



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ERICA AIRES GIL

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS EM
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFÓIDE
AGUDA DO RIO GRANDE DO NORTE**

**NATAL-RN
2011**

ERICA AIRES GIL

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS EM
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFÓIDE
AGUDA DO RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito final à obtenção do grau de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior

**NATAL-RN
2011**

G463i

Gil, Erica Aires.

Investigação das alterações citogenéticas em pacientes pediátricos com leucemia linfóide / Erica Aires Gil. – Natal, 2011. 97f.

Orientador: Prof.. Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Junior.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Citogenética – Dissertação. 2. Alterações cromossômicas – Dissertação. 3. Leucemia linfoblástica aguda – Dissertação. I. Cavalcanti Júnior, Geraldo Barroso. II. Título.

RN-UF/BS-CCS

CDU: 616.155.392(043.3)

ERICA AIRES GIL

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS EM
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFÓIDE
AGUDA DO RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito final à obtenção do grau de mestre.

BANCA EXAMINADORA

1º Examinador: Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior
DACT/UFRN (Presidente)

2º Examinador Externo: Prof. Dr. Carlos Roberto Alves / FIOCRUZ-RJ

3º Examinador Interno: Dulce Marta Smiguel / DACT/UFRN

*Dedico este trabalho e a minha incursão no estudo da Citogenética ao meu querido, amado e saudoso pai (Gentil Gil **in memorian**). Sua lembrança me torna forte e me estimula a seguir por este campo de pesquisa científica.*

AGRADECIMENTOS

A minha **amada mãe**, eu agradeço todos os dias da minha vida pelo imenso amor, dedicação, paciência, zelo e apoio nas horas mais difíceis. Graças a ela eu sempre tive exemplo, força e incentivo para partir em busca de meu crescimento pessoal e profissional;

Ao meu **companheiro Henrique**, pelo apoio, respeito, tolerância, paciência, parceria e por suas palavras e atitudes que sempre me conferiram força e alegria nos momentos em que essas me faltaram;

Ao meu orientador, **Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior**, minha eterna gratidão pela oportunidade, disponibilidade e pelos seus ensinamentos que foram indispensáveis para o meu crescimento acadêmico e profissional;

As minhas irmãs, **Angélica e Jeane**, pela força e por acreditar em mim e no que eu poderia me tornar como profissional;

Ao **Laboratório DNA Center**, pelo suporte e infra-estrutura para a realização deste estudo.

Às minhas queridas e amadas **amigas Gilena, Ana Paula, Adriana, Regina, Dra Iracema e Eliane**, citogeneticistas do HEMORIO-RJ, por tornarem a minha profissão cada vez mais importante e por modificarem (para melhor) a minha vida profissional e pessoal.

A minha mais **nova BFF Profa. Dra. Tizah**, por compartilhar todo o seu conhecimento científico e por contribuir na elaboração deste estudo.

Aos **pacientes**, que permitiram ser investigados, colocando suas vidas à mostra e, assim, contribuíram para a pesquisa científica deste estudo;

Aos serviços especializados **LIGA Norte Riograndense Contra o Câncer, Hospital Infantil Varela Santiago, Centro de Oncologia e Hematologia de Mossoró e HEMORTE**, pela disposição dos prontuários e pela dedicação e comprometimento com a saúde do nosso estado;

Aos **médicos e médicas hematologistas**, pelo apoio, paciência e dedicação ao realizarem tão árduo e gratificante ofício;

RESUMO

As leucemias são grupos heterogêneos de neoplasias hematológicas, que resultam da transformação total ou parcial das células blásticas. A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é a neoplasia mais comum na infância, principalmente na população masculina caucasiana menor de 14 anos. Vários critérios podem ser adotados para classificar LLA, dentre eles a morfologia celular, a citoquímica, a imunofenotipagem e o estudo citogenético. A citogenética permite uma análise mais detalhada o que possibilita detectar as alterações cromossômicas das células leucêmicas. Estas alterações irão auxiliar no diagnóstico, na classificação, na caracterização de diferentes estágios, na avaliação da remissão e no prognóstico dessas neoplasias. Foram avaliados neste estudo 30 pacientes com idade variando de quatro meses a dezessete anos, de ambos os sexos e de várias etnias. A faixa etária predominante neste estudo foi de pacientes entre um e dez anos (67%) com média de idade de 7 anos e meio, de etnia caucasiana (50%) e sexo masculino (57%). De acordo com a imunofenotipagem 93% dos pacientes apresentaram LLA de linhagem B precoce e 7% de linhagem T. Considerando a população total estudada, os achados clínicos mais frequentes foram linfadenopatia (37%), hepatomegalia (77%) e esplenomegalia (70%), podendo, em muitos casos um paciente apresentar mais de um desses achados. Em relação ao hemograma, a maioria dos pacientes apresentou hemoglobina abaixo de 10 g/dl (73%), contagem de leucócitos inferior a 10.000/ μ L (60%) e contagem de plaquetas abaixo de 150.000/ μ L (83%). As anormalidades cromossômicas foram observadas em 64%, dessas a hiperdiploidia foi à alteração numérica mais comum (67%), seguida pela hipodiploidia com 33%. Todos esses dados corroboram com os relatos da literatura. Adicionalmente, foram observadas alterações estruturais e/ou numéricas complexas ainda não descritas na literatura, as quais indicaram prognóstico desfavorável. Conclui-se que a partir deste trabalho foi possível demonstrar a importância do estudo citogenético no diagnóstico e na identificação de fatores prognósticos nos pacientes pediátricos com LLA do Rio Grande do Norte. Os resultados obtidos neste estudo são de extrema importância e ressaltam que pesquisas desta natureza devem ser realizadas com maior frequência em nosso Estado.

Palavras-chave: Leucemia Linfóide Aguda, Alterações Cromossômicas, Citogenética.

ABSTRACT

Leukemia is a heterogeneous group of hematologic malignancies that result from partial or total transformation of the blast cells. The Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common malignancy in childhood, especially in male, Caucasian children younger than 14 years. Several criteria are adopted to classify ALL, including the cell morphology, cytochemistry, immunophenotyping and cytogenetic analysis. Cytogenetic studies allow a more detailed analysis to detect chromosomal abnormalities of leukemic cells. These modifications will determine the diagnosis, classification, stage characterization, remission assessment and prognosis. In this study were evaluated 30 patients, aged from four months to seventeen years, of both sexes and various ethnicities. The age distribution showed that 67% of patients had between one and ten years (with mean age of XX years old), the most prevalent ethnic was Caucasian (50%) and 57% were males. According to immunophenotype, 93% of patients had B-cells progenitor ALL and 7% early lineage T. Considering the total studied population, the most frequent medical findings were lymphadenopathy (37%), hepatomegaly (77%) and splenomegaly (70%), where one patient could present more than one of these medical findings. Regarding the CBC, the majority of patients had hemoglobin below 10 g / dl (73%), leukocyte count less than 10.000/ μ L (60%) and platelet count below 150.000/ μ L (83%). Chromosomal abnormalities were observed in 64% of all patients, where hyperdiploidy was the most common numerical change (67%), followed by hypodiploid (33%). All these data are in agreement with the literature. Moreover, complexes structural and/or number changes not yet described in literature were observed, which indicated poor prognosis. Finally, we concluded that this study demonstrated the importance of cytogenetic study in the diagnosis and identification of prognostic factors in pediatric patients with ALL in Rio Grande do Norte. The results obtained in this study are extremely useful and emphasizes that surveys of this nature must be conducted more frequently in our state.

Keywords: Acute Lymphoid Leukemia, Chromosomal Changes, Cytogenetics.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação imunológica das leucemias agudas	26
Tabela 2 - Classificação imunológica das leucemias linfóides agudas	26
Tabela 3 – Critérios diagnósticos para a Leucemia Bifenotípica Aguda proposto pelo grupo Europeu para classificação imunológica das leucemias	27
Tabela 4 - Rearranjos cromossômicos, genes, morfologia e imunofenótipo	42/43
Tabela 5 – Características gerais e laboratoriais dos pacientes	51
Tabela 6 - Achados mais frequentes ao exame físico	52
Tabela 7 – Cariótipo, Perfil imunofenotípico e Tipo de alteração	53
Tabela 8 - Subclassificação das alterações numéricas	55
Tabela 9 – Cariótipos complexos e possíveis prognósticos	55
Tabela 10 - Frequência do sexo masculino em pacientes com	63
Tabela 11 - Sumário das frequências das alterações citogenéticas	65
Tabela 12 - Sumário das ploidias em crianças com LLA	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da ativação dos proto-oncogenes	15
Figura 2 - Cariótipo humano normal do sexo feminino	29
Figura 3 - Deleção cromossômica	32
Figura 4 - Isocromossomo	32
Figura 5 - Duplicação cromossômica	33
Figura 6 - Cromossomo em anel	34
Figura 7 - Inversão cromossômica	34
Figura 8 - Translocação cromossômica	35
Figura 9 - Inserção cromossômica	35
Figura 10 - t(9;22)(q34;q11)	40
Figura 11 - t(1;19)(q23;p13)	40
Figura 12 - 11q23- t(4;11)(q21;q23)	42
Figura 13 - Protocolo para cultura celular	50
Figura 14 - 48, XY, t (1;3) (q32;q27), +16, + mar	57
Figura 15 - 46,XY, del(11)(q23)	57
Figura 16 - Cariótipo complexo envolvendo os cromossomos 1, 7, 13 e 21	58
Figura 17 - Cariótipo complexo apresentando ph e add(14)(q32)	59
Figura 18 - Cariótipo complexo em paciente com Síndrome de Down	59
Figura 19 - 46,XX, + mar, - 20	60
Figura 20 - Hiperdiploidia com add(16)(p13.3) e add(14)(q32?)	60
Figura 21 - Cariótipo complexo envolvendo o cromossomo 7	61
Figura 22 - Hipodiploidia com del(20q), t(9;14)(q22?;q32?)	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

add	Adição Cromossômica
AUL	<i>Acute Undifferentiated Leukemia</i>
BAL	<i>Biphenotypic Acute Leukemia</i>
CC	Citogenética Convencional
CCG	<i>Children's Cancer Group</i>
CD	<i>Cluster Designation</i>
del	Deleção Cromossômica
dic	Cromossomo Dicêntrico
der	Derivativo
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dup	Duplicação Cromossômica
EBV	<i>Epstein Barr virus</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EGIL	<i>European Group for The Immunological Classification of Leukemias</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAB	<i>French-American-British</i>
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
HTLV-I	<i>Human T-Lymphotropic Virus Type I</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>Human Leukocytic Antigen</i>
I	Isocromossomo
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer World Health Organization</i>
INCA	<i>Instituto Nacional Do Câncer</i>
Inv	Inversão Cromossômica
Ins	Inserção Cromossômica
ISCN	<i>System For Human Cytogenetic Nomenclature</i>
LA	Leucemia Aguda
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica

mar	Cromossomo Marcador
MIC	Grupo de Morfologia Imunofenotipagem Citogenética
MRC	<i>Medical Research Council</i>
MO	Medula Óssea
MPO	Mieloperoxidase
p	(<i>petit</i>) braços cromossômicos superiores ou curtos
Ph	Cromossomo Philadéfi
pH	Potencial Hidrogeniônico
q	Braços cromossômicos inferiores ou longos
OMS	Organização Mundial da Saúde
POG	<i>Pediatric Oncology Group</i>
REAL	<i>Revised European-American Lymphoma</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> - Meio de cultura celular
SBF	Soro Bovino Fetal
SD	Síndrome de Down
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Sangue Periférico
SPSS	<i>Statistical Package For The Social Sciences</i>
SWOG	<i>Southwest Oncology Group</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
t	Translocação Cromossômica
°C	Grau celsius
≥	Maior igual
>	Maior
<	Menor
%	Por cento
≤	Menor igual
μL	Microlitros
g/dL	Gramas por decilitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Neoplasias Hematológicas	18
2.2 HISTÓRIA DA LEUCEMIA	18
2.3 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA)	19
2.3.1 Incidência	19
2.3.2 Fatores Etiológicos	20
2.3.2.1 <i>Genética</i>	20
2.3.2.2 <i>Fatores Ambientais</i>	21
2.3.3 Diagnóstico laboratorial	22
2.3.4 Classificação das LLAs	23
2.3.4.1 <i>Classificação Morfológica</i>	23
2.3.4.2 <i>Classificação Imunológica ou classificação EGIL</i>	24
2.3.4.3 <i>Classificação OMS</i>	27
2.4 CITOGENÉTICA	28
2.4.1 Considerações gerais	28
2.4.2 História da Citogenética	29
2.4.3 Anomalias Cromossômicas	30
2.4.3.1 <i>Deleção Cromossômica</i>	32
2.4.3.2 <i>Isocromossomo</i>	32
2.4.3.3 <i>Duplicação cromossômica</i>	33
2.4.3.4 <i>Cromossomo em anel</i>	33

