorrência de rearranjos recorrentes em leucemias infantis, amostras de aspirado de medula óssea (136) ou de sangue periférico (06) foram transportadas, em temperatura ambiente, do Hospital de Apoio de Brasília, local da coleta, até o Laboratório de Biologia do Gene, do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília. Considerando o procedimento, espécimens de 115 pacientes foram analisados somente ao diagnóstico; de doze, apenas em recaída e de seis, ao diagnóstico e em recaída. Um paciente com LLA B e trissomia constitucional do 21 foi incluído.

No Núcleo de Genética do Hospital de Apoio de Brasília, amostras de aspirado de medula óssea de cada paciente foram submetidas ao exame de imunofenotipagem, para identificação da linhagem e do grau de diferenciação das células leucêmicas, bem como à análise citogenética, tanto para completar informações referentes aos rearranjos específicos, quanto para a identificação das alterações cromossômicas numéricas.

Por vezes, dependendo da idade do paciente, do tipo de leucemia e da gravidade da doença, tornava-se difícil a obtenção de volume adequado de aspirado de medula óssea para a realização de todas as análises. Assim sendo, o material obtido era imediatamente dividido e processado no próprio Núcleo de Genética do hospital, por técnico especializado. A fração destinada à análise molecular, que consistia de medula total ou camada leucoplaquetária já isolada, era criopreservada em solução contendo 50% de meio de cultura (RPMI 1640), 40% de soro bovino fetal (SBF) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Este procedimento foi também realizado em casos da impossibilidade de imediato transporte da amostra ao Laboratório de Biologia do Gene e, principalmente, com as amostras referentes ao ano de 2005, época em que a técnica para a realização da pesquisa molecular ainda não havia sido padronizada no laboratório. Entre as 142 amostras analisadas por Biologia Molecular, 83 (58,45%) haviam sido criopreservadas.

4.1 Técnicas realizadas

Biologia Molecular

De maneira geral, as amostras foram coletadas em EDTA e processadas em gradiente de Ficoll, o que permitiu a retirada da camada leucoplaquetária, de onde foi extraído o RNA total, posteriormente analisado em gel de agarose. A partir do RNA total foi sintetizado o cDNA e, em seguida, realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase, com *primers* específicos para cada situação.

4.1.1 Gradiente de Ficoll

A técnica consistiu em adicionar, em um tubo de centrífuga devidamente identificado, com auxílio de uma seringa sem agulha, de 1,5 a 2,0ml de Ficoll Hystopaque (*Sigma Diagnostics*) volume que dependeu do volume total da amostra recebida (geralmente 2ml de Ficoll para cada 4ml de medula). A amostra do paciente foi homogeneizada e transferida, com o auxílio de uma pipeta automática e ponteira livre de *RNAse*, vagarosamente, pela parede do

tubo, de modo que a medula ficasse em cima do Ficoll. Centrifugou-se a 3.000rpm, por 20 minutos a 10° (Hitachi, himac CR21, rotor 36). A centrifugação permitiu a separação, por gradiente de densidade, dos elementos do sangue que se distinguiram em: soro, camada leucoplaquetária e hemácias. A quantidade da camada leucoplaquetária variou em função do volume total da amostra e do tipo de leucemia.

O soro foi retirado e descartado em recipiente próprio. A camada leucoplaquetária foi retirada e transferida para um *ependorf* previamente identificado. Completou-se o volume total do *ependorf* com tampão PBS. Centrifugou-se por 5 minutos a 4.000rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e a lavagem com PBS repetida. Ao sedimento obtido foi adicionado Trizol (*Invitrogen*), em volume aproximadamente dez vezes ao do *sedimento* e com a mesma ponteira homogeneizou-se o material. A partir de então, procedeu-se a extração do RNA ou, quando se tornou necessário adiar este procedimento, armazenou-se o material a - 20° ou -80°.

As ponteiros utilizadas, bem como o tubo *vacutainer*, o soro e sobrenadante descartados foram colocados em um único recipiente que foi, em seguida, autoclavado para descarte do material. Os tubos de centrífuga ficaram, por um tempo mínimo de 24 horas, de molho em hipoclorito de sódio ou amoníaco e, após esse período, lavados com água e sabão neutro e aquecidos em forno, por 16 horas a 180°, para serem reutilizados.

4.1.2 Extração de RNA total

Na maioria dos tipos de aberração cromossômica com fusão gênica, os pontos de quebra, em diferentes pacientes, estão espalhados em regiões de 10kb ou mais no DNA, distâncias que são difíceis de amplificar por PCR em rotina básica. Isto implica que, para se realizarem análises confiáveis por PCR a partir do DNA, os pontos exatos de quebra devem ser determinados para cada paciente, individualmente. Entretanto, na maioria das leucemias, a fusão gênica é transcrita em um RNAm, que pode servir como alvo de PCR depois da transcrição reversa em cDNA ([van Dongen et al, 1999](#)). Por outro lado, a análise da alteração genética a partir do RNAm permite que a amplificação ocorra apenas a partir de células nas quais a alteração genética esteja sendo expressa. Estas considerações explicam o motivo pelo qual se deve realizar a extração do RNA do material a ser analisado.

As amostras criopreservadas primeiramente foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37° e centrifugadas por um minuto a 6.000 rpm, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento obtido, adicionado Trizol.

O volume de Trizol adicionado em cada amostra determinou o volume de todos os reagentes seguintes. Para esta descrição padronizou-se 1000µl de Trizol.

Caso a extração tenha sido realizada após congelamento da amostra com Trizol já adicionado, esta foi deixada à temperatura ambiente para descongelar naturalmente. Em seguida, ressuspendeu-se novamente o material para homogeneizá-lo. Incubou-se a amostra por 5 minutos à temperatura ambiente e foram adicionados 200µl de clorofórmio. O tubo foi agitado vigorosamente, por 15 segundos e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada (Sanyo *micro centaur* MSE) a 8.000rpm por 15 minutos a 4° ou em câmara fria (2 a 8°). Após a centrifugação, o RNA encontrava-se na fase aquosa superior, que foi transferida para um outro *eppendorf*, tendo a atenção para não contaminar com a fase fenólica, onde estava o DNA. Foram adicionados 500µl de álcool isopropil e, após agitação, incubou-se a amostra por 10 minutos à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 8.000rpm por 10 minutos a 4° ou em câmara fria (2° a 8°), resultando na formação de um sedimento branco na parte inferior do *eppendorf*, onde se encontra o RNA. O sobrenadante foi desprezado, ao verter o *eppendorf*, que assim foi deixado, em cima de um pedaço de papel, para evaporação do álcool. Foram adicionados 1.000µl de etanol 75%, gelado e o *eppendorf* foi agitado em vórtex para soltar o sedimento. Centrifugou-se o material a 7.000rpm por 5 minutos a 4° ou em câmara fria (2 a 8°) e o sobrenadante foi desprezado. Novamente o *eppendorf* ficou vertido, em cima de um pedaço de papel, a fim de permitir a evaporação do álcool e secagem do RNA. Neste momento, foi verificado o volume de material, uma vez que a quantidade de água a ser adicionada posteriormente deveria ser proporcional a ele. Ao RNA já seco, foram adicionados: 40 µl, 30 µl, 20 µl ou 15 µl de água *Mili Q*, o que variou de acordo com o volume do sedimento obtido. Ressuspendeu-se várias vezes o material a fim de dissolver o sedimento. A partir de então, procedeu-se à quantificação do RNA ou, quando se tornou necessário adiar este procedimento, armazenou-se o material a - 20°.

Houve casos em que, após análise do material em gel de agarose, confirmou-se contaminação com DNA, procedendo-se a reextração do RNA, com a quarta parte do volume de Trizol utilizado inicialmente.

4.1.3 Eletroforese de RNA

A análise do RNA total em gel desnaturante de agarose teve como objetivo avaliar a qualidade da amostra para que não comprometesse a análise final, o que ocorreria em caso de degradação ou contaminação com DNA.

Quantificou-se a amostra de RNA em espectrofotômetro (*Pharmacia Biotech–Gene Quant*), o que permitiu o preparo da amostra em concentração ideal para análise. Foi preparado gel desnaturante de agarose a 1%. Em um *epENDORF* livre de *RNAse*, foi aliqotado o volume de RNA correspondente à concentração de 1µg a 2µg de RNA. Completou-se este volume para 10µl com água livre de *RNAse* e adicionou-se 1µl de tampão de amostra 10X. A amostra foi incubada por 10 minutos a 65° C e, em seguida, aplicada no gel.

A eletroforese foi realizada num tempo variável de uma hora e meia a duas horas e com voltagem variando entre 42V a 50V.

4.1.4 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, primeiramente foi aliqotado volume de RNA correspondente a 2µg, ao qual foi adicionado volume de água necessário para completar 20µl. Incubou-se a 65° por 5 minutos e, em seguida, no gelo por dois minutos. A amostra foi centrifugada e a ela foram adicionados: 20mM tris HCl, 50mM KCl, 5mM MgCl₂, (pH:8,3); 0,5 µg de *Random hexamers* (*Amersham Biosciences*); 0,125 mM de dNTPs (*Bio-Rad*); 40U de *RNAse out*TM (*Invitrogen*) e 200 U de transcriptase reversa M-MLV (*Promega*), resultando num volume final de 40 µl. Incubou-se por uma hora a 37° e, em seguida, por 7 minutos a 65° e no gelo por dois minutos. Após rápida centrifugação, armazenou-se a – 20° C.

4.1.5 Reação da Polimerização em Cadeia seguida de transcrição reversa (RT– PCR)

A reação de RT-PCR foi realizada de acordo com protocolo padronizado por van Dongen e colaboradores, com modificações ([van Dongen et al, 1999](#)). Segundo este protocolo, devem ser realizadas duas reações de RT-PCR consecutivas: *single*, para identificação da alteração e, em caso de amplificação no *single* RT-PCR, realiza-se o *shifted*, com um segundo para de *primers*, para confirmação ou exclusão de resultado falso positivo.

De acordo com o tipo e subtipo de leucemia, diferentes rearranjos gênicos foram pesquisados. Em todos os casos de LLA B, a pesquisa foi realizada para *BCR/ABL* (*minor* e *major*), *MLL/AF4*, *E2A/PBX1* e *TEL/AML1*, sendo que em lactentes, adicionalmente para *MLL/AF9*, *MLL/ENLA1*, *MLL/ENLA2* e *MLL/ELL*. Nos casos de LMA, a suspeita clínica e a classificação morfológica de cada caso permitiram a realização da pesquisa de acordo com um

fluxograma. Assim sendo, para casos classificados como pertencendo ao subtipo FAB M2 pesquisou-se o transcrito *AML1/ETO* e, em caso de resultado negativo, o transcrito *BCR/ABL*; em casos do subtipo FAB M3, foi realizada pesquisa para o transcrito *PML/RAR α* e, em caso de ausência de amplificação, pesquisou-se o transcrito *AML1/ETO*; em casos do subtipo FAB M4, pesquisou-se o transcrito *CBF β /MYH11* e, em caso de resultado negativo, pesquisaram-se os transcritos *BCR/ABL*, *MLL/AF9* e *AML1/ETO*. Nos casos nos quais foi identificado subtipo FAB diferentes de M2, M3 e M4 e naqueles cuja análise morfológica não possibilitou a classificação, foram pesquisados os transcritos: *AML1/ETO*, *CBF β /MYH11*, *PML/RAR α* e *MLL/AF9*. Adicionalmente, em dois casos (51 e 54) foram investigados os transcritos *MLL/AF4*, *MLL/ENLA1*, *MLL/ENLA2* e *MLL/ELL*. Em material de LMC e leucemia bifenotípica, pesquisou-se para *BCR/ABL major* e *minor*.

Para a reação, 2 μ l de cDNA foram adicionados a um mix (volume final 30 μ l) contendo: 20mM tris HCl (pH:8,3), 50mM de KCl; 2,0 mM de MgCl₂; 10 μ M de cada primer específico (*single/shifted*) ou 5 μ M de cada *primer* controle (GAPDH); 0,2 mM de dNTPs (*Bio-Rad*) e 1U de Taq Polimerase (*Invitrogen*). A reação foi submetida a 35 ciclos no termociclador (iCycler™ *Bio-Rad*). Desnaturação inicial ocorreu por 30 segundos. O tempo de ciclo e as temperaturas para desnaturação, anelamento e extensão foram respectivamente: 94° por 30 segundos, 65° C por 60 segundos e 72° por 60 segundos. Não foi realizada extensão final.

A programação do termociclador foi a mesma para os dois diferentes grupos de *primers* utilizados (*Biomed Concerted Action e St. Jude Children's Research Hospital*) e para a detecção de todos os tipos de transcritos. Em todos os casos a amplificação foi confirmada por *shifted* RT-PCR. A integridade do cDNA foi avaliada por amplificação do gene do gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase (GAPDH), constitutivamente expresso em quase todos os tecidos, em níveis elevados. A [tabela 1](#) indica os diferentes pares de *primers* específicos para cada situação e os respectivos tamanhos dos fragmentos obtidos. Em anexo ([11.1 pg.111](#)), estão apresentadas as seqüências de todos os *primers* utilizados.

Foram consideradas válidas para análise todas as amostras que apresentaram amplificação do gene controle (GAPDH) e como casos positivos os que, além deste efeito, também evidenciaram banda específica para *single* e *shifted* RT-PCR. Todos os casos analisados foram reavaliados, pelo menos uma vez, usando controle positivo (linhagem celular K562, REH ou cDNA de paciente positivo) e negativo (linhagem celular HL-60). As linhagens celulares foram gentilmente cedidas por Dr. José Andrés Yunes (Laboratório de Biologia Molecular do Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Boldrini, São Paulo).

Tabela 1. Indicação de pares de *primers* para amplificação de transcritos gênicos para *single* e *shifted* RT-PCR, de acordo com *Biomed Concerted Action* e *St. Jude Children's Research Hospital*.

Alteração	Rearranjo gênico	Tipo de transcrito	Single St. Jude	pb	Single Biomed	pb	Shifted Biomed	pb
t(9;22)	<i>BCR/ABL minor</i>	e1-a2	1a + 4	433	A2 + B	521	C2 + E	445
t(4;11)	<i>MLL/AF4</i>	variável	6 + 7 *	variável	A + B *	variável	D + E *	variável
t(1;19)	<i>E2A/PBX1</i>	padrão	12 + 13	625	A + B	373	C + E	401
t(12;21)	<i>TEL/AML1</i>	padrão	9A + 10 *	1.171	A + B	298	D + E	545 ◊
		splic. alter.	9A + 10 *	1.132	A + B	259 *	D + E *	506 ◊
t(9;11)	<i>MLL/AF9</i>	padrão	37 + 38 *	NP	-	-	-	-
t(11;19)	<i>MLL/ENLA1</i>	padrão	38 + 39	NP	-	-	-	-
t(11;19)	<i>MLL/ENLA2</i>	padrão	38 + 40 *	NP	-	-	-	-
t(11;19)	<i>MLL/ELL</i>	padrão	38 + 41 *	NP	-	-	-	-
t(8;21)	<i>AML1/ETO</i>	padrão	26 + 27	338	A + B	395	D + E	338
t(15;17)	<i>PML/RARA</i>	<i>bcr 1 / 2</i>	29 + 31	963 (1)	A1 + B	381 (1)	C1 + E	470 (1)
		<i>bcr 3</i>	29 + 31	489	A1 + B	não amp.	C2 + E	545
inv(16)	<i>CBFB/MYH11</i>	tipo A	33 + 35	416	A + B2	418	D2 + E	417
		tipo E	33 + 34 *	367	A + B1 *	545	D1 + E *	508 *
t(9;22)	<i>BCR/ABL major</i>	b3-a2	1a + 5	512	A1 + B	417	C1 + E	424
		b2-a2	1a + 5	437	A1 + B	342	C1 + E	349

* Não há, no presente trabalho, detecção de amplificação positiva com este para de *primer*.

◊ A seqüência do *primer* (12;21)E é diferente daquela referida em van Dongen et al, 1999. Por este motivo, os fragmentos amplificados apresentam tamanho diferente do esperado.

pb: pares de bases; não amp.: não amplifica; NP: não pesquisado.

Referência para pontos de quebra: van Dongen *et al*, 1999.

4.1.6 Eletroforese de DNA

Para análise do produto de RT-PCR, em gel de agarose 1,0% foram aplicados 15µl do produto adicionados de 2,0µl de tampão de amostra 10X e 3,0µl de água destilada. Os marcadores de peso molecular utilizados foram 1kb *ladder* e 100pb da *Invitrogen*.

O tampão de corrida utilizado foi o TEB 0,5X. A eletroforese foi realizada em um tempo variável de uma hora e meia a duas horas e com voltagem igual a 80 V. Após a corrida, o gel foi visualizado em transluminador e o resultado documentado digitalmente com auxílio do *software Quantity one* da *Bio-Rad*.

O resultado de cada paciente foi registrado em laudo e entregue ao chefe da equipe de Oncologia e Hematologia Pediátrica do Hospital de Apoio de Brasília para integrar os respectivos prontuários.

4.1.7 Obtenção de metáfases a partir do cultivo de células de medula óssea (Bottura & Ferrari, 1960)

De cada paciente foram obtidos aproximadamente 2 mL de aspirado de medula óssea, heparinizado. Essa amostra foi mantida em duas garrafas de cultivo estéreis, onde era semeado o aspirado de medula óssea em uma garrafa com 13mL de RPMI com 2mL de soro fetal bovino, previamente filtrado, acrescidos de penicilina e estreptomicina (100 U/mL) ou em 15mL de meio HAM F10. Após homogeneizar o material, o mesmo foi dividido em dois frascos estéreis, que foram identificados como cultura direta (MOD) e de 24 horas (MO24h), colocados em estufa a 37°C em atmosfera úmida. Para a realização da MOD, 280µL de colchicina (0,16 µg/10mL) foram acrescentados imediatamente e para a cultura de 24 horas, esta foi acrescentada somente no dia seguinte. Esta substância tem por função despolimerizar a tubulina do fuso mitótico com bloqueio das mitoses em metáfase.

Após o período de atuação da colchicina, 20 minutos, o material foi transferido para quatro tubos de fundo cônico (falcon), com capacidade para 15 mL, e centrifugado por cinco minutos a 1000 rpm (Centrífuga Internacional, modelo K, tamanho 2, rotor nº 250, não refrigerada). O sobrenadante foi então desprezado e adicionaram-se ao *sedimento* 14 mL de solução hipotônica KCl 0,075 M previamente aquecida a 37°C, a qual provoca intumescência da célula e espalhamento dos cromossomos, seguida por homogeneização com auxílio de pipeta Pasteur. Em seguida, os tubos foram colocados em estufa a 37°C, por 20 minutos e submetidos à nova centrifugação a 1000 rpm durante cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e com a utilização do vórtex foram acrescidos 7 mL de fixador, constituído de uma solução de metanol e ácido acético glacial na proporção de 3 para 1, o qual fixa as metáfases e lava os restos celulares. Os tubos foram novamente centrifugados por cinco minutos, o sobrenadante desprezado e 7 mL de fixador acrescidos. A fixação foi repetida por mais três vezes e, ao término, cerca de 1,0 mL de fixador foi utilizado a fim de suspender as células para o preparo das lâminas, variando o volume de acordo com o tamanho do *sedimento*.

As lâminas utilizadas foram limpas com solução saturada de KOH, diluída em álcool comercial, onde permaneciam por 24 horas antes de serem lavadas em água corrente e depois armazenadas em água destilada em geladeira na temperatura de 4 a 6°C. No momento do uso, as lâminas foram posicionadas ligeiramente inclinadas e uma gota da suspensão de células era então colocada sobre a lâmina com ajuda de pipeta Pasteur. O excesso de água foi retirado com papel absorvente e a primeira lâmina foi flambada com auxílio de uma lamparina de álcool a fim de se observar a concentração do material e a qualidade das metáfases, e mais dez

lâminas foram preparadas e guardadas. Essas lâminas que não foram flambadas foram submetidas ao processo de “envelhecimento” (desidratação), colocadas em estufa seca, a 50°C durante 24 horas. Todas as lâminas foram identificadas para posterior análise.

A coloração foi feita com a utilização da solução de Giemsa, corante químico que se liga ao DNA, diluído em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8 (Fosfato dibásico de sódio Na_2HPO_4 e Fosfato monobásico de potássio KH_2PO_4) na proporção de 1 para 30, durante cinco minutos.

As lâminas desidratadas passaram por um processo de bandamento G, técnica de coloração dos cromossomos para produzir padrões específicos de bandas heterocromáticas escuras (bandas G) e eucromáticas claras alternadas (G - negativas). Cada lâmina foi inicialmente colocada em uma cubeta de plástico, contendo 50 mL de tampão HBSS (*Hanks Balance Salt Solution*) e 100µL de tripsina, 2,5% a 37°C, solução que irá submeter os cromossomos a uma digestão controlada, durante um tempo variável de 15 a 25 segundos. Após serem retiradas do frasco com tripsina, as lâminas foram mergulhadas em frasco contendo apenas HBSS (50 mL), retiradas, e em seguida mergulhadas em um terceiro frasco contendo 50 mL de HBSS e 1 mL de soro fetal bovino, e finalmente, mergulhadas em um quarto frasco contendo apenas HBSS, retiradas e submetidas à coloração com Giemsa nas mesmas proporções já descritas (Seabright, 1971).

Após análise, as alterações identificadas foram descritas de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (ISCN, 2005) (Shaffer & Tomerupp, 2005).

4.1.8 Imunofenotipagem

Foram realizadas análises multiparamétricas através da técnica de citometria de fluxo para determinação das linhagens celulares, de acordo com os seus estágios de maturação normal na medula óssea. O painel de anticorpos monoclonais (AcMo) disponível estabelecido incluiu: Anticorpos monoclonais intracitoplasmáticos (cCD22, cTdT, cCD13, cCD22, cCD79a, cCD2, cCD3, cMPO) e de superfície (sHLA- DR, sCD8, sCD4, sCD19, sCD56, sCD34, sCD38, sCD10, sCD20, sCD3, sCD4, sCD45, sCD7, sCD117). Inicialmente, a amostra de medula óssea total foi distribuída em diferentes tubos contendo 50µl em cada um, separando-os em dois grupos, para marcação com painel intracitoplasmático e de superfície.

Para a marcação intracitoplasmática, foi adicionado, em cada tubo, 1ml de solução de lise comercial (BD FACS™ Lysing Solution) e incubados em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 400µl de solução de saponina a 5% (saponina + PBS) durante 10 minutos, para perfuração da membrana citoplasmática das células mononucleares. Posteriormente, as células foram lavadas com solução salina balanceada

(PBS) e foram adicionados 4µl de cada AcMo do painel citoplasmático, conjugados a fluorocromos diferentes, incubando-se os tubos por 15 minutos, no escuro e em temperatura ambiente.

Para a marcação de superfície foram utilizados 4µl de cada AcMo do painel pré estabelecido, com posterior incubação em temperatura ambiente por 15 minutos e suspensão em solução de lise comercial (BD FACS™ Lysing Solution) por 10 minutos. Em seguida, o material foi lavado por três vezes com solução salina balanceada (PBS).

Os dados foram coletados ajustando-se o limiar de dispersão frontal (FSC) em células viáveis para excluir plaquetas e debris (células mortas), com análise de pelo menos 10.000 eventos de cada tubo, usando-se o programa CellQuest (BD, San Jose, CA) do citômetro de fluxo FACS Calibur (BD, San Jose, CA). Os resultados foram reportados como porcentagem de células positivas e intensidade média de fluorescência (IMF) das células positivas.

5. RESULTADOS

No período compreendido entre janeiro de 2005 a dezembro de 2007, 169 casos pediátricos registrados no Hospital de Apoio de Brasília tiveram diagnóstico confirmado de leucemia, sendo 58 em 2005, 63 em 2006 e 48 em 2007. Deste total, 133 foram analisados, 40 em 2005 (casos 1 ao 40), 51 em 2006 (casos 41 ao 91) e 42 em 2007 (casos 92 ao 133), o que representa 78,70% do total de casos registrados. A [listagem 1 \(pg.41\)](#) apresenta a identificação e caracterização geral dos 133 casos analisados. Verificou-se crescimento gradual na porcentagem de material analisado por RT-PCR, no decorrer dos anos, sendo 68,97% em 2005, 80,95% em 2006 e 87,5% em 2007 ([Tabela 2, Figura 1, pg.44](#))

Dentre os 133 pacientes, 128 eram maiores e cinco menores de um ano, 67 (50,38%) eram do sexo masculino e 66 (49,62%) do sexo feminino e as idades ao diagnóstico variaram entre 13 dias e 17,6 anos, com mediana de 7,7 anos. Observaram-se um total de 88 casos de LLA de linhagem B, 34 de LMA, sete de leucemia aguda bifenotípica e quatro de LMC, correspondendo, respectivamente, a 66,17%, 25,56%, 5,26% e 3,01% do total analisado. Verificou-se que 8,27% (11/133) eram menores de 2 anos, 33,08% (44/133) apresentavam idade entre 2 e 5 anos, 27,82% (37/130) entre 6 e 10 anos, 30,83% (41/130) eram maiores de 10 anos e ([Figura 2, pg.45](#)).

A análise imunofenotípica, por citometria de fluxo, foi realizada em todos os casos, excetuando-se aqueles de LMC. A análise citogenética foi realizada em 117 (87,97%) casos, sendo que em 38 (32,48%) destas amostras, identificadas na [listagem 1](#) como sem metáfase (S/M), não foi possível o diagnóstico devido: ao não crescimento da cultura, à sobreposição dos homólogos ou à destruição cromossômica, impedindo a identificação. Outros dezesseis (12,5%) casos identificados na [listagem 1](#) como *não realizados*, não foram submetidos à análise citogenética. Entre os 79 casos com análise cariotípica completa, 47 apresentaram cariótipo normal e 32 outros evidenciaram alterações cromossômicas.

A análise para detecção de transcritos de rearranjos de alterações cromossômicas específicas foi realizada em todas as 133 amostras e um total de 32 resultados positivos foi obtido no grupo estudado. Em todos os casos, a amplificação do transcrito foi confirmada por *shifted* RT-PCR. Considerando-se conjuntamente os dois tipos de análise genética, foram identificadas alterações em 55 casos, o que corresponde a 41,35% do total analisado.

Foram encontradas amostras positivas para oito dos doze diferentes tipos de transcritos pesquisados: *BCR/ABL minor* (1), *E2A/PBX1* (5), *TEL/AML1* (10), *MLL/ENLA1* (1), *AML1/ETO* (5), *PML/RAR α* (3), *CBF β /MYH11* (3) e *BCR/ABL major* (4) ([Figuras 3 a 12, pgs.](#)

46 a 48). Para os transcritos: *MLL/AF4*, *MLL/AF9*, *MLL/ENLA2* e *MLL/ELL*, nenhuma amplificação foi observada.

A amplificação de transcritos de fusão gênica em amostras de diferentes pacientes possibilitou a organização de uma coleção de cDNA de amostras positivas para os diferentes tipos de transcrito híbridos identificados, o que pôde ser utilizado como controle positivo na realização dos exames ([Listagem 2, pg.49](#)).