2.4.3.5 <i>Inversão cromossômica</i>	34
2.4.3.6 <i>Translocação cromossômica</i>	34
2.4.3.7 <i>Inserção cromossômica</i>	35
2.5 CITOGENÉTICA NAS LEUCEMIAS AGUDAS	36
2.5.1 Alterações Numéricas nas LLAs	36
2.5.1.1 <i>Hiperdiploidia</i>	37
2.5.1.2 <i>Near-triploidia e near-tetraploidia</i>	38
2.5.1.3 <i>Hipodiploidia</i>	38
2.5.1.4 <i>Pseudodiploidia</i>	39
2.5.2 Alterações Estruturais nas LLAs	39
2.5.2.1 - <i>t(9;22)(q34;q11.2)</i>	39
2.5.2.2 - <i>t(1;19)(q23;p13)</i>	40
2.5.2.3 - <i>t(12;21)(p13;q22)</i>	41
2.5.2.4 – <i>Anormalidades envolvendo 11q23- t(4;11)(q21;q23)</i>	41
2.5.3 Fatores prognósticos	44
3 OBJETIVOS	45
3.1 PRINCIPAL	45
3.2 ESPECÍFICOS	45
4 METODOLOGIA	46
4.1 CASUÍSTICA	46
4.1.1 Caracterização do estudo	46
4.1.2 Critérios de Inclusão	46
4.1.3 Critérios de Exclusão	46
4.1.4 Comitê de ética	47
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	47

4.2.1 Obtenção das amostras	47
4.3 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL	47
4.3.1 Cultura e Pós-Cultura	47
4.3.2 Bandeamento Cromossômico	48
4.3.2.1 Bandeamento G	48
4.3.2.1.1 <i>Bandeamento G com Tampão Fosfato / Wright</i>	48
4.3.3 Nomenclatura	49
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5 RESULTADOS	51
5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PACIENTES	51
5.2 FREQUÊNCIAS DAS ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS	53
5.3 RECIDIVAS E ÓBITOS	56
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
APÊNDICE A	82
APÊNDICE B	84
ANEXO 1	85
ANEXO 2	86

1 INTRODUÇÃO

As leucemias agudas (LAs) compreendem um grupo de neoplasias caracterizadas pela proliferação clonal e acúmulo na medula óssea de células hematopoéticas imaturas denominadas blastos. Estas células ocupam o ambiente medular e inibem o crescimento e a maturação normal dos precursores eritróides, mielóides e megacariocitários. As LAs se diferenciam entre si com respeito à célula de origem, apresentação clínica, curso e resposta terapêutica ⁽¹⁾.

À medida que se acumulam na medula óssea as células leucêmicas suprimem a expansão das células progenitoras hematopoéticas normais, refletindo as manifestações clínicas comumente observadas nas leucemias agudas no momento do diagnóstico, tais como: anemia, infecções e hemorragias que são resultantes da escassez de hemácias, leucócitos funcionais e plaquetas, respectivamente ⁽¹⁾.

Nas leucemias agudas dois estágios de desenvolvimento hematopoético são prováveis alvos para a transformação maligna: a célula tronco multipotente e as células precursoras não linfóides e linfóides (B e T), originando a leucemia mielóide aguda (LMA) e a leucemia linfoblástica aguda (LLA), respectivamente ⁽²⁾. O estágio onde essa transformação ocorre tem importantes implicações clínicas, terapêuticas e prognósticas, nas quais a resposta clínica inicial e a chance de cura variam de acordo com o estágio em que as células são afetadas ^(1,3).

A etiologia das leucemias ainda permanece obscura, e sua patogênese estaria relacionada às alterações genéticas, ambientais e imunológicas. Assim como outros tipos de câncer resultam de mutações no DNA de células somáticas. Vários fatores ambientais, agentes químicos (pesticidas, herbicidas, benzeno, borracha, fumo, tintas, derivados de petróleo, óxido de etileno) ou fármacos (cloranfenicol, fenilbutazona, cloroquina), exposição laboral ou acidental à radiação ionizante, radioterapia, quimioterapia no tratamento de neoplasias prévias, infecções virais por: *Epstein Barr virus* (EBV), *Human immunodeficiency virus* (HIV) e o *human T-lymphotropic virus type I* (HTLV-1), doenças genéticas, como a síndrome de Down, bem como algumas doenças onco-hematológicas, como a síndrome mielodisplásica, podem aumentar o risco de leucemias ^(4,5).

Os eventos moleculares responsáveis pela transformação leucêmica ainda não são conhecidos, entretanto o resultado final consiste na proliferação das células hematopoéticas imaturas que perderam sua capacidade de diferenciação normal típica ⁽⁴⁾. No entanto, a

ativação de proto-oncogenes e mutações em genes supressores que regulam o ciclo celular parecem estar envolvidos na perda do controle da proliferação celular, diferenciação, maturação e morte celular programada (apoptose). Desta forma, o processo tumoral está intimamente relacionado com a alteração do ciclo celular. Neste nível, a leucemia é um processo dinâmico decorrente de múltiplas etapas onde a célula mutada sofre algumas divisões, produzindo um clone de células que apresentam a mutação^(5,6).

Novas mutações podem ocorrer em cada estágio da proliferação clonal, até o momento em que uma célula adquire número de mutações suficientemente necessário para a transformação maligna. O tecido hematopoético apresenta elevada quantidade de células em divisão e diferenciação, desde célula tronco (*stem cell*) até as células mais diferenciadas. À medida que se diferenciam essas células perdem a capacidade de divisão, corroborando que a leucemogênese pode estar relacionada com alterações dos oncogenes e genes supressores de tumor⁽⁶⁾.

Alguns modelos de tumorigênese são baseados nos resultados de uma série de alterações dos genes que atuam direta ou indiretamente no controle do ciclo celular. Atualmente, são conhecidas duas classes de genes que atuam nos processos de tumorigênese: a primeira classe inclui os genes que controlam diretamente a proliferação celular, denominados proto-oncogenes, e os genes supressores de tumor; a segunda classe é formada por genes que não controlam diretamente o ciclo celular, mas controlam as taxas de mutações. Esses genes são muito importantes no reparo do DNA e são denominados *mutator genes*⁽⁷⁾.

Muitas vezes um proto-oncogene é ativado (FIG. 1) por translocação cromossômica a oncogene e se funde a outro gene celular. Os produtos resultantes destas translocações são os fatores de transcrição, cujas funções são de codificar proteínas que controlam o crescimento e a diferenciação celular. Estes genes híbridos têm importância na tumorigênese, pois têm a capacidade de controlar a expressão de diversos outros genes^(8,9).



Figura 1 - Esquema da ativação dos proto-oncogenes

Fonte: Carakushansky, 2001⁽¹⁰⁾.

As leucemias, assim como as mielodisplasias, síndromes mieloproliferativas e doenças relacionadas são distúrbios neoplásicos do tecido hematopoético. As leucemias são diferentes dos outros tipos de câncer do ponto de vista de sua evolução, uma vez que, para sua disseminação, são desnecessários os mecanismos de angiogênese, ruptura estrutural e de formação de metástase, comuns aos demais. Apesar dessas diferenças, elas se constituem em exemplo de ruptura do desenvolvimento normal celular, pois se originam de uma somatória de mutações que afetam as células tronco hematopoéticas^(4,6).

As leucemias podem ser classificadas e diagnosticadas de acordo com a morfologia e citoquímica, complementada pela imunofenotipagem, proposta pelo grupo *French-American-British* (FAB); pela morfologia, imunofenotipagem e citogenética, proposta pelos grupos MIC (classificação morfológica, imunológica e citogenética); pela imunofenotipagem, proposta pelo *European Group for the Immunological Classification of Leukemias* (EGIL); por eventos antecedentes e pela natureza da célula progenitora na qual a mutação leucemogênica ocorreu⁽¹¹⁾.

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou que em 2010 a incidência de câncer no Brasil foi de 489.270 novos casos de neoplasias, sendo as leucemias responsáveis por 9.580 casos, com maior prevalência no sexo masculino, ocupando a nona colocação dentre as neoplasias. Na região Nordeste as taxas brutas de incidência estimadas para leucemias foram de 4,01 casos para homens e 3,11 casos para mulheres (por 100.000 habitantes), sendo a oitava mais prevalente. No Rio Grande do Norte as taxas são de 6,42 casos e 4,98 casos, respectivamente, e, em Natal, a estimativa é de 30 novos casos. Dentre esses, 7,58 em homens e 6,67 em mulheres⁽¹²⁾.

Estudos na América do Norte, Ásia, e Europa apontaram que a taxa de incidência de leucemia em crianças aumentou nas duas últimas décadas^(13, 14). Embora parte deste aumento possa ser decorrente da melhoria nos registros de câncer e no diagnóstico da doença, esses fatos explicam apenas parte da tendência. Alguns autores acreditam que as taxas realmente aumentaram, porém os fatores contribuintes ainda não estão bem estabelecidos. Uma hipótese é de que a tendência esteja relacionada ao estilo de vida moderno.

Um campo importante na pesquisa do câncer é o delineamento das alterações citogenéticas em forma específica de tumores, relacionadas com os pontos de quebra dos diversos rearranjos estruturais. A associação da análise citogenética ao tipo de tumor e a eficácia do tratamento é uma parte importante da assistência de pacientes com câncer, particularmente nos portadores de leucemias⁽¹⁵⁾.

A citogenética clássica ou convencional tem sido considerada um instrumento de diagnóstico de grande importância na medicina clínica, visto que as anomalias cromossômicas são causas importantes de esterilidade, doenças congênitas e de retardo mental, revelando-se freqüentes em muitas formas de câncer, particularmente em alguns tipos de leucemias ^(16, 17). A sensibilidade da análise citogenética clássica pode ser melhorada quando complementada por técnicas moleculares tais como a *FISH* do termo em inglês *fluorescence in situ hybridization*, sendo importante ferramenta para confirmar a presença de rearranjos recorrentes ou na detecção de alterações não detectadas na citogenética clássica ⁽¹⁸⁾.

Diante do que foi apresentado, conclui-se que a citogenética é atualmente uma ferramenta importante no diagnóstico, classificação e prognóstico das leucemias agudas. Apesar da sua importância, ainda não havia sido realizado nenhum estudo referente às alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais presentes em pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda, no Rio Grande do Norte. Dessa forma, este estudo proporcionou uma significativa contribuição científica para o desenvolvimento de novas pesquisas dentro do nosso estado, principalmente no setor onco-hematológico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

As leucemias agudas, caracterizadas por maturação defeituosa, apresentam um infiltrado leucêmico constituído basicamente por células blásticas, enquanto as leucemias crônicas caracterizam-se por um elevado número de células em proliferação, que mantém a capacidade de se diferenciarem em células maduras ⁽¹⁹⁾. As agudas são divididas em Leucemia Linfóide Aguda (LLA), Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Leucemia Bifenotípica Aguda (LBA), enquanto as crônicas são separadas em Leucemia Linfóide Crônica (LLC) e Leucemia Mielóide Crônica (LMC) ⁽¹⁹⁾.

A LLC é caracterizada por apresentar linfócitos maduros (principalmente de linhagem B) no sangue, medula óssea e órgãos linfóides. Na LMC o achado característico é a predominância de células granulocíticas em todos os estágios de diferenciação no sangue, medula óssea, baço, fígado e outros órgãos ⁽²⁰⁾.

A LLA é caracterizada pela proliferação maligna de linfoblastos que são células precursoras dos linfócitos B e T ⁽²¹⁾. Diferente dos linfomas, pois, geralmente, estes últimos apresentam células mais maduras tipicamente linfóides nos gânglios linfáticos, baço, etc ⁽²³⁾. Alguns linfomas, como o linfoma linfoblástico e linfoma de Burkitt, apresentam características semelhantes às leucemias, todavia, são derivados de células imaturas e exigem terapêutica semelhante à utilizada para LLA ⁽²²⁾.

2.2 HISTÓRIA DA LEUCEMIA

No ano de 1827 foram registrados os primeiros casos de leucemias descritos na literatura médica, quando o médico francês Alfred Armand Lois Marie Velppeau registrou, numa paciente de 63 anos, uma doença com sintomas de febre, fraqueza, cálculos renais, hepatomegalia e esplenomegalia, apresentando, ainda, sangue com características que fugiam a normalidade – A especulação imediata de causa da doença foi o aparecimento de “corpúsculos brancos” ⁽²³⁾. Quase duas décadas depois, mais exatamente no ano de 1845, John Hughes Bennett, médico inglês, fisiologista e patologista, fez a primeira descrição da

leucemia como distúrbio sanguíneo. Entretanto, a primeira pessoa a descrever realmente a leucemia como uma doença foi o médico francês Donné Alfred⁽²³⁾.