À medida que as análises moleculares eram realizadas, os resultados obtidos eram entregues em forma de laudo, em caráter de pesquisa, ao chefe do Núcleo de Oncologia e Hematologia Pediátrica do Hospital de Apoio de Brasília (NOHP/HAB), a fim de disponibilizar a informação à equipe médica ([Apêndice 10.2, pg.103](#))

A realização do exame molecular em amostras de pacientes pediátricos portadores de leucemia, registrados no Hospital de Apoio de Brasília, no período de 2005 a 2007, permitiu a adaptação do protocolo padronizado para pesquisa de rearranjos moleculares recorrentes em leucemias à realidade local. Em março de 2008, a metodologia estabelecida no Laboratório de Biologia do Gene foi transmitida, em treinamento, a um funcionário do Hospital de Apoio de Brasília e entregue, em documento, ao chefe do Núcleo de Oncologia e Hematologia Pediátrica deste hospital. O trabalho realizado permitiu a instalação de uma Unidade de Diagnóstico Molecular de Leucemias no Distrito Federal, ao possibilitar a incorporação do exame molecular no grupo de exames realizados ao diagnóstico em todos os pacientes com suspeita de leucemia, registrados no Hospital de Apoio.

Listagem 1. identificação e caracterização dos 133 casos analisados, com relação à idade, sexo, procedência, estado clínico e resultado das análises imunofenotípica, molecular e citogenética.

Caso	idade	sexo	Pc	IF	RT-PCR	CG	EC
1	3,7	M	DF	LMA	negativo	46,XX	D
2	6,5	F	DF	LLA prec. B	negativo	47,XX,+21	D
3	5,0	M	GO	LLA pré B CD10+	E2A/PBX1	46,XY	D
4	14,0	F	DF	LA bifeno.	negativo	46,XX	D
5	7,11	M	DF	LMC	BCR/ABL major	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	D
6	4,3	M	GO	LLA pré B CD10+	E2A/PBX1	46,XY,del(1)(q)	D
7	8,6	F	BA	LMA	negativo	S/M	D
8	15,6	M	GO	LA bifeno.	negativo	S/M	D
9	9,6	M	MG	LLA pré B CD10+	negativo	45,XY,-20,del(6p),add(9p),add(14q),add(17q)	D
10	2,3	M	DF	LLA prec.B CD10-	negativo	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	D e r
11	9,5	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
12	2,0	F	MG	LMA M4	negativo	46,XX	r
13	12,3	M	GO	LLA pré.B CD10-	negativo	47,XY,+C	D
14	1,8	F	DF	LA bifeno.	negativo	46,XX	D
15	7,0	F	DF	LMA M4	CBFB/MYH11	46,XX	D e r
16	7,0	F	DF	LMA	negativo	46,XX,del(7)(q22)	D
17	14,8	F	GO	LLA pré B CD10+	negativo	46,XX	D
18	1,7	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	46,XX	D
19	5,3	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	hipodiploidia	D
20	5,6	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	46,XX,del(2)(q?)	D
21	7,8	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	50,XXY,add(1)(q44),+5,+6,+10,+14,+17,+18,+21,+22r	D
22	8,9	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	46,XX	D
23	7,4	M	BA	LMA M3	negativo	47,XY,+8	D
24	12,0	M	PA	LLA pré B CD10+	negativo	não realizado	D
25	2,5	M	DF	LMA M3	negativo	S/M	D
26	9 ms	M	BA	LMA M4	CBFB/MYH11	46,XY	D e r
27	1,11	M	DF	LLA prec.B CD10-	negativo	46,XY	D
28	4,10	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
29	13 dias	F	DF	LLA pró.B CD10-	MLL/ENLAI	S/M	D
30	2,1	M	BA	LLA pré B CD10+	negativo	46,XY	D
31	6,10	F	DF	LMA M2	negativo	46,XX	D
32	7,1	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	46,XY	D
33	3,10	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	D
34	10,2	M	DF	LMA	negativo	46,XY	D
35	8,3	M	RR	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
36	12,1	M	DF	LLA prec.B CD10-	negativo	S/M	D
37	15,7	F	MG	LLA pró.B CD10-	negativo	S/M	D
38	12,6	F	BA	LMA	AML1/ETO	46,XX	D e r
39	8,6	F	GO	LMA M3	PML/RARA	não realizado	D
40	1,0	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	46,XX	D
41	12,2	F	GO	LLA pré B CD10+	negativo	46,XX	D
42	3,10	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	não realizado	D
43	12,10	M	BA	LMA M4	negativo	45,XY,-7	D
44	12,9	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
45	6,5	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
46	4,10	F	BA	LLA prec.B	negativo	46,XX	D
47	8,10	M	DF	LLA prec.B	negativo	46,XY	r
48	3,8	F	DF	LLA prec.B CD10-	negativo	48,XX,add(7)(p?)-8,+10,add(22)(q?)+2mar	D
49	12,5	M	DF	LA bifeno.	negativo	S/M	D
50	16,9	F	GO	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
51	6,0	F	DF	LMA	negativo	46,XX	D e r

Listagem 1. continuação

Caso	idade	sexo	Pc	IF	RT-PCR	CG	EC
52	5,5	M	BA	LMA	AML1/ETO	46,XY	D
53	5,0	F	MT	LMA	negativo	46,XX	D
54	3,10	M	DF	LMA	negativo	46,XY	r
55	4,0	M	DF	LLA pré B CD10+	TEL/AML1	46,XY	D
56	15,8	M	DF	LMA M0	negativo	46,XY	D
57	7,11	M	RR	LMA M2	AML1/ETO	45,X,t(8;21)(q22;q22),-Y	D
58	13,3	M	DF	LMC	BCR/ABL major	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	D
59	2,0	M	BA	LMA M4	CBFB/MYH11	46,XY	D
60	3,10	M	GO	LLA pré B CD10+	negativo	49,XY,+C,+C,+G	D
61	16,2	F	BA	LA bifeno.	negativo	45,XX,-16,del(17)(p11.1),+mar	D
62	10,7	F	DF	LLA prec.B CD10-	negativo	46,XX	r
63	10,6	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	36,XX,-2,-3,-4,-7,-8,-12,-13,-15,-16,-17/47,XX,+8	D
64	9,8	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
65	11,2	M	BA	LMA M3	negativo	46,XY	D
66	10,7	M	GO	LLA pré B CD10+	E2A/PBX1	46,XY	D e r
67	7,5	M	PB	LLA pré B CD10+	negativo	46,XY	D
68	6,7	M	MG	LLA pré B CD10+	negativo	55,XY,+4,+4,+5,+6,+9,+10,-20,+21,+21,+mar	D
69	1,8	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	45,X,-Y	D
70	6,1	F	DF	LA bifeno.	negativo	não realizado	D
71	15,11	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	57,XY,+X+4,+6,+7,+14,+17,+18,+21,+21,+22,+22	D
72	13,8	F	DF	LMC	BCR/ABL major	46,XX,t(9;22)(q34;q11)	D
73	9,10	M	GO	LMA M3	negativo	S/M	D
74	9,0	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	56,XY	D
75	3,2	M	GO	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
76	4,0	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
77	16,10	F	DF	LLA pré B CD10+	E2A/PBX1	46,XY	D
78	11,2	M	GO	LMA	negativo	S/M	D
79	15,2	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	não realizado	D
80	17,6	M	MG	LLA pré B CD10+	E2A/PBX1	S/M	D
81	7,3	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
82	5,4	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	r
83	11,4	M	BA	LMA M3	PML/RARA	46,XY	D
84	6,7	F	RR	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
85	7,9	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
86	3,8	F	DF	LMA M3	negativo	46,XX	D
87	14,3	F	BA	LMA M0	negativo	46,XX	D
88	4,3	F	DF	LLA pré B CD10+	TEL/AML1	48,XX	D
89	4,2	M	GO	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
90	13,7	F	BA	LMA	AML1/ETO	46,XX,t(8;21)(q22;q22)	r
91	16,11	M	DF	LLA pré B CD10+	TEL/AML1	S/M	D
92	2,2	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	54,XX	D
93	6,0	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	não realizado	D
94	2,4	M	DF	LMA	negativo	não realizado	r
95	17,2	F	DF	LMA	negativo	46,XX	D
96	13,3	F	DF	LMA	AML1/ETO	46,XX,t(8;21)(q22;q22)	D
97	2,5	F	RR	LLA pré B CD10+	negativo	não realizado	D
98	16,10	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
99	2,0	F	DF	LLA prec.B	negativo	S/M	D
100	9,2	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
101	2,5	F	BA	LLA pré B CD10+	negativo	46,XX	D
102	4,9	M	DF	LLA pré B CD10+	TEL/AML1	S/M	D

Listagem 1 continuação

Caso	idade	sexo	Pc	IF	RT-PCR	CG	EC
103	5,0	M	DF	LLA pré B CD10+	TEL/AML1	não realizado	D
104	14,2	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	46,XX	D
105	11,7	M	DF	LLA pré B CD10+	BCR/ABL minor	S/M	D
106	3,3	M	GO	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
107	15,6	M	DF	LMA M3	PML/RARA	46,XY	D
108	11,2	M	DF	LMA M4	negativo	46,XY	D
109	4,11	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	46,XY	D
110	5,8	F	DF	LLA pré B CD10+	TEL/AML1	46,XX	D
111	12,7	F	GO	LLA prec.B	negativo	S/M	r
112	12,10	F	DF	LLA prec.B	negativo	46,XX	D
113	16,4	F	DF	LMC	BCR/ABL major	46,XX,t(9;22)(q34;q11)	D
114	15,6	F	DF	LLA prec. B	negativo	S/M	D
115	2ms	F	DF	LA bif.	negativo	não realizado	D
116	16,0	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	não realizado	r
117	1,9	F	BA	LLA pré B CD10+	negativo	não realizado	D
118	2,10	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
119	8,4	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	não realizado	D
120	4,11	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	não realizado	D
121	6,6	F	DF	LLA pré B CD10+	TEL/AML1	não realizado	D
122	11,3	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	46,XX	D
123	8,6	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	52,XY,+X,t(1;6)(q?q?),+4,+5,+6,+14,-19,+21	r
124	9ms	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
125	3,9	F	DF	LLA pré B CD10+	TEL/AML1	46,XX	D
126	9,8	F	BA	LMA M7	negativo	45,XX,der(3)?inv(3)(p?),t(3;9)(p22~p26;q13),...	D
127	9ms	M	MA	LLA pró B CD10-	negativo	49,XY,+6,+8,+19	D
128	2,1	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
129	5,7	M	DF	LLA pré B CD10+	negativo	46,XY	D
130	3,8	M	BA	LLA pré B CD10+	TEL/AML1	S/M	r
131	2,2	F	DF	LLA pré B CD10+	TEL/AML1	não realizado	D
132	3,4	F	DF	LLA pré B CD10+	negativo	S/M	D
133	5,11	F	BA	LMA	negativo	46,XX,del(3)(p21),t(15;17)(q?q?)	D

Pc: procedência; IF: imunofenotipagem; RT-PCR: reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa; CG: citogenética; M: masculino; F: feminino; S/M: sem metáfases; LMA: leucemia mielóide aguda; LLA: leucemia linfocítica aguda; LA bifeno.: leucemia bifenotípica aguda; LMC: leucemia mielóide crônica; ms: meses; D: amostra analisada ao diagnóstico; D e r: amostra analisada ao diagnóstico e em recaída; r: amostra analisada em recaída; N: resultado negativo; EC: estágio clínico.

Tabela 2. Frequência de casos registrados e analisados de leucemia pediátrica no Hospital de Apoio de Brasília no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2007

leucemia	2005		2006		2007		N		%	
	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A ^o
LLA B	30	24	36	31	36	33	102	88	60,36	66,17
LLA T	07	0*	03	0*	02	0*	12	0*	07,10	0
LMA	17	12	19	15	08	07	44	34	26,03	25,56
LA bife.	03	03	03	03	01	01	07	07	04,14	05,26
LMC	01	01	02	02	01	01	04	04	02,37	03,01
Total	58	40	63	51	48	42	169	133	100,00	100,00

N: somatória das amostras;

T: número total de casos registrados;

A: número total de casos analisados;

*Os casos de LLAT não foram analisados para pesquisa de rearranjos moleculares;

^o % calculada tendo como referência o número total de casos analisados.

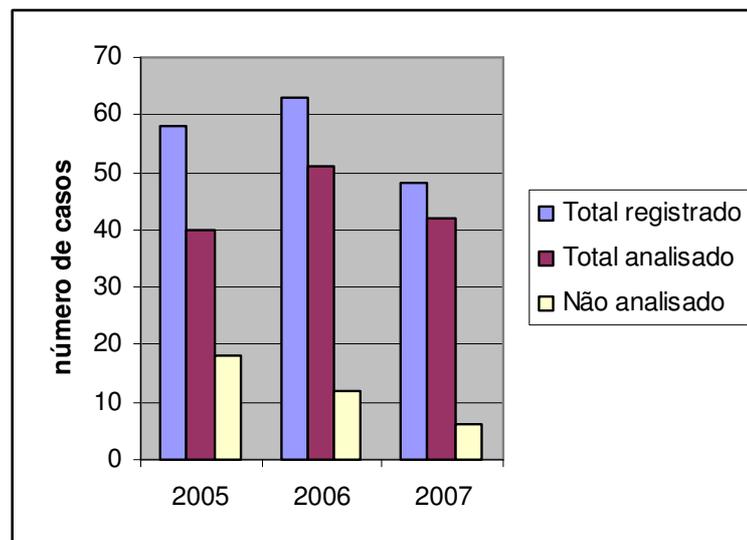


Figura 1. Distribuição de casos analisados, por ano.

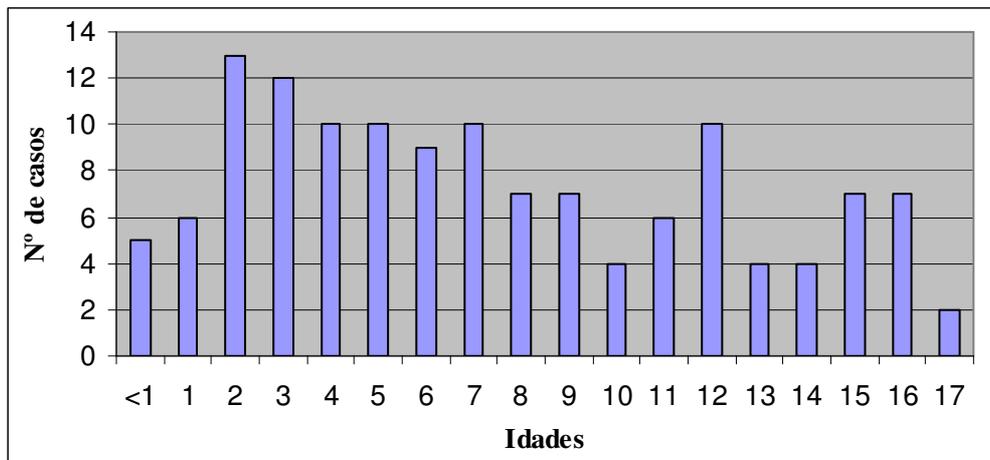


Figura 2. Distribuição dos casos analisados, por idade (em anos).

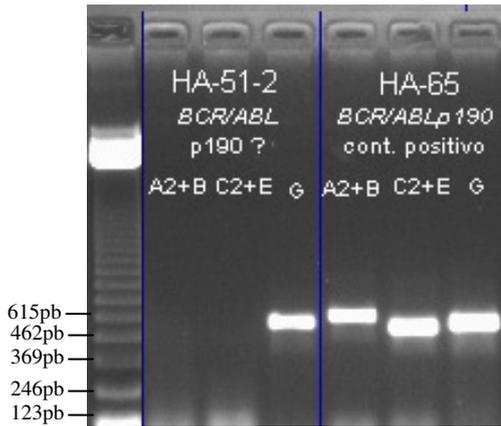


Figura 3. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio evidenciando RT-PCR com resultado negativo para amplificação do transcrito do rearranjo *BCR/ABL minor* na amostra HA-51-2. *Single* (A2+B) e *shifted* (C2+E). A amostra HA-65 foi utilizada como controle positivo.

Figura 4. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio evidenciando RT-PCR positivo para amplificação do transcrito do rearranjo *E2A/PBX1* na amostra HA-33. *Single* (A+B) e *shifted* (C+E). A amostra 16/05 foi utilizada como controle positivo e a linhagem HL-60 como negativo.

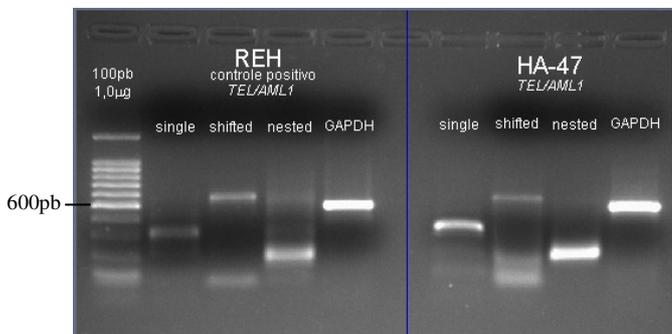
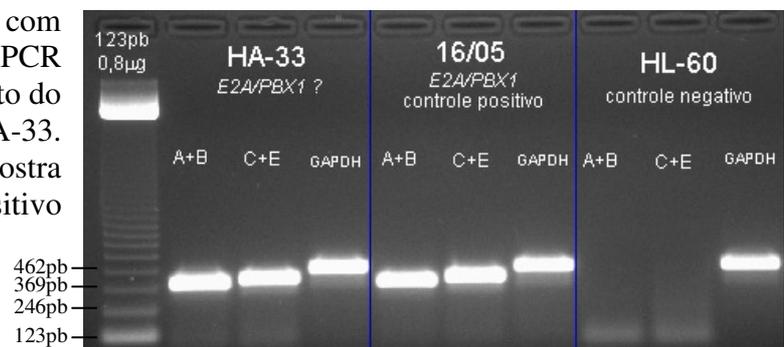


Figura 5. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio evidenciando RT-PCR positivo para amplificação do transcrito do rearranjo *TEL/AML1* na amostra HA-47. A linhagem REH foi utilizada como controle positivo.

Figura 6. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio evidenciando RT-PCR positivo para amplificação do transcrito do rearranjo *MLL/ENLA1* na amostra HA-104.

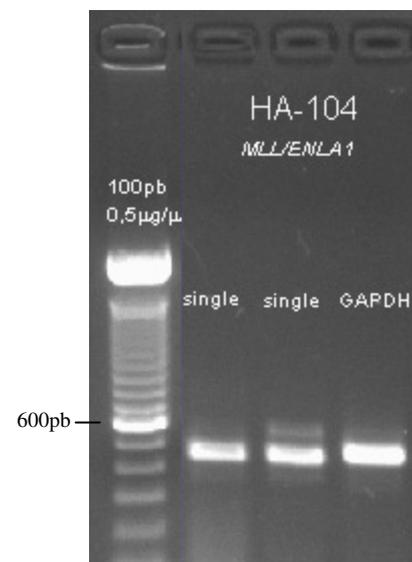




Figura 7. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio evidenciando RT-PCR com resultado negativo para amplificação do transcrito do rearranjo *AML1/ETO* na amostra HA-69. A amostra HA-53 foi utilizada como controle positivo.

Figura 8. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio evidenciando RT-PCR positivo para amplificação do transcrito do rearranjo *CBFB-MYH11* na amostra HA-58-2. A amostra HA-58-1 foi utilizada como controle positivo. *Single* (A+B2) e *shifted* (D2+E).

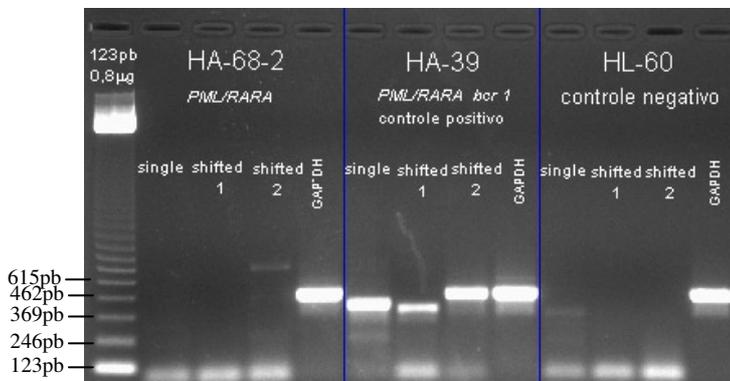
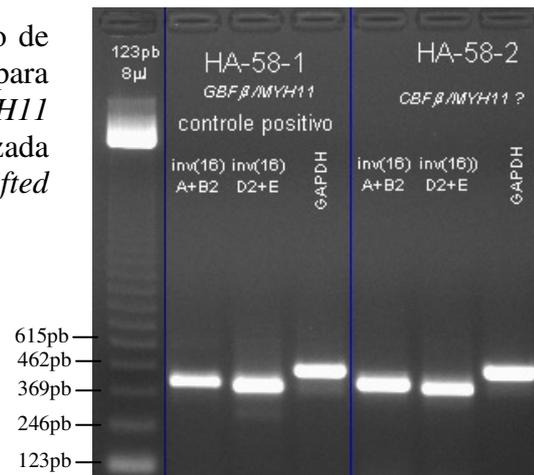


Figura 9. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio evidenciando RT-PCR com resultado negativo para amplificação do transcrito do rearranjo *PML/RARA do tipo bcr1* na amostra HA-68-2. A amostra HA-39 foi utilizada como controle positivo e a linhagem HL-60 como negativo. *Single* (29+30) e (A1+B) e *shifted* (C1+E).

Figura 10. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio evidenciando RT-PCR positivo para amplificação do transcrito do rearranjo *PML/RARA do tipo bcr3* na amostra 126/05. A amostra HA-36 foi utilizada como controle positivo. *Single* (29+31) e *shifted* (C2+E).



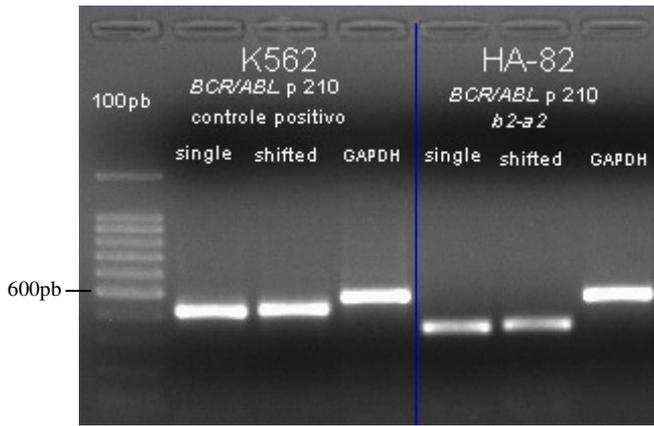
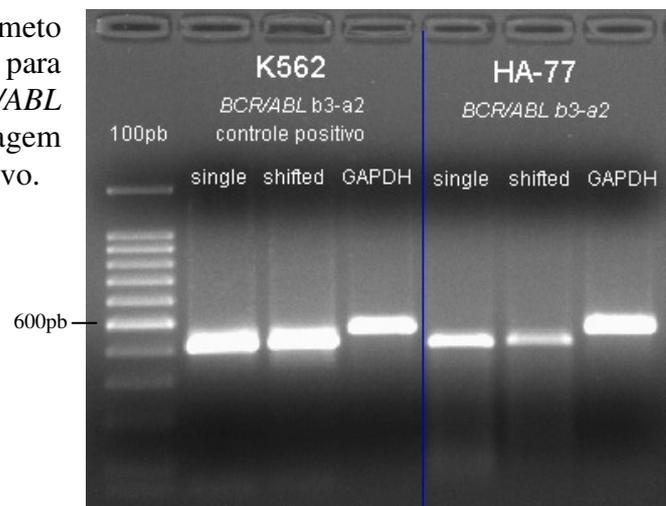


Figura 11. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio evidenciando RT-PCR positivo para amplificação do transcrito do rearranjo *BCR/ABL major* do tipo *b2-a2* na amostra HA-82. A linhagem K562 (*b3-a2*) foi utilizada como controle positivo.

Figura 12. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio evidenciando RT-PCR positivo para amplificação do transcrito do rearranjo *BCR/ABL major* do tipo *b3-a2* na amostra HA-77. A linhagem K562 (*b3-a2*) foi utilizada como controle positivo.



Listagem 2. Coleção de cDNA de amostras positivas para amplificação de transcritos de fusões gênicas recorrentes em leucemias.

Amostra	Gene híbrido	Alteração	Tipo
HA-23 HA-82	<i>BCR/ABL</i> p210	t(9;22)(q34;q11)	<i>b2-a2</i>
HA-12 HA-77	<i>BCR/ABL</i> p210	t(9;22)(q34;q11)	<i>b3-a2</i>
HA-06 HA-44 HA-47 HA-62 HA-63 HA-71 HA-141 HA-147 HA-152 HA-153	<i>TEL/AML1</i>	t(12;21)(p13;q22)	padrão
HA-14 HA-58-1/ 2/ 3 HA-91-1	<i>CBFβ/MYH11</i>	inv(16)(p13;q22)	tipo A
HA-03 HA-11 HA-46 HA-53 HA-113-2	<i>AML1/ETO</i>	t(8;21)(q22;q22)	padrão
HA-68-2	<i>PML/RARα</i>	t(15;17)(q22;q21)	<i>bcr 1</i>
HA-36 HA-114	<i>PML/RARα</i>	t(15;17)(q22;q21)	<i>bcr 3</i>
HA-65	<i>BCR/ABL</i> p190	t(9;22)(q34;q11)	padrão
HA-19-2 HA-33 HA-80 HA-83 HA-130	<i>E2A/PBX1</i>	t(1;19)(q23;p13)	padrão
HA-104	<i>MLL/ENL1</i>	t(11;19)(q23;p13)	

5.1 Leucemia Linfoblástica Aguda de linhagem B

Dentre os 88 pacientes considerados, 45 (51,14%) eram do sexo masculino e 43 (48,86%) do sexo feminino e as idades ao diagnóstico variaram entre 13 dias a 17,6 anos, com mediana de 6,7 anos. Obteve-se média anual de 29 casos analisados. Verificou-se que 9,10% (8/88) eram menores de dois anos, 38,63% (34/88) tinham idades entre dois e cinco anos, 27,27% (24/88) entre 6 e 10 anos e 25% (22/88) eram maiores de 10 anos (Figura 13, pg.51).

A análise imunofenotípica permitiu a caracterização de 70 casos como LLA comum (LLA precursora B CD10+), 9 como LLA pró B (LLA precursora B CD10-) e 7 como LLA precursora B sem definição do grau de maturação celular.

A cultura para análise citogenética foi realizada em 76 pacientes (86,36%), sendo que em 32 destes não foi possível o diagnóstico devido à falta de figuras em mitose na cultura. Entre os 44 casos com análise cariotípica completa, 24 apontaram cariótipo normal, 18 evidenciaram alterações cromossômicas sem associação com rearranjo molecular, sendo dez com hiperdiploidia, quatro com hipodiploidia e quatro com pseudodiploidia; um paciente apresentou hiperdiploidia associada ao rearranjo *TEL/AML1* e outro, trissomia constitucional do cromossomo 21 (Tabela 3, pg.51).

Amostras de todos os pacientes foram submetidas à análise molecular para identificação de transcrito. A tabela 4 (pg.52) expressa os dados referentes à perda de material para análise molecular, onde se observa tendência decrescente do valor desta perda, no decorrer dos anos.

A tabela 5 (pg.52) indica as frequências obtidas para cada um dos rearranjos pesquisados e respectivas flutuações de frequência ano a ano. Registra-se que o rearranjo *MLL/AF4* e *BCR/ABL major* não foram detectados no período estudado.

Em dois casos de lactentes, caracterizados com imunofenótipo LLA pró B CD10-, foram pesquisados, adicionalmente, o transcrito *MLL/AF9* referente à translocação t(9;11) e *MLL/ENLA1*, *MLL/ENLA2* e *MLL/ELLA* referentes à translocação t(11;19), rearranjos mais frequentes com o gene *MLL*, além do *MLL/AF4*. O transcrito *MLL/ENLA1* foi identificado em um deles (caso 29) (Listagem 1, pg.41) (Tabela 6, pg.52).

Os resultados combinados da análise molecular e citogenética estão apresentados na Tabela 6. Pontua-se a não detecção de resultados conclusivos na maioria dos casos estudados e a não concordância entre os achados moleculares e citogenéticos. Ressalta-se a ocorrência de dois casos nos quais foi identificada a translocação t(9;22)(q34;q11) e ausência do transcrito *BCR/ABL*. Um paciente apresentou hiperdiploidia associada ao rearranjo

TEL/AML1. Estas análises totalizaram alterações cromossômicas em 36 entre os 88 casos de LLA B analisados.

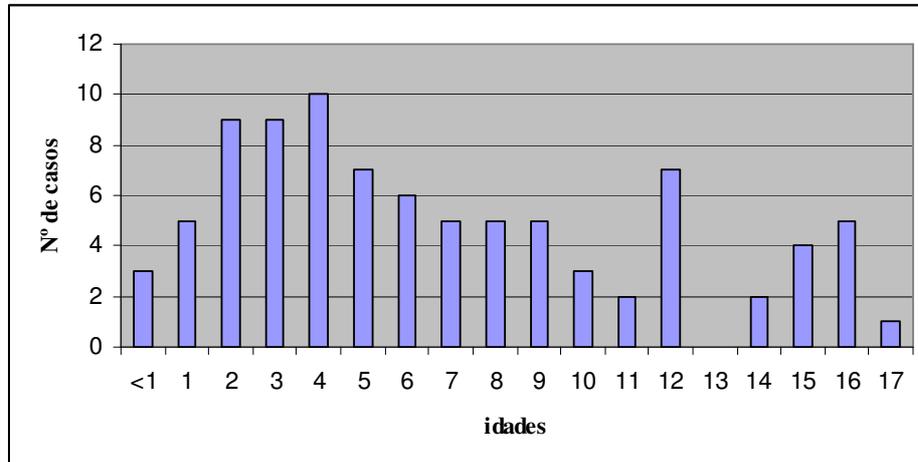


Figura 13. Distribuição dos casos de LLA B analisados, por idade (em anos).

Tabela 3. Distribuição de frequências absolutas e relativas do grupo de estudo referente aos casos de LLA B, segundo resultados da análise citogenética.

Resultado	Frequências Absolutas	Frequências Relativas
Não realização	12	13,64%
Não crescimento em cultura	32	36,36%
Análises	44	50,00%
Cariótipo Normal	24	27,27%
Alterações cromossômicas	20	22,73%
Hiperdiploidia	11*	12,50%
Hipodiploidia	4	4,55%
Pseudodiploidia	4	4,55%
Trissomia do 21	1	1,13%
Total	88	100,00%

* Inclui o caso positivo para *TEL/AML1*

Tabela 4. Indisponibilidade de material dos casos de LLA B para análise molecular ano a ano.

	2005	2006	2007	Total
Total registrado	30	36	36	102
Total analisado	24	31	33	88
Não analisado	6	5	3	14
% de perda	20,00	13,89	8,33	13,73

Tabela 5. Distribuição anual de frequências absolutas e relativas da amplificação de transcritos do grupo de estudo referente aos casos de LLA B, segundo resultado da análise molecular por RT-PCR.

	2005		2006		2007		Total		Idade (a)		M/F
	N	%	N	%	N	%	N	%	Variação	Med	
Total analisado	24	27,27	31	35,23	33	37,50	88	100,00	13 d-17,6	6,7	45/43
<i>TEL/AML1</i>	0	0,00	3	9,68	7	21,21	10	11,36	2,2-16,11	4,6	5/5
<i>E2A/PBX1</i>	2	8,70	3	9,68	0	0,00	5	5,68	4,3-17,6	10,7	4/1
<i>BCR/ABL</i> p190	0	0,00	0	0,00	1	3,03	1	1,14	11,7	-	1/0
Total amplificado	2	8,70	6	19,36	8	24,24	16	18,18	2,2-17,6	5,4	10/6

Med: mediana, Imunof.: imunofenotipagem, M: masculino, F: feminino (a): ano, d: dia N: número absoluto

Tabela 6. Resultados combinados das análises molecular e citogenética referentes aos casos de LLA B.

Alterações Cromossômicas	RT-PCR	Citogenética	
t(9;22) <i>BCR/ABL</i>	01	Não crescimento	01
t(1;19) <i>E2A/PBX1</i>	05	Não crescimento	01
		Cariótipo normal	03
		46,XX,del(1)(q?)	01
t(12;21) <i>TEL/AML1</i>	10	Não crescimento	03
		Cariótipo normal	03
		Hiperdiploidia	01
		Não realizada	03
t(11;19) <i>MLL/ENL1</i>	01	Não crescimento	01
Hiperdiploidia	-	47 a 50	06*
		>50	05
Hipodiploidia	-	36 a 45	04
Pseudodiploidia	-	t(9;22)(q34;q11)	02
		46,XX,del(2)(q?)	01
Anomalias	17		19

* Inclui o caso positivo para *TEL/AML1*

5.2 Leucemia Mielóide Aguda

Entre os 34 pacientes analisados, 18 (52,94%) eram do sexo masculino e 16 (47,06%) do sexo feminino, e as idades ao diagnóstico variaram entre nove meses e 17,2 anos, com uma mediana de 8,2 anos. Verificou-se que 2,94% (1/34) eram menores de 2 anos, 29,41% (10/44) apresentavam idades entre 2 e 5 anos, 32,35% (11/44) entre 6 e 10 anos e 35,29% (12/44) maiores de 10 anos (**Figura 14, pg.54**).

A análise morfológica permitiu a caracterização de 19 casos, considerando os critérios da classificação FAB para subtipos, sendo dois como M0, dois M2, oito M3, seis M4 e um M7. A análise de quinze casos não foi suficiente para classificá-los.

A análise citogenética foi realizada em 32 pacientes (94,12%), sendo que em quatro destes não houve metáfases nas culturas. Entre os 28 casos com análise cariotípica completa, 19 apresentaram cariótipo normal e oito evidenciaram alterações cromossômicas sem associação com rearranjo molecular, dos quais um mostrou hiperdiploidia, três hipodiploidia e cinco pseudodiploidia (**Tabela 7, pg.54**). Um paciente apresentou hipodiploidia associada com o rearranjo *AML1/ETO*. Amostras de todos os pacientes foram submetidas à análise molecular para identificação de transcritos. A **tabela 8 (pg.54)** mostra os dados referentes à indisponibilidade de material para a análise molecular. Uma média anual de onze casos foi analisada por ano. A **tabela 9 (pg.55)** indica a frequência obtida para cada transcrito pesquisado e suas respectivas frequências de flutuação, ano a ano. O rearranjo *MLL/AF9* não foi identificado nos casos analisados (casos: 01, 07, 16, 26, 51, 54, 78, 94, 95 e 108) (**Listagem 1, pg.41**).

Os resultados combinados entre análise citogenética e molecular evidencia a não detecção de resultados conclusivos na maioria dos casos estudados e a não concordância entre os achados das análises molecular e citogenética (**Tabela 10, pg.55**). Destaca-se a ocorrência de um caso no qual foi identificada translocação $t(15;17)(q?;q?)$ e ausência do transcrito *PML/RAR α* (caso 130) (**Listagem 1**). As análises permitiram a identificação de um total de dezenove casos com alterações cromossômicas entre os 34 analisados.

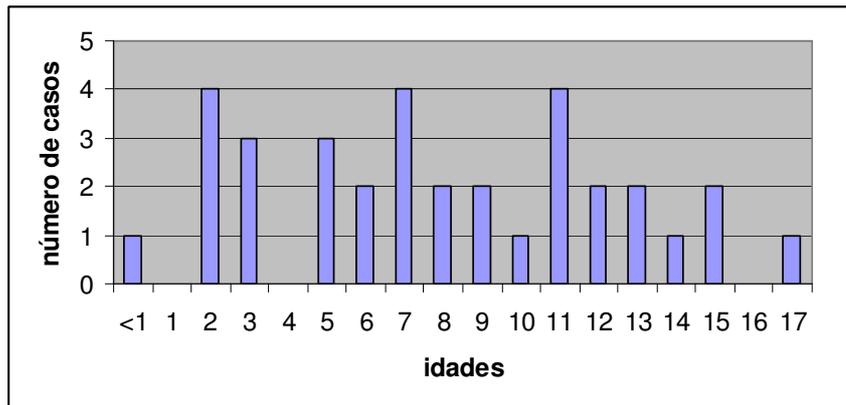


Figura 14. Distribuição dos casos de LMA analisados, por idade (em anos).

Tabela 7. Distribuição de frequências absolutas e relativas do grupo de estudo referente aos casos de LMA, segundo resultados da análise citogenética.

Resultados	Frequências	Frequências
	Absolutas	Relativas
Não realização	02	5,89%
Não crescimento em cultura	04	11,76%
Análises	28	82,35%
Cariótipo Normal	19	67,86%
Alterações cromossômicas	09	32,14%
Hiperdiploidia	01	11,11%
Hipodiploidia	03	33,33%
Pseudodiploidia	05	55,56%
Total	34	100,00%

Tabela 8. Indisponibilidade de material dos casos de LMA para análise molecular ano a ano.

	2005	2006	2007	Total
Total registrado	17	19	08	44
Total analisado	12	15	07	34
Não analisado	05	04	01	10
% de perda	29,41	21,05%	12,5%	22,73%

Tabela 9. Distribuição anual de frequências absolutas e relativas da amplificação de transcritos do grupo de estudo referente aos casos de LMA, segundo resultado da análise molecular por RT-PCR.

	2005		2006		2007		Total		Idade(a)		M/F
	N	%	N	%	N	%	N	%	Varição	Med	
Total analisado	12	35,29	15	44,12	07	20,59	34	100,00	9m-17,2	7,4	17/14
<i>AML1/ETO</i>	01	8,33	03	20,00	01	14,29	05	14,71	5,5-13,7	12,6	2/3
<i>CBFβ/MYH11</i>	02	16,66	01	6,67	0	0,00	03	8,82	9m-7,0	2,0	2/1
<i>PML/RARα</i>	01	8,33	01	6,67	01	14,29	03	8,82	86-15,6	11,4	2/1
Total amplificado	04	33,32	05	33,34	02	28,57	11	32,35	9m-15,6	8,6	6/5

Med: mediana, Imunof.: imunofenotipagem, M: masculino, F: feminino (a): ano, d: dia N: número absoluto

Tabela 10. Resultados combinados das análises molecular e citogenética referentes aos casos de LMA.

Alterações Cromossômicas	RT-PCR	Citogenética	
t(8;21) <i>AML1/ETO</i>	05	Cariótipo normal	02
		t(8;21)(q22;q22)	03
inv(16) <i>CBFβ/MYH11</i>	03	Cariótipo normal	03
t(15;17) <i>PML/RARα</i>	03	Não realizada	01
		Cariótipo normal	02
Hiperdiploidia	-	2n=47	01
Hipodiploidia	-	2n= 45	03*
Pseudodiploidia	-	t(15;17)(q?;q?)	01
		del(7)(q22)	01
Alterações	11		09

*Inclui o caso positivo para *AML1/ETO*

5.3 Leucemia Bifenotípica Aguda

Em relação à leucemia aguda bifenotípica, diagnosticada em duas crianças do sexo masculino e em cinco do feminino, com mediana de 12,5 anos (variando de 7,11 a 16,4 anos), não foram observados, em nenhum dos casos (casos 4, 8, 14, 49, 61, 70 e 115), os transcritos *BCR/ABL* variantes p190 e p210, pesquisados neste grupo. A análise citogenética completa foi realizada em três deles, tendo identificado hipodiploidia e deleção em um (caso 61) e cariótipo normal em dois ([listagem 1, pg.41](#)).

5.4 Leucemia Mielóide Crônica

Nos quatro casos de LMC (casos 5, 58, 72 e 113), sendo dois do sexo masculino e dois do feminino, com mediana de idade de 13,5 anos (variando de 2 meses a 16,2 anos), observou-se a amplificação do transcrito do rearranjo *BCR/ABL* variante p210 referente à translocação t(9;22), sendo que dois apresentaram o subtipo *b3-a2* e os outros dois, *b2-a2*. A análise citogenética identificou a presença do cromossomo Philadelphia em todos os casos ([listagem 1, pg.41](#)).

6. DISCUSSÃO

6.1 Frequência de ocorrência dos transcritos

A distribuição dos subtipos de leucemia referentes aos casos registrados no período de realização do presente trabalho mostrou-se similar à identificada pelo Grupo Colaborativo Brasileiro de Leucemia Aguda da Infância (Tabela 2, pg.44) (Pombo de Oliveira *et al*, 2009).

Em relação à frequência do transcrito *TEL/AML1*, observam-se valores crescentes no decorrer dos anos. Em 2005, nenhum caso apresentou resultado positivo e, é interessante notar que, em 2006 e 2007, os valores encontrados: 9,68% e 21,21%, respectivamente (Tabela 5, pg.52), são inferiores à média de 25% relatada na literatura (Pui *et al*, 2008) e semelhantes aos dados anteriormente publicados no México (9,6%) (Jiménez-Morales *et al*, 2008) e no Distrito Federal (20%) (Magalhães *et al*, 2000). Em estudos realizados no Rio Grande do Sul e Paraná, com a técnica de FISH, foram identificadas frequências de 19% e 40%, respectivamente (Zen *et al*, 2004; Veiga *et al*, 2004). Apesar da média de 25% para o transcrito *TEL/AML1* apresentada com frequência na literatura, observa-se, entre relatos de diferentes países, variação dos valores encontrados.

Para a fusão *E2A/PBX1*, os valores obtidos, em 2005 (8,70%) e 2006 (9,68%) (Tabela 5, pg.52), foram superiores à frequência relatada na literatura (5% a 6%) (van Dongen *et al*, 1999; Armstrong & Look, 2005) e um dos mais altos já registrados, de acordo com revisão realizada por Jiménez-Morales e colaboradores, em 2008. No Brasil, Emerenciano e colaboradores relatam, para esta fusão, uma frequência de 2,7%, tratando-se, no entanto, de dados obtidos a partir da análise de crianças menores que dois anos (Emerenciano *et al*, 2006). Por outro lado, sabe-se que em casos de LLA precursora B expressando imunoglobulina citoplasmática (Ig μ) a frequência da referida fusão é de 25% (Armstrong & Look, 2005). É possível, portanto, considerar a possibilidade de que entre os casos relatados como positivos, nos trabalhos do México e Estados Unidos, acima citados, exista casos expressando Ig μ (Jiménez-Morales *et al*, 2008). A mesma consideração pode ser feita em relação aos dados do presente trabalho, uma vez que o painel de anticorpos monoclonais disponível não incluiu a análise da imunoglobulina citoplasmática.

Para o transcrito *BCR/ABL* variante p190, em 2005 e 2006, nenhum caso positivo foi observado, enquanto que, em 2007, o valor encontrado (3,03%) (Tabela 5, pg.52) foi similar ao relatado na literatura (3% a 5%) (Rubnitz & Look, 1999). Há relatos de frequência mais

baixa para o transcrito *BCR/ABL* variante p190, na Argentina (1,6%) (Alonso *et al*, 2006) e no Canadá (2%) (Abdelhaleem, 2007).

A ausência de amplificação do transcrito *MLL/AF4*, pesquisado em todos os casos de LLA B (88), pode ser atribuída à baixa frequência desta alteração cromossômica. A presença de rearranjos gênicos compreendendo o gene *MLL* parece estar correlacionada à ausência de expressão de CD10 e imunofenótipo pró B e é inversamente associada à idade, ocorrendo em maior frequência em casos de crianças menores de um ano (Pui *et al*, 1990; van Dongen *et al*, 1999). No grupo estudado, houve apenas dois casos de lactentes com esta caracterização, nos quais foram pesquisados, além das principais alterações recorrentes analisadas em todos os casos de LLA B, os quatro outros rearranjos mais frequentes compreendendo o gene *MLL*: *MLL/AF9*, *MLL/ENLA1*, *MLL/ENLA2* e *MLL/ELL*. Considerando-se o número reduzido de casos com o referido imunofenótipo e a detecção do transcrito *MLL/ENLA1* em um dos casos, confirma-se, no grupo estudado, a frequência relatada na literatura.

Como dito anteriormente, em relação aos casos de leucemia mielóide aguda, sabe-se que alguns subtipos FAB específicos como M2, M3 e M4 prevêm as alterações genéticas sugerindo correlações genético-morfológicas. Entretanto, sabe-se também que estas correlações nem sempre são corretas e que as alterações genéticas devem prever o prognóstico e as propriedades biológicas da leucemia mais consistentemente que a morfologia. Considerando-se esta questão e o fato de que, no presente trabalho, a análise morfológica não permitiu a classificação de 18 dos 34 casos analisados de LMA, optou-se por comparar as frequências obtidas para cada transcrito considerando o grupo de casos de LMA como um todo e não considerando as frequências relatadas na literatura para cada subtipo morfológico. Na literatura, são relatadas frequências de 18%, 8% e 10%, respectivamente, para os transcrito *AML1/ETO*, *CBF β /MYH11* e *PML/RAR α* (Rego, 2002). No grupo estudado, foram identificados para os três transcritos pesquisados diferentes frequências, ano a ano, sendo: 8,33%, 20,0% e 14,29% para *AML1/ETO*; 16,66%, 6,67% e 0% para *CBF β /MYH11* e 8,33%, 6,67% e 14,29% para *PML/RAR α* , (Tabela 9, pg.55). É necessário atentar para o fato de que o número de casos de LMA ocorrido em cada ano é baixo, o que pode estar influenciando nos valores obtidos para cada transcrito (Tabelas 8, pg.54).

Em relação aos quatro casos de leucemia mielóide crônica, nos quais se pesquisou o transcrito *BCR/ABL* variante p210, o mesmo foi identificado em todos os casos, o que está de acordo com o relato da literatura de que 95% dos casos de LMC apresentam *BCR/ABL* variante p210 (van Dongen *et al*, 1999). Nos casos de leucemia bifenotípica, nenhum dos dois tipos de transcrito *BCR/ABL* foi identificado. Considera-se o número reduzido de casos

presente no grupo de estudo e a possibilidade de ocorrência de outra alteração genética, uma vez que, mesmo sendo maior a probabilidade de ocorrência do transcrito *BCR/ABL*, tratando-se de leucemia bifenotípica, podem estar presentes alterações genéticas de ambas as linhagens.

Apesar de ter havido diminuição gradativa da perda de material disponível para a análise molecular, no decorrer dos anos (Tabelas 4 e 8, pgs.52 e 54), o que poderia contribuir para a identificação de frequências em valores crescentes, para os diferentes tipos de transcritos pesquisados, ano a ano, ao contrário, verificou-se variação dos valores (Tabelas 5 e 9, pgs.52 e 55). Considera-se a possibilidade de resultado casual e a de que outros fatores, como a grande miscigenação da população brasileira (Pimenta *et al*, 2006), possam também estar relacionados aos achados encontrados.

Variações na incidência dos diferentes subtipos de leucemia e nas frequências identificadas para os transcritos híbridos recorrentes têm sido observadas entre grupos étnicos distintos, sugerindo a existência de correlação entre o “pool” genético de uma população e a ocorrência das alterações cromossômicas.

Em estudo realizado com pacientes asiáticos consecutivos e, portanto, não selecionados, com composição étnica variada e predominantemente chinesa (51,8%), relata-se que chineses apresentam frequência significativamente mais baixa para o transcrito *TEL/AML1* (13,3%), quando comparados aos malaios (22,2%) e indianos (21,7%). Malaios têm frequência mais baixa de LLA T (6,2%), comparada aos chineses e indianos (9,8%). Malaios e chineses têm frequência significativamente mais alta de *BCR/ABL* (7,4% e 5,0%, respectivamente) comparada à população indiana, embora a mediana de idade ao diagnóstico seja similar. Os autores sugerem que as diferenças raciais sejam fatores significativos e importantes na determinação da frequência dos subtipos de LLA pediátrica e seus respectivos transcritos (Ariffin *et al*, 2007).

No México, a frequência para o transcrito *TEL/AML1* (13,5%), considerando a LLA como um todo (Jiménez-Morales, 2008), foi comparada à relatada no Japão (13%) (Nakao *et al*, 1996), em pacientes afro-americanos (13,2%) (Pui *et al*, 2003 b) e em américo-hispânicos (12,6%) (Aldrich *et al*, 2006), porém mais baixa que a encontrada em caucasianos (Attarbaschi *et al*, 2004). Jiménez-Morales e colaboradores identificaram ainda, para o transcrito *E2A/PBX1*, frequência de 11,5%, cujo valor foi similar ao encontrado em pacientes afro-americanos (11,8%) (Pui *et al*, 2003 b) e muito superior ao identificado no Reino Unido (2,3%) (Devaraj *et al*, 1995). Os achados sustentam a existência de diferenças raciais e geográficas na frequência de marcadores moleculares em LLA pediátrica

Em estudo realizado nos Estados Unidos, com crianças brancas e negras com LLA, diferenças significativas foram encontradas em relação às frequências de ocorrência dos transcritos híbridos recorrentes. Crianças negras apresentaram valores mais altos para a ocorrência de alterações como *E2A/PBX1* (11,8%) e *BCR/ABL* (5,9%) que as brancas (3,0% e 2,4%, respectivamente) e mais baixa para *TEL/AML1* (13,2%) e *MLL/AF4* (1,5%), comparada a 18,9% e 3,0% em crianças brancas (Pui *et al*, 2003 b).

Análise comparativa, por meio de citogenética convencional e molecular, entre grupo de crianças hispânicas e não-hispânicas, nos Estados Unidos, demonstrou que a frequência de *TEL/AML1* foi significativamente mais baixa em hispânicos (13%), que em não-hispânicos (24%). As crianças foram classificadas como hispânicas, quando ambos os pais foram assim identificados, a partir de informações obtidas na certidão de nascimento (Aldrich *et al*, 2006). Apesar de o termo hispânico descrever herança cultural comum, ao invés de raça ou etnia uniforme (Salari *et al*, 2005), os autores sustentam que a variação observada em relação à frequência deve-se a fatores de risco étnico-específicos, que devem ser ainda explorados (Aldrich *et al*, 2006).

A incidência da LLA em crianças brancas, no Brasil, é próxima à descrita em países industrializados. Por outro lado, a incidência em crianças não-brancas é mais baixa e menor que a descrita em negros, caucasianos e americanos (Neglia *et al*, 1988; Rego *et al*, 1996). Além disso, registrou-se ausência do pico típico (de 2 a 5 anos) de ocorrência em pacientes brasileiros não-brancos (Rego *et al*, 1996), semelhante ao que ocorre em crianças não-brancas nos Estados Unidos (Greaves *et al*, 1993). É interessante notar que, em ambos os países, a população não-branca apresenta níveis sócio-econômicos mais baixos, embora a diferença seja mais notável no Brasil. Este déficit associado à ausência do pico típico em pacientes brasileiros não-brancos levou os autores a sugerirem correlação com déficit na incidência do subtipo B comum (Rego *et al*, 1996). A similaridade das taxas de incidência de LLA T em crianças e adultos, em ambos os grupos raciais, e a semelhança entre a razão brancos:não-brancos dos dados obtidos e o censo demográfico, contribuem para indicar que se trata de dados reais. De fato, Greaves e colaboradores, ao analisarem a distribuição geográfica dos subtipos de LLA, já haviam registrado, em populações africanas, déficit seletivo significativo na incidência do subtipo LLA B comum (Greaves *et al*, 1993; Rego *et al*, 1996).

Sabe-se que dentre as neoplasias infantis, as leucemias representam as mais freqüentemente diagnosticadas, sendo responsáveis, na maioria das populações, por 25% a 35% de todas as neoplasias malignas pediátricas. Na África, no entanto, as leucemias são

predominantes apenas na Argélia (37%) e no Zimbábue (21%), compreendendo, nos demais países, apenas de 10% a 15% dos tumores infantis (Braga *et al*, 2002).

Em estudo posterior, realizado com casos consecutivos nos Estados Unidos, verificou-se também menor incidência de LLA em crianças negras, que correspondiam a 16,5% do total analisado, sendo 82,0% brancas e 1,5% de outras raças (Pui *et al*, 2003 b).

A cor da pele é um exemplo de característica cuja expressão tem variação contínua na população, uma vez que é determinado por herança poligênica, onde dependendo do número de genes que estão atuando (aditivos e não aditivos), obtém-se maior ou menor variação fenotípica. Além disso, este é também um caráter multifatorial, podendo ter o fenótipo, temporariamente, modificado pelo ambiente (Griffith *et al*, 2002; Vogel & Motulsky, 1997). Considera-se, portanto, questionável e, muitas vezes, impreciso o modo de categorização dos casos analisados em raças ou etnias. Na maioria das vezes, esta classificação é realizada com base em informações obtidas por meio de questionários direcionados aos responsáveis, geralmente a mãe biológica, ou a partir da revisão de prontuários, nos quais muitas vezes esta informação está ausente (Aldrich *et al*, 2006). O entendimento pessoal a respeito da própria cor, raça ou etnia nem sempre é o real. A informação pode ser dada de maneira subjetiva, o que pode gerar interpretação errônea dos dados e conclusões que não refletem a realidade.

No Brasil, um país de extensão continental, são notáveis as diferenças na heterogeneidade étnica (Rego *et al*, 2003) entre as regiões (Callegari-Jaques *et al*, 2003).

O grau de contribuição de europeus, africanos e ameríndios no pool genético da população brasileira foi realizado a partir da análise de indivíduos residentes nas cinco regiões sócio-geográficas do Brasil, em relação ao polimorfismo de doze curtas repetições em *tandem* (STR). Pelo fato de existir alto grau de mistura étnica na população brasileira, os indivíduos não foram classificados com base em seus traços morfológicos. O estudo permitiu a constatação da existência de diferenças genéticas significativas entre os habitantes das diferentes regiões. A contribuição européia é crescente no sentido Norte-Sul do país, enquanto o componente africano é mais baixo no Sul, com valores mais altos encontrados no Centro-Oeste e Sudeste. Na região Norte foram encontrados os mais altos valores para a contribuição ameríndia, ao contrário do identificado nas regiões Sul e Sudeste (Callegari-Jaques *et al*, 2003).

Os casos analisados no presente estudo são, em sua maioria (63,91%), do Distrito Federal, sendo o restante proveniente, principalmente, das regiões Nordeste (15,79%) e Centro-Oeste (12,78%), com alguns poucos representantes das regiões Norte (3,76%) e

Sudeste (3,76%). Este fato pode estar relacionado à existência de maior quantidade de centros de referência para diagnóstico e tratamento das leucemias nas regiões Sul e Sudeste do país.