Na cidade de Edimburgo, capital da Escócia, Bennett publicou um documento intitulado “Processo de Hipertrofia do Baço e do Fígado”, relatando diversos casos de óbitos de pacientes que apresentaram esplenomegalia e alterações de cor e consistência sanguíneas. Na ocasião, utilizou-se do termo “leucocythemia” para descrever a patologia, voltando a utilizá-lo em 1852 para intitular livro que escrevera, registrando o primeiro caso de cura que publicara em 1845⁽²³⁾.

O termo leucemia, porém, foi utilizado apenas em 1856, pelo patologista alemão Rudolf Ludwig Karl Virchow. Pioneiro no uso do microscópio ótico em patologia, Virchow descreveu o excesso de glóbulos brancos nos doentes com a síndrome clínica relatada por Velpeau e Bennett. Na incerteza da causa da elevada presença dos glóbulos brancos no sangue, descreveu suas observações simplesmente como "leucemia", do grego "glóbulos brancos", para referir-se a condição analisada⁽²³⁾. Em 1877, Paul Ehrlich desenvolveu uma técnica de coloração que permitiu a diferenciação entre os leucócitos normais e anormais – importante avanço para a classificação das leucemias⁽²⁴⁾.

2.3 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA)

2.3.1 Incidência

A incidência da leucemia apresenta dois picos em relação à idade, o primeiro na infância (menores de 14 anos) e o segundo em idosos⁽²⁵⁾. A idade é um fator fortemente associado com o tipo de leucemia. A LLA é uma doença da infância, particularmente de 3 a 5 anos⁽²⁶⁾ e a leucemia linfocítica crônica (LLC) é mais incidente nos idosos⁽²⁷⁾.

Nos EUA, crianças de 1 a 4 anos, quando comparadas com as demais faixas etárias, apresentaram as maiores taxas de LLA chegando a 73,2/1 milhão de pessoas anos, caindo para 32,2 em crianças de 5 a 9 anos e 19,4 em crianças de 10 a 14 anos⁽²⁸⁾. Na Inglaterra e no País de Gales, crianças entre 1 a 4 anos, apresentaram taxa de incidência de LLA semelhante a do estudo anterior (79,81/1 milhão de pessoas anos)⁽²⁹⁾. Coebergh et al., (2006)⁽³⁰⁾, relataram que as taxas de LLA mais elevadas foram observadas em crianças de 1 a 4 anos, reduzindo pela metade em crianças de 5 a 9 anos e aproximadamente 25% em crianças de 10 a 14 anos.

Na Índia, a LLA em crianças de 0 a 4 anos do sexo masculino apresentou taxa de 40,1/1 milhão, e para o sexo feminino de 34,3⁽³¹⁾. Embora a Índia apresente baixas taxas de incidência quando comparadas com as dos EUA e Europa, o comportamento da incidência segundo a faixa etária infantil foi semelhante, sendo maior entre crianças de 0 a 4 anos, seguida das de 5 a 9 anos de idade⁽³¹⁾.

A LLA em crianças apresenta uma razão de sexo mundial de 1,2 homens para cada mulher⁽²⁵⁾. Na Europa (< 14 anos) a incidência entre os meninos foi maior do que entre as meninas⁽²⁸⁾. Nos EUA em crianças menores de 14 anos, os meninos também apresentaram taxa maior que as meninas, 46,1 e 37,4/1 milhão de pessoas anos respectivamente⁽²⁸⁾. Na Índia a taxa de incidência para a LLA foi de 35,5 em meninos e 22,2/ 1 milhão em meninas⁽²⁹⁾. No Brasil, observou-se uma taxa de incidência de leucemia entre os meninos de 41 e 36/1 milhão em meninas⁽³²⁾.

2.3.2 Fatores Etiológicos

Estudos epidemiológicos sobre leucemias agudas na infância têm examinado inúmeros possíveis fatores de risco com intuito de revelar sua etiologia. Em revisão, Greaves (1997)⁽³³⁾ propôs um modelo dos possíveis fatores causais, subdivididos em: modificações genéticas (modificação no sistema imune, metabolismo carcinogênico, reparação do DNA e mutação de alelos herdados), fatores ambientais (radiação ionizante, solventes, infecções, toxinas, dieta e transformações viróticas) e modificações adquiridas (dieta, infecções e imunossupressores). Da mesma forma, Linet et al., (2006)⁽³⁴⁾ apontaram vários fatores de risco ambientais, tais como poluentes no ar, radiações ionizantes e não-ionizantes e aspectos ligados ao estilo de vida moderno.

2.3.2.1 Genética

A ocorrência de leucemias em crianças, bem como de outros cânceres, pode ser o resultado da interação entre a herança genética e exposições ambientais⁽³⁵⁾. A importância de eventos genéticos na vida uterina foi estudada utilizando concordância entre gêmeos com leucemia^(36, 37). De acordo com Zipf et al.,(2000)⁽³⁷⁾, gêmeos idênticos quando comparados com a população em geral possuem duas vezes mais chance de desenvolverem leucemia se um deles desenvolver a doença com idade menor do que 7 anos. A hipótese da leucemia na infância se originar durante a vida uterina se confirmou através de estudos realizados em

amostras de sangue coletado para o teste do pezinho de crianças que apresentaram leucemia, foram observadas alterações cromossômicas características de LLA nestas amostras, particularmente t(4;11) e t(12;21)⁽³⁸⁾.

Apesar de síndromes genéticas acometerem pequena proporção de crianças com leucemia, certas doenças hereditárias foram associadas com aumento do risco em desenvolver leucemia. Alguns exemplos são citados em revisão de Belson et al.,⁽³⁵⁾: anemia de Fanconi, Síndrome de Bloom, Síndrome de Down, Síndrome de Shwachman e neurofibromatose. Essas doenças são caracterizadas por defeito na reparação do DNA, anormalidade no número de cromossomos e translocações cromossômicas⁽³⁵⁾.

2.3.2.2 Fatores Ambientais

A radiação ionizante é uma das poucas exposições que esteve associada com leucemia em crianças, em particular com a LMA. A incidência de leucemia entre os sobreviventes das explosões das bombas de Hiroshima e Nagasaki (1945) foi 20 vezes maior que a taxa na população em geral. O efeito das radiações ionizantes pode ocorrer antes da concepção, durante a gestação ou no puerpério. Estudos sobre exposição a radiações ionizantes antes da concepção investigaram a exposição dos pais das crianças nos locais de trabalho⁽³⁹⁾. Os estudos realizados sobre exposições à radiação ionizante no útero direcionavam-se na análise dos efeitos das explosões ocorridas na II Guerra Mundial (1939-1945), no acidente de Chernobyl em 1986 (Rússia) e, ainda, pela exposição a exames que envolvem o uso de raio-X. O estudo em Chernobyl encontrou risco aumentado de leucemia em crianças para exposições durante a vida intra uterina de pessoas que viviam nas áreas do acidente⁽⁴⁰⁾.

A partir da experiência das bombas atômicas de Hiroshima e Nagasaki, a radiação foi admitida como causa das LLA, LMA e LMC nos sobreviventes⁽⁴¹⁾. Porém, os diferentes subtipos de leucemia implicam em diferentes mecanismos causais da doença e, apesar dos grandes progressos no diagnóstico e na terapia das leucemias agudas, sua etiologia permanece obscura.

A classe de compostos químicos mais comumente associada com leucemia em crianças são os hidrocarbonetos e pesticidas. Estudos examinaram a associação entre leucemia na infância e a exposição direta e indireta a esses químicos^(42, 43). Hidrocarbonetos são compostos orgânicos formados por átomos de carbono e hidrogênio. Eles podem ser encontrados em casas especializadas em tintas e em indústrias de solventes. O mais conhecido

e estudado é o benzeno, utilizado por pintores e encontrado em plásticos. Muitos estudos demonstraram associação estatisticamente significativa entre o benzeno e a leucemia ⁽⁴²⁾.

A ausência de infecções comuns durante o primeiro ano de vida foi considerada um fator de risco para ocorrência de LLA. A explicação é que, na ausência da modulação da resposta do sistema imune à infecção no primeiro ano de vida, podem ocorrer respostas imunes altamente desreguladas a subseqüentes infecções em indivíduos susceptíveis. Estas respostas desreguladas podem iniciar a proliferação de células pré-leucêmicas na medula óssea, sendo o segundo evento necessário para o desenvolvimento da leucemia ⁽⁴³⁾.

2.3.3 Diagnóstico laboratorial

O exame cuidadoso da medula óssea é essencial para estabelecer o diagnóstico da LLA, pois cerca de 20% dos pacientes com leucemia aguda não apresentam blastos no sangue periférico no momento do diagnóstico ⁽⁴⁵⁾. A morfologia dos blastos pode ser diferenciada no sangue periférico e na medula. É necessária a presença de no mínimo 20% de blastos na medula óssea para se confirmar um diagnóstico de LLA ⁽⁴⁶⁾. As características morfológicas, imunofenotípicas, bioquímicas, citogenéticas e moleculares das células leucêmicas, confirmam que a LLA é uma doença biologicamente heterogênea. Essa heterogeneidade resulta do fato da leucemia poder se desenvolver em qualquer etapa da diferenciação linfóide normal. Essa característica é primordial no diagnóstico por imunofenotipagem.

Aproximadamente 50% dos pacientes com LLA apresentam contagem inicial de leucócitos acima de 10.000/ μ L e cerca de 20% desses, estão acima de 50.000/ μ L. Neutropenia (menos de 500 granulócitos/ μ L) é um achado comum ao diagnóstico, o que leva ao aumento do risco de infecção. Os blastos podem estar ausentes no sangue periférico. Hemoglobina menor que 10g/dL está presente em 80% dos pacientes. Mesmo em concentrações baixas de hemoglobina, a anemia é normocítica e normocrômica, e a contagem de reticulócitos é reduzida. A trombocitopenia está presente na maioria dos pacientes, sendo a contagem de plaquetas menor que 100.000/ μ L em aproximadamente 75% dos casos ⁽⁴⁶⁾. Algumas crianças com LLA, mesmo com infiltração da medula óssea por blastos, podem apresentar hemograma normal ⁽⁴⁷⁾.

Outras alterações laboratoriais dependem da quantidade de blastos circulantes, da extensão da doença extra medular, da proliferação excessiva e da destruição das células

leucêmicas. A elevação da concentração sérica de desidrogenase láctica é comum em pacientes com grande quantidade de blastos circulantes e reflete o aumento do anabolismo e catabolismo das purinas ⁽⁴⁶⁾. As concentrações séricas de ácido úrico também podem estar aumentadas, principalmente após o início do tratamento, quando ocorre maior lise celular.

Doença Extra medular

Os locais mais freqüentemente acometidos pela LLA são: SNC, testículos, fígado, baço, linfonodos e rins. Em relação à conduta terapêutica e ao prognóstico, os que apresentam maior importância são SNC e testículos. O SNC está envolvido em menos de 5% das crianças com LLA ao diagnóstico ⁽⁴⁸⁾. Mesmo crianças com envolvimento do SNC pela LLA são, na maioria das vezes, assintomáticas. Pacientes sintomáticos podem apresentar sinais e sintomas neurológicos, localizados ou difusos, e, também, manifestações de hipertensão intracraniana (vômitos, cefaléia, letargia, edema de papila), convulsões, rigidez de nuca e irritabilidade.

A LLA testicular ocorre com o aumento doloroso de um ou ambos os testículos, raramente visto ao diagnóstico. Em 25% dos pacientes há doença microscópica no momento do diagnóstico, detectada apenas por biópsia testicular. Os testículos são considerados um reservatório de células leucêmicas, favorecendo recidiva da doença extra medular, que ocorre em aproximadamente 5% dos casos. Alguns fatores relacionados ao maior risco de recidiva nos testículos são: contagem inicial de leucócitos elevada (mais de 20.000/ μ L), LLA-T, linfonodomegalia e esplenomegalia proeminentes e plaquetopenia significativa (menos de 30.000/ μ l) ⁽⁴⁹⁾. Embora as leucemias agudas sejam relativamente raras, elas são bem estudadas e caracterizadas. Muitos subtipos de leucemia foram descritos e definidos por diversas técnicas, entre elas: morfologia (*French-American-British Cooperative Working Group* [FAB]), imunofenotipagem (células T, B e precursores) ou critério citogenético (t[9;22], t[4;11], t[1;19] e t[12;21]) ⁽⁵⁰⁾.

2.3.4 Classificação das LLAs

2.3.4.1. *Classificação Morfológica*

Conforme já descrito anteriormente, as LLAs podem ser classificadas pelo aspecto morfológico. O grupo *French- American- British* (FAB) classificou as LLAs em três subtipos

distintos baseados somente em critérios morfológicos de distensão de aspirado de medula óssea e sangue periférico corados pelo May-Grüwald- Giemsa: L1, L2 e L3, com base no diâmetro celular, na forma do núcleo, no número e na protuberância dos nucléolos e na quantidade e aspectos relativos do citoplasma^(51, 52). (Quadro 1)

Aspecto Morfológico	L1	L2	L3
Diâmetro Celular	Predominância de células pequenas, homogêneas	Grandes, heterogêneas	Grandes, homogêneas
Cromatina Nuclear	Fina ou aglomerada	Fina	Fina
Forma do núcleo	Regular, pode apresentar fenda ou indentação	Irregular, podendo apresentar fenda ou indentação	Regular, redondo ou oval
Nucléolos	Indistintos ou não-visíveis	Um ou mais por célula, grandes, proeminentes	Um ou mais por célula, grandes, proeminentes
Quantidade de citoplasma	Escassa	Moderadamente abundante	Moderadamente abundante
Basofilia citoplasmática	Ligeira	Ligeira	Intensa
Vacúolos citoplasmáticos	Ausentes	Ausentes	Evidente

Quadro 1 – Classificação morfológica (FAB) da leucemia linfóide aguda

Nota: L1 - leucemia linfóide aguda tipo L1; L2 - leucemia linfóide aguda tipo L2; L3 - leucemia linfóide aguda tipo L3. **Fonte:** Bennett et al.,⁽⁵³⁾

A análise morfológica proposta pela classificação FAB não é suficiente para determinar a linhagem celular nos casos de leucemia aguda. Algumas reações citoquímicas são úteis para diferenciar a LLA da LMA. Os blastos, na LLA, apresentam reações negativas para mieloperoxidase (MPO), cloroacetato esterase (CAE) e Sudan black B (SBB). Na LLA de linhagem B, a coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) muitas vezes mostra positividade característica em blocos, o que também pode ocorrer, embora com menor frequência, nos casos de LLA de linhagem T. A LLA-L3 geralmente é PAS-negativa⁽⁵⁴⁾. Embora a coloração com PAS possa ser útil no diagnóstico da LLA, é importante reconhecer que a positividade em blocos não é, isoladamente, um dado suficiente para determinar o diagnóstico⁽⁵⁴⁾. É comum na LLA-T forte positividade para fosfatase ácida, porém é rara na LLA de linhagem B, podendo ocorrer em alguns casos de LLA L2⁽⁵⁴⁾.

2.3.4.2 Classificação Imunológica ou classificação EGIL

Em 1995, o Grupo EGIL, propôs que a classificação imunológica para as leucemias agudas fosse uniformizada, apresentando como base o perfil de expressão de marcadores

celulares, determinado por painéis de anticorpos monoclonais direcionados contra antígenos de diferenciação celular ⁽⁵⁵⁾.

Baseando-se no princípio de que no processo de maturação os linfócitos apresentam antígenos de superfície e de membranas citoplasmáticas, e que algumas destas moléculas são perdidas e adquiridas no processo de maturação, diversos autores propuseram uma classificação imunológica das LLA, de acordo com a expressão de antígenos específicos, podendo, inicialmente, classificar essas leucemias como de linhagem T ou B, de acordo com as características imunofenóticas dos linfoblastos, sendo possível detectar, além da linhagem celular, o nível de diferenciação em que se encontra o processo leucêmico ^(55, 56).

Essas expressões passam a predizer, a partir dos fenótipos B ou T, que as alterações biológicas associadas à resposta terapêutica, monitorização de doença residual mínima e extratificação de grupos em maior ou menor risco, hoje em dia, são sabidamente bem mais importantes que os critérios estritamente morfológicos ⁽⁵⁵⁾.

Quanto à linhagem celular, as LLA são classificadas em LLA de linhagem B e LLA T. Aproximadamente 20% dos casos são de origem de célula T, 75% precursores de célula B, e 5% de células B maduras ^(19,20).

LLA de linhagem B

As leucemias de linhagem B foram divididas de acordo com os estágios de diferenciação normal dos progenitores B na medula óssea, classificando-se em: pró-B, comum, pré-B e B-maduro. A LLA do tipo pró-B representa 5% dos casos pediátricos e 10% dos casos de LLA em adulto ^(38, 57). As células expressam: HLA-DR, Terminal Desoxinucleotidil Transferase (TdT), CD34, CD19 e CD22(c) ⁽⁵⁸⁾. A LLA do tipo comum (Calla) expressa CD10, o que causa um impacto favorável no prognóstico ^(59, 60), CD22(c), CD19 e/ou CD20 ⁽¹⁹⁾. Representa 75% dos casos da LLA infantil e 50% dos casos em adultos. A leucemia pré-B expressa cadeia μ citoplasmática, em adição a CD19, CD20 e CD10 ⁽⁵⁷⁾, representando, aproximadamente, 15% das crianças com LLA e 10% dos casos em adultos ⁽⁶¹⁾. Finalmente, a LLA do tipo B maduro, presente em 2% a 5% de crianças e adultos, apresenta um fenótipo incomum, caracterizando-se pela expressão de cadeias leves de imunoglobulina na superfície de membrana (SmIg) ⁽³⁸⁾. Os blastos apresentam as mesmas características morfológicas (FAB L3) e translocações cromossômicas associadas à célula maligna do linfoma de Burkitt ^(19, 48, 54, 58). Esse tipo de leucemia apresenta prognóstico desfavorável, pois há elevada incidência de envolvimento no sistema nervoso central (SNC), resposta deficiente à terapia e sobrevida abreviada ⁽¹⁹⁾.

LLA de linhagem T

As LLAs de linhagem T se dividem em três subgrupos, de acordo com os antígenos de diferenciação correspondentes aos níveis de diferenciação intratímica normal, que são: LLA pré-T, T-intermediária e T medular. Na LLA pré-T, as células expressam CD3 no citoplasma (cCD3), mas não na superfície celular, expressando caracteristicamente CD7⁽⁵⁸⁾. Na LLA do tipo T intermediária, as células expressam fortemente cCD3, CD2, CD1a, podendo também co-expressar CD4 e CD8^(58, 60). Na LLA de linhagem T medular, as células blásticas correspondem a contraparte maligna dos timócitos medulares, expressando o CD7, sCD3, CD2, CD5 e CD7, ocorrendo a dicotomia para os antígenos CD4 e CD8^(48, 61). O fenótipo T está presente em 25% dos adultos e 15% das crianças com LLA⁽⁵⁵⁾, e ocorre com frequência em indivíduos do sexo masculino, estando associado à elevada leucometria ao diagnóstico, presença de massa mediastinal e envolvimento no SNC^(19, 51, 62).

TABELA 1 - Classificação imunológica das leucemias agudas^{(EGIL)⁽⁵⁵⁾}

Leucemias linfóides agudas (LLA)
Leucemias mielóides agudas (LMA)
Leucemias bifenotípicas agudas (BAL)
Leucemias indiferenciadas agudas (AUL)

TABELA 2 - Classificação imunológica das leucemias linfóides agudas^{(EGIL)⁽⁵⁵⁾}

LLA linhagem B: (CD19+ e/ou CD79a+ e/ou CD22+)*
LLA- pro B: sem expressão de outros antígenos de diferenciação
LLA-pré-B (comum): CD10+ (<i>calla</i> +)
LLA-pré-B (cμ+): com expressão citoplasmática da cadeia pesada da imunoglobulina IgM (cμ+).
LLA-B: Com expressão da imunoglobulina IgM de superfície e restrição clonal para cadeia leve das imunoglobulinas Kappa ou Lambda citoplasmática ou de membrana.
LLA linhagem T: (CD3+ citoplasmático e / ou de membrana)**
LLA- pré T: CD7+
LLA-T intermediária: CD2+, CD1a, CD7, CD4/CD8
LLA- T medular: CD3+ membrana, CD1a-, CD4+ ou CD8+
LLA-T α/β + : TCR α/β +
LLA-T γ/δ + : TCR γ/δ +
LLA com expressão aberrante de antígenos mielóides (CD13 e / ou CD33)
Sem critério de escore para bifenotípica

* positivo para no mínimo dois dos três marcadores. Muitos casos são TdT+, HLA-DR+, exceto em B-IV que geralmente são TdT-, ** muitos casos são TdT+, HLA-DR-, CD34-, porém esses marcadores não são considerados para efeito de diagnóstico ou classificação dessas neoplasias

Fonte: Bene et al., 1995⁽⁵⁵⁾

Leucemias Bifenotípicas Agudas e Leucemias Agudas Indiferenciadas

A classificação imunológica, além de subdividir as LLAs B e T em seus vários estágios de diferenciação acima citados, também define critérios em um sistema de pontuação (*score*) que definem as Leucemias Bifenotípicas Aguda (LBA). Essas leucemias caracterizam-se pela expressão simultânea de antígenos de superfície, citoplasmáticos ou nucleares, tanto na linhagem linfóide como na mielóide, com critérios diagnósticos definidos (20, 56). Conforme mostra a tabela 3, o diagnóstico de leucemia bifenotípica é alcançado quando se tem dois ou mais pontos para duas linhagens específicas, possibilitando a distinção das leucemias mielóides com expressão anômala de marcadores linfóides.

TABELA 3 – Critérios diagnósticos para a Leucemia Bifenotípica Aguda proposto pelo grupo Europeu para classificação imunológica das leucemias

<i>Pontos</i>	<i>B</i>	<i>T</i>	<i>Mielóide</i>
2	cCD22 CD79a ClgM	cCD3 anti-TCR α/β Anti-TCR $\gamma/8$	MPO*
1	CD10 CD20 CD19	CD2/CD5 CD8 CD10	CD13/CD33 CD117 CD65w
0, 5	TdT CD24	CD7 TdT	CD14/CD15 CD64

* demonstração de MPO por qualquer método. Obs: 2 ou mais pontos para duas linhagens qualifica como LA bifenotípica, **Fonte:** EGIL⁽⁵⁵⁾

2.3.4.3 *Classificação OMS*

A classificação OMS (*Organização Mundial da Saúde*), baseando-se em dados de imunofenótipo, cariótipo e biologia molecular, permite a classificação de acordo com a linhagem B ou T. A OMS classifica a LLA como leucemia de células B precursoras, leucemia de células T precursoras ou neoplasia de células B maduras, subtipo Linfoma/Leucemia de Burkitt^(63, 64). Cada método de diagnóstico apresenta limitações para a classificação das leucemias. Segundo a Organização Mundial da Saúde, o sistema FAB propunha uma classificação baseada apenas nas colorações habituais^(65, 66). O uso da imunofenotipagem e das técnicas de biologia molecular mostraram que as categorias individuais de leucemia eram heterogêneas e, ainda, verificou-se que a diferenciação de leucemia linfóide (LL) e linfomas era bastante artificial, pois referia-se a padrões de invasão em cada paciente e não se baseava

no tipo celular ou nas diferenças clínicas ⁽⁶⁵⁾. Os estudos citogenéticos revelaram a importância das translocações cromossômicas com alterações de genes específicos na patogênese e no comportamento clínico de vários tipos de leucemias ^(65, 66).

2.4 CITOGENÉTICA

2.4.1 Considerações gerais

A citogenética é a parte da genética que estuda os cromossomos, sua estrutura e sua herança. Os cromossomos que se encontram dentro dos núcleos das células são estruturas complexas constituídos por agregados de genes. Nos organismos superiores, os cromossomos são formados por DNA e diversos tipos de proteínas, podendo ser visualizados em microscópio na fase da divisão celular conhecida como metáfase. Embora os cromossomos sejam visíveis como estruturas distintas apenas nas células em divisão, eles conservam sua integridade, inclusive entre as divisões celulares ⁽⁶⁷⁾. Os cromossomos metafásicos humanos são constituídos por duas cromátides unidas pelo centrômero, também chamadas cinetócoro ou constrição primária. Este centrômero divide as cromátides em “braços cromossômicos”, sendo denominados de *p* (*petit*) os braços superiores e *q* (pois é a letra que vem após o p) os braços inferiores ao posicionamento do centrômero ⁽⁶⁷⁾. As extremidades dos braços cromossômicos são denominadas de telômeros.

Cada espécie tem um conjunto cromossômico típico em termos de número e morfologia, denominado *cariótipo*. Os 46 cromossomos das células somáticas humanas constituem 23 pares, nos quais 22 pares são semelhantes em ambos os sexos, denominados autossomos, e o par restante representa os cromossomos sexuais, que são: XX no sexo feminino e XY no sexo masculino. Os membros de um par autossomo possuem informações genéticas equivalentes, ou seja, possuem os mesmos *locus* gênicos na mesma sequência em cromossomos homólogos denominados alelos. Um membro de cada par dos cromossomos é herdado do pai e o outro da mãe ⁽⁶⁸⁾. (FIG. 2)



Figura 2 – Cariótipo humano normal do sexo feminino

Fonte: Cariótipo humano. Disponível em:

<<http://mutacoes.tripod.com/cariotipohumano.htm>>. Acesso em: 24 maio 2010

As preparações cromossômicas podem ser feitas de todos os tecidos e de todas as suspensões que contenham mitose. Nos humanos podem ser usadas as preparações de curto prazo de medula óssea, sangue periférico, sangue de cordão, material fetal e vilosidade coriônica, ou de longo prazo, de líquido amniótico, fibroblastos ou outras células cultivadas. O material que permitiu o grande desenvolvimento da citogenética humana foi o sangue periférico, pois há um grande número de linfócitos no sangue circulante e são eles que, quando estimulados, entram em divisão ⁽⁶⁹⁾.