A frequência média de 25%, relatada na literatura para o transcrito *TEL/AML1*, é principalmente obtida a partir de análises realizadas nos Estados Unidos e Europa. Sabe-se ainda que a incidência da leucemia é menor em populações africanas (Braga *et al*, 2002), bem como, em afro-americanos, a frequência para o transcrito *TEL/AML1* é mais baixa (Pui *et al*, 2003 b). Considerando estas questões, é possível sugerir que as diferenças genéticas, conseqüentes da heterogeneidade étnica de cada região, estejam correlacionadas à variação dos valores encontrados, por exemplo, para transcritos como *TEL/AML1*, com registro de ocorrência de 21% no Distrito Federal (presente trabalho), 25% em Campinas (Yunes, comunicação pessoal, 2007) e 40% no Paraná (Veiga *et al*, 2004). É, no entanto, necessário ressaltar que, neste último trabalho, apesar de as amostras serem referentes a um período de onze anos (1993 a 2002), houve seleção dos casos analisados (30).

O estudo a respeito das diferentes frequências dos subtipos de leucemia e alterações cromossômicas, quando grupos étnicos distintos são comparados, pode contribuir para elucidar fatores relacionados ao risco e etiologia da doença (Magalhães *et al*, 2000).

6.2 Instalação de uma unidade para diagnóstico molecular

Houve diminuição da perda de material disponível para a análise molecular, no decorrer dos anos (Figura 1, pg.44), fato que ilustra a crescente incorporação da pesquisa molecular para transcritos híbridos, por RT-PCR, como um dos exames realizados ao diagnóstico em pacientes pediátricos atendidos na rotina do Hospital de Apoio de Brasília, caracterizando gradativa implantação do exame molecular neste centro.

As alterações genéticas são reconhecidas pela OMS como critério principal para classificação das leucemias agudas, pois indicam melhor o comportamento clínico e o resultado terapêutico que a morfologia, sendo consideradas de grande valor prognóstico (Chauffaille *et al*, 2004), permitindo caracterização mais completa da doença em cada paciente. Apesar disso, a análise molecular para detecção de transcritos híbridos recorrentes em leucemia, no Brasil, está restrita a alguns poucos centros de referência, concentrando-se principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país.

Relatos de diferentes centros, onde o exame molecular é realizado, ilustram a importância da incorporação deste exame que, associado à análise citogenética, se tornou parte essencial na rotina do diagnóstico das leucemias, e evidenciam a sua contribuição em relação à melhor categorização de grupos prognósticos, tornando-se primordial para a

definição da intensificação de terapias e indicação das modalidades de transplante de medula óssea (Oliveira *et al*, 2004).

O desenvolvimento de combinações terapêuticas, utilizando diversas drogas citotóxicas, com ou sem transplante de *stem-cell*, tem aumentado o percentual de cura de criança portadora de leucemia linfóide aguda em mais de 80% (Brenner & Pinkel, 1999). Essa acentuada melhora nos resultados tem produzido aumento na população de sobreviventes. Anualmente cerca de 1.500 crianças com LLA, nos Estados Unidos, estão sendo curadas. É estimado que um em cada 1.000 adultos jovens, com menos de 20 anos de idade, seja um sobrevivente do câncer. Contudo, dos 75.000 novos casos de LLA, que são diagnosticados anualmente em todo o mundo, cerca de 60.000 (80%) não têm acesso às modernas formas de diagnóstico e tratamento e são, portanto, excluídos do processo de cura (Pedrosa & Lins, 2002).

O olhar de modo prospectivo para estudos realizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre proporcionou mudança de postura frente ao diagnóstico de LMA. Nos anos 2000 tratamentos só foram iniciados após análise de fatores prognósticos (Bittencourt *et al*, 2003).

De 70% a 80% dos pacientes com LMA apresentam alterações genéticas não casuais. Os trabalhos relacionando essas alterações e os prognósticos têm se multiplicado. Foram esses estudos que mostraram que diferentes subtipos da LMA podem, no futuro, ter tratamentos distintos, o que já ocorre com a LMA M3, tratada com ácido trans-retinóico e quimioterapia (Mendonça, 2003).

Em conciso relato do Grupo Colaborativo Brasileiro de Leucemia Aguda da Infância, os autores registram além de considerável aumento na taxa de avaliação e identificação das leucemias pediátricas, avanços na realização do diagnóstico deste grupo de doenças (Pombo de Oliveira *et al*, 2009).

Até 1997, poucas instituições de saúde no Brasil realizavam análises imunofenotípica, citogenética e/ou molecular possibilitando cuidados apropriados às crianças com leucemia. Uma parceria entre o Ministério da Saúde e a Fundação Banco do Brasil possibilitou a realização de um projeto intitulado Programa Criança e Vida, a partir do qual centros de referência foram equipados para realizar os exames (Pombo de Oliveira *et al*, 2009). Atualmente, o exame molecular é realizado em: São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais Paraná, Rio-Grande-do-Sul, e Pernambuco.

No entanto, em vários outros estados do país, nos quais o exame está ausente, a obtenção das informações referentes às alterações moleculares é limitada aos pacientes que têm condições financeiras para realizar a análise molecular por intermédio de laboratórios

particulares, que enviam o material biológico a outros centros, ou aos que têm possibilidade de mudar de cidade para realizar o tratamento. A impossibilidade de realização do exame, o que ocorre na maioria dos casos, implica na ausência de informações que permitiriam um olhar diferenciado para cada paciente, não sendo possível prever a resposta ao tratamento, que pode ser distinta em cada caso.

Crianças leucêmicas de diferentes regiões apresentam, portanto, diferentes chances de acesso a um diagnóstico preciso e completa caracterização da doença, conseqüentemente têm diferentes chances de correta adequação do tratamento, de sobrevida livre da doença e de cura. A padronização e incorporação do exame molecular no âmbito público são fundamentais para garantir às crianças, independentemente do local onde elas residam, acesso igualitário à mais moderna caracterização da doença e conseqüente estratificação em grupos de risco e adequação do tratamento.

O exame para diagnóstico molecular de transcritos híbridos recorrentes vem sendo realizado em todos os pacientes pediátricos com diagnóstico de leucemia atendidos no Hospital de Apoio de Brasília desde 2006. A implantação deste exame no referido hospital tem garantido à população do Distrito Federal acesso a informações peculiares de cada caso, permitindo gradativo aumento da capacidade de decisão clínica do melhor esquema terapêutico e, portanto, contribuindo para melhorar a sobrevida dos pacientes.

6.3 Comparação entre análise molecular e análise citogenética

Considerando os casos de LLA B, não houve concordância entre os resultados obtidos a partir das análises citogenética e molecular. Na análise molecular, dezessete casos evidenciaram amplificação para transcritos híbridos recorrentes e em nenhum deles foi identificada a translocação correspondente (Tabela 6, pg 52). No entanto, sabe-se que a translocação t(12;21)(p13;q22), que origina o gene de fusão *TEL/AML1*, detectado em dez casos, é de difícil identificação por análise citogenética convencional (Armstrong & Look, 2005), sendo considerada um rearranjo críptico. Dentre os dez casos, em três não houve crescimento da cultura (91, 102 e 130), em três foi identificado cariótipo normal (55, 88 e 110), três não foram analisados (103, 121 e 131) e um apresentou hiperdiploidia (88). Neste último caso, trata-se da ocorrência simultânea de dois fatores de bom prognóstico, fato extremamente infrequente também relatado por Attarbaschi e colaboradores, em 2004.

Em relação aos casos nos quais foram detectados os transcritos *BCR/ABL* do tipo p190 (105) e *MLL/ENLAI* (29), em ambos, a análise citogenética não foi possível devido ao não crescimento da cultura. Entre os cinco casos com amplificação do transcrito *E2A/PBX1*, em

três foi identificado cariótipo normal (3, 66 e 77), em um não houve crescimento da cultura (80) e em um (6) foi identificada deleção no braço longo do cromossomo um, o que pode estar relacionado à presença da translocação $t(1;19)(q23;p13)$, que origina o gene híbrido *E2A/PBX1*.

Foram identificados dois casos (10 e 33) nos quais foi detectada a translocação $t(9;22)(q34;q11)$, o cromossomo Philadelphia, na análise citogenética e não foi observada amplificação do transcrito correspondente, *BCR/ABL*, na análise molecular. Considerando-se que, em ambos os casos, as análises foram realizadas repetidas vezes e que foram pesquisados os dois tipos de transcrito *BCR/ABL* (p190 e p210), utilizando-se controles positivos, é possível sugerir que a translocação $t(9;22)$ tenha resultado na formação de gene híbrido, onde outros genes, diferentes de *BCR* e *ABL*, estejam fusionados ou que, pelo menos, um deles não esteja comprometido na translocação, não possibilitando a formação do gene híbrido *BCR/ABL*, o que explicaria a ausência de amplificação. Há relatos de rearranjo do gene *BCR* com outros genes, como o *JAK2* (*janus kinase 2*), em leucemia mielóide aguda (Cirmena *et al*, 2008).

Por outro lado, deleções submicroscópicas de genes comprometidos com alterações cromossômicas recorrentes ocorrem com frequência nas doenças hematológicas. No entanto, pelo fato de as mesmas não serem detectadas por meio da análise citogenética convencional, a verdadeira incidência destas deleções não é conhecida, com exceção de casos de leucemia mielóide crônica, com rearranjos *BCR/ABL* (Moon *et al*, 2007). Moon e colaboradores, ao utilizarem a técnica de FISH para identificar a incidência de deleções submicroscópicas em alterações recorrentes em leucemias, relataram, entre outros, 19% desta alteração em pacientes com LMC e positivos para a fusão *BCR/ABL* (*major*), mas não em casos de LLA (*minor*). As deleções são mais comuns em pacientes com cromossomo Philadelphia variante e que elas são muito raras em casos de LLA (Huntly *et al*, 2001; Reid *et al*, 2002). Os autores sugerem que existe maior probabilidade de ocorrência de deleções no caso da translocação na qual está comprometido o ponto de quebra *major*, o que explicaria a maior ocorrência destas alterações em casos de LMC, o que está de acordo com relatos da literatura (Kolomietz *et al*, 2001; Moon *et al*, 2007). Considerando que deleções submicroscópicas estão associadas a diferentes rearranjos cromossômicos, é possível que o mecanismo para formação da deleção seja dependente da natureza das seqüências que flanqueiam as regiões de pontos de quebra das translocações. Sabendo-se que seqüências *Alu* são conhecidas por facilitar o processo de recombinação, Kolomietz e colaboradores pesquisaram a distribuição de repetições *Alu* nas regiões dos pontos de quebra, referentes a diferentes rearranjos, encontrando alta densidade

destas seqüências nas regiões de pontos de quebra dos genes *BCR* e *ABL*, o que gerou a sugestão de que deleções submicroscópicas ocorrem em regiões com repetições de seqüências *Alu*. Sugere-se ainda que estas deleções podem acarretar a haploinsuficiência de um ou mais genes, o que pode influenciar na progressão da doença (Kolomietz *et al*, 2001).

Em raros casos pode ocorrer, em leucemia mielóide crônica, um transcrito híbrido resultante da fusão entre o exon 2 do gene *ABL* e o exon 19 do *BCR*, causada pela quebra na região *micro* de *BCR* (μ -*bcr*), entre os exons 19 e 20, que teria como consequência a amplificação do transcrito *BCR/ABL* c3-a2, de maior extensão, cuja proteína teria 230 KDa (van Dongen *et al*, 1999). Considerando que o *primer* A1 anela no exon 13 do gene *BCR*, o mesmo par de *primer* (A1 + B) utilizado para detecção dos transcritos dos tipos b3-a2 e b2-a2, referentes à proteína p210, possibilitaria a identificação, evidenciando um fragmento de maior tamanho no gel, o que não ocorreu.

Há também relatos sobre a ocorrência de pontos de quebra em regiões diferentes das anteriormente citadas (*major*, *minor* e *micro*), compreendendo os íntrons 2, 5, 6, 8 e 10 (Melo, 1996). No entanto, o *primer* A2, utilizado, em ambos os casos em questão, conjuntamente com o *primer* B para detecção do transcrito *BCR/ABL* e1-a2 (p190), anela no exon 1 do gene *BCR*, região portanto, anterior aos referidos íntrons. Deste modo, caso o transcrito híbrido fosse resultante de quebra no gene *BCR* em diferentes regiões, este par de *primer* (A2 + B) possibilitaria a sua amplificação.

Pesquisas adicionais seriam necessárias, como a análise por meio da técnica de FISH, com uso de sondas específicas para os genes *BCR* e *ABL*, a fim de comparar os resultados com a análise molecular, confirmando ou não a ausência de formação do transcrito. O seqüenciamento da amostra seria também importante para identificar possíveis deleções submicroscópicas ou mutações pontuais que estariam impedindo o completo anelamento de *primers* e, conseqüentemente, a amplificação.

A análise citogenética, no subtipo LLA B, em 50% (44/88) dos casos não foi realizada, sendo que em cerca de 72,72% destes (32/44) devido ao não crescimento da cultura, enquanto que, no subtipo LMA, a mesma análise não foi realizada em cerca de 17% (6/34), e em quatro dos seis por não crescimento da cultura (Tabelas 3 e 7, pag. 51 e 54). Este fato revela maior dificuldade de obtenção de material de qualidade para a análise citogenética em casos de LLA B, conforme relatado na literatura (Pallisgaard *et al*, em 1998; Pombo de Oliveira, 2008) e evidencia a importância da realização do exame molecular, com o objetivo de garantir o diagnóstico das alterações genéticas recorrentes. No presente trabalho, por

exemplo, em dezessete casos de LLA B, as alterações foram detectadas apenas na análise molecular.

Em relação aos cinco casos de LMA nos quais foi detectado o transcrito *AML1/ETO*, em três deles (57, 90 e 96) foi identificada a translocação $t(8;21)(q22;q22)$ e, em dois (38 e 52), cariótipo normal. A ausência de resultado positivo na análise citogenética pode dever-se à baixa porcentagem de células do clone no grupo de células analisadas.

Nos três casos nos quais foi identificado o transcrito *CBF β /MYH11*, na análise citogenética observou-se cariótipo normal. A alteração cariotípica referente à inversão $inv(16)$ é de natureza sutil e de difícil detecção por meio da citogenética convencional, principalmente quando sua presença não é suspeitada pelos achados morfológicos. Por estas razões, o resultado positivo na análise molecular e negativo na citogenética não é um achado incomum. Ritter e colaboradores, ao identificarem o transcrito de fusão *CBF β /MYH11* em casos cuja análise citogenética revelou cariótipo normal, já haviam sugerido que a técnica de PCR é a melhor indicada para detectar a inversão $inv(16)$ (Ritter *et al*, 1997).

O transcrito *PML/RAR α* foi identificado em três casos. Em um (39) deles a análise citogenética não foi realizada e em dois (83 e 107) foi observado cariótipo normal. Há também relatos a respeito da melhor eficiência da técnica molecular na detecção deste transcrito (Jurgen *et al*, 1998) (Tabela 10, pg.55)

Nos casos de LMC, os resultados obtidos a partir das análises molecular e citogenética foram concordantes, tendo sido encontrados o transcrito *BCR/ABL* e o cromossomo Philadelphia referente à translocação $t(9;22)(q34;q11)$, respectivamente, nos quatro casos (5, 58, 72 e 113). Em relação aos casos de leucemia bifenotípica, nos quais foi observada ausência de amplificação para o transcrito *BCR/ABL*, também não foi identificada, na análise citogenética, a translocação correspondente.

A análise molecular por RT-PCR foi realizada em todas as amostras, incluindo aquelas inadequadas para a análise citogenética, as criopreservadas e as com pouca celularidade, revelando-se, no presente trabalho, como ferramenta ideal para a detecção de transcritos híbridos, sendo mais sensível e mais específica que a citogenética por identificar a presença de rearranjos gênicos em amostras nas quais o resultado citogenético foi negativo, bem como a ausência de importantes rearranjos gênicos em pacientes com translocações citogeneticamente idênticas, casos nos quais foi detectada a translocação $t(9;22)$ e ausência do transcrito *BCR/ABL*. Alterações crípticas, a ausência de crescimento da cultura e, por vezes, a baixa porcentagem de células do clone no grupo de metáfases analisadas foram fatores que contribuíram para a dificuldade de realização de boa análise cariotípica. No entanto, ela

contribuiu para a identificação de alterações numéricas, alterações estruturais não recorrentes e pseudodiploidia sem transcrito correspondente, como exemplificado em 19 casos entre 88 de LLA B, em seis entre 34 de LMA e em um entre sete de leucemia bifenotípica. Os dados confirmam a necessidade da combinação das análises citogenética e molecular com o objetivo de tornar mais eficiente e completa a pesquisa de alterações genéticas nas leucemias da infância.

6.4 Etiologia infecciosa para LLA

A baixa frequência (21,21%) para o transcrito *TEL/AML1* identificada no presente trabalho, no ano de 2007, (Tabela 5, pg.52) assemelha-se aos dados anteriormente publicados (20%) em relação às crianças no Distrito Federal (Magalhães *et al*, 2000) sendo, porém, inferior à média de 25% relatada na literatura. Apesar de já ter sido identificada diversidade geográfica em relação à frequência de ocorrência do transcrito *TEL/AML1* (Sawinska & Ladón, 2004), é fato que a grande maioria dos relatos na literatura refere-se a dados obtidos em países industrializados, como EUA (Armstrong & Look, 2005; Rubnitz *et al*, 2008; Pui *et al*, 2008), Canadá (Abdelhaleem, 2007) e países da Europa (Cavé *et al*, 1997), cujas realidades podem não ser representativas do que ocorre em outros países.

Ao realizar análise comparativa de relatos de diferentes países a respeito da frequência encontrada para o transcrito *TEL/AML1*, verifica-se grande variação nos valores, o que pode ser real, mas não se descarta a possibilidade da influência da falta de padronização dos estudos (Listagem 3, pg.74). Compreende-se que a realização da análise molecular exige integridade do material a ser pesquisado e que, principalmente quando trabalhos são realizados de forma retrospectiva, muitas vezes não é possível resgatar um número representativo de casos. O congelamento da amostra pode comprometer a qualidade do material, não permitindo obtenção de RNA viável. Observa-se, no entanto, a falta de informação a respeito do número total de casos registrados no período de análise, que também é omitido com frequência, ocorrendo que as amostras disponíveis passam a ser consideradas como o total referente àquele período e as amostras inviáveis para análise são desconsideradas. Os resultados assim obtidos podem levar a conclusões incorretas com respeito à real frequência dos transcritos. A diferença entre a verdadeira incidência e o número de casos analisados pode ser ilustrada pelo trabalho realizado na Índia, por Hill e colaboradores, durante um período de seis anos, quando 308 casos pediátricos foram registrados, mas apenas 42 (13,64% do total) foram disponibilizadas para análise (Hill *et al*, 2005). Deve-se considerar a possibilidade de que, nesta amostra, a frequência encontrada para o transcrito

TEL/AML1 (4,8%) seja representativa do que ocorre em um todo, todavia, a informação completa permite melhor comparação entre diferentes trabalhos. Por exemplo, em estudo conduzido na Espanha, durante um período de sete anos, 42 casos foram analisados obtendo-se frequência de 17%, não havendo, contudo, informação a respeito do número total de casos registrados naquele período, o que diminui a credibilidade em relação ao dado obtido (Martinez-Ramírez *et al*, 2001). Vários autores limitam-se a mencionar o período em que o trabalho foi realizado e a identificação da frequência a partir de amostras disponíveis (Shaker *et al*, 2001; Tsang *et al*, 2001; Gill *et al*, 2005; Artigas *et al*, 2006). Em outros, não há a informação a respeito do período de análise (Jiménez-Morales *et al*, 2008; Tiensiwakul, 2004) e há aqueles que informam que a pesquisa foi realizada em amostras selecionadas (Spathas *et al*, 1999; Veiga *et al*, 2004) (Listagem 3, pg.74).

No entanto, apesar da variação de abordagens utilizadas nos estudos realizados em diferentes países, o que pode comprometer uma análise comparativa, consideram-se os relatos como reais e representativos de cada país, sugerindo-se que a frequência do transcrito *TEL/AML1* esteja diretamente relacionada à incidência do subtipo LLA comum.

Neste sentido, é interessante notar que frequências mais baixas são identificadas, em sua maioria, em países menos industrializados como: Índia (4,8%) (Hill *et al*, 2005), México (9,6%) (Jiménez-Morales *et al*, 2008), Egito (11,6%) (Shaker *et al*, 2001), Argentina (11,6%) (Alonso *et al*, 2006), Tailândia (12%) (Tiensiwakul, 2004), China (17,9%) (Tsang *et al*, 2001), Taiwan (19%) (Liang *et al*, 2002) e Malásia (20,2%) (Gill *et al*, 2005). Enquanto que, os valores mais altos são encontrados em países industrializados como: Itália (22%) (Borkhardt *et al*, 1997), Chile (23,2%) (Artigas *et al*, 2006), Áustria (25%) (Attarbaschi *et al*, 2004), Canadá (26,15%) (Abdelhalem, 2007), Estados Unidos (26,34%) (Rubnitz *et al*, 2008), França (35,2%) (Cavé *et al*, 1997), Inglaterra (39%) (Codrington *et al*, 2000) e Jerusalém (40%) (Yehuda-Gafni *et al*, 2002) (Listagem 3, pg.74).

De fato, há relatos de que a forma comum da LLA, que inclui todos os casos de *TEL/AML1*, tem baixa incidência em países menos industrializados (Greaves *et al*, 1993) e que o risco de desenvolver esta doença aumenta com o nível sócio-econômico (Greaves & Alexander, 1993), o que leva à hipótese de que este tipo de câncer pediátrico estaria associado a melhores condições de vida e, talvez, a padrões alterados de infecção na infância (Greaves, 1997). Na Índia, onde parece existir um déficit de casos de LLA comum, a frequência de casos com *TEL/AML1* dentro daqueles classificados como LLA de linhagem precursora B também parece estar reduzida (Inamdar *et al*, 1998).

No Brasil, poucos são os trabalhos que relatam a frequência do transcrito *TEL/AML1* e, baseando-se nestes, diferentes valores são observados, sendo 21% no Distrito Federal (presente trabalho), 25% em Campinas (Yunes, comunicação pessoal, 2007) e 40% no Paraná (Veiga *et al*, 2004). Há, no entanto, em relação à região Sul, outro trabalho, também realizado com a técnica de FISH, que relata valor distinto e muito inferior (19%) (Zen *et al*, 2004) ao de 40%, anteriormente citado para o Paraná. Esta diferença pode estar relacionada ao número reduzido de casos analisados e à seleção destes para pesquisa.

Devido à extensão continental do Brasil e a diferentes graus de industrialização entre as regiões, são notáveis as diferenças de realidades, que se refletem na existência de grupos sociais que apresentam padrões de vida extremos. O processo de industrialização produziu uma ampla variedade de novas exposições ambientais, padrões alimentares, estilos de vida, padrões de família, concentração populacional que, no entanto, não substituiu completamente as condições de um país pré-industrializado (Pombo de Oliveira *et al*, 2009). Fato que contribui para a coexistência de populações que vivem em situação de miséria, em absoluta ausência de condições básicas de educação, higiene e saúde, com aquelas de alto padrão sócio-econômico, assemelhando-se às de países industrializados. Neste sentido, é possível considerar que podem ocorrer, entre diferentes regiões do Brasil, assim como ocorrem entre diferentes países, taxas distintas de incidência da leucemia (Reis *et al*, 2007) e, conseqüentemente das alterações genéticas recorrentes, o que pode, pelo menos em parte, explicar as diferenças encontradas em relação às frequências dos transcritos. De fato, Córdoba, em 2008, ao realizar estudo epidemiológico descritivo de causas de leucemias agudas na infância no Distrito Federal, cita que “a melhoria da assistência médica e dos níveis sócio-econômicos no Brasil, resultou na redução da taxa de mortalidade infantil por leucemia, no Distrito Federal, mas não no aumento da incidência desta doença aos níveis encontrados em países desenvolvidos” (Córdoba, 2008 dados não publicados).

A mediana de idade encontrada para os casos positivos de *TEL/AML1* (4,6 anos) (Tabela 5, pg.52) apresenta-se dentro do pico identificado para esta doença (Greaves, 2006). No entanto, a mediana à época do diagnóstico para leucemia linfoblástica aguda, no grupo estudado, foi de 6,7 anos, o que pode estar refletindo ocorrência mais tardia da doença.

A comparação da frequência relativa de diferentes subtipos de leucemia em relação ao sexo, idade, etnia e condições sociais tem demonstrado consistentes diferenças observadas em crianças residentes em diferentes regiões do mundo, o que parece sugerir que o risco de desenvolvimento de diferentes doenças é devido à complexa interação entre diferentes fatores de risco ambientais ou estilos de vida (Greaves *et al*, 1993). Estudos epidemiológicos têm

contribuído para o entendimento da etiologia da leucemia pediátrica ao analisar associações entre genética, infecções e outros fatores ambientais (Belson *et al*, 2007).

O contato com agentes infecciosos e, então, com estímulos, no primeiro ano de vida, mesmo quando a criança ainda é tolerante, isto é, não tem capacidade de resposta como, por exemplo, de produzir anticorpos e, conseqüentemente, de se defender, é importante, pois exerce a função de estímulo para a ativação do sistema imunológico (Parslow *et al*, 2004; Abbas *et al*, 2007). Ao considerar o processo infeccioso tardio como promotor da segunda alteração genética, Greaves baseou-se no argumento de que exposição a agentes infecciosos nos primeiros meses de vida é essencial para a organização adaptativa do sistema imune permitindo eficiente resposta a futuras exposições (Greaves, 1997). Desta forma, ameniza-se um possível “estresse” imunológico que poderia ser decorrente de infecção tardia, aquela ocorrida após o primeiro ano de vida, pois parece que o contraste entre a ausência de estímulo durante o primeiro ano de vida, conseqüente de um “isolamento social”, e a subseqüente exposição e contato com diversos agentes infecciosos após esse período, pode ser o fator responsável pela resposta anômala do sistema imune, que propicia um “estresse” proliferativo.

Diferenças no nível sócio-econômico, uso de creches, número de filhos, acesso à educação, saneamento básico, condições de higiene e saúde, índice de aleitamento materno, peso ao nascimento, entre outras questões, podem caracterizar padrões de vida distintos observados entre populações presentes em países mais e menos industrializados, refletindo em maior ou menor grau de isolamento social, respectivamente. A ausência ou diminuição da exposição a agentes infecciosos no primeiro ano de vida é característica de sociedades “higiênicas”, presentes em países mais industrializados.

De acordo com Greaves, maior exposição a infecções comuns no primeiro ano de vida, situação mais freqüente em países menos industrializados, exerceria efeito protetor contra o desenvolvimento de um processo leucêmico (Greaves, 1997). Assim, sobre crianças com leucemia, quando comparadas a casos controle, devem ser relatados, no primeiro ano de vida, menor contato social e potencial para exposição a agentes infecciosos e menor número de episódios infecciosos comuns (Greaves, 2006).

É relatada, na literatura, associação inversa entre o uso de creches e parquinhos e o risco de desenvolvimento de leucemia pediátrica. Há evidências de que o contato social com outras crianças, nos primeiros meses de vida, aumenta a chance de aquisição de infecções comuns e que a probabilidade de ocorrência destas infecções está relacionada ao número de crianças no grupo social e à freqüência de participação nesse grupo. Esse contato, que é o

inverso do isolamento social, forneceria proteção significativa contra LLA pediátrica (Infante-Rivard *et al*, 2000; Petridou *et al*, 2001; Gilham, 2005).