2.4.2 História da Citogenética

Os resultados de pesquisas envolvendo a citogenética humana foram relatados primeiramente nos trabalhos de Arnold e colaboradores ⁽⁷⁰⁾ e Fleming e colaboradores ⁽⁷¹⁾, que pela primeira vez examinaram cromossomos humanos mitóticos. Nos anos seguintes, vários relatos foram descritos com estimativas sobre o número de cromossomos humanos ⁽⁷²⁾.

Em 1917, Wieman e colaboradores ⁽⁷³⁾ descreveram a presença do cromossomo Y no sexo masculino, o que gerou grande polêmica na época. A controvérsia acerca da existência de um cromossomo Y no sexo masculino persistiu até 1921, quando Painter e colaboradores ⁽⁷⁴⁾ verificaram a presença de um cromossomo pequeno (Y) em células de vários indivíduos do sexo masculino, e descreveram que o número de cromossomos, em ambos os sexos, era de 48, incluindo 23 pares de autossomos e 2 cromossomos sexuais. Nos anos subsequentes, o número cromossômico de 48 em humanos foi apoiado em vários relatos ⁽⁷²⁾ e todos os manuais de Genética Humana da época estavam de acordo com as observações e conclusões descritas por Painter e colaboradores em 1921 ⁽⁷⁴⁾.

O estudo citogenético do material humano se defrontou com inúmeros obstáculos em virtude da inadequação das metodologias de apresentadas à época. Dessa forma, somente em

meados dos anos 50, o homem veio a conhecer o número exato de cromossomos que compõe o seu complemento normal. No verão de 1955, Levan, um citogeneticista sueco, visitou Hsu, em Nova York, e aprendeu a técnica de preparação, usando o choque hipotônico. A técnica do choque hipotônico abriu o caminho para a fácil contagem cromossômica ⁽⁷⁵⁾. Um fato interessante é que, mesmo 30 anos após a descoberta de 48 cromossomos por Painter e colaboradores (1921), essa técnica estava tão fortemente impressa na mente dos pesquisadores, que no primeiro estudo sobre cromossomos humanos usando a mesma, o número de cromossomos ainda foi relatado como 48 ⁽⁷⁶⁾.

Em 1956, Tjio e Levan ⁽⁷⁵⁾ aprimoraram a técnica encurtando o tratamento hipotônico e adicionando colchicina, uma substância química que bloqueia as células em metáfase para aumentar o número de células contáveis. Eles examinaram fibroblastos de pulmão de quatro embriões humanos. Os autores relataram a observação de um número cromossômico de 46 na maioria das metáfases. Ao discutir seus achados, eles mencionaram três pesquisadores suecos que haviam estudado mitoses em células hepáticas de embriões humanos abortados. Esse estudo foi descontinuado porque eles foram incapazes de encontrar 48 cromossomos, encontrando, apenas, 46 ⁽⁷⁵⁾.

Essa evidência foi logo suplementada por Ford e Hamerton, em 1956 ⁽⁷⁷⁾. Os referidos autores examinaram tecido testicular de três homens. As mitoses espermatogônias eram difíceis de encontrar, mas algumas poucas contagens claras confirmaram que o número cromossômico humano era 46, confirmando os resultados de Tjio e Levan ⁽⁷⁵⁾. Portanto, foram Tjio e Levan ⁽⁷⁵⁾ e Ford e Hamerton ⁽⁷⁷⁾ que estabeleceram como 46 o número exato de cromossomos humanos.

2.4.3 Anomalias Cromossômicas

A estabilidade do número e da morfologia dos cromossomos em qualquer organismo é fundamental para o seu desenvolvimento harmonioso, resultando num indivíduo físico e psicologicamente normal. Como os cromossomos contêm os genes, qualquer mudança em sua estrutura ou número pode alterar a expressão gênica, produzindo um indivíduo fenotipicamente inviável ou anormal ^(74, 78).

As alterações numéricas ou estruturais dos cromossomos constituem as mutações cromossômicas que, como nas mutações gênicas, consistem numa fonte de variação importante para a evolução das espécies. As alterações cromossômicas podem ser constitucionais ou

adquiridas. As constitucionais fazem parte da constituição do indivíduo e estão presentes já nas células fetais. As adquiridas são alterações que ocorrem durante o desenvolvimento do indivíduo, como nos tumores sólidos e nas leucemias. As alterações ou aberrações cromossômicas podem ser classificadas em dois grandes grupos: numéricas e/ou estruturais, e podem envolver um ou mais autossomos, cromossomos sexuais ou ambos ⁽⁷⁸⁾.

As alterações numéricas correspondem às mudanças no número dos cromossomos, que são resultantes de erros durante as divisões celulares e podem ser de dois tipos: euploidias e aneuploidias. As euploidias são alterações que envolvem todo o genoma, originando células cujo número de cromossomos é um múltiplo exato do número haplóide característico da espécie, ou seja, todos os cromossomos serão duplicados (diploidia – condição normal), triplicados (triploidia) e assim por diante ⁽⁷⁸⁾. Enquanto que na aneuploidia o número de cromossomos não é um múltiplo exato do número haplóide da espécie, como por exemplo, a síndrome de Down ^(78, 79).

Seres humanos completamente triplóides são muitos raros e os poucos casos conhecidos são os abortos espontâneos ou natimortos. Alguns vivem por poucas horas. Em todos os casos há malformações múltiplas e grosseiras. Avalia-se que aproximadamente 15% de todos os fetos espontaneamente abortados são triplóides e tetraplóides ⁽⁷⁹⁾.

Nas células tumorais as alterações numéricas são consideradas clonais quando há presença adicional de um mesmo cromossomo em, no mínimo, duas células ou quando um mesmo cromossomo está ausente em, no mínimo, três células. As alterações estruturais são consideradas clonais quando uma mesma aberração cromossômica está presente em duas ou mais células ⁽⁸⁰⁾.

As alterações na estrutura dos cromossomos são classificadas em dois tipos: os rearranjos não balanceados e os balanceados. Nos rearranjos não balanceados há alteração no número de genes, onde o fenótipo provavelmente é anormal, como as deleções, as duplicações, os cromossomos em anel, os isocromossomos e os cromossomos dicêntricos ⁽⁸¹⁾. Já nos rearranjos balanceados há mudanças na localização dos genes sem haver perda de material genético, tais como as inversões, as translocações, as inserções e os cromossomos marcadores. São aqueles em que o conjunto cromossômico possui o complemento normal de informações. Todas as informações genéticas estão presentes, mas de modo diferente do original. São alterações balanceadas.

2.4.3.1 Deleção Cromossômica

As deleções são perdas de segmentos cromossômicos. Estas perdas podem ocorrer como resultado de uma simples quebra, sem reunião das extremidades quebradas (deleção terminal), ou de uma dupla quebra, com perda de um segmento inteiro, seguido da soldadura dos segmentos quebrados (deleção intersticial). Um *crossing over* desigual entre os cromossomos homólogos desalinhados ou cromátides irmãs é responsável por deleções em alguns casos. O efeito das deleções depende da quantidade e da qualidade do material genético perdido, mas, geralmente, as deficiências são danosas e produzem consequências graves^(81, 82). (FIG. 3)

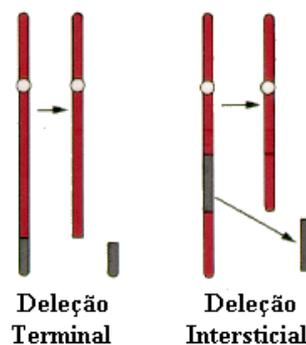


Figura 3 – Representação esquemática de deleção cromossômica

Fonte: Genética. Aberrações cromossômicas. Disponível em: <<http://www.virtual.epm.br/cursos/genetica/htm/abestru.htm>>. Acesso em: 24 maio 2010

2.4.3.2 Isocromossomo

Os isocromossomos se formam quando a divisão do centrômero, durante a divisão celular, se dá transversalmente, ao invés de longitudinalmente. Como consequência desta divisão anormal, um braço do cromossomo está ausente e o outro duplicado. Portanto, uma pessoa com 46 cromossomos que possui um isocromossomo tem uma única cópia do material genético de um braço e três cópias do material genético do outro braço, ou seja, é parcialmente monossômica e parcialmente trissômica^(81, 82). (FIG. 4)

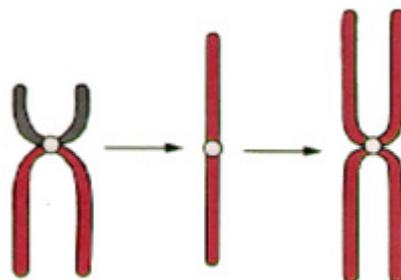


Figura 4 – Representação esquemática de duplicação cromossômica

Fonte: Genética. Aberrações cromossômicas. Disponível em: <<http://www.virtual.epm.br/cursos/genetica/htm/abestru.htm>>. Acesso em: 24 maio 2010

2.4.3.3 Duplicação cromossômica

As duplicações se caracterizam pela repetição de um segmento cromossômico, causando um aumento do número de genes. A maioria das duplicações resulta também de um *crossing over* desigual entre cromátides homólogos durante a meiose, produzindo segmentos adjacentes duplicados e/ou deletados. As duplicações são mais comuns e menos prejudiciais do que as deleções, concluindo-se que o excesso de genes geralmente é menos prejudicial do que a falta deles. Este tipo de alteração cromossômica estrutural é considerado importante sob o aspecto evolutivo, uma vez que genes duplicados podem, por mutação, dar origem a novos genes com novas funções^(81, 82). (FIG. 5)

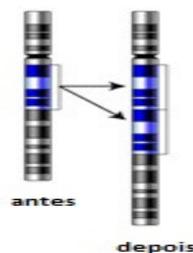


Figura 5 – Representação esquemática de duplicação cromossômica

Fonte: Genética. Aberrações cromossômicas. Disponível em: <<http://www.virtual.epm.br/cursos/genetica/htm/abestru.htm>>. Acesso em: 24 maio 2010

2.4.3.4 Cromossomo em anel

O cromossomo em anel é um tipo de alteração estrutural que ocorre quando um cromossomo apresenta duas deleções terminais e as suas extremidades, agora sem telômeros, tendem a unir-se, levando à formação de um cromossomo em anel. Os fragmentos deletados acêntricos (sem centrômero) se perdem. Esse tipo de alteração estrutural geralmente apresenta instabilidade durante a divisão celular^(81, 82). (FIG.6)

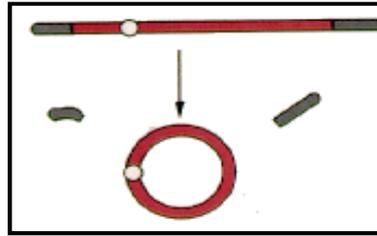


Figura 6 – Representação da formação de cromossomo em anel

Fonte: Genética. Aberrações cromossômicas. Disponível em: <<http://www.virtual.epm.br/cursos/genetica/htm/abestru.htm>>. Acesso em: 24 maio 2010

2.4.3.5 Inversão cromossômica

A inversão é uma alteração na reorganização na seqüência dos genes, devido a duas quebras de um cromossomo, seguidas de soldadura do segmento quebrado aos pontos de quebra, mas em posição inversa, ou seja, o segmento gira 180° e liga-se novamente à origem. As inversões podem ser paracêntricas (ao lado do centrômero), nas quais as duas quebras ocorrem num só braço, ou pericêntricas (ao redor do centrômero), quando há uma quebra em cada braço ^(81, 82). (FIG. 7)

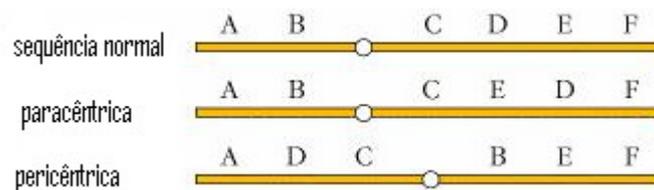


Figura 7 – Representação esquemática de inversões cromossômicas

Fonte: Genética. Aberrações cromossômicas. Disponível em: <<http://www.virtual.epm.br/cursos/genetica/htm/abestru.htm>>. Acesso em: 24 maio 2010

2.4.3.6 Translocação cromossômica

As translocações são alterações nas quais ocorre a transferência de segmentos de um cromossomo para o outro, geralmente não homólogo. As translocações ocorrem quando há quebra em dois cromossomos, seguida de troca dos segmentos quebrados. Elas podem ser recíprocas ou não-recíprocas e envolvem, geralmente, alterações na ligação entre os genes. Nas translocações recíprocas há trocas de segmentos entre os cromossomos que sofreram as quebras. Nas não recíprocas o segmento de um cromossomo liga-se ao outro sem que, no entanto, haja troca entre eles ^(81, 82). (FIG. 8)

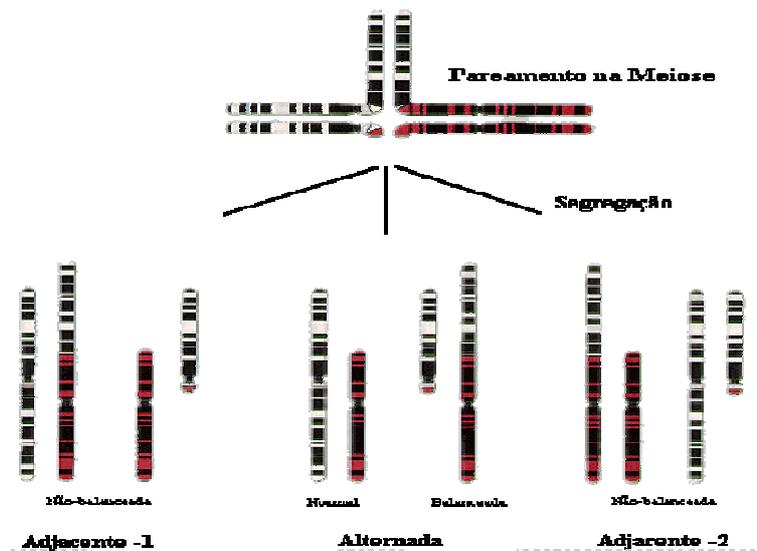


Figura 8 – Representação esquemática de translocações cromossômicas

Fonte: Genética. Aberrações cromossômicas. Disponível em:

<<http://www.virtual.epm.br/cursos/genetica/htm/abestru.htm>>. Acesso em: 24 maio 2010

É considerada não-balanceada a translocação simples, que ocorre quando somente um cromossomo perde um segmento para outro não-homólogo (isto é, que não são iguais entre si, não formam um par) ⁽⁸³⁾.

2.4.3.7 Inserção cromossômica

A inserção é um tipo de translocação não recíproca que ocorre quando um segmento é removido de um cromossomo e inserido em outro cromossomo diferente, modificando sua estrutura habitual ou o invertido ⁽⁸²⁾. (FIG. 9)

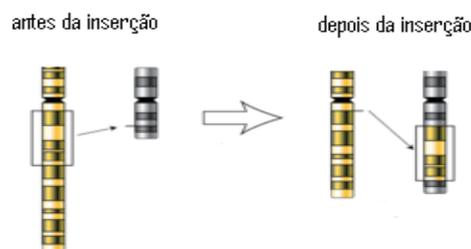


Figura 9 – Representação esquemática de inserção cromossômica

Fonte: Genética. Aberrações cromossômicas. Disponível em:

<<http://www.virtual.epm.br/cursos/genetica/htm/abestru.htm>>. Acesso em: 24 maio 2010

Os cromossomos marcadores são cromossomos com tamanhos variados, supranumerários, de difícil identificação e, geralmente, em estado de mosaico. Embora pareça ser uma anormalidade numérica, um cromossomo marcador também é um rearranjo estrutural. Os marcadores diminutos consistem, muitas vezes, em pouco mais do que heterocromatina cêntrica. Entretanto, os maiores contêm algum material de um ou ambos os braços cromossômicos, criando um desequilíbrio em quaisquer genes que estejam presentes⁽⁸¹⁾.

2.5 CITOGÉNÉTICA NAS LEUCEMIAS AGUDAS

Nas leucemias Agudas (LAs) a citogenética auxilia o diagnóstico e a conduta terapêutica através da detecção de anomalias cromossômicas específicas de subgrupos da doença, da detecção de anomalias secundárias e da presença de células normais⁽⁸⁶⁾. Atualmente, a análise citogenética tem sido considerada um instrumento de grande importância para determinação do fator prognóstico nas leucemias^(84, 85). As alterações estão presentes entre 55 a 78% dos adultos e entre 79 a 85% das crianças⁽⁸⁶⁾.

A incidência de casos em que não se encontram alterações citogenéticas varia muito, em parte, porque a morfologia dos cromossomos nas metáfases dos blastos leucêmicos é de difícil avaliação. É comum não se detectar anormalidades cromossômicas pela citogenética convencional (CC) em cerca de 10% a 15% dos pacientes com LLA. Mais de 30% dos pacientes com LLA-T apresentam cariótipo normal. Para que se possa considerar como normal, no mínimo 20 metáfases precisam ser analisadas e que não haja nenhuma alteração. Em muitos dos casos considerados normais, o que pode ocorrer é que a qualidade das metáfases seja ruim, impossibilitando a detecção de pequenos rearranjos cromossômicos ou alterações genéticas submicroscópicas, ou que os clones sejam mitoticamente inativos. Em muitos casos, para melhorar a qualidade da análise, é necessário o uso de técnicas moleculares com o *FISH*. A translocação t(12; 21) (p13; q22) é um exemplo de alteração que não pode ser identificada pela CC⁽⁸⁷⁾.

2.5.1 Alterações Numéricas nas LLAs

A classificação é baseada no número modal de cromossomos em cinco subtipos, que são: hiperdiploidia, quando a célula apresenta 47 a 50 cromossomos; hiperdiploidia com mais

de 50 cromossomos; pseudodiploidia, blastos com 46 cromossomos e alterações estruturais; diploidia, semelhante à célula normal de origem, ou seja, 46 cromossomos, sem anormalidades estruturais; e hipodiploidia, quando são observados menos de 46 cromossomos. O reconhecimento da ploidia como uma característica citogenética na LLA melhorou a habilidade de prever o prognóstico e de orientar a escolha terapêutica⁽⁸⁸⁾.

2.5.1.1 Hiperdiploidia

Nas Leucemias Linfóides agudas (LLAs) a hiperdiploidia é a anormalidade cariotípica mais comum, com a presença de numerosas trissomias somando mais de 50 cromossomos. As características comumente associadas são cor branca, idade entre dois e 10 anos, contagem inicial de leucócitos baixa, ausência de células T, LLA pré-B precoce e expressão de CD10. Esse perfil ocorre em 25% em crianças com LLA^(83, 88). Essa alteração é rara em recém nascidos e em pacientes adultos.

Pacientes com hiperdiploidia entre 51 e 68 cromossomos representam 25 a 30% das crianças com LLA com características clínicas favoráveis e melhor resposta ao tratamento, do que aqueles que apresentam células com outras alterações numéricas. A base biológica ainda não está clara, porém algumas hipóteses têm sido propostas. Uma delas é que estes pacientes apresentam porcentagem maior de células na fase S de divisão celular, resultando em sensibilidade maior aos quimioterápicos ciclos celulares específicos. Outra sugestão está relacionada ao maior acúmulo de metotrexato e seus poliglutamatos nas células leucêmicas com hiperdiploidia, com conseqüente redução na expressão do transportador de folato, tornando as células leucêmicas mais sensíveis aos antimetabólitos. A terceira possibilidade é que as células leucêmicas, hiperdiploides, sejam mais propensas a apoptose⁽⁸⁹⁾.

O ganho do cromossomo 21 é a anormalidade mais comum na LLA, ocorrendo em aproximadamente 20% dos casos com alteração citogenética e em mais de 90% dos casos com hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos⁽⁵⁴⁾. Quando a trissomia do cromossomo 21 é a única alteração encontrada, ela está associada a um prognóstico favorável⁽⁵⁸⁾. Outras trissomias que também são encontradas freqüentemente envolvem os cromossomos 4, 6, 10, 14, 17, 18, 20 e o cromossomo X. Investigadores do *Pediatric Oncology Group* (POG) relataram que em pacientes com hiperdiploidia com mais de 53 cromossomos, aqueles que apresentavam trissomias dos cromossomos 4 e 10, tiveram prognóstico melhor⁽⁹⁰⁾.

2.5.1.2 *Near-triploidia e near-tetraploidia*

Os casos de LLA pediátrica com near-triploidia (69 a 81 cromossomos) são raros, com a ocorrência de apenas 0,3%. Até 1990 foram descritos apenas sete casos em crianças com LLA ⁽⁹⁰⁾. Por ser uma condição incomum, ainda é incerto se pacientes com 69 a 81 cromossomos devem ser considerados como uma entidade clínica e biológica diferente dos outros casos de hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos ⁽⁸⁸⁾.

A near-tetraploidia (82 a 94 cromossomos) corresponde a menos de 1% dos casos de LLA pediátrica e seu prognóstico é incerto. Em todos os casos descritos foi relatado ganho do cromossomo 21. Acredita-se que os casos de near-tetraploidia originam-se de endorreduplicação, pois, em alguns casos, são encontrados pares de cromossomos com os mesmos rearranjos ou deleções. Os casos com near-tetraploidia estão associados à morfologia L2 em 30% dos casos, imunofenótipo T em 47%, presença de marcadores mieloides na imunofenotipagem (CD13, CD15 e CD33) em aproximadamente 40% e ocorrem em pacientes com idade maior ao diagnóstico (média de 8,6 anos) quando comparados àqueles com LLA com outras alterações cromossômicas numéricas ^(83, 88).

2.5.1.3 *Hipodiploidia*

A hipodiploidia é encontrada em aproximadamente 8% dos casos de LLA infantil e caracteriza-se pela presença de menos de 46 cromossomos. Subdivide-se em três categorias: 41-45 cromossomos, 30-40 e menos de 30 (near-haploidia). Mais de 80% dos casos apresentam 45 cromossomos, o que ocorre pela perda de um cromossomo inteiro, translocações não balanceadas ou pela formação de cromossomos dicêntricos ⁽⁹³⁾. A monossomia do cromossomo 20 é a mais frequente e, muitas vezes, é a única anormalidade encontrada. Blastos com hipodiploidia têm alta frequência de translocações cromossômicas, comparáveis àquelas encontradas associadas à pseudodiploidia. Por haver um número limitado de relatos de pacientes com hipodiploidia são necessários mais estudos para definir o prognóstico, apesar de alguns estudos demonstrarem que estes pacientes apresentam evolução pior ⁽⁹¹⁾.

2.5.1.4 Pseudodiploidia

Caracteriza-se por um número de 46 cromossomos por célula, porém com anormalidades estruturais, principalmente translocações. Corresponde a aproximadamente 40% dos casos de LLA pediátrica, sendo o maior grupo em relação à ploidia. As alterações estruturais mais comuns envolvem o braço curto do cromossomo 12, em 10% a 12% dos casos, e a translocação mais encontrada é a $t(1;19)(q23;p13)$, em 5% a 6% dos pacientes. Os blastos pseudodiplóides estão associados à contagem inicial de leucócitos elevada e nível alto de desidrogenase láctica. O prognóstico neste grupo era desfavorável até o desenvolvimento da quimioterapia com múltiplas drogas^(83, 92). Algumas translocações, como $t(9;22)$ e $t(4;11)$, são exceções que, independentemente do esquema de tratamento, continuam representando pior prognóstico, com doença altamente resistente aos quimioterápicos^(83, 88).

2.5.2 Alterações Estruturais nas LLAs

No primeiro Workshop de Morfologia, Imunologia e Citogenética (MIC), relatou-se que 66% dos casos de LLA, considerando adultos e crianças, apresentavam, no mínimo, uma alteração cromossômica em associação com características específicas de imunofenotipagem⁽²⁰⁾. Em 1987, foram reconhecidas na Nona Conferência de Mapeamento do Genoma Humano (HMG) trinta aberrações cromossômicas na LLA, sendo mais seis alterações estruturais descritas no Workshop seguinte, em 1989. Até 1999, mais de 200 alterações cromossômicas clonais foram identificadas e mais de 50 anormalidades moleculares descritas⁽⁹³⁾. A TAB.4 demonstra os principais rearranjos cromossômicos, genes envolvidos, morfologia e o imunofenótipo relacionado.