Ressalta-se que em dois estudos realizados na França, não houve distinção entre os diferentes tipos de leucemias agudas e que ambos sustentam a hipótese de que infecções comuns no primeiro ano de vida devem exercer efeito protetor contra a leucemia aguda pediátrica de forma geral, não sendo este efeito específico para casos de LLA comum (Perrillat *et al*, 2002; Jourdan-Da Silva *et al*, 2004). Neste sentido, é interessante notar que, apesar de menos freqüente, há relatos de origem pré-natal para as principais alterações recorrentes ocorridas na leucemia mielóide aguda: *AML1/ETO* (Wiemels *et al*, 2002), *PML/RAR α* e *CBF β /MYH11* (McHale *et al*, 2003). No caso da fusão *AML1/ETO*, há registros de latência pós-natal prolongada, uma vez que o diagnóstico da leucemia ocorreu quando a crianças tinha dez anos de idade. Estes dados indicam que outras alterações, como as recorrentes em leucemia mielóide aguda, também podem ocorrer *in utero* possivelmente caracterizando um evento inicial na LMA e devem conferir estabilidade ao clone parental, que exige alterações genéticas secundárias adicionais para o desenvolvimento da leucemia. Estas considerações levantam a possibilidade de que uma etiologia infecciosa possa estar também relacionada à leucemia mielóide aguda.

Ter irmãos mais velhos no primeiro ano de vida exerce efeito protetor entre crianças diagnosticadas aos quatro anos ou mais (Infante-Rivard *et al*, 2000). Há relatos contrários, segundo os quais ser o quarto ou mais na ordem de nascimento está associado a risco significativamente aumentado de desenvolver leucemia (Dockerty *et al*, 2001). No entanto Greaves, argumenta que o estudo foi realizado com número reduzido de casos referentes a diferentes tipos de leucemia e que a impossibilidade de afirmação da hipótese de uma etiologia infecciosa a partir dos dados obtidos contribuiu para a sua negação (Greaves, 2001).

Associação positiva entre o alto peso ao nascimento e o risco aumentado para leucemia pediátrica tem sido relatada em países industrializados (Hjalgrim *et al*, 2003). Em recente estudo realizado no Brasil, registrou-se associação entre este fator e casos de lactentes positivos para rearranjos com o gene *MLL*, mas não para os casos negativos (Koifman *et al*, 2008).

Tem sido demonstrado que o aleitamento materno, principalmente num período superior a seis meses, também exerce efeito protetor contra o desenvolvimento da leucemia pediátrica (McNally & Eden, 2004; Martin *et al*, 2005). Nos países não industrializados, as mulheres de classes menos favorecidas, de baixo e médio poder aquisitivo, amamentam mais que as de melhor nível sócio-econômico (Faleiros *et al*, 2006).

Na contínua ausência de evidência direta para identificar uma possível infecção causal para a LLA pediátrica, Taylor e colaboradores, em diferentes estudos, avaliaram, em crianças diagnosticadas com LLA, o polimorfismo de alelos de antígeno leucocitário humano (HLA) classe II, a fim de identificar marcadores funcionais da resposta imune que, potencialmente, poderiam estar influenciando na susceptibilidade para desenvolver LLA pediátrica. Foi verificada, em pacientes pediátricos portadores de LLA, maior frequência dos alelos HLA-DPB1*0201 (Taylor *et al*, 2002) e DPB*0601 (Taylor *et al*, 2009), quando comparados com crianças sem leucemia, e que outros alelos, como DPB1*0101, parecem proporcionar proteção contra a doença (Taylor *et al*, 2008). Os autores sugerem a ocorrência de mecanismo de susceptibilidade imunogenética (Taylor *et al*, 2009).

Diferentes enzimas estão relacionadas à bioativação e detoxificação de xenobióticos presentes em alimentos, solventes orgânicos, tabaco, drogas, bebidas alcoólicas, pesticidas e poluentes ambientais. No Brasil, Canalle e colaboradores ao investigarem a relação entre o polimorfismo dos genes codificadores destas enzimas e a ocorrência da leucemia pediátrica, encontraram que a presença (glutathione S transferase P1) GDTP1 confere alto risco de desenvolvimento da LLA pediátrica (Canalle *et al*, 2004).

É possível considerar que diferentes fatores, como a heterogeneidade étnica, a infecção tardia e a susceptibilidade genética individual, estejam atuando simultaneamente na etiologia da leucemia pediátrica e contribuindo conjuntamente para as diferenças observadas em relação às frequências de ocorrência de rearranjos cromossômicos no presente trabalho.

Listagem 3. Frequência do transcrito *TEL/AML1* por localização geográfica, em ordem crescente de frequência.

Referência	Período	País-cidade	Técnica	N	%
Sazawal <i>et al</i> , 2004	Não menc.	Índia- nova Delhi	RT-PCR	35	0%
Hill <i>et al</i> , 2005	1996 a 2000	Índia- Kerala	RT-PCR	42	4,80%
Jiménez-Morales <i>et al</i> , 2008	Não menc.	México- Cid.México	RT-PCR	52	9,6%
Shaker <i>et al</i> , 2001	1999 a 2000	Egito- Cairo	RT-PCR	60	11,6%
Alonso <i>et al</i> , 2006	2002 a 2005	Argentina	RT-PCR	129	11,6%
Tiensiwakul, 2004	Não menc.	Tailândia- Bangkok	RT-PCR	25	12,0%
Spathas <i>et al</i> , 1999	Não menc.	UK- Glasgow	FISH	31	13,0%
Park <i>et al</i> , 2001	Não menc.	Koréia do Sul- Seul	FISH	30	13,3%
Yoshiyuki <i>et al</i> , 1998	Não menc.	Japão	RT-PCR	144	16,0%
Martinez-Ramírez <i>et al</i> , 2001	1995 a 2001	Espanha- Madri	FISH +RT-PCR	42	17,0%
Tsang <i>et al</i> , 2001	1995 a 2000	China- Hong Kong	RT-PCR	65	17,9%
Liang <i>et al</i> , 2002	Não menc.	Taiwan- Taipei	RT-PCR	41	18,0%
Zen <i>et al</i> , 2004	Não menc.	Brasil – Rio Grande do Sul	FISH	58	19,0%
Magalhães <i>et al</i> , 2000	Não menc.	Brasil- DF + RJ	RT-PCR	60	20,0%
Ozbek <i>et al</i> , 2003	Não menc.	Turquia- Istambul	RT-PCR	219	20,1%
Gill <i>et al</i> , 2005	1999 a 2002	Malásia- Kuala Lumpur	RT-PCR+ FISH	84	20,2%
Harbott <i>et al</i> , 1997	1996	Alemanha- Berlim	RT-PCR	204	21,0%
Mesquita <i>et al</i> , 2009	2005 a 2007	Brasil- DF	RT-PCR	88	21,21%
Zuna <i>et al</i> , 1999	1995 a 1998	Rep. Theca- Praga	RT-PCR	190	21,6%
Borkhardt <i>et al</i> , 1997	1995 a 1996	Itália- Milão	RT-PCR	334	22,0%
Artigas <i>et al</i> , 2006	2000 a 2003	Chile- Temuco/ Santiago	RT-PCR	56	23,2%
Attarbaschi <i>et al</i> , 2004	1990 a 1999	Austria- Viena	FISH	372	25,0%
Abdelhalem, 2007	2001 a 2006	Canadá- Toronto	RT-PCR	260	26,15%
Rubnitz <i>et al</i> , 2008	1995 a 1998	EUA- Memphis	RT-PCR	926	26,34%
Amor <i>et al</i> , 1998	Não menc.	Austrália	RT-PCR	66	33,0%
Cavé <i>et al</i> , 1997	Não menc.	França- Paris	RT-PCR+ FISH	125	35,2%
Codrington <i>et al</i> , 2000	Não menc.	Inglaterra	RT-PCR	56	39,0%
Veiga <i>et al</i> , 2004	1993 a 2002	Brasil – Paraná	FISH	30	40,0%
Yehuda-Gafni <i>et al</i> , 2002	Não menc.	Israel- Jerusalém	FISH	15	40,0%

7. CONCLUSÕES

Foram as seguintes as conclusões deste estudo:

1. A implantação do método de RT-PCR para pesquisa de transcritos híbridos recorrentes em leucemia é factível e deve fazer parte dos exames realizados ao diagnóstico das leucemias, para maior precisão na identificação das alterações genéticas.
2. É possível realizar o diagnóstico molecular a partir de material criopreservado, bem como de amostra colhida com heparina. Deve-se atentar, no entanto, para as técnicas de criopreservação das amostras para se garantir a manutenção da viabilidade do RNA.
3. A análise molecular, por RT-PCR, foi considerada a técnica ideal para a detecção de transcritos híbridos, enquanto que a análise citogenética contribuiu para a identificação de alterações numéricas e alterações estruturais não recorrentes. As duas análises devem ser realizadas com o objetivo de tornar mais eficiente e completa a pesquisa de alterações genéticas nas leucemias da infância.
4. A realização da análise molecular é imprescindível nos casos de LLA, considerando a dificuldade de realização da análise citogenética neste subtipo de leucemia, bem como para a identificação dos transcritos *TEL/AML1* e *E2A/PBX* e, em casos de LMA, dos transcritos, *CBF β /MYH11* e *PML/RAR α* .
5. A frequência do transcrito *TEL/AML1* (21,21%) assemelha-se aos dados anteriormente obtidos no Distrito Federal (20%) e é inferior à média relatada na literatura (25%), provavelmente devido a diferenças na heterogeneidade étnica do grupo estudado.
6. É possível considerar que a coexistência, no Brasil, de padrões de vida de países industrializados e daqueles em processo de industrialização, com menor e maior grau de exposição a agentes infecciosos, esteja resultando em variação referente aos valores obtidos para os transcritos pesquisados.

7. É possível considerar que diferentes fatores, como a heterogeneidade étnica, a infecção tardia e a susceptibilidade genética individual, estejam atuando simultaneamente na etiologia da leucemia pediátrica e contribuindo conjuntamente para as diferenças observadas em relação às frequências de ocorrência de rearranjos cromossômicos no presente trabalho.

8. PERSPECTIVAS

1. Tendo em vista a questão da susceptibilidade genética na etiologia da leucemia pediátrica, é válido considerar a possibilidade de se avaliar o padrão de expressão de genes de imunoproteassoma em casos de leucemia.

2. Considerando que as unidades de saúde que realizam exames para diagnóstico genético das alterações recorrentes em leucemia estão concentradas nas regiões Sul e Sudeste e a existência de vínculo profissional entre a autora do trabalho e uma Instituição Federal de Ensino no Amazonas (CEFET-AM), vislumbra-se a possibilidade de implantar, na cidade de Manaus, uma unidade para diagnóstico genético em leucemias.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, AK, Lichtman, AH, Pobe, JS. *Biologia Celular e Molecular*. Revinter; Rio de Janeiro 2007.
- Abdelhalem M. Frequente but nonrandom expression of myeloid markers on *de novo* childhood acute lymphoblastic leukemia. *Experimental and molecular Pathology* 2007; 83:138-141.
- Alcalay M, Orleth a, Sebastiani C, Meani N, Chiaradonna F, Casciari C, Scirpi MT, Gelmetti V, Riganelli D, minucci S, Fagioli M, Pelicci PG. Common themes in the pathogenesis of myeloid leukemia. *Oncogene* 2001;20:5680-5694.
- Aldrich MC, Zhang L, Wielmels JL, Ma X, Loh ML, Metayer C, Selvin S, Feusner J, Smith MT and Buffler PA. Cytogenetics of Hispanic and White Children with Acute Lymphoblastic Leukemia in California. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(3):578-581.
- Alexander FE, Patheal SI, biondi A, Brandalise S, Cabrera M-E, Chan LC, Chen A, Cimino G, Córdoba JC, Gu L-J, Hussein H, Ishii E, Kamel AM, Labra S, Magalhães IQ, Mizutani S, Petridou E, Pombo de oliveira, MS, Yuen Patrick, Wielmels JL and Greaves MF. Transplacental Chemical Exposure and Risk of Infant Luekemia with MLL Gene Fusion. *Cancer Research* 2001;61:2542-2546.
- Alonso CN, Gallego MS, Alfaro EM, Rossi JG, Maria S. Caracterización molecular em leucemia linfoblástica aguda pediátrica em uma instituição hospitalaria. *Hematologia (B. aires)* 2006;10(1):8-12.
- Amor DJ, Algar EM, Slater HR, Smith PJ. High frequency of t(12;21) in childhood acute lymphoblastic leukemia detected by RT-PCR. *Pathology* 1998;30(4):381-385.
- Andersen MK, Christiansen DH, Jensen BA, Ernst P, Hauge G, Pedersen-Bjergaard J. Therapy-related acute lymphoblastic leukaemia with *MLL* rearrangements following DNA topoisomerase II inhibitors, an increasing problem: report on two new cases and review of the literature since 1992. *British Journal of Haematology* 2001;114(3):539-543.
- Ariffin HM, Chen S-P, Kwok CS, Quah T-CM, Lin H-P, Yeoh AEJ and Malaysia-Singapore Leukemia Study Group. *Journal of Perdiatric Hematologic Oncology* 2007;29(1):27-31.
- Armstrong SA & Look T. Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2005;23:6306-6315.
- Artigas CG, Cabrera MA, Melo A, Páez E, Arriagada M, Estete C, Roa I, Roa JC. Frecuencia de los genes de fusión TEL/AML1 y BCR/ABL en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica agua. *Rev Méd Chile* 2006; 134:1367-1376.
- Attarbaschi A, Mann G, König M, Dworzak MN, Trebo MM, Mühlegger N, Gadner H and Haas OA. Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukemia: an interphase FISH analysis. *Leukemia* 2004;18:1611-1616.

Bain BJ, Barnett D, Linch D, Matutes E, Reilly JT. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clin. Lab. Haem.* 2002;24:1-13.

Barr FG. Translocations, cancer and the puzzle of specificity. *Nature Genetics* 1998;19:121-124.

Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. *Environmental Health Perspectives* 2007;115(1):138.

Bene MC, Bernier M, Casasnovas RO, Gastoldi G, Knapp W, Lanza F, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, Sperling C, Veer MB. The Reliability and specificity of c-kit for the Diagnosis of Acute Myeloid Leukemias and undifferentiated Leukemias. *Blood* 1998;92(2):596-599.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposal for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology* 1976;33(4):451-458.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103(4):620-625.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* 1991;78(3):325-329.

Bergantini APF, Castro FA, Souza AM, Fett-Conte AC. Lucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. *Rev. Bras Hematol Hemoter* 2005;27(2):120-125.

Bittencourt R, Fogliato L, Daudr L, Bittencourt HNS, Friederich JR, Fernandes F, Onsten T, Fassina K, Rocha LK, Moreno F, Silva G, Cruz MS, Garcia RG, Masnierky JC, Silla LMR. Leucemia Mielóide Água: perfil de duas décadas do Serviço do Hospital de Clínicas de Porto Alegre-RS. *Rev. Bras Hematol Hemoter* 2003;25(1):17-24.

Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, Valsecchi MG, Ludwig WD, Burci L, Mangioni S, Scharappe M, Riehm H, Lampert F, Basso G, Masera G, Harbott J, Biondi A. Incidence and Clinical Relevance of TEL/AML1 Fusion Genes in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia Enrolled in the German and Italian Multicenter Therapy Trials. *Blood* 1997;90(2):571-577.

Bottura C & Ferrari I. A simplified method for the study of chromosomes in man. *Nature* 1960;186: 904-905.

Braga PE, Latorre MRDO, Curado MP. Câncer na infância: análise comparativa da incidência, mortalidade e sobrevida em Goiânia (Brasil) e outros países. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro 2002;18(1):33-44.

Brenner MK & Pinkel D. Cure of leukemia. *Semin Hematol* 1999;36(4):73-83.

Butler LH, Slany R, Cui X, Cleary ML, Mason DY. The HRX Proto-oncogene Product Is Widely Expressed in Human Tissues and Localizes to Nuclear Structures. *Blood* 1997;89:3361-3370.

Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME, Hutz MH. Historical Genetics: Spatiotemporal Analysis of the Formation of the Brazilian Population. *American Journal of Human Biology* 2003;15:824–834.

Canalle R, Burim RV, Tone LG, Takahashi CS. Genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2004;43(2):100-109.

Castilla LH, Wijmenga C, Wang Q, Stacy T, Speck NA, Eckhaus M, Marín-Padilla M, Collins FS, Wynshaw-Boris A, Liu PP. Failure of embryonic hematopoiesis and lethal hemorrhages in mouse embryos heterozygous for a knocked-in leukemia gene CFBF-MYH11. *Cell* 1996;87(4):687-696.

Cavé H, Cacheux V, Raynaud S, Brunie G, Bakkus M, Cochaux P, Preudhomme C, Lai JL, Vilmer E, Grandchamps B. ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1997;11:1459-1464.

Chauffaille MLLF, Borri D, Marins SLR. Leucemia mielóide aguda t(8;21): frequência em pacientes brasileiros. *Rev. Bras Hematol Hemoter* 2004;26(2):99-103.

Chen W, Li Q, Hudson WA, Kumar A, Kirchhof N, Kersey JH. Amurine *Mll-AF4* knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy. *Blood* 2006;108: 669-677.

Cimino G, Rapanotti MC, Biondi A, Elia L, Lo Coco F, Price C, Rossi V, Rivolta A, Canaani E, Croce CM, Mandelli F, Greaves MF. Infant Acute Leukemias Show the Same Biased Distribution of ALLJ Gene Breaks As Topoisomerase II Related Secondary Acute Leukemias. *Cancer Research* 1997;57:2879-2883.

Cirmena G, Aliano S, Fugazza G, BruzzoneR, Garuti a, Bocciardi R, Baciagalupo a, Ravazzolo R, Ballestrero A, Sassarego M. A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11) in a patient with acute myeloid leukemia. *Câncer Genetics and Cytogenetics* 2008;183:105-108.

Codrington R, O'connor HE, Jalali GR, Carrara P, Papaioannou M, Hart SM, Hoffbrand AV, Michel P, Grant PH, Harrison CJ, Foroni L. Analysis of ETV6/AML1 abnormalities in acute lymphoblastic leukaemia: incidence, alternative spliced forms and minimal residual disease value. *British Journal of Haematology* 2000;111(4-II):1071-1079.

Cuneo A, Ferrant A, Michaux J-L, Demuyneck H, Boogaerts M, Louwagie A, Doyen C, Stul M, Cassiman J-J, Cin PD, Castoldi G, Herman Van den Berghe H. Philadelphia Chromosome-Positive Acute Myeloid Leukemia: Cytoimmunologic and Cytogenetic Features. *Haematologica* 1996; 81:423-427.

Curry JD, Glaser MC, Smith MT. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction detection and quantification of t(1;19)(E2A-PBX1) fusion genes associated with leukaemia. *British Journal of Haematology* 2001;115:826-830.

Deschler B & Lübbert M. Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology. *Cancer* 2006;107:2099-2107.

Devaraj PE, foroni L, Kitra-Roussos V, Secker-Walker LM. Detection of BCR-ABL and E2A-PBX1 fusion genes by RT-PCR in acute lymphoblastic leukemia with failed or normal cytogenetics. *British Journal of Haematology* 1995;89:349-355.

Dockerty JD, Draper G, Vincent T, Rowan SD, Bunch KJ. Case-Control study of parental age, parity and socioeconomic level in relation to childhood cancers. *International Journal of Epidemiology* 2001;30:1428-1437.

Downing JR: Molecular Genetics of Acute Myeloid Leukemia. In Pui C-H (Ed): Childhood Leukemias. Cambridge, United Kingdom, Cambridge University Press, 1999. Cap11, p.219-254.

Elagib KE and Goldfarb NA. Oncogenic pathways of AML1-ETO in acute myeloid leukemia: multifaceted manipulation of marrow maturation. *Cancer Lett.* 2007;251(2): 179-186.

Emerenciano M, bossa Y, Zanrosso CW, Alencar DM, Campos MM, Dopbbin J, Carriço K, Pombo de oliveira MS. Frequência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2004;50(3):183-189.

Emerenciano M, Arias DPA, Coser VM, Brito GD, MLM, Pombo de Oliveira MS. Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia. *Pediatric Blood & Cancer* 2006;47(5):549- 554.

Ernst P, Mabon M, Davidson AJ, Leonard I, Zon LI, Korsmeyer SJ. An *Mll*-Dependent *Hox* Program Drives Hematopoietic Progenitor Expansion. *Current Biology* 2004;14:2063-2069.

Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z. Clinical Significance of Cytogenetic Abnormalities in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 1998;91:3995-4019.

Falcão RP & Rego EM. Leucemia linfóide aguda em adultos e crianças. Características morfológicas e imunofenotípicas. *Ser. Monogr. Esc. Bras. Hematol* 2002;9:25-35.

Faleiros FTV, Trezza EMC, Carandina L. Aleitamento materno: fatores de influência na sua decisão e duração. *Rev. Nutr. Campinas* 2006;19(5):623-630.

Farias MG e Castro SM. Diagnóstico Laboratorial das Leucemias Linfóides Agudas. *Bras. Patol. Med. Lab* 2004;2:91-98.

Fazi F, Zardo G, Gelmetti V, Travaglini L, Ciolfi AI, Di Croce L, Rosa A, Bozzoni I, Grignani F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Nervi C. Heterochromatic gene repression of the retinoic acid pathway in acute myeloid leukemia. *Blood* 2007;109:4432-4440.

Feinstein PG, Kornfeld K, Hogness DS, Manr RS. Identification of Homeotic Target Genes in *Drosophila melanogaster* Including *neruy*, a Proto-Oncogene Homologue. *Genetics* 1995;140:573-586.

Ford AM, Fasching K, Panzer-Grümayer RP, Koeing M, Haas AO, Greaves MF. Origins of “late” relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL/AML1 fusion genes. *Blood* 2001;98(3):558-564.

Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB, Mel F. Greaves MF. Backtracking leukemia to birth: Identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:13950-13954.

Kaspers GJL & Zwaan CM. Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients. *Haematologica* 2007;92(11):1519-1532.

Gilham C, Peto J, Simpson J, Roman E, Eden TOB, Greaves MF, Alexander FE. Day care in infancy and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: findings from UK case-control study. *British Medical Journal* 2005;330:1294-1299.

Gill HK, Keoh TS, Dhaliwal JS, Moore S, Kim TS, Hassan R, Karim FA, Zakaria Z, Murad S, Mohamed M, Ho CML, Ibrahim H, Rahman EJA. TEL-AML1 frequency in multi-ethnic Malaysian pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2005;156:129-133.

Golub TR, Barker GF, Bohlandert SK, Hiebert SW, Wards DC, Bray-Wards P, Morganii E, Raimondi SC, Rowleyi JD, Gilliland DG. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995;92:4917-4921.

Greaves MF. Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1988;2(2):120-125.

Greaves MF, Colman SM, Beard ME, Bradstock K, Cabrera ME, Chen PM, Jacobs P, Lam-Po-Tang PR, MacDougall LG, Williams CK. Geographicall distribution of acute lymphoblastic leukaemia subtypes: second report of the collaborative group study. *Leukemia* 1993;7(1):27-34.

Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *The Lancet* 1997;349:344-349.

Greaves MF. Molecular Genetics, Natural History and the Demise of Childhood Leukaemia. *European Journal of Cancer* 1999;35(2):173-185.

Greaves MF. Commentary: Birth order and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *International journal of Epidemiology* 2001;30:1438-1439.

Greaves MF. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature* 2006;6:193-203.

Greaves MF & Alexander FE. An infectious etiology for common lymphoblastic leukemia in childhood? *Leukemia* 1993;7(3):349-360.

Greaves MF & Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nature* 2003;3:1-11.

Griffiths AJF. Introdução à Genética. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2002. 7^a.ed. 794pp.

Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 2001; 98:1312-1320.

Haase D, Feuring-Buske M, Konemann S, Fonatsch C, Troff C, Verbeek W, Pekrun A, Hiddemann W, Wormann B. Evidence for malignant transformation in acute myeloid leukemia at the level of early hematopoietic stem cells by cytogenetic analysis of CD34+ subpopulations. *Blood* 86: 2906-2912.

Haferlach T, Wolfgang K, Schnittger S, Schoch C. Modern diagnosis in acute leukemias. *Oncology Hematology* 2005; 56, Issue 2, Pages 223-234.

Hanson CA, Abaza M, Sheldon S, Ross CW, Schnitzer B, Stoolman LM. Acute biphenotypic leukaemia: immunophenotypic and cytogenetic analysis. *British Journal of Haematology* 2008;84(1):49-60.

Harbott J, Viehmann S, Borkhardt A, Henze G, Lampert F. Incidence of TEL/AML1 Fusion Gene In Children With Acute Lymphoblastic Leukemia In Relapse. *Blood* 1997;90(12):4933-4937.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting—Airlie House, Virginia, 1997. *Journal of Clinical Oncology* 1999;17(12):3835-3849.

Harrison CJ & Foroni L. Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2002;6(2):91-107.

Head DR & Pui C-H: Diagnosis and Classification. In: Pui C-H (Ed): Childhood Leukemias. Cambridge, United Kingdom, Cambridge University Press, 1999. Cap2, p.19-37.

Heerema NA, Arthur DC, Sather H, Albo V, Feusner J, Lange BJ, Steinherz PG, Zeltzer P, Hammond D, Reaman GH. Cytogenetic features of infants less than 12 months of age at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia: impact of the 11q23. *Blood* 1994; 83: 2274-2284.

Hilden JM, Dinndorf PA, Meerbaum SO, Sather H, Vilaluna D, Heerema NA, McGlennen R, Smith FO, Woods WG, Salzer WL, Johnstone HS, Dreyer Z, Reaman GH. 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.

Hill A, Short MA, Varghese C, Kusumakumary P, Kumari P, Morgan GJ. The t(12:21) is underrepresented in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia in Kerala, Southern India. *Haematologica* 2005; 90(3):414-415.

Hjalgrim LL, Westergaard T, Rostgaard K, Schmiegelow K, Melbye M, Hjalgrim H, Engels EA. Birth Weight as a Risk Factor for Childhood Leukemia: A Meta-Analysis of 18 Epidemiologic Studies. *American Journal of Epidemiology* 2003; 158(8):724–735.

Hoffbrand, AV & Pettit, J. Atlas Colorido de Hematologia Clínica. Manole; São Paulo 2001;

Huntly BJP, Reid AG, Bench AJ, Campbell LJ, Shepher P, Szer J, Prince M, Turner P, Grace C, Nacheva EP, Green AR. Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2001;98(6):1732-1738.

Infante-Rivard C, Fortieri I, Olson E. Markers of infection, breast-feeding and childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Cancer* 2000;83(11):1559-1564.

Jennings CD & Foon KA. Recent Advances in Flow Cytometry: Application to the Diagnosis of Hematologic Malignancy. *Blood* 1997;90(8):2863-2892.

Jiménez-Morales S, Miranda-Peralta E, Saldaña-alvarez Y, Perz-Vera P, Paredes-Aguilera R, Rivera-Luna R, Velásquez-Cruz R, Ramírez-Bello J, Carnevale A, Orozco L. *BCR-ABL*, *ETV6-RUNX1* and *E2A-PBX1*: prevalence of the most common acute lymphoblastic leukemia fusion genes in Mexican patients. *Leukemia Research* 2008;32:1518-1522.

Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ & White RL. Genética Médica, Rio de Janeiro, Elsevier Ltda 2004.

Jourdan-Da Silva N, Perel Y, Méchinaud F, Plouvier E, Gandemer V, Lutz P, Vannier JP, Lamagnère JL, Marguerite G, Boutard P, Robert A, Armar C, Munzer M, Millot F, Lumley L, Berthou C, Rialland X, Pautard B, Hémon D, Clavel J. Infectious diseases in the first year of life, perinatal characteristics and childhood acute leukaemia. *British Journal of Cancer* 2004;90:139-145.