2.5.2.1 - $t(9;22)(q34;q11.2)$

Na $t(9;22)$, conhecida como cromossomo Philadelphia (Ph), ocorre a fusão gênica BCR-ABL⁽¹¹⁾ que codifica uma proteína quimérica com atividade tirosinaquinase muito elevada, resultando em proliferação celular e leucemogênese^(94, 95, 96) (FIG. 8). O cromossomo Ph está presente em 25% dos pacientes adultos com LLA e em 2% a 4% dos casos pediátricos^(94, 95, 96). Quase todos os casos de LLA Ph⁺ estão associados ao

imunofenótipo de linfócitos pré-B, B-comum com CD10 positivo (antígeno CALLA), CD 19⁺ e TdT^(94, 95). A LLA Ph⁺ pode ocorrer ao *diagnóstico* ou em uma crise blástica linfóide da leucemia mielóide crônica. Essa forma secundária à crise blástica apresenta uma maior heterogeneidade clínica decorrente da presença das alterações próprias da leucemia mielóide crônica⁽⁹⁶⁾. É uma alteração que confere prognóstico desfavorável. (FIG. 10)



Figura 10 - Translocação entre os cromossomos 9 e 22 entre as regiões q34 e q11

Fonte: Chromosomal abnormalities in câncer. Disponível em: <www.slh.wisc.edu/cytogenetics/cancer/>. Acesso em 24 maio 2010.

2.5.2.2 - $t(1;19)(q23;p13)$

A $t(1;19)(q23;p13)$ causa a fusão dos genes E2A do cromossomo 19 com o PBX1 no cromossomo 1, levando à formação do gene híbrido E2A/PBX1, expressando uma proteína oncogênica^(94, 95, 96) (FIG. 9). O gene E2A codifica fatores de transcrição essenciais para a linfopoese normal e a regulação do desenvolvimento da célula B⁽¹⁸⁾. A translocação $t(1;19)$ é vista em diferentes tipos de LLA de linhagem B e está presente em 5% a 6% de todos os casos de LLA, representando cerca de 25%-30% das crianças com LLA de linfócito pré-B e menos de 5% dos casos de LLA em adultos^(79, 94). É uma alteração que confere prognóstico desfavorável. (FIG. 1



$t(1;19)(q23;p13)$

Figura 11 - Translocação entre os cromossomos 1 e 9 entre as regiões q23 e q13

Fonte: Chromosomal abnormalities in câncer. Disponível em: <www.slh.wisc.edu/cytogenetics/cancer/>. Acesso em 24 maio 2010

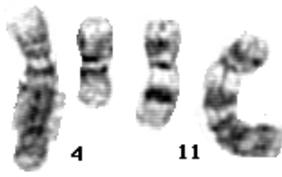
2.5.2.3 - $t(12;21)(p13;q22)$

Na $t(12;21)(p13;q22)$ ocorre a fusão dos genes TEL e AML1. Trata-se do rearranjo mais freqüente nas LLAs em crianças, ocorrendo em aproximadamente 25% dos casos, com baixa freqüência em LLAs de adultos (< 2%). Não é visível pela citogenética convencional, sendo detectada por FISH ou RT-PCR^(97, 98).

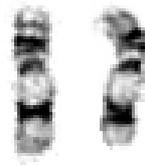
A maioria dos casos citados na literatura associa a presença da translocação *TELAML1* ao imunofenótipo B. No entanto, alguns casos de linhagem T já foram diagnosticados. Foram associadas mutações adicionais no cromossomo 12 e alguns relatos indicam maior agressividade da doença devido à resistência terapêutica. No entanto, especula-se o papel de células pré-leucêmicas que expressam *TEL-AML1* remanescentes, causando a pior resposta ao tratamento^(97, 99). Vários estudos demonstram associação de *TEL-AML1* com um prognóstico favorável, que inclui baixa contagem de leucócitos ao diagnóstico e a boa resposta a terapia de indução da remissão⁽¹⁰⁰⁾. Apesar de estar incluída em variados protocolos terapêuticos internacionais como indicativa de bom prognóstico, estudos recentes vêm demonstrando associação à recaídas tardias em até 20% dos casos. Os protocolos mais utilizados no Brasil (GBTLI 99 e BFM 95) ainda a utilizam como fator prognóstico para baixo risco, o que já não acontece no protocolo terapêutico italiano unificado (AIEOP LLA), o qual intensifica a terapia no caso de persistência da detecção da translocação após a indução da remissão^(99, 100).

2.5.2.4 – Anormalidades envolvendo 11q23- $t(4;11)(q21;q23)$

Rearranjos cromossômicos envolvendo o gene MLL estão associados com a LLA em lactentes (< 1 ano), ocorrendo em cerca de 85% dos casos⁽¹¹¹⁾ com incidência baixa em crianças e adultos (<10%). Entre as translocações envolvendo o gene MLL, a $t(4; 11)$ é resultante de um rearranjo MLL-AF4^(95, 103, 104), ocorre em 60% das LLAs em lactentes e menores de 1 ano, 2% em crianças e entre 3% e 6% em adultos^(9, 26). O gene MLL foi identificado em leucemias de linhagem mista ou leucemias bifenótípicas⁽¹⁰⁴⁾. O evento da transformação envolve a *stem cell*, ou a célula progenitora pluripotente, com capacidade para se diferenciar tanto na linhagem linfóide quanto na mielóide. O fenótipo é CD10(-), precursor de células-B, ou pré-B com co-expressão de antígenos mielóides, principalmente o CD15^(102, 105). Alterações que envolvem o gene MLL conferem prognóstico desfavorável. (FIG. 12)



t(4;11)(q21;q23)



del(11)(q23)



del(11)(q13q23)

Figura 12 – Deleções no cromossomo 11 e 9 nas regiões q23 e q13q23

Fonte: Chromosomal abnormalities in câncer. Disponível em:
www.slh.wisc.edu/cytogenetics/cancer/. Acesso em 24 maio 2010

TABELA 4 - Principais rearranjos cromossômicos, genes envolvidos, morfologia e imunofenótipo
 (continua)

Rearranjo cromossômico	Genes Envolvidos	Morfologia Típica	Imunofenótipo
t(1;7)(p32;q34)	TAL1;TCRB		Linhagem T
t(1;7)(p34;q34)	LCK;TCRB		Linhagem T
t(1;11)(p32;q23)	AF1P;MLL	L1	
t(1;14)(p32-34;q11)	TAL1;TCRD	L1	Linhagem T
t(1;19)(q23;p13)	PBX1;E2A	L1	Pré-B
dup(1)(q12-21q31-32)	?	L2,L3	Pré-B,Célula B
t(2;8)(p12;q24)	IGK;MYC	L3	Célula B
t(4;11)(q21;q23)	AF4;MLL	L1,L2	Pré-B precoce Bifenotípica Linhagem mista
del(6q)	?	L1,L2	Linhagem B ou T
i(6q)	?		
dic(7;9)(p11-13;p11)	?	L1	Pré-B
i(7q)	?		
t(7;9)(q34-36;q34)	TCRB;TAN1		Linhagem T
t(7;9)(q34;q32)	TCRB;TAL2		Linhagem T
t(7;10)(q34-36;q24)	TCRB;HOX11		Linhagem T
t(7;11)(q34-36;p13)	TCRB;RHOM2		Linhagem T

(CONCLUSÃO)

Rearranjo cromossômico	Genes Envolvidos	Morfologia Típica	Imunofenótipo
t(7;19)(q34;p13)	TCRB;LYL1		Linhagem T
+8	?		Linhagem B ou T
t(8;14)(q24;q11)	MYC;TCRA/TCRD		Linhagem T
t(8;14)(q24;q32)	MYC;IGH	L3	Célula B
t(8;22)(q24;q11)	MYC;IGL	L3	Célula B
t/dic(9;12)(p11-12;p11-13)	?		Pré-B ou Pré-B precoce
		L2	B
i(9q)	?	L1;L2	Pré-B
t(9;22)(q34;q11)	ABL;BCR		Linhagem B
		L2	Linhagem mista
t(10;11)(p13-14;14-21)	?		Linhagem T
t(10;14)(q24;q11)	HOX11;TCRD		Linhagem T
t(11;14)(p15;q11)	RBTN1;TCRD		Linhagem T
t(11;14)(p13;q11)	RBTN2;TCRD	L1;L2	Linhagem T
t(11;19)(q23;p13)	MLL;ENL		Bifenotípica
			Linhagem mista
t(12;17)(p13;q21)	?	L1;L2	Pré-B precoce
t(12;21)(p12;q22)	TEL;AML-1	L1	Linhagem B
t/del(12p)	?	L2;L3	Linhagem T ou B
t(14;18)(q32;q21)	IGH;BCL2		Linhagem B
t(14;22)(q32;q11)	?/BCR		
i(17q)	?	L1	
t(17;19)(q22;p23)	HLF;E2A	L1	Pré-B
-20	?	L1;L2	Linhagem B
+21	?		Linhagem B

Fonte: <www.slh.wisc.edu/cytogenetics/cancer/>. Acesso em 15 de março 2011

2.5.3 Fatores prognósticos

O prognóstico e evolução clínica dos pacientes com LLA dependem de uma série de fatores os quais são empregados para estratificar os pacientes em diferentes grupos de risco levando-os a diferentes estratégias de tratamento. As principais variáveis de risco incluem: a idade, o sexo, a leucometria inicial, a etnia, anormalidades citogenéticas, a imunofenotipagem e a resposta ao tratamento. A combinação destes fatores tem sido utilizada para definir fatores de risco e orientação terapêutica^(25, 79, 92).

Dentre os fatores considerados como favoráveis, destaca-se a faixa etária variando entre 2 a 10 anos, leucometria inferior a 20.000/ μ L, ausência de organomegalias, perfil imunofenotípico pré-B comum (CD10 positivo e *c μ* negativo), hiperdiploidia (trissomias dos cromossomos 4,6, 10, 14, 17, 18, 20, 21 e X), sexo feminino, subtipo morfológico L1 e baixo percentual de blastos na medula óssea^(92, 93, 102).

Os fatores descritos como desfavoráveis, destacam-se a idade < que 1 ano e > que 10 anos, contagem de leucócitos superior a 50.000 / μ L, presença de organomegalias, subtipos imunológicos T, B e pré-B precoce, sexo masculino, subtipos morfológicos L2 e L3, percentual elevado de células blásticas na medula óssea e no sangue periférico, ausência de resposta ao tratamento de indução e alterações citogenéticas como: hipodiploidia, t(9; 22), t(8;14), t(4; 11), t(1; 19), etc^(25, 93, 102).

3 OBJETIVOS

3.1 PRINCIPAL

Investigar, caracterizar e estratificar as alterações citogenéticas presentes na Leucemia Linfóide Aguda na infância, analisando a frequência obtida frente a estudos prévios.

3.2 ESPECÍFICOS

- Analisar possíveis alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais através de técnicas de bandeamento G nas células neoplásicas.
- Comparar os resultados obtidos com os de outros estudos voltados para a área de citogenética.
- Determinar a frequência de cariótipos normais e anômalos e das diferentes aberrações citogenéticas numérica e /ou estrutural nos pacientes estudados.
- Estratificar os pacientes de acordo com os fatores prognósticos estudados.

4 METODOLOGIA

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Caracterização do estudo

O estudo caracterizado como transversal retrospectivo foi realizado no período de Janeiro de 2009 a novembro de 2010, quando foram analisadas amostras de medula óssea ou sangue periférico (quantidade de blastos foi acima de 20%) de trinta pacientes com diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (LLA) de ambos os sexos, com faixa etária entre 4 meses a 17 anos, atendidos nos seguintes serviços:

- Hospital Infantil Varela Santiago, Natal-RN;
- LIGA Norte-Riograndense Contra o Câncer, Natal-RN;
- Centro de Oncologia e Hematologia de Mossoró, Mossoró-RN
- Clínica DNA Center, Natal-RN

4.1.2 Critérios de Inclusão

A inclusão dos pacientes ocorreu mediante:

- Diagnóstico citológico e imunofenotípico para leucemia linfoblástica aguda.
- Pacientes entre 0-18 anos;
- Disponibilidade de material para análise citogenética;
- Dados laboratoriais, tais como: leucometria, percentagem de blastos, contagem de plaquetas e hemoglobina;
- Dados clínicos: presença ou ausência de visceromegalias.

4.1.3 Critérios de Exclusão

Não foram incluídos no estudo:

- Pacientes classificados pela análise imunofenotípica e molecular como leucemia mieloide aguda, linfoma linfoblástico, anemia de Fanconi, anemia aplástica, síndrome mieodisplásica e linfoma de Burkitt;

- Impossibilidade de obtenção de dados clínicos dos centros de origem;
- Amostras para citogenética coletas em EDTA, citrato de sódio (anticoagulantes) e/ou que apresentassem algum tipo de contaminação bacteriana.

4.1.4 Comitê de ética

Esse trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes (CEP_HUOL), em 31 de Agosto de 2007, sob o número de protocolo 083/07. (Anexo 1)

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção das amostras

A análise citogenética dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda foi realizada no laboratório de citogenética do DNA Center. Para a obtenção dos cromossomos metafásicos em amostras de medula óssea e/ou sangue periférico (blastos > 20%) foi utilizado o método descrito por Raimondi et al.(2000) ⁽¹⁰⁶⁾, com modificações (temperatura, água utilizada, tempo de incubação). A medula óssea (MO) foi coletada por punção aspirativa medular pelo médico e o sangue periférico (SP) foi obtido por punção venosa. O material foi enviado ao laboratório em isopor com gelo, no prazo máximo de 24 a 48 horas (Apêndice A).