Jurgen K; Wolfgang P, Ulrich P, Barbara H, Lothar B, Dieter H, Michael L, Gunther S, , Renate A, Hartmut K, Maria P, Arnold G, Gerhard H. Detection of karyotypic aberrations in acute myeloblastic leukaemia: a prospective comparison between PCR/FISH and standard cytogenetics in 140 patients with de novo AML. *British Journal of Haematology* 1998;103(1):72-78.

Kellett CE. Acute Myeloid Leukaemia in One of Identical Twins. *Archives of Disease in Childhood* 1937;12(70):239-252.

Killick S, Matutes E, Powles RI, Hamblin M, Swansbury J, Treleaven Jg, Zomas A, Atr A, Catovsky D. Outcome of biphenotypic acute leukemia. *Haematologica* 1999; 84:699-706.

Kinlen L & Doll R. Population mixing and childhood leukaemia: Fallon and other US clusters. *British Journal of Cancer* 2004;91:1-3.

Koifman S, Pombo de Oliveira MS and The Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia. High birth weight as an important risk factor for infant leukemia. *British Journal of Cancer* 2008;98: 664-667.

Kolomietz E, Al-Maghrabi J, Brennan S, Karaskova J, Minkin S, Lipton J, Squire JA. Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood* 2001;97(11):3581-3588.

Kundu M & Liu PP. Function of the inv(16) fusion gene CFBF-MYH11. *Curr Opin Hematol* 2001;8(4):201-205.

Mondira Kundu, Amy Chen, Stacie Anderson, Martha Kirby, LiPing Xu, Lucio H. Castilla, David Bodine Pu Paul Liu. Role of Cbfb in hematopoiesis and perturbations resulting from expression of the leukemogenic fusion gene Cbfb-MYH11. *Blood* 2002 100: 2449-2456.

Liang D-C, Shih L-Y, Yang C-P, Hung IH, Chen S-H, Jaing T-H, Liu H-C, Chang W-H. Multiplex RT-PCR assay for the detection of major fusion transcripts in Taiwanese children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 2002;39:12-17.

Licht JD. AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene* 2001;20:5660-5679.

Lightfoot TJ & Roman E. Causes of childhood leukaemia and lymphoma. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2004;199:104-117.

Liu P, Tarle SA, Hajra A, Claxton DF, Marlton P, Freedman M, Siciliano MJ, Collins FS. Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 1993;261(5124):1041-1044.

Löffler H, & Rastetter J. Atlas Colorido de Hematologia. Revinter 5ªed. 2002.

Look AT. Oncogenic transcription Factors in the Human Acute Leukemias. *Science* 1997;278(5340):1059-1064.

Magalhães IQ, Pombo de Oliveira MS, Bennet CA, Córdoba JC, Dobbin J, Ford AM, Greaves MF. TEL-AML1 fusion gene frequency in paediatric acute lymphoblastic leukaemia in Brazil. *British Journal of Haematology* 2000;111:204-207.

Maia AT, van der Velden VHJ, Harrison CJ, Szczepanski T, Williams MD, Griffiths MJ, van Dongen JJD, Greaves MF. Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins. *Leukemia* 2003;17:2202-2206.

Martin RM, Middleton N, Gunnell D, Owen CG, Smith GD. Breast-Feeding and Cancer: The Boyd Orr Cohort and a Systematic Review With Meta-Analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 2005; 97(19):1446-1457.

Martínez-Ramírez A, Urioste M, Contra T, Cantalejo A, Tavares A, Portero JA, López-Ibor B, Bernacer M, Soto C, Cigudosa JC, Benítez J. Fluorescence *in situ* hybridization study of TEL/AML1 fusion and other abnormalities involving TEL and AML1 genes. Correlation with cytogenetic findings and prognostic value in children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2001; 86:1245-1253.

Matutes E & Catovsky D. The Value of Scoring Systems for the Diagnosis of Biphennotypic Leukemia and Mature B-Cell Disorders. *Leukemia and Lymphoma* 1994;13:11-14.

Matutes E, Morilla R, Farahat N, Carbonell F, Swanbury J, Dyer M, Catovsky D. Definition of Acute Bephenotypic Leukemia. *Haematologica* 1997;82:64-66.

McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, Ma X, Buffler P, Feusner J, Matthay K, Dahl G, Smith MT. Prenatal origin of childhood acute myeloid leukemias harboring chromosomal. *Blood* 2003 101(11):4640-4641.

McNally RJ & Eden TOB. An infectious aetiology for childhood acute leukaemia: a review of the evidence. *British Journal of Haematology* 2004;127:243-263.

Melo JV. The Diversity of BCR-ABL Fusion Proteins and Their Relationship to Leukemia Phenotype. *Blood* 1996;88(7):2375-2384.

Mendonça N, Leucemia mielóide aguda na criança.: como andamos no Brasil? *Jornal de Pediatria* 2003;79(6):476-477.

Mesquita DR, Córdoba JC, Magalhães ÍQ, Córdoba MS, Oliveira JRC, Gonçalves A, Ferrari I Martins-de-Sá C. Molecular and chromosomal mutations among children with B-lineage lymphoblastic leukemia in Brazil's Federal District. *Genetics and Molecular Research* 2009;8(1):345-353.

Meyer C, Schneider B, Jakob S, Strehl S, Attarbaschi A, Schnittger S, Schoch C, Jansen MWJC, van Dongen JJM, den Boer ML, Pieters R, Ennas M-G, Angelucci E, Koehl U, Greil J, Griesinger F, zur Stadt U, Eckert C, Szczepaski T, Niggli F K, Schäfer BW, Kempinski H, Brady HJM, Zuna J, Trka J, Nigro LL, Biondi A, Delabesse E, Macintyre E, Stanulla M, Schrappe M, Haas OA, Burmeister T, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R. The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 2006;20:777-784.

Moon HW, Chang YH, Kim TY, Oh BR, Min HC, Kim BK, Ahn HS, Cho HI, Lee DS. Incidence of submicroscopic deletions and chromosomal translocations in hematologic malignancies: investigation by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2007;75:166-168.

Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, Hows JM, Navarrete C, Greaves MF. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *PNAS* 2002; 99(12):8242-8247.

Muindi J, Frankel SR, Miller WH, Jakubowski A, Scheinberg DA, Young CW, Dmitrovsky E Warrell RP. Continuous treatment with all-trans retinoic acid causes a progressive reduction in plasma drug concentrations: implications for relapse and retinoid "resistance" in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1992;79:299-303.

Nakao M, Yokota S, Horiike S, Taniwaki M, Kashima K, Sonoda Y, Koizumi S, Takaue Y, Matsushita T, Fujimoto T, Misawa S, Detection and quantification of TEL/AML1 fusion transcripts by polymerase chain reaction in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1996;10(9):1463-1470.

Namba K, Abe M, Saito S, Satake M, Ohmoto T, Watanabe T, Sato Y.. Indispensable role of the transcription factor PEBP2/CBF in angiogenic activity of a murine endothelial cell MSS31. *Oncogene* 2000;19:106-114.

Neglia JP, Robison LL. Epidemiology of the childhood acute leukemias. *Pediatr Clin North Am* 1988;35(4):675-692.

Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K, Ito Y. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila runt* gene and the human AML1 gene. *Proc. Natl. Acad.* 1993; 90:6859-6863.

Okuda T, Cai Z, Yang S, Lenny N, Lyu C-J, van Deursen JMA, Harada H, Downing JR. Expression of a Knocked-In AML1-ETO Leukemia Gene Inhibits the Dysplastic Hematopoietic Progenitors Establishment of Normal Definitive Hematopoiesis and Directly Generates. *Blood* 1998 91: 3134-3143.

Oliveira RAG & Neto AP. Anemias e Leucemias: conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais. Roca, São Paulo 2004.

Oliveira BM, Diniz MS, Viana MB. Leucemias Agudas Na Infância. *Rev Med Minas Gerais* 2004;14 (1):S33-S9.

Ozbek U, Sirma S, Agaoglu L, Yuksel L, Anak S, Yildiz I, Devecioglu O, Timur C, Meral A, Gedikiglu G. Prognostic significance of the TEL-AML1 fusion gene in pediatric acute lymphoblastic leukemia in Turkey. *J Pediatr Hematol* 2003;25(3):204-208.

Pallisgaard N, Hokland P, Riishoj DC, Pedersen B, Jorgensen P. Multiplex Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Screening of 29 Translocations and Chromosomal aberrations in Acute Leukemia. *Blood* 1998;92(2):574-588.

Park KU, Shea CJ, Shinb HY, Ahn HS, Kimc CJ, Chod BK, Choa HI, Leea DS. Low incidence of *TEL/AML1* fusion and *TEL* deletion in Korean childhood acute leukemia by extra-signal fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2001;126:73-77.

Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. *Imunologia Médica*. The McGraw-Hill Companies, Inc. Guanabara koogan. 10ª ed. 2004.

Pedrosa F e Lins M. Leucemia mielóide aguda: uma doença curável. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.* 2002;2(1):63-68.

Pellosso LAF, Chauffaille MLLF, Ghaname FS, Yamamoto M, Bahia DMM, Kerbauy J. Cariótipo em leucemia mielóide aguda: importância e tipo de alteração em 30 pacientes ao diagnóstico. *Rev Assoc Med Bras* 2003;49(2):150-155.

Penther D, Preudhomme C, Talmant P, Roumier C, Godon A, Méchinaud F, Milpied N, Baraille R, Avet-Loiseau H. amplification of AML1 gene is present in childhood acute lymphoblastic leukemia but not in adult, and is not associated with AML1 gene mutation. *Leukemia* 2002;16:1131-1134.

Perrillat F, Clavel J, Auclerc MF, Baruchel A, Leverger G, Nelken B, Philippe N, Schaison G, Sommelet D, Vilmer E, Hémon D. Day-care early common infections and childhood acute leukemia: a multicentre French case-control study. *British Journal of Cancer* 2002;86(7):1064-1069.

Petridou E, Dalamaga M, Mentis A, Skalkidou A, Moustaki M, Karpathios T, Trichopoulos D. Evidence on the infectious etiology of childhood leukemia: the role of low immunity (Greece). *Cancer Causes and Control* 2001;12:645-652.

Petrie K & Zelent A. AML1/ETO, a promiscuous fusion oncoprotein. *Blood* 2007;109(10):4109-4110.

Pimenta JR, Zucherato LW, Debes AA, Maselli L, soares R, Moura-Neto RS, Rocha J, Bydlowski SP, Pena SDJ. Color and Genomic ancestry in Brazilians: A Study with Forensic Microsatellites. *Human Heredity* 2006;62:190-195.

Pombo de Oliveira MS. Leucemias Infantis: Abordagem Imuno-molecular no Diagnóstico e nas Pesquisas. Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 2008.

Pombo de Oliveira MS, Koifman S, Vasconcelos GM, Emerenciano M, Novaes CO, Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia. Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2009;42:121-125.

Preiss BS, Kerndrup GB, Pedersen RK, Hasle H, Pallisgaard N on behalf of the Lymphoma-Leukemia Study Group of the Region of Southern Denmark. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2006;165:1-8.

Pui C-H, Crist WM, Look AT. Biology and Clinical Significance of Cytogenetic Abnormalities in childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 1990;76(8):1449-1463.

Pui CH, Kane JR, Crist WM. Biology and treatment of infant leukemias. *Leukemia* 1995;9(5):762-769.

Pui C-H, Chessells JM, Camitta B, Baruchel A, Biondi A, Boyett JM, Carroll A, Eden OB, Evans WE, Gardner H, Harbott J, Harms DO, Harrison CJ, Harrison PL, Heerema N, Janka-Schaub G, Kamps W, Masera G, Pullen J, Raimondi SC, Richards S, Riehm H, Sallan S, Sather H, Shuster J, Silverman LB, Valsecchi MG, Vilmer E, Zhou Y, Gaynon PS, Schrappe M. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23Rearrangements. *Leukemia* 2003;17:700-706 a

Pui C-H, Sandlund JY, Pei D, Rivera GK, Howard SC, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Razzouk BI, Hudson MM, Cheng C, Raimondi SC, Behm FG, Downing JR, Relling MV, William EE. Results of Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia in Black and White Children. *JAMA*. 2003;290(15):2001-2007. b

Pui CH, Sandlund JT, Pei D. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. *Blood* 2004;9:2690-2696.

Pui C-H, Robison L, Look AT. Acute Lymphoblastic Leukaemia. *The Lancet* 2008;371:1030-1043.

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

Rapaport SI. Introdução à Hematologia, Roca, São Paulo, 450 pp. 1990.

Rego EM, Garcia AB, Viana SR, Falcão RP. Characterization of Acute Lymphoblastic leukemia Subtypes in Brazilian Patients. *Leukemia Research* 1996;20(4):349-355.

Rego EM. Molecular Basis of Acute Myelogenous Leukemia. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2002;24(3):160-165.

Rego MFN, Pinheiro GS, Metze K, Lorand-Metze I. Acute leukemias in Piauí: comparison with features observed in other regions of Brazil. *Brazilian journal of Medical and Biological Research* 2003;36:331-337.

Reid AG, Huntly BJP, Hennig E, Niederwieser D, Campbell LJ, Bown N, Telford N, Walker H, Grace CD, Deininger MW, Green AR, Nacheva EP. Deletions of the derivative chromosome 9 do not account for the poor prognosis associated with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99(6):2274-2275.

Reis RS, Santos MO, Thuler LCS. Incidência de tumores pediátricos no Brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007;53(1): 5-15.

Ritter M, Thiede C, Schakel U, Schmidt M, Alpen B, Pascheberg U, Mohr B, Ehninger G, Neubauer A. Underestimation of inversion (16) in acute myeloid leukaemia using standard cytogenetics as compared with polymerase chain reaction: results of a prospective investigation. *British Journal of Haematology* 1997;98:4-11.

Roman E, Simpson J, Ansell P, Kinsey S, Mitchell CD, McKinney PA, Birch JM, Greaves MF, Eden T, on behalf of the United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Infections in the First Year of Life: A Report from the United Kingdom Childhood Cancer Study. *American journal of Epidemiology* 2007;165:496-504.

Romana SP, Mauchauffe M, Le Coniat M, Chumakov I, Le Paslier D, Berger R, Bernard OA. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood* 1995; 85: 3662-3670.

Roman-Gomez J, Castillejo JÁ, Jimenez A, Gonzalez MG, moreno F, Rodriguez MC, Barrios M, Maldonado J, Torres A. 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21^{CIP1/WAF1/SDI1} gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99(7):2291-2296.

Ross JA. Maternal diet and infant leukemia: A role for DNA topoisomerase II inhibitors? *International Journal of Cancer* 1999;78(S11):26-28.

Roulston D, Espinosa R, Nucifora G, Larson RA, Le Beau MM, Rowley JD. CBFA2(AML1) Translocations With Novel Partner Chromosomes in Myeloid Leukemias: Association With Prior Therapy. *Blood* 1998;92:2879-2885.

Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243:290-293.

Rowley JD, Golomb HM, Vardiman J, Fukuhara S, Dougherty C, Potter D. Further evidence for a non-random chromosomal abnormality in acute promyelocytic leukemia. *International Journal of Cancer* 1977;20(6):869-872.

Rubnitz JE & Look TA: Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. In Pui C-H (Ed): *Childhood Leukemias*. Cambridge, United Kingdom, Cambridge University Press, 1999. Cap10, p.197-218.

Rubnitz JE, Wichlan D, Devidas M, Shuster J, Linda SB, Kurtzberg J, Bell B, Hunger SP, Chauvenet A, Pui C-H, Camitta B, Pullen J. Prospective analysis of TEL Gene Rearrangements in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Children's Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology* 2008;26(13):2186-2191.

Ruthardt M, Testa U, Nervi C, Ferrucci PF, Grignani F, Puccetti E, Grignani F, Peschle C, Pelicci PG. Opposite Effects of the Acute Promyelocytic Leukemia PML-Retinoic Acid Receptor α (RARA) and PLZF-RARA Fusion Proteins on Retinoic Acid Signalling. *Molecular And Cellular Biology* 1997;17(8):4859-4869.

Salari K, Choudhry S, Tang H, Naqvi M, Lind D, Avila PC, Coyle NE, Ngim Ung N, Nazario S, Casal J, Torres-Palacios A, Clark S, Phong A, Gomez I, Matallana H, Pérez-Stable EJ, Shriver MD, Kwok P-Y, Sheppard D, Rodriguez-Cintron W, Risch NJ, Burchard EG, Ziv E, from the Genetics of Asthma in Latino Americans (GALA) Study. Genetic admixture and asthma-related phenotypes in Mexican American and Puerto Rican asthmatics. *Genetic Epidemiology* 2005;29(1):76-86.

Santana-Lemos BA, Rafael H, Santos J, Santos G. Leucemias: misteriosas e temidas, mas não invencíveis! 02.02, 1-3 (2007) www.sbg.org.br.

Sawinska M & Ladón D. Mechanism, detection and clinical significance of the reciprocal translocation t(12;21)(p12;q22) in the children suffering from acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia Research* 2004;28:35-42.

Sazawal S, Bhatia K, Gutierrez MI, Saxena R, Arya RS, Bhargava M. Paucity of TEL-AML 1 Translocation, by Multiplex RT-PCR, in B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in Indian Patients. *American Journal of Hematology* 2004;76:80-82.

Schlieben S, Borkhardt A, Reinisch I, Ritterbach J, Janssen JW, Ratei R, Schrappe M, Repp R, Zimmermann M, Kabisch H, Janka-Schaub G, Bartram CR, Ludwig WD, Riehm H, Lampert F, Harbott J. Incidence and clinical outcome of children with BCR/ABL-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL). A prospective RT-PCR study based on 673 patients enrolled in the German pediatric multicenter therapy trials ALL-BFM-90 and CoALL-05-92. *Leukemia* 1996;10(6):957-963.

Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *The Lancet* 1971;2:971-972.

Secker-Walker LM, Craig JM, Hawkins JM, Hoffbrand AV. Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia in adults: age distribution, BCR breakpoint and prognostic significance. *Leukemia* 1991;5(3):196-199.

Shaker HM, Sidhom IA, El-Attar IA. Frequency and Clinical Relevance of TEL-AML1 Fusion Gene in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Egypt. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst.* 2001;13(1):9-18.

Shigesada K, van de Sluis B, Liu PP. Mechanism of leukemogenesis by the inv(16) chimeric gene CBFβ/PEBP2B-MHY11. *Oncogene* 2004;23:4297-4307.

Silva GC, Pilger DA, Castro SM, Wagner SC. Diagnóstico Laboratorial das Leucemias mielóides Agudas. *Bras Patol Med Lab* 2006;42(2):77-84.

Smith MA, Simon R, Strickler HD, McQuillan G, Ries LAG, Linet MS. Evidence that childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with an infectious agent linked to hygiene conditions. *Cancer Causes and Control* 1998;9:285-298.

Spathas DH, Stewart J, Singer IO, Theriault A, Bovey M, Connor M. Detection of t(12;21) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia by Fluorescence in Situ Hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1999;110:7-13.

Strick R, Strissel PL, Borgers S, Smith SL, Rowley JD. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *PNAS* 2000; 97(9):4790-4795.

Suryanarayan K, Hunger SP, Kohler S, Carroll AJ, Crist W, Link MP, Cleary ML. Consistent involvement of the bcr gene by 9;22 breakpoints in pediatric acute leukemias. *Blood* 1991;77(2):324-330.

Tahirov TH, Inoue-Bungo T, Morii H, Fujikawa A, Sasaki M, Kimura K, Shiina M, Sato K, Kumasaka T, Yamamoto M, Ishii S, Ogata K. Structural Analyses of DNA Recognition by the AML1/Runx-1 Runt Domain and Its Allosteric Control by CBFβ. *Cell* 2001;104:755-767.

Taylor GM, Dearden S, Ravetto P, Ayres M, Watson P, Hussain A, Greaves MF, Alexander F, Eden OB and UKCCS Investigators. Genetic susceptibility to childhood common acute lymphoblastic leukaemia is associated with polymorphic peptide-binding pocket profiles in HLA-DPB1*0201. *Human Molecular Genetics* 2002;11(14):1585–1597.

Taylor GM, Harrison C, Eden T, Birch J, Greaves MF, Lightfoot T, Hussain A on behalf of UKCCS Investigators. *HLA-DPB1* supertype-associated protection from childhood leukaemia: relationship to leukaemia karyotype and implications for prevention. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:53–61.

Taylor GM, Hussain A, Verhage V, Thompson PD, Fergusson WD, Watkins G, Lightfoot T, Harrison CJ, Birch JM; UKCCS Investigators. Strong association of the HLA-DP6 supertype with childhood leukaemia is due to a single allele, DPB1*0601. *Leukemia* 2009;23(5):863-869.

Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nature Reviews Cancer* 2003;3:89-101.

Thompson & Thompson. *Genética Médica*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 6ª ed. 2002.

Tiensiwakul P. Cloning and sequencing of ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) variant in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2004;149:85-88.

Tsang KS, Li CK, Chik KW, Shing MMK, Tsoi WC, Ng MHL, Lau TT, Leung Y, Yuen PMP. *TEL/AML1* rearrangement and the prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia in Hong Kong. *American Journal of Hematology* 2001;68(2):91-98.

van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, González Díaz M, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. Standardized RT-PCR analysis of gene transcripts from chromosome aberrations in leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999;13:1901-1928.

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (OMS) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292-2302.

Veiga LBA, Coser VM, Cavalli LR, Cavalli IJ, Rodrigues JN, Pereira WV, Pereira DV, Lafayette TCS, Villalba BT, Moreira MES, Haddad BR, Ribeiro EMSF. High frequency of *t*(12;21)(p13;q22) in children with acute lymphoblastic leukemia and known clinical outcome in southern Brazil. *Leukemia Research* 2004;28:1033-1038.

Viana MB, Cunha KCS, Ramos G, Murao M. Leucemia mielóide aguda na criança: experiência de 15 anos em uma única instituição. *Jornal de Pediatria (Rio J)* 2003;79(6):489-96.

Vogel F & Motulsky AG. *Genética Humana: Problemas e Abordagens*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 3ª. ed. 684pp. 2000.

Wang S, Wang TQ, Crute BE, Melnikova IN, Keller SR, Speck NA. Cloning and Characterization of Subunits of the T-Cell Receptor and Murine Leukemia Virus Enhancer Core-Binding Factor. *Molecular and Cellular Biology* 1993;13(6):3324-3339.

Wang LC, Kuo F, Fujiwara Y, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH. Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *The EMBO Journal* 1997;16(14):4374-4383.

Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, Davidson L, Visvader J, Kuo F, Alt FW, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH. The *TEL/ETV6* gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes & Development* 1998;12:2392-2402.

Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Nmasera G, Saha V, Biondi A, Greaves MF. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *The Lancet* 1999;354:1499-1503.

Wiemels JL, Xiao Z, Buffler PA, Maia AT, Ma X, Dicks BM, Smith MT, Zhang L, Feusner J, Wiencke J, Pritchard-Jones K, Kempfski H, Greaves MF. In utero origin of *t*(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 99:3801-3805.

Yehuda-Gafni O, Cividalli G, Abrahmov A, Weintrob M, Neriah SB, Cohen R, Abeliovich D. Fluorescence in situ hybridization analysis of the cryptic t(12;21) (p13;q22) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2002;132(1):61-64.

Yergeau DA, Hetherington CJ, Wang Q, Zhang P, Sharpe AH, Binder M, Marín-Padilla M, Tenen DG, Speck NA, Zhang D-R. Embryonic lethality and impairment of haematopoiesis in mice heterozygous for an *AML1-ETO* fusion gene. *Nature Genetics* 1997;15:303-306.

Yoshiyuki T, Horibe H, Hitoshi K, Yoshiko M, Minoru F, Hiroshi M, Chika N, Shinji H, Takashi K, Koji K, Seiji K, Takaharu M, Tomoki N. Prognostic Significance of TEL/AML1 Fusion Transcript in Childhood B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 1998;20(3):190-195.

Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GAJ, Korsmeyer SJ. Altered Hox expression and segmental identity in *Mll*-mutant mice. *Nature* 1995;378:505-508.

Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia: Fundamentos e Práticas. Atheneu, São Paulo. 2001.

Zanichelli MA, Cristófani LM, Almeida MAT, Maluf PT, Filho VO. Perspectivas para a leucemia mielóide aguda na infância após a observação de um grupo de pacientes tratados convencionalmente. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2006;28(4):246-252.

Zen PRG, Lima MC, Coser VM, Silla L, Daudtd L, Fernandes MS, Neumann J, Mattevia MS, Ortigara R, Paskulin GA. Prevalence of *TEL/AML1* fusion gene in Brazilian pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2004;151(1):68-72.

Zhao L, Cannons JL, Anderson S, Kirby M, Xu L, Castilla LH, Schwartzberg PL, Bosselut R, Liu PP. *CBFB-MYH11* hinders early T-cell development and induces massive cell death in the thymus. *Blood* 2007;109:3432-3440.

Zhong S, Salomoni P & Pandolfi PP. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nature Cell Biology* 2000;2:E85-E90.

Zuna J, Hrusák O, Kalinová M, Muzíková K, Starý J, Trka J. TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? Czech Paediatric Haematology Working Group. *Leukemia* 1999;13(1):22-24.

10. APÊNCICES

10.1 Publicação



Molecular and chromosomal mutations among children with B-lineage lymphoblastic leukemia in Brazil's Federal District

D.R. Mesquita^{1,6}, J.C. Córdoba², Í.Q. Magalhães², M.S. Córdoba^{2,3},
J.R.C. Oliveira², A. Gonçalves⁴, I. Ferrari^{3,5} and C. Martins-de-Sá⁶

¹Diretoria de Ensino de Graduação,
Centro Federal de Educação Tecnológica do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

²Núcleo de Oncologia e Hematologia Pediátrica,
Hospital de Apoio de Brasília, Secretaria de Saúde do DF,
Brasília, DF, Brasil

³Serviço de Genética Clínica, Hospital Universitário de Brasília,
Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil

⁴Grupo de Saúde Coletiva e Atividade Física,
Faculdade de Educação Física, Universidade de Campinas,
Campinas, SP, Brasil

⁵Departamento de Genética e Morfologia,
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília,
Brasília, DF, Brasil

⁶Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil

Corresponding author: C. Martins-de-Sá
E-mail: sasa@unb.br

Genet. Mol. Res. 8 (1): 345-353 (2009)

Received January 13, 2009

Accepted February 4, 2009

Published March 24, 2009

ABSTRACT. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) accounts for approximately 80% of all acute leukemias during childhood. Chromosomal anomalies resulting from gene fusion, which are frequent in leukemias, create hybrid transcripts, the great majority of which encode transcription factors. We analyzed 88 pediatric patients (median age 7.3 years) who had B-lineage acute lymphoblastic leukemia (B-ALL), using reverse tran-

scriptase-polymerase chain reaction, to look for gene fusion transcripts of *TEL/AML1*, *E2A/PBX1*, *BCR/ABL* p190, and *MLL/AF4*. The frequencies of these transcripts were 21.21, 9.68, 3.03, and 0%, respectively. All positive cases had a common B-ALL immunophenotype. The low frequency of the *TEL/AML1* transcript that is found in developing countries, such as Brazil, may be due to the low incidence of leukemia; this would support Greaves' hypothesis.

Key words: Acute lymphoblastic leukemia; Cytogenetics; Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; Chromosomal anomalies; Hybrid transcripts

INTRODUCTION

Acute leukemias comprise a heterogeneous group of hematologic neoplasias in which there is clonal proliferation of myeloid or lymphoid cells; they occur in adults as well as children, although at different frequencies (Zago et al., 2001). In patients under 15 years old, they account for over 30% of all malignant diseases (Pui et al., 2008). Acute lymphoblastic leukemia (ALL) accounts for approximately 80% of all acute leukemia in childhood, contrasting with about 20% of the cases in adults (Pui and Crist, 1994).

In B-lineage ALL (B-ALL) among children, the most prevalent chromosomal mutation is the t(12;21) translocation, which causes *TEL/AML1* gene fusion, and hyperdiploidy. Both show evidence of prenatal origins (Wiemels et al., 1999), occur in approximately 25% of cases (van Dongen et al., 1999) and confer a good prognosis (Rubnitz and Look, 1999). This disease's common form, which includes all variations of *TEL/AML1* fusion, has a low incidence in developing countries, which supports the hypothesis that this cancer may be associated with a better quality of life and perhaps with modified infection patterns in childhood (Greaves, 1988; Magalhães et al., 2000). According to Greaves, the absence or reduction of common infections during the first year of life may favor immunological stress when confronting these infections later in life. This phenomenon would lead to a second molecular event, necessary to promote the malignant process, explaining the peak in ALL among children of 2 to 5 years of age (Greaves, 1988).

The recurrent rearrangements associated with poor prognosis occur at a lower frequency: t(1;19) *E2A/PBX1*, present in 5 to 6% of cases (van Dongen et al., 1999; Raimond, 1999); p190 type t(9;22) *BCR/ABL*, in 3 to 5% (Raimond, 1999; Sastre et al., 2007), and t(4;11) *MLL/AF4*, detected in 2 to 5% of pediatric B-ALL cases (Pui et al., 1990; van Dongen et al., 1999) and in over 50 to 85% of B-ALL cases among unweaned infants (van Dongen et al., 1999; Emerenciano et al., 2007).

In this research, cytogenetic studies were carried out along with molecular analyses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in 88 pediatric patients with B-ALL, consecutively admitted in the Oncological and Hematological Pediatric Service (NOHP-SESDF) at the Hospital de Apoio de Brasília (HAB), from 2005 to 2007. The respective results are presented here to: i) report, for the first time in Brazil's Federal District, the frequency observed in recurrent rearrangements in pediatric B-ALL; ii) explore the association between molecular and cytogenetic characterization of these mutations, and iii) correlate these sets of data in order to gain a better understanding of the disease in nonindustrialized countries.

MATERIAL AND METHODS

Reference population and study group

The reference population in this study was made up of all the children and adolescents less than 18 years of age and diagnosed with B-ALL, consecutively admitted by the NOHP-SESDF team, from January 2005 to December 2007. Of a total of 170 pediatric patients, with an initial clinical-laboratory diagnosis of leukemia registered in that period, 102 (60%) presented B-ALL, of which 14 were excluded due to insufficient quantity of material for molecular analyses (13) and RNA degradation (1), resulting in a group consisting of 88 patients (86.27%).

Given the fact that HAB is the regional benchmark in public health treatment of infant leukemias, this service covers all leukemia cases handled by the Federal District's public network, which includes pediatric patients from the Federal District and its outlying areas. The Hospital also attends pediatric cases from other states in Brazil, especially Goiás, Minas Gerais and Bahia, estimated to account for 5% of the pediatric hematology/oncology cases.

Samples and techniques

Samples taken from the bone marrow of each patient were sent to the Genetics Unit at the Hospital de Apoio in Brasília, where immunophenotyping was carried out to identify the lineage and differentiation level of the leukemia cells. In the course of the project, a subsample of 44 cases was submitted to cytogenetic analysis both to provide more complete information on the specific rearrangement, and also to identify numerical chromosomal mutations.

For the molecular analysis, bone marrow (86) or peripheral blood (4) samples were sent to the Gene Biology Laboratory of the Cell Biology Department of the University of Brasília. This technique was carried out to detect hybrid transcripts and identify the occurrence of the recurrent rearrangements (*BCR/ABL*, *MLL/AF4*, *E2A/PBX1*, and *TEL/AML1*). Regarding this last procedure, specimens from 80 patients were analyzed only at the time of diagnosis, six only during relapse and two at diagnosis and in relapse. Of the 90 samples analyzed, 54 had been cryopreserved. A patient with constitutional trisomy 21 was included.

Written informed consent was obtained from patients or their legal guardians, and all studies were approved by the institutional review board at each collaborating site.

Immunophenotyping

The leukemic cells were immunophenotyped using monoclonal antibodies to define the lineage and to determine the level of differentiation. Antigen expression was determined by indirect immunofluorescence (BD, FACS Calibur) evaluated by flow cytometry (Catovsky et al., 1991). The default panel established included: sCD34, sCD45, sHLA-Dr, sCD117, sCD10, sCD4, sCD7, sCD8, sCD19, sCD38, and cCD13, cMPO, cTdt, cCD2, cCD3, cCD22, and cCD79a. The reactivity of cells was considered to be positive starting at 20% (CellQuest).

Cytogenetic analysis

To obtain metaphase chromosomes, two cultures were grown in GIBCO® RPMI

Media 1640 and GIBCO® fetal bovine serum, both incubated at 37°C and submitted to treatment with colchicine, hypotonic solution and fixation (Bottura and Ferrari, 1960). The cytological preparations were analyzed by conventional staining or treated with trypsin solution to obtain GPG banding (Seabright, 1971). The mutations encountered were described according to ISCN 2005 (ISCN, 2005).

RT-PCR

The samples were processed by Ficoll Histopaque density gradient centrifugation (Sigma Diagnostics), and total RNA was extracted from the resulting leukocyte layer according to the Trizol (Invitrogen) protocol. For the reverse transcription reaction, 2 µg RNA, dissolved in 20 µL distilled water, was incubated for 10 min at 65°C, and to this the following were added: 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 8.3, 0.5 µg Random Hexamers primers (Amersham Biosciences), 0.125 mM dNTPs (Bio-Rad), 40 U RNase out™ (Invitrogen), 200 U M-MLV reverse transcriptase (Promega), in a final volume of 40 µL, which was incubated for 1 h at 37°C and then for 7 min at 65°C.

RT-PCR was performed according to a standardized protocol by van Dongen et al. (1999), with modifications. In brief, 2 µL cDNA was added to a mixture (final volume of 30 µL) containing: 20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl₂, 10 mM of each internal primer (single) or 5 mM of each control primer (GAPDH), 0.2 mM dNTPs (Bio-Rad), and 1 U Taq Polymerase (Invitrogen). The reaction was submitted to 35 cycles in a thermocycler (iCycler™ Bio-Rad). The cycle time and the temperatures for denaturing, annealing and extension were respectively 94°C for 30 s, 65°C for 60 s, and 72°C for 60 s. A final extension was not carried out. For analysis, 15 µL PCR product was applied to a 2% agarose gel. The thermocycler was programmed in the same way to detect all types of transcripts, and in every case the amplification was confirmed by shifted RT-PCR (van Dongen et al., 1999). The integrity of the cDNA was evaluated by amplification of the GAPDH gene.

Every sample that showed amplification of the control gene (GAPDH) was considered to be valid for analyses; those that also demonstrated a specific band for single-shifted RT-PCR were evaluated as positive cases. All cases were analyzed and reevaluated at least once, using positive control (REH cell line or cDNA from positive patient) and negative control (HL-60 cell line). The cell lines were kindly supplied by Dr. José Andres Yunes (Laboratório de Biologia Molecular do Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Boldrini, São Paulo, Brazil).

RESULTS

Among the 88 patients evaluated, 45 (51.14%) were male and 43 (48.86%) were female, and their ages at the time of diagnosis varied between 13 days and 17.6 years, with a median of 7.3 years.

The immunophenotyping analysis permitted the characterization of 72 cases as common ALL (B-precursor CD10+ ALL), 5 as pre-B-ALL (B-precursor CD10- ALL), 4 as pro-B-ALL (B-precursor CD10- ALL), and 7 as B-precursor ALL without definition of cellular maturation level.

Samples from every patient were submitted to molecular analysis for transcript identification. Table 1 shows the data referring to loss of material for molecular analyses; over the

years, we can observe a downward trend in losses. An annual average of 29 cases analyzed was reached.

Table 1. Unavailability of material for molecular analysis/year.

	2005	2006	2007	Total
Total registered	30	36	36	102
Total analyzed	24	31	33	88
Not analyzed	6	5	3	14
% of loss	20.00	13.89	8.33	13.73

Table 2 indicates the frequencies obtained for each of the rearrangements investigated and their respective fluctuation in year by year frequency. Records show that rearrangement *MLL/AF4* was not detected during the period studied.

Table 2. Annual distribution of amplification frequencies of transcript fusions.

	2005		2006		2007		Total		Age (years)		Male/Female	Immunophenotyping
	N	%	N	%	N	%	N	%	Variation	Median		
Total analyzed	24	27.27	31	35.23	33	37.50	88	100.00	13 days-17.6	7.3	45/43	
<i>TEL/AML1</i>	0	0.00	3	9.68	7	21.21	10	11.36	2.2-16.11	4.6	5/5	pre-B-ALL CD10+
<i>E2A/PBX1</i>	2	8.70	3	9.68	0	0.00	5	5.68	4.3-17.6	10.7	4/1	pre-B-ALL CD10+
<i>BCR/ABL</i> p190	0	0.00	0	0.00	1	3.03	1	1.14	11.7	-	1/0	pre-B-ALL CD10+
Total amplified	2	8.70	6	19.36	8	24.24	16	18.18	2.2-17.6	5.4	10/6	

In addition, we studied two cases of unweaned infants, characterized with immunophenotype pro-B CD10- ALL, translocations t(9;11) *MLL/AF9* and t(11;19) *MLL/ENL1*, *MLL/ENL2* and *MLL/ELLA*, the most frequent rearrangements involving the *MLL* gene. The *MLL/ENL1* transcript was identified as one of them.

Of the 44 cases with complete karyotypic analysis, 25 had a normal karyotype and 19 demonstrated chromosomal mutations, of which 11 showed hyperdiploidy, 4 hypodiploidy, 3 pseudodiploidy, and one constitutional trisomy 21. One patient showed hyperdiploidy associated with a *TEL/AML1* rearrangement (Table 3).

Table 3. Frequency distribution according to cytogenetic data.

Results	Absolute frequency	Relative frequency
Normal karyotype	25	56.82%
Chromosome anomaly	19	43.18%
Hyperdiploidy	11*	25.00%
Hypodiploidy	4	9.10%
Pseudodiploidy	3	6.81%
Trisomy 21	1	2.27%
Total	44	100.00%

*Includes the case that tested positive for *TEL/AML1*.

The combined results of molecular and cytogenetic analysis are presented in Table 4. We highlighted the non-detection of conclusive results in the majority of the cases studied and the non-agreement between molecular and cytogenetic findings. We also stress the occurrence of two cases, which showed a t(9;22)(q34;q11) translocation and the absence of *BCR/ABL* transcript. One patient showed hyperdiploidy associated with a *TEL/AML1* rearrangement. These analyses showed a total of 36 chromosomal mutations among the 88 cases analyzed.

Table 4. Combined molecular and cytogenetic analysis

Anomalies	Molecular	Cytogenetic	
t(9;22) <i>BCR/ABL</i>	1	Not grown	1
t(1;19) <i>E2A/PBX1</i>	5	Not grown	1
		Normal karyotype	3
		Detection	1
t(12;21) <i>TEL/AML1</i>	10	Not grown	3
		Normal karyotype	3
		Hyperdiploidy	1
		Not analyzed	3
t(11;19) <i>MLL/ENL1</i>	1	Not grown	1
Hyperdiploidy	-	47 to 50	6*
		>50	6
Hypodiploidy	-	36 to 45	4
Pseudodiploidy	-	t(9;22)(q34;q11)	2
Total	17		19

*Includes the case that tested positive for *TEL/AML1*.

DISCUSSION

The frequency of 21.21% referring to the *TEL/AML1* rearrangement, in 2007 (Table 2), is similar to previously published data for Brazilian children (20%) (Magalhães et al., 2000), but it is below the 25% average reported in the literature (Abdelhaleem, 2007; Pui et al., 2008; Rubnitz et al., 2008). It is worth noting that the lower frequency of this fusion has also been observed in countries such as India (6%) (Inamdar et al., 1998), Mexico (9.6%) (Jiménez-Morales et al., 2008), Argentina (11.6%) (Alonso et al., 2006), Thailand (12%) (Tiensiwakul, 2004), China (17.9%) (Tsang et al., 2001), and Taiwan (19%) (Liang et al., 1996). These values may reflect a lower incidence of pediatric B-ALL, a finding that supports Greaves' hypothesis, according to which children exposed to common infections during their first year of life, as is the case in less industrialized countries, have a better prepared immunological system. They are then less susceptible to the immunological stress of a later infection that would trigger molecular events subsequent to those that existed since neonatal life, leading to the stages of leukemogenesis (Greaves, 1988).

The improvement in medical assistance and socio-economic conditions in Brazil has resulted in the reduction of infant mortality rates caused by leukemia in the Federal District, but it has not led to an increased incidence of this disease to the level found in developed countries (Córdoba MS, unpublished data). We point out that the median reported here for positive cases of *TEL/AML1* (4.6 years) is within this disease's identified occurrence peak (Greaves, 2006). However, the median age for leukemia occurrence in the group studied was 7.3 years (Table 3), and therefore later.

As shown in Table 2, the frequency obtained for each transcript is not maintained over the years. It should be considered that there was a gradual decrease in the limited loss of available material for molecular analysis (Table 1). The frequency of transcript *BCR/ABL* p190 in 2007 (3.03%) was similar to that in the literature (Rubnitz and Look, 1999; Abdelhaleem, 2007; Sastre et al., 2007). On the other hand, although potentially a random event, the values obtained for *E2A/PBX1* fusion in 2006 (8.70%) and 2007 (9.68%) were above the median reported, above the existing data in Brazil (Emerenciano et al., 2007) and among the highest ever registered (Jiménez-Morales, 2008).

Differences in rearrangement frequencies have been observed between different ethnic groups (Pui et al., 2003; Aldrich et al., 2006; Jiménez-Morales, 2008), suggesting the existence of a correlation between a population's gene pool and the occurrence of these chromosomal mutations. Considering the high miscegenation of Brazil's population (Pimenta et al., 2006), ethnic factors may also account for the findings.

It is possible that different factors act simultaneously in the etiology of B-ALL in childhood. With this in mind, we can consider that Greaves' hypothesis and the ethnic issue, among others, may contribute to the differences observed between the frequencies in occurrence of chromosomal rearrangements in this disease.

Although this is extremely infrequent (Attarbaschi et al., 2004), a concomitant finding of hyperdiploidy and cryptic translocation t(12;21) was identified by the detection of the transcript of *TEL-AML1* gene fusion by RT-PCR (Table 4).

There was no detection of transcript amplification for *MLL/AF4* t(4;11). The presence of genetic rearrangements involving the *MLL* gene seems to be correlated to the non-expression of CD10 and immunophenotype pro-B, and is inversely associated with age, occurring at a higher frequency (50 to 80%) among children younger than one year (Pui et al., 1990; van Dongen et al., 1999; Emerenciano et al., 2007). In the group studied, there were two cases of unweaned infants with this characterization. Over 25 chromosome loci are related to rearrangements involving the *MLL* gene, with the most common translocations being t(4;11), t(9;11) and t(11;19) (Rubnitz and Look, 1999), researched in both cases. The detection of *MLL/ENL1* transcript in one of these cases confirms for the Federal District the frequency reported in the literature.

Two cases were identified in which the t(9;22)(q34;q11) translocation was detected in cytogenetic analyses and in which no amplification of the corresponding transcript (*BCR/ABL*) was observed. It is possible that other genes that are different from *BCR* and *ABL*, or at least from one of them, are not involved in the translocation, making it impossible for the hybrid gene *BCR/ABL* to form. There are reports of the *BCR* gene rearranging with other genes (Cirmena et al., 2008) and also the occurrence of submicroscopic deletions adjacent to breakpoints in *BCR* and *ABL*, which could explain this finding (Table 4) (Moon et al., 2007; De Melo et al., 2008).

Among the patients with chromosomal anomalies (Table 3), hyperdiploidy (N = 47 to 57) was identified in 25% (11) of the cases analyzed. One of them occurred in association with the amplification of the *TEL/AML1* transcript (Table 4).

Table 4 presents the results of the cytogenetic analysis concerning the presence of translocations that refer to the transcripts, showing that these do not agree with those from the molecular analysis. In 17 cases, the mutations were detected only in the molecular analysis. The lack of conclusive results, previously reported, makes it impossible to correlate cyto-

netic and molecular results. Cryptic mutations, the inability to obtain mitotic figures in ALL, and the often low percentage of clone cells in the group of metaphases analyzed are factors that make it difficult to perform good analyses. However, karyotypic analysis is essential in identifying numerical mutations and non-recurrent structural mutations.

Molecular analysis by RT-PCR was carried out in every sample, including those that were unsuitable for cytogenetic analysis, the cryopreserved ones and those with little cellularity. Furthermore, molecular analysis is more sensitive and more specific than cytogenetic as it identifies the presence of genetic rearrangements in samples where the cytogenetic result was negative, as well as the absence of important genetic rearrangements in patients with cytogenetically identical translocations, and cases in which the t(9;22) translocation was detected in the absence of *BCR/ABL* transcript (Table 4) (Pallisgaard et al., 1998; Rubnitz and Look, 1999). It is important to add that in a unique RT-PCR program different rearrangements may be detected simultaneously (van Dongen et al., 1999).

In the present analysis, molecular analysis by RT-PCR was shown to be an ideal tool for detecting hybrid transcripts, while cytogenetic research, a complementary technique, contributed to identifying numerical mutations and pseudodiploidy with no corresponding transcript.

The lower frequency for the *TEL/AML1* transcript found in developing countries such as Brazil may be related to the lower incidence of leukemia, which would support Greaves' hypothesis.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Pronex/FAPDF/CNPq - Project 380/4. D.R. Mesquita was awarded a doctoral scholarship from FAPEAM, in the RH-POSGRAD modality.

REFERENCES

- Abdelhaleem M (2007). Frequent but nonrandom expression of lymphoid markers on *de novo* childhood acute myeloid leukemia. *Exp. Mol. Pathol.* 83: 259-263.
- Aldrich MC, Zhang L, Wiemels JL, Ma X, et al. (2006). Cytogenetics of Hispanic and White children with acute lymphoblastic leukemia in California. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15: 578-581.
- Alonso CN, Gallego MS, Alfaro EM, Rossi JG, et al. (2006). Caracterización molecular en leucemia linfoblástica aguda pediátrica en una institución hospitalaria/Pediatric lymphoblastic leukemia molecular characterization in a single institution. *Hematología* 10: 8-12.
- Attarbaschi A, Mann G, König M, Dworzak MN, et al. (2004). Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukemia: an interphase FISH analysis. *Leukemia* 18: 1611-1616.
- Bottura C and Ferrari I (1960). A simplified method for the study of chromosomes in man. *Nature* 186: 904-905.
- Catovsky D, Matutes E, Buccheri V, Shetty V, et al. (1991). A classification of acute leukaemia for the 1990s. *Ann. Hematol.* 62: 16-21.
- Cirmena G, Aliano S, Fugazza G, Bruzzone R, et al. (2008). A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11) in a patient with acute myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 183: 105-108.
- De Melo V, Milojkovic D, Marin D, Apperley JF, et al. (2008). Deletions adjacent to BCR and ABL1 breakpoints occur in a substantial minority of chronic myeloid leukemia patients with masked Philadelphia rearrangements. *Cancer Genet. Cytogenet.* 182: 111-115.
- Emerenciano M, Koifman S and Pombo-de-Oliveira MS (2007). Acute leukemia in early childhood. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40: 749-760.
- Greaves M (2006). Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 6: 193-203.
- Greaves MF (1988). Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2: 120-125.
- Inamdar N, Kumar SA, Banavali SD, Advani S, et al. (1998). Comparative incidence of the rearrangements of TEL/AML1

- and ALL1 genes in pediatric precursor B acute lymphoblastic leukemias in India. *Int. J. Oncol.* 13: 1319-1322.
- ISCN (2005). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. S Karger, Basel.
- Jiménez-Morales S, Miranda-Peralta E, Saldaña-Alvarez Y, Perez-Vera P, et al. (2008). BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: prevalence of the most common acute lymphoblastic leukemia fusion genes in Mexican patients. *Leuk. Res.* 32: 1518-1522.
- Liang DC, Chou TB, Chen JS, Shurtleff SA, et al. (1996). High incidence of TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia in Taiwan. *Leukemia* 10: 1075-1088, 991-993.
- Magalhaes IQ, Pombo-de-Oliveira MS, Bennett CA, Cordoba JC, et al. (2000). TEL-AML1 fusion gene frequency in paediatric acute lymphoblastic leukaemia in Brazil. *Br. J. Haematol.* 111: 204-207.
- Moon HW, Chang YH, Kim TY, Oh BR, et al. (2007). Incidence of submicroscopic deletions vary according to disease entities and chromosomal translocations in hematologic malignancies: investigation by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 175: 166-168.
- Pallisgaard N, Hokland P, Riishoj DC, Pedersen B, et al. (1998). Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood* 92: 574-588.
- Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, et al. (2006). Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum. Hered.* 62: 190-195.
- Pui CH and Crist WM (1994). Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *J. Pediatr.* 124: 491-503.
- Pui CH, Crist WM and Look AT (1990). Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 76: 1449-1463.
- Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Rivera GK, et al. (2003). Results of therapy for acute lymphoblastic leukemia in black and white children. *JAMA* 290: 2001-2007.
- Pui CH, Robison LL and Look AT (2008). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371: 1030-1043.
- Raimond SC (1999). Cytogenetics of Acute Leukemias. In: Childhood Leukemias (Pui CH, ed.). Cambridge University Press, Memphis, 168-196.
- Rubnitz JE and Look AT (1999). Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Childhood Leukemias (Pui CH, ed.). Cambridge University Press, Memphis, 197-218.
- Rubnitz JE, Wichlan D, Devidas M, Shuster J, et al. (2008). Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* 26: 2186-2191.
- Sastre DA, Argaraña CE, Heller VB, Gallo M, et al. (2007). An analysis of multiplex-PCR in the detection of BCR-ABL transcripts in hematological disorders. *Genet. Mol. Biol.* 30: 520-523.
- Seabright M (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-972.
- Tiensiwakul P (2004). Cloning and sequencing of ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) variant in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 149: 85-88.
- Tsang KS, Li CK, Chik KW, Shing MM, et al. (2001). TEL/AML1 rearrangement and the prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia in Hong Kong. *Am. J. Hematol.* 68: 91-98.
- van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, et al. (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 13: 1901-1928.
- Wiemels JL, Ford AM, Van Wering ER, Postma A, et al. (1999). Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. *Blood* 94: 1057-1062.
- Zago MA, Falcão RP and Pasquini R (2001). Hematologia: Fundamentos e Prática. Atheneu, São Paulo.

10.2 Modelo de laudo para diagnóstico molecular



GDF/ Secretaria de Estado de Saúde
Universidade de Brasília / Hospital de Apoio de Brasília



Laboratório de Biologia do Gene / Núcleo de Laboratórios Especializados

PCR Qualitativo

Diagnóstico molecular de alterações cromossômicas

Nome: PACA

HD: LLA

Data nasc.: 19 / 03 / 1989

Coleta: 18 / 09 / 06

Registro: HA-33

Data do laudo: 20 / 07 / 07

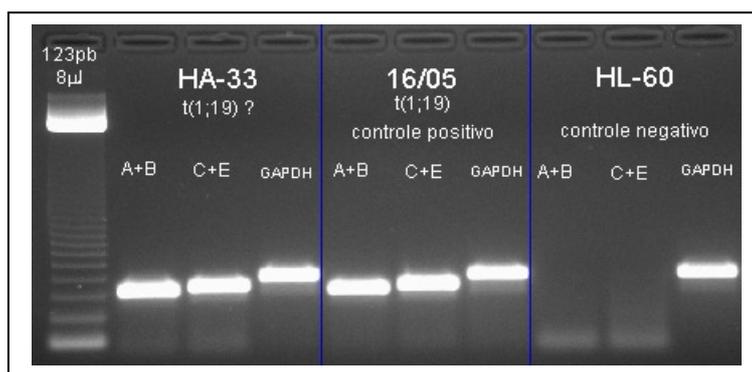
Médico solicitante: Dr. José C. Córdoba

Material: MO + EDTA

Procedência: Hospital de Apoio

Registro Hospital: IF 144/06

Exame coletado para fins de: diagnóstico acompanhamento



Primers utilizados:

BCR/ABL p190: BCR-e1-A e ABL-a3-B / **MLL/AF4:** MLL-A e AF4-B / **TEL/AML1:** TEL-A e AML1-B / **E2A/PBX1:** *single* E2A-A e PBX1-B; *shifted:* E2A-C e PBX1-E3; GAPDH: Pr194 e Pr195.

Resultado: Amplificação do transcrito do rearranjo *E2A/PBX1* referente à translocação t(1;19). Não foram identificadas, nesta amostra, amplificações dos transcritos dos rearranjos: *BCR/ABL* t(9;22) p190, *MLL/AF4* t(4;11) e *TEL/AML* t(12;21). Exame realizado por método RT-PCR *shifted*. A amostra 16/05 foi utilizada como controle positivo para a amplificação do rearranjo *E2A/PBX1* t(1;19). A amplificação do gene GAPDH ocorreu para controle interno da reação.

Exame realizado por Dr. Cezar Martins de Sá e Débora Rabello Mesquita, em caráter de pesquisa, com apoio do projeto de pesquisa da FAP-DF, registrado sob o nº 193.000.124/2004.

Universidade de Brasília / Hospital de Apoio de Brasília
Laboratório de Biologia do Gene / Núcleo de Genética

10.3. Amostras de pacientes pediátricos com diagnóstico de leucemia, analisados em 2005

IF	HA	CG	O	Cong.	coleta	Idade	RT-PCR	IF	CG
05	78	19/82	01	05 t	14 / 02 / 05	3,7	negativo	LMA	46,XX
07	79	33	02	03 t	15 / 02 / 05	6,5	negativo	LLA precursora B	47, XX, +21 (s. Down)
10	80	29	03	04 t	21 / 02 / 05	5	E2A/PBX1	LLA pré B calla +	46,XY
11	81	30/36	04	02 t	21 / 02 / 05	14	negativo	LA biclonal	46,XX
15	82	?	05	07 t	25 / 02 / 05	7,11	BCR/ABL p210	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
16	83	37	06	05 t	28 / 02 / 05	4,3	E2A/PBX1	LLA pré B calla +	46,XY,del (1)(q)
18	84	43/69	07	05 t	03 / 03 / 05	8,6	negativo	LMA HLA-DR ?	S/M
20	85	45	08	04 t	08 / 05 / 05	15,6	negativo	LA Bif.	S/M
21	86	51	09	06 t	10 / 03 / 05	9,6	negativo	LLA pré B calla +	45,XY,-20,del(6p), add...
22/05 14/07	51-1 51-2	57//33	10	02 t	18 / 03 / 05	2,3	negativo	LLA prec.B calla - De rec.	46,XY, t(9;22)(q34;q11)
23	87	59	11	06 t	22 / 03 / 05	9,5	negativo	LLA pré B calla +	S/M
24	88	60	12	03 t	01 / 03 / 05	2	negativo	LMA M 4 rec.	46,XX
26	89	64	13	06 t	30 / 03 / 05	12,3	negativo	LLA pró B calla -	47,XY,+C
29	90	70	14	02 t	04 / 04 / 05	1,8	negativo	LA Bif.	46,XX
31/05 40/06	91-1 91-2	73	15	03 t	05 / 04 / 05	7	CBFB/MYH11	LMA M4 De rec.	46,XX
32	92	79	16	09 t	18 / 04 / 05	7	negativo	LMA e.a. antg. Linf. b	46,XX,del(7)(q22)/46XX
34	93	80	17	06 t	19 / 04 / 05	14,8	negativo	LLA pré B calla +	46,XX
39	94	86	18	04 t	26 / 04 / 05	1,7	negativo	LLA pré B calla +	46,XX
41	95	91	19	04 t	27 / 04 / 05	5,3	negativo	LLA pré B calla +	Hipod 45 croms.

IF	HA	CG	O	Cong.	coleta	Idade	RT- PCR	IF	CG
43	96	95	20	02 t	03 / 05 / 05	5,6	negativo	LLA pré B calla +	46,XX,del(2)(q?)
53	97	137	21	03 t	16 / 06 / 05	7,8	negativo	LLA pré B calla + rec.	50,XXY,add(1)(q44),+5,+6.
56	98	142	22	03 t	21 / 06 / 05	8,9	negativo	LLA pré B calla +, e.a. CD33	46,XX
59	99	147/31	23	03 t	23 / 06 / 05	7,4	negativo	LMA M3	47,XY,+8/46,XY
65	100	SR	24	04 t	1º / 07 / 05	12	negativo	LLA pré B calla +	não realizado
66	101	155	25	04 t	06 / 06 / 05	2,5	negativo	LMA M3	S/M
69/05 27/07 60/07	58-1 58-2 58-3	174	26	08 t	27 / 07 / 05	9 meses	CBFB/MYH11	LMA M4 D e rec.	46,XY
84	102	184	27	03 t	23 / 08 / 05	1,11	negativo	LLA precursora B calla -	46,XY
85	103	199	28	02 t	17 / 08 / 05	4,10	negativo	LLA pré B calla +, mieloper.	S/M
92	104	228	29	12 t	06 / 09 / 05	13 dias	MLL/ENL1	LLA pró B calla -	S/M
93	105	229	30	03 t	09 / 09 / 05	2,1	negativo	LLA pré B calla +	46,XY
99	106	241	31	04 t	29 / 09 / 05	6,10	negativo	LMA M 2	46,XX
101	107	247	32	04 t	10 / 10 / 05	7,1	negativo	LLA pré B calla +	46,XY
102	108	250	33	03 t	20 / 10 / 05	3,10	negativo	LLA pré B calla +	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
103	109	?	34	02 t	21 / 10 / 05	10,2	negativo	LMA, n.e.HLA-DR , CD34	46,XY
107	110	258	35	06 t	/ 10 / 05	8,3	negativo	LLA pré B calla +	S/M
108	111	259	36	01 t	30 / 10 / 05	12,1	negativo	LLA precursora B calla -	S/M
115	112	269	37	03 t	14 / 11 / 05	15,7	negativo	LLA pró B calla -	S/M
117/05 145/06	113-1 113-2	273/05 228/06	38	04 t	17 / 11 / 05 18 / 09 / 06	12,6	1-Negativo 2- AML1/ETO	LMA D e rec.	46,XX S/M
126	114	SR	39	02 t	22 / 11 / 05	8,6	PML/RARA bcr 3	LMA M3	não realizado
140	43	?	40	04 t	30 / 12 / 05	1	negativo	LLA pré calla +	46,XX

Universidade de Brasília / Hospital de Apoio de Brasília
Laboratório de Biologia do Gene / Núcleo de Genética

10.4 Amostras de pacientes pediátricos com diagnóstico de leucemia, analisados em 2006

IF	HA	CG	O	Cong.	coleta	Idade	RT- PCR	IF	CG
12	116	13	41	04 t	19 / 01 / 06	12,2	negativo	LLA pré B calla+	46,XX
16	117	SR	42	01 t	30 / 01 / 06	3,10	negativo	LLA pré B calla+	não realizado
19	118	30	43	06 t	09 / 02 / 06	12,10	negativo	LMA M 4	45,XY,-7
25	01	39	44	02 t	17 / 02 / 06	12,9	negativo	LLA pré B calla+	S/M
26	02	40	45	acabou	17 / 02 / 06	6,5	negativo	LLA pré B calla+	S/M
27	119	41	46	04 t	17 / 02 / 06	4,10	negativo	LLA precursora B	46,XX
29	120	46	47	05 t	24 / 02 / 06	8,10	negativo	LLA prec B rec.	46,XY
31	121	50	48	04 t	02 / 03 / 06	3,8	negativo	LLA prec.B calla-	48,XX,-8,+10,+2mar...
33	122	54	49	04 t	06 / 03 / 06	12,5	negativo	LA bifen.	S/M
41	124	?	50	08 t	13 / 03 / 06	16,9	negativo	LLA pré B calla+	S/M
48/06 11/07	125-1 125-2	73	51	04 t	05 / 04 / 06	6	negativo	LMA D e rec.	46,XX
54	03	85	52	07 t	19 / 04 / 06	5,5	AML1/ETO	LMA	46,XY
56	04	87	53	07 t	26 / 04 / 06	5	negativo	LMA b.e. HLA-DR	46,XX
57	28	88	54	01 t	26 / 04 / 06	3,10	negativo	LMA rec.	46,XY
66	06	102	55	03 t	17 / 05 / 06	4	TEL/AML1	LLA pré B calla+	46,XY
67	07	106	56	-----	22 / 05 / 2006	15,8	negativo	LMA M0	46,XY
73	11	119	57	04 t	31 / 05 / 06	7,11	AML1/ETO	LMA M2	45,XX,t(8;21)
-----	12	121	58	-----	01 / 06 / 06	13,3	BCR/ABL p210	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
76	14	123	59	04 t	05 / 06 / 06	2	CBFB/MYH11	LMA M4	46,XY

IF	HA	CG	O	Cong.	Coleta	Idade	RT- PCR	IF	CG
77	13	125	60	04 t	07 / 06 / 06	3,10	negativo	LLA pré B calla+	49,XY,+C,+C,+G
80	15	130	61	02 t	14 / 06 / 06	16,2	negativo	LA bifenotípica	45,XX,-16,del(17)(p11.1),+mar
81	29	131	62	03 t	16 / 06 / 06	10,7	negativo	LLA prec. B calla- rec.	46,XX
83	16	135	63	03 t	19 / 06 / 06	10,6	negativo	LLA pré B calla+	36,XX,-2,-3,-4,-7,-8,-12...
86	17	137	64	04 t	21 / 06 / 06	9,8	negativo	LLA pré B calla+	S/M
89	18	141	65	04 t	23 / 06 / 06	11,2	negativo	LMA M 3	46,XY
90/06 101/07	19-1 19-2	142	66	-----	23 / 06 / 06	10,7	E2A/PBX1 (101/07)	LLA pré B calla+ D e rec.	46,XY
93	127	65/145	67	04 t	27 / 06 / 06	7,5	negativo	LLA pré B calla+	46,XY
95	20	150	68	04 t	29 / 06 / 06	6,7	negativo	LLA pré B calla+	55,XY,+4,+4,+5,+6,+9...
97	21	153	69	-----	06 / 07 / 06	1,8	negativo	LLA pré B calla+	46,XY/45,X
106	128	SR	70	03 t	21 / 06 / 06	6,1	negativo	LA bifen.	Não realizado
111	22	Xerox	71	04 t	31 / 06 / 06	15,11	negativo	LLA pré B calla+	57,XY,+X,+4,+6,+7,+14...
117	23	185/31	72	12 t	10 / 08 / 06	13,8	BCR/ABL p210	LMC	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
118	25	187	73	02 t	14 / 08 / 06	9,10	negativo	LMA M 3	S/M
119	24	188	74	02 t	14 / 08 / 06	9	negativo	LLA pré B calla+	hiperd. 2n=56
122	26	195	75	02 t	15 / 08 / 06	3,2	negativo	LLA pré B calla+	S/M
131	129	199/36	76	02 t	18 / 08 / 06	4	negativo	LLA pré B calla+	S/M
135	130	209	77	05 t	28 / 08 / 06	16,10	E2A/PBX1	LLA pré B calla+	pos.env. croms. 19 em t
138	30	217	78	10 t	04 / 09 / 06	11,2	negativo	LMA	S/M
Partc.	31	SR	79	-----	18 / 09 / 06	15,2	negativo	LLA pré B calla+	não realizado
144	33	227	80	-----	19 / 09 / 06	17,6	E2A/PBX1	LLA pré B calla+	S/M
146	32	229	81	-----	18 / 09 / 06	7,3	negativo	LLA pré B calla+	S/M
160	35	248	82	-----	03 / 10 / 06	5,4	negativo	LLA pré B calla+ rec.	S/M
162	36	253	83	02 t	06 / 10 / 06	11,4	PML/RARA bcr3	LMA M 3	46,XY

IF	HA	CG	O	Cong.	Coleta	Idade	RT- PCR	IF	CG
173	37	266	84	-----	25 / 10 / 06	6,7	negativo	LLA pré B calla+	S/M
176	38	271	85	02 t	31 / 10 / 06	7,9	negativo	LLA pré B calla+	S/M
181	132	?	86	05 t	28 / 09 / 2005	3,8	negativo	LMA M 3	46,XX
188	42	289	87	-----	16 / 11 / 2006	14,3	negativo	LMA M0	46,XX
192	44	292	88	-----	23 / 11 / 06	4,3	TEL/AML1	LLA pré B calla+	48,XX
195	45	298	89	-----	1º / 12 / 06	4,2	negativo	LLA pré B calla+	S/M
197	46	296	90	-----	1º / 12 / 06	13,7	AML1/ETO	LMA rec.	46,XX,t(8;21)(q22;q22)
204	47	309	91	04 t	18 / 12 / 06	16,11	TEL/AML1	LLA pré B calla+	S/M

Universidade de Brasília / Hospital de Apoio de Brasília
Laboratório de Biologia do Gene / Núcleo de Genética

10.5. Amostras de pacientes pediátricos com diagnóstico de leucemia, analisados em **2007**

IF	HA	CG	O	Coleta	Idade	RT-PCR	IF	CG
01	HA-48	07	92	09 / 01 / 07	2,2	negativo	LLA pré B calla +	54,XX[2]
10	HA-49	SR	93	27 / 02 / 07	6	negativo	LLA pré B calla +	não realizado
07/07 93/07	HA-50-1 HA-50-2	SR	94	16 / 02 / 07	2,4	negativo	LMA rec.	Não realizado
16	HA-52	34/38	95	08 / 03 / 07	17,2	negativo	LMA	46,XX
17	HA-53	36	96	12 / 03 / 07	13,3	AML1/ETO	LMA + lupus	46,XX,t(8;21)(q22;q22)
20	HA-54	SR	97	19 / 03 / 07	2,5	negativo	LLA pré B calla +	não realizado
19	HA-55	41	98	19 / 03 / 07	16,10	negativo	LLA pré B calla +	S/M
24	HA-56	46	99	03 / 04 / 07	2	negativo	LLA prec.B	S/M
29	HA-59	50	100	24 / 04 / 07	9,2	negativo	LLA pré B calla +	S/M
32	HA-61	52	101	03 / 05 / 07	2,5	negativo	LLA pré B calla +	46,XX
33	HA-62	53	102	15 / 05 / 07	4,9	TEL/AML1	LLA pré B calla +	S/M
34	HA-63	SR	103	17 / 05 / 07	5	TEL/AML1	LLA pré B calla +	não realizado
35	HA-66	56	104	22 / 05 / 07	14,2	negativo	LLA pré B calla +	46,XX
36	HA-65	57	105	22 / 05 / 07	11,7	BCR/ABL p190	LLA pré B calla +	S/M
37	HA-64	58	106	22 / 05 / 07	3,3	negativo	LLA pré B calla +	S/M
38/07 H. Base	HA-68-1 HA-68-2	59/68	107	29 / 05 / 07	15,6	PML/RARA bcr1	LMA M 3	46,XY
41	HA-69	63	108	11 / 06 / 07	11,2	negativo	LMA M4/M5	46,XY
42	HA-70	62	109	11 / 06 / 07	4,11	negativo	LLA pré B calla +	46,XY

IF	HA	CG	O	Coleta	Idade	RT- PCR	IF	CG
43	HA-71	64	110	14 / 06 / 07	5,8	TEL/AML1	LLA pré B calla +	46,XX
--	HA-73	66	111	25 / 06 / 07	12,7	negativo	LLA prec. B	S/M
48	HA-74	67	112	27 / 06 / 07	12,10	negativo	LLA prec. B	46,XX
55	HA-77	SR	113	30 / 07 / 07	16,4	BCR/ABL p210	LMC	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
99	HA-115	97	114	05 / 11 / 07	15,6	negativo	LLA prec. B	S/M
09	HA-123	SR	115	12 / 05 / 07	2 meses	negativo	LA bif.	Não realizado
44	HA-135	SR	116	20 / 06 / 07	16	negativo	LLA pré B calla +	não realizado
51	HA-136	70	117	23 / 07 / 07	1,9	negativo	LLA pré B calla +	não realizado
58	HA-137	76	118	06 / 08 / 07	2,10	negativo	LLA pré B calla +	S/M
66	HA-139	SR	119	03 / 09 / 07	8,4	negativo	LLA pré B calla +	não realizado
67	HA-140	SR	120	03 / 09 / 07	4,11	negativo	LLA pré B calla +	não realizado
68	HA-141	SR	121	10 / 09 / 07	6,6	TEL/AML1	LLA pré B calla +	não realizado
74	HA-144	88	122	13 / 09 / 07	11,3	negativo	LLA pré B calla +	46,XX
75	HA-145	89	123	17 / 09 / 07	8,6	negativo	LLA pré B calla + rec.	52,XY,+X,t(1;6)(q?q?),....
76	HA-146	90	124	17 / 09 / 07	9 meses	negativo	LLA pré B calla +	S/M
78	HA-147	8570	125	26 / 09 / 07	3,9	TEL/AML1	LLA pré B calla +	46,XX
79	HA-143	87	126	27 / 09 / 07	9,8	negativo	LMA M7	45,XX,der(3)?inv(3)(p?)t(3;9).....
85	HA-149	8396	127	04 / 10 / 07	9 meses	negativo	LLA pró B calla -	49,XY,+6,+8,+19
86	HA-150	91	128	04 / 10 / 07	2,1	negativo	LLA B calla +	S/M
91	HA-151	94	129	08 / 10 / 07	5,7	negativo	LLA pré B calla +	46,XY
92	HA-152	95	130	17 / 10 / 07	3,8	TEL/AML1	LLA pré B calla + rec.	S/M
94	HA-153	96	131	22 / 10 / 07	2,2	TEL/AML1	LLA pré B calla +	não realizado
102	HA-154		132	20 / 11 / 07	3,4	negativo	LLA pré B calla +	S/M
118	HA-158	103	133	26 / 12 / 07	5,11	negativo	LMA	46,XX,del(3)(p21),t(15;17)(q?q?)

11. ANEXOS

11.1 Primers utilizados para pesquisa de rearranjos cromossômicos em leucemias

BIOMED-1 Concerted Action e St Jude Children's Research Hospital Protocol

Biomed-1 Concerted Action					
IDT	PRIMER	SEQÜÊNCIA 5'→3'	ALTERAÇÃO	GENE HÍBRIDO	LEUCEMIA
(9;22)A1	BCR-b1-A	GAAGTGTTCAGAAAGCTTCTCC	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL p210</i>	LMC
(9;22)B	ABL-a3-B	GTTTGGGCTTCACACCATTC	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL</i>	LMC/LLA B
(9;22)C1	BCR-b2-C	CAGATGCTGACCAACTCGTGT	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL p210</i>	LMC
(9;22)E	ABL-a3-E3'	TGACTGGCGTGATGTAGTTGCTT	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL</i>	LLA B
(9;22)A2	BCR-e1-A2	GACTGCAGCTCCAATGAGAAC	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL p190</i>	LLA B
(9;22)C2	BCR-e1-C	CAGAACTCGCAACAGTCTTTC	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL p190</i>	LLA B
(4;11)A	MLL-A	CCGCCTCAGCCACCTAC	t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL-AF4</i>	LLA B
(4;11)B	AF4-B	TGTCACTGAGCTGAAGGTCG	t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL-AF4</i>	LLA B
(4;11)D	AF4-D	CGTTCCTTGCTGAGAATTTG	t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL-AF4</i>	LLA B
(4;11)E	MLL-E5'	AAGCCCGTCGAGGAAAAG	t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL-AF4</i>	LLA B
(1;19)A	E2A-A	CACCAGCCTCATGCACAAC	t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A-PBX1</i>	LLA B
(1;19)B	PBX-B	TCGCAGGAGATTCATCACG	t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A-PBX1</i>	LLA B
(1;19)C	E2A-C	CACCCTCCCTGACCTGTCT	t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A-PBX1</i>	LLA B
(1;19)E	PBX-E3'	TGAACTTGCGGTGGATGAT	t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A-PBX1</i>	LLA B
(12;21)A	TEL-A bis	TGCACCCTCTGATCCTGAAC	t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL-AML1</i>	LLA B
(12;21)B	AML1-B tris	AACGCCTCGCTCATCTTGC	t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL-AML1</i>	LLA B
(12;21)D	AML1-D tris	TGGAAGGCGGCGTGAAGC	t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL-AML1</i>	LLA B
(12;21)E	TEL-E5' bis	ACCGCTCCAGGTCACCTATC	t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL-AML1</i>	LLA B
(15;17)A1	PML-A1	CAGTGTACGCCTTCTCCATCA	t(15;17)(q23;q21)	<i>PML-RARA</i>	LMA M3
(15;17)B	RARA-B	GCTTGATAGATGCGGGTAGA	t(15;17)(q23;q21)	<i>PML-RARA</i>	LMA M3
(15;17)C1	PML-C1	TCAAGATGGAGTCTGAGGAGG	t(15;17)(q23;q21)	<i>PML-RARA</i>	LMA M3
(15;17)C2	PML-C2	AGCGCGACTACGAGGAGAT	t(15;17)(q23;q21)	<i>PML-RARA</i>	LMA M3
(15;17)E	RARA-E3'	GCCCCACTTCAAAGCACTTCT	t(15;17)(q23;q21)	<i>PML-RARA</i>	LMA M3
(8;21)A	AML1-Abis	CTACCGCAGCCATGAAGAACC	t(8;21)(q22;q22)	<i>AML1-ETO</i>	LMA M2
(8;21)B	ETO-Bbis	AGAGGAAGGCCCATTTGCTGAA	t(8;21)(q22;q22)	<i>AML1-ETO</i>	LMA M2
(8;21)D	ETO-Dter	TGAACTGGTTCTTGGAGCTCCT	t(8;21)(q22;q22)	<i>AML1-ETO</i>	LMA M2
(8;21)E	AML1-	TGGCTGGCAATGATGAAAACACT	t(8;21)(q22;q22)	<i>AML1-ETO</i>	LMA M2
inv(16)A	CBFB-A	GCAGGCAAGGTATATTTGAAGG	inv(16)(p13;q22)	<i>CBFB-MYH11</i>	LMA M4
inv(16)B1	MYH11-B1	TGAAGCAACTCCTGGGTGTC	inv(16)(p13;q22)	<i>CBFB-MYH11</i>	LMA M4
inv(16)B2	MYH11-B2	TCCTCTTCTCCTCATTTCTGCTC	inv(16)(p13;q22)	<i>CBFB-MYH11</i>	LMA M4
inv(16)D1	MYH11-D1	TCCCTGTGACGCTCTCAACT	inv(16)(p13;q22)	<i>CBFB-MYH11</i>	LMA M4
inv(16)D2	MYH11-D2	GTTGACTTCCAGCCGAGT	inv(16)(p13;q22)	<i>CBFB-MYH11</i>	LMA M4
inv(16)E	CBFB-E5'	CAGGGAGAACAGCGACAAACA	inv(16)(p13;q22)	<i>CBFB-MYH11</i>	LMA M4
St Jude Children's Research Hospital Protocol					
IDT	PRIMER	SEQÜÊNCIA 5'→3'	ALTERAÇÃO	GENE HÍBRIDO	LEUCEMIA
1A	abl3'	AGATACTCAGCGGCATTG	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL p210/P190</i>	LMC / LMA
4	922e5'	CGGTTGTGCTGTCCGAGG	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL p190</i>	LLA B
5	CML-5' bcr	AGCTTCTCCCTCACATCCGTG	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL p210</i>	LMC
6	(4;11)e3'	GGTTACAGAACTGACATGCTG	t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL/AF-4</i>	LLA B
7	(4;11)e5'	AAAGCAGCCTCCACCACC	t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL/AF-4</i>	LLA B
9A	3'der21	CATTGCCAGCCATCACAGTGAC	t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL/AML-1</i>	LLA B
10	5'ex3tel	GATGACGTAGCCAGTGGCTC	t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL/AML-1</i>	LLA B
12	3'(1;19)brk2	TAACCTCTCTTTGGCTTCTC	t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A/PBX1</i>	LLA B
13	5'(1;19)	CAGCCTCATGCACAACCAC	t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A/PBX1</i>	LLA B

IDT	PRIMER	SEQÜÊNCIA 5'→3'	ALTERAÇÃO	GENE HÍBRIDO	LEUCEMIA
26	(8;21)3'	AGGCTGTAGGAGAATGG	t(8;21)(q22;q22)	<i>AML-1/ETO</i>	LMA M2
27	(8;21)5'	AGCCATGAAGAACCAGG	t(8;21)(q22;q22)	<i>AML-1/ETO</i>	LMA M2
29	APLB3'	ATGCAGTTCTTGTCCTCCGGTGA	t(15;17)(q23;q21)	<i>PML/RARα</i>	LMA M3
31	APLC5'	GCGGTACCAGCGCGACTACGAGGAGAT	t(15;17)(q23;q21)	<i>PML/RARα</i>	LMA M3
33	M1	CTCTTCTCCTCATTCTGCTC	inv(16)(p13;q22)	<i>CBF-β/MYH11</i>	LMA M4
34	M2	ACTGCAGCTCCTGCACCTGC	inv(16)(p13;q22)	<i>CBF-β/MYH11</i>	LMA M4
35	C1	GCAGGCAAGGTATATTTGAAGG	inv(16)(p13;q22)	<i>CBF-β/MYH11</i>	LMA M4
37	AF93'	TATGCCTTGTCACATTCACC	t(9;11)(p22;q13)	<i>MLL/AF9</i>	LLA B/LMA
38	MLL5'	CGCCTCAGCCACCTACTACA	t(9;11), t(11;19)	<i>MLL/AF9-ENLA 1</i> <i>ENLA 2- ELLA</i>	LLA B
39	ENLA-1 3'	TGCAGCCAGAAGACCACCTT	t(11;19)(q23;p13)	<i>MLL/ENLA 1</i>	LLA B
40	ENLA-2 3'	CCGGCAGCCTCCTCGCCTG	t(11;19)(q23;p13)	<i>MLL/ENLA 2</i>	LLA B
41	ELLA 3'	GCCGATGTTGGAGAGGTAGA	t(11;19)(q23;p13)	<i>MLL/ELLA</i>	LLA B
GAPDH					
	PR 194	CCCATCACCATCTTCCAGG			
	PR 195	AGTGAGCTTCCCGTTCAGC			

11.2. Soluções preparadas

Biologia Molecular

11.2.1 PBS 1X

NaCl	137mM	8g
KCl	2,7mM	0,2g
KH ₂ PO ₄	1,5mM	0,24g
Na ₂ HPO ₄	7mM	1,44g
pH 7,4		

11.2.2 MOPS 10X

MOPS	0,2M	41,85g
EDTA	0,01M	3,72g
acetato de sódio	0,05M	4,102g
pH 7,0		

11.2.3 Tampão de amostra para RNA

Formamida	750µl
MOPs 10X	150µl
Formaldeído	240µl
H ₂ O	100µl
Glicerol 100%	100µl
Azul de bromofenol 10%	80µl

11.2.4 Gel desnaturante de agarose

Antes de iniciar o preparo do gel, colocar a cuba de eletroforese e o pente de molho em DEPC 0,1% na câmara fria, por, no mínimo, 1 hora.

agarose	0,3g
MOPS 10X	3ml
Água milli Q	22ml
aquecer para solubilizar a agarose e deixar resfriar	
formaldeído	5ml

11.2.5 Brometo de etídio

O brometo de etídio é intercalante de ácido nucléico sendo, portanto, necessário para permitir a visualização do RNA e do DNA no gel. No gel de RNA o brometo de etídio (0,0001%) é colocado diretamente na amostra a ser aplicada e é então menos concentrado que o utilizado para evidenciar o DNA (0,001%), que, neste caso, é colocado diretamente no gel enquanto este está sendo preparado.

11.2.6 TEB 5X

Tris-base	0,45 M	54g
H ₃ BO ₃	0,45M	27,5g
EDTA	0,01M	14,88g

pH: 8,0

OBS: Solução de uso 0,5X

11.2.7 Tampão de amostra 10X

O tampão de amostra é utilizado como agente espessante, isto é, para evitar o refluxo da amostra de DNA, ao ser aplicada no poço do gel, e como corante, permitindo o acompanhamento da frente de corrida. Dois corantes são utilizados neste tampão: o azul de bromofenol, que migra concomitantemente com os fragmentos de 300pb e o xileno cianol, que migra com a mesma velocidade dos fragmentos lineares de 4kb.

glicerol 50%

TEB 10X

xileno cianol 0,01%

azul de bromofenol 0,01%

11.2.8 Gel de agarose (1%)

TEB 0,5X	150 ml
agarose	1,5g
aquecer até solubilizar completamente	
brometo de etídio (0,001%)	3,5µl

Citogenética

11.2.9 Meio de cultura – RPMI

Meio RPMI (1640)	80%
Soro fetal bovino	15%
Fitohemaglutinina	4%
Penicilina	5mg
Estreptomicina	10mg
Água estéril	1L

Obs: Aliquotar 9mL em garrafinhas de cultura e congelar.

11.2.10 Tampão Fosfato

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,06M
KH_2PO_4	0,06M

11.2.11 Solução Hipotônica (KCl)

Cloreto de Potássio - KCl	0,075M
---------------------------	--------

11.2.12 Solução de Tripsina

Tripsina (<i>Sigma</i>)	500g
Água milli Q	15mL

11.2.13 Solução de Colchicina – 10X

Colchicina	160mg
Água milli Q	100mL

Obs: Armazenar em frasco âmbar na geladeira.

11.2.14 Solução de Giemsa

Giemsa (<i>Merck</i>)	1g
Glicerina	54mL
Metanol	84mL

Obs: Armazenar em frasco âmbar a temperatura ambiente

11.2.15 Solução de Hank's Balance Salt Solution (HBSS) – 10X

NaCl	80g
KCl	4,0g
Na ₂ HPO ₄	0.5g
KH ₂ PO ₄	0.6g
Glucose	10g
Água dest. qsp	1L

Obs: Ajustar o pH para 8,0. Aliquotar 100mL e congelar.

Solução para uso: 20mL de HBSS + 180mL de H₂O destilada.

11.2.16 Solução de KOH

KOH	40g
Álcool comercial 99%	1L