4.3 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

4.3.1 Cultura e Pós-Cultura

O material enviado foi inoculado em frascos de cultura celular (overnight e 24h) em meio estéril, no fluxo laminar, contendo 8% RPMI 1640 suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF) e glutamina (todos da GIBCO-Invitrogen), sendo incubado em estufa a 37° C por 24 horas. Após esse período o protocolo de preparação citológica seguiu três

etapas principais: **interrupção mitótica**, quando foi adicionado colchicina (GIBCO-16ug/mL) a cultura, que foi mantida a 37° C por mais uma hora; **tratamento hipotônico** com solução de cloreto de potássio (KCl- Merck a 0,075M, a 37° C por 20 minutos); e **fixação** do material com 3 volumes de metanol P.A(VETEC) para 1 ácido acético glacial(VETEC) recém preparado. No centro das lâminas foi gotejado entre duas e três alíquotas da suspensão celular e a secagem foi feita em placa aquecedora. Foram preparadas lâminas para cada paciente de acordo com a necessidade de cada caso e deixadas secar por 24h para o bandeamento G. (FIG. 13)

4.3.2 Bandeamento Cromossômico

O desenvolvimento das técnicas de bandeamento por Caspersson e colaboradores ⁽⁸¹⁾ trouxe um avanço significativo para a citogenética, porque, a partir delas, foi possível a identificação de cada par cromossômico pelo padrão característico das bandas que eles apresentam, após tratamento adequado. Esse tratamento é feito depois da distribuição do material nas lâminas.

4.3.2.1 Bandeamento G

Os cromossomos são submetidos a um tampão fosfato conhecido como Sorensen que desnatura as proteínas não histônicas, sendo posteriormente corados com os corantes Wright ou Giemsa (origem do nome banda G).

4.3.2.1.1 *Bandeamento G com Tampão Fosfato / Wright*

Lâminas envelhecidas por, no mínimo, um dia são colocadas em uma solução de 2ml de tampão Sorensen. Após o tampão, a lâmina foi corada peloWright/fosfato (2ml do tampão previamente preparado com 1ml de corante Wright-Merck) por aproximadamente dois minutos, depois foi lavada em água corrente para, logo após, ser analisada no microscópio óptico (Nikon-E200).

4.3.3 Nomenclatura

Em 1978, foi criado um documento de nomenclatura de cromossomos humanos intitulado *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN), que incluiu todos os resultados de várias conferências internacionais (Denver 1960, Londres 1963, Chicago 1966, Paris 1971, Paris 1975, Stocolmo 1977, Paris 1980 e Memphis 1994)⁽¹⁰⁷⁾.

Em 1985, o ISCN foi revisado, admitindo-se um novo padrão de classificação dos cromossomos individuais. Em 1995, foi realizada uma nova modificação ao ISCN de 1985, onde o mesmo foi revisado e incorporado à nomenclatura de novos desenvolvimentos na citogenética humana, como a técnica de FISH. Portanto, o ISCN é a nomenclatura mais aceita e utilizada atualmente.

Na descrição do cariótipo o primeiro item a ser considerado é o número total de cromossomos seguido de vírgula (,) e a constituição dos cromossomos sexuais. Por exemplo: cariótipo normal feminino (46,XX); cariótipo normal masculino (46,XY).

Na descrição de cariótipos anormais as anomalias sexuais são apresentadas em primeiro lugar, seguidas das anomalias autossômicas em ordem numérica, independente do tipo de alteração e do ponto de quebra no caso das alterações estruturais. Cada alteração é separada por vírgula.

Na descrição de anomalias numéricas constitucionais o sinal de (+) ou (-), colocado antes do número de um cromossomo, indica um cromossomo inteiro adicional ou ausente, com exceção aos cromossomos sexuais. O sinal de (+) ou (-) após o símbolo *p* ou *q* pode ser usado no texto para indicar aumento ou diminuição do tamanho de um braço ou de um segmento cromossômico, mas não deve ser usado na descrição do cariótipo. Em caso de dúvida quanto ao cromossomo adicional ou ausente, coloca-se um ponto de interrogação (?) após o símbolo.

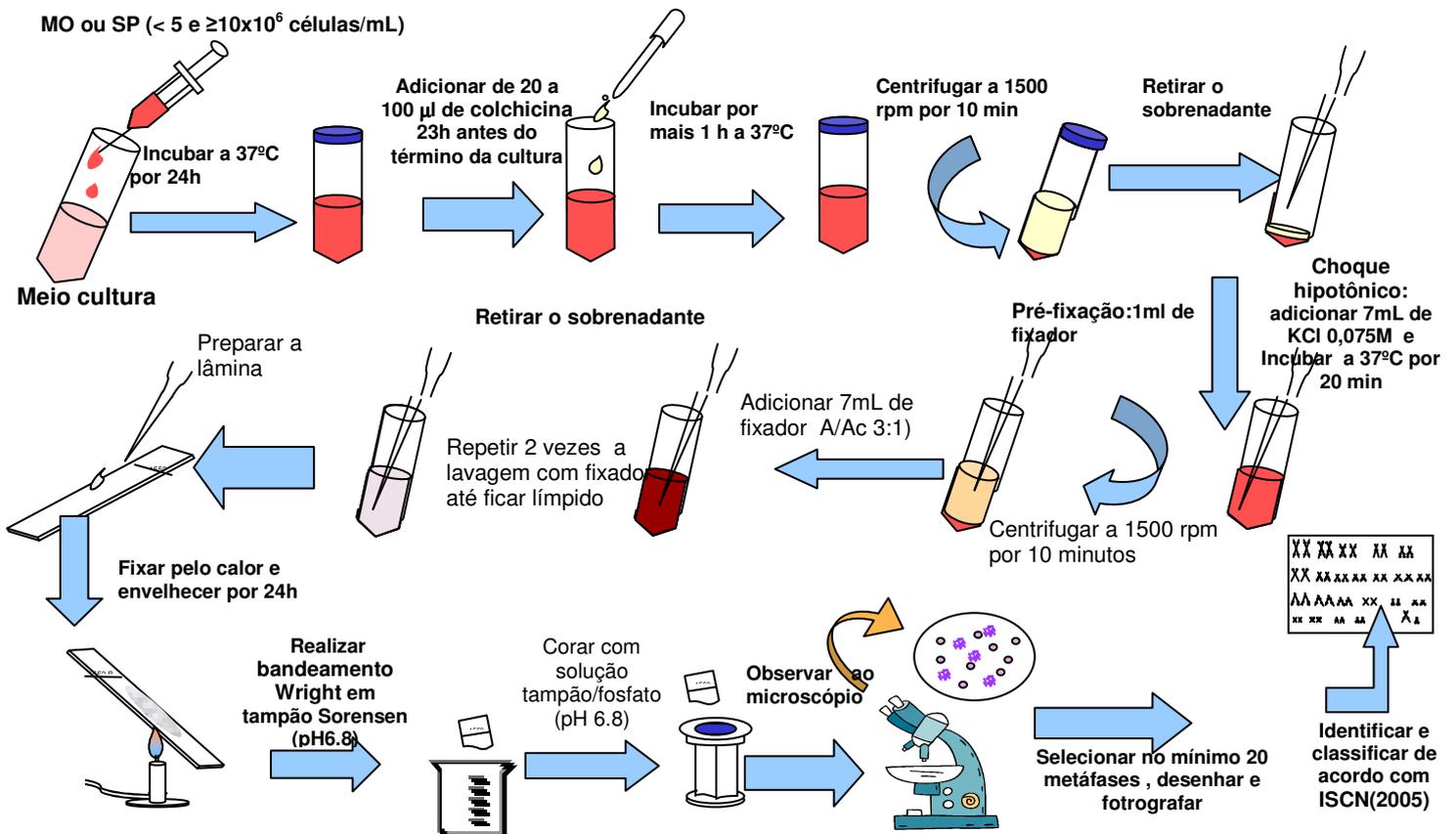
A constituição cromossômica de duas ou mais linhagens diferentes são enumeradas em ordem decrescente da frequência de células de cada linhagem, separadas por um traço oblíquo (/). Entre colchetes [] coloca-se o número de células analisadas de cada tipo. O clone diplóide normal sempre vem em último lugar. É possível serem utilizados os símbolos *mos*, para mosaicos, e *chi*, para quimeras, precedendo o cariótipo.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram coletados e digitados na planilha eletrônica Microsoft Excel® e, posteriormente, realizou-se a análise descritiva pelo programa SPSS Statistics 17.0, com

média, mediana e desvio padrão das características dos pacientes (faixa etária, sexo, cor), dados clínicos (linfadenopatia, hepatomegalia e esplenomegalia), alterações cromossômicas presentes nas amostras, prognóstico das alterações encontradas e, por último, os parâmetros hematológicos (hemoglobina, leucócitos e plaquetas).

FIGURA 13 - Esquema da metodologia utilizada no laboratório de citogenética para cultura e pós-cultura celular.



5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PACIENTES

A principal faixa etária deste estudo foi de pacientes entre um e dez anos (67%), dos quais 37% pertenciam a faixa entre dois e cinco anos, com média de idade de 7 anos e meio. Em relação ao sexo, a proporção foi de 1,3: 1 (M/F). A cor da pele predominante foi a branca (50%), seguida da parda (33%) e da negra (17%). Considerando os valores de hemoglobina encontrados, 73% apresentaram valor inferior a 10 g/dL. Na contagem de leucócitos, 60% apresentaram valores abaixo de 10 000/ μ L e 40% acima desse valor. Desses, 10% estavam acima de 50 000/ μ L. Observou-se trombocitopenia em 83% dos casos analisados. Logo abaixo, a TAB. 5 mostra as características analisadas: idade, sexo, cor, concentração de hemoglobina, leucometria e contagem de plaquetas.

TABELA 5 – CARACTERÍSTICAS GERAIS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES

N	SEXO	IDADE	COR	HEMOGLOBINA	LEUCOMETRIA	PLAQUETAS
1	F	4	branca	7,3	20200	32000
2	F	7	branca	12	11000	44000
3	M	5	parda	5,9	34700	33000
4	M	16	branca	13	4600	63000
5	F	6	branca	7,5	3100	32000
6	F	4	negra	8	4300	283000
7	M	3	negra	9	5800	336000
8	F	5	branca	10,2	7800	165000
9	M	12	branca	14	4400	249000
10	M	16	negra	8	1500	12000
11	M	17	parda	15	2800	19000
12	F	15	branca	8	3000	52000
13	M	8	parda	11,3	3200	44900
14	F	4meses	negra	7,8	96600	65000
15	M	3	parda	9,2	21900	55000
16	F	3	negra	7,3	7900	26000
17	M	5	parda	6,8	35900	54000
18	M	2	branca	5,7	6300	7000
19	M	3	branca	8,4	50900	37000
20	F	1	parda	5,4	45700	26000
21	M	17	parda	7,1	60000	12000
22	F	7	parda	9,4	33200	83000
23	F	3	branca	7,5	5600	45000
24	F	6	branca	9,4	25000	38000
25	F	17	branca	11,3	6.500	18.000
26	M	2	branca	8,5	7400	45000
27	M	4 meses	parda	10	13500	60000
28	M	6	branca	7,8	2.100	42.000
29	M	5	branca	6,9	5600	77000
30	M	16	parda	11,5	5300	160000

N: pacientes admitidos consecutivamente; idade em anos ou meses; sexo F:feminino, M: masculino, Cor: branca, parda e negra; Hemoglobina em g/dL, Leucometria em μ L. **Fonte:** Lab. DNA Center, Fevereiro/2011

Considerando a população total estudada, os achados clínicos mais frequentes foram hepatomegalia (73%), esplenomegalia (70%) e linfadenopatia (37%). É importante ressaltar que todos estes dados foram fornecidos pelo médico hematologista. A TAB.6 mostra os pacientes que apresentaram, individualmente, algum tipo de achado clínico.

TABELA 6 - ACHADOS MAIS FREQUENTES NO EXAME FÍSICO

ACHADOS FÍSICOS	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAGEM (%)
HEPATOMEGALIA	22	77
ESPLENOMEGALIA	21	70
LINFOADENOPATIA	11	37

Fonte: Lab. DNA Center, Fevereiro/2011

Os padrões imunofenotípicos encontrados foram fornecidos pelos prontuários médicos. 93% dos pacientes apresentavam LLA de linhagem B. Desses, 83% foram de LLA pré -B, sendo 7% de linhagem T.

Em relação à indicação clínica, as requisições médicas demonstraram que 83% dos pacientes apresentavam LLA *diagnóstico* e 17% LLA recidiva (em recaída). Esses dados podem ser observados no GRÁF. 1, que mostra a proporção de LLA diagnóstico em comparação com LLA recidiva.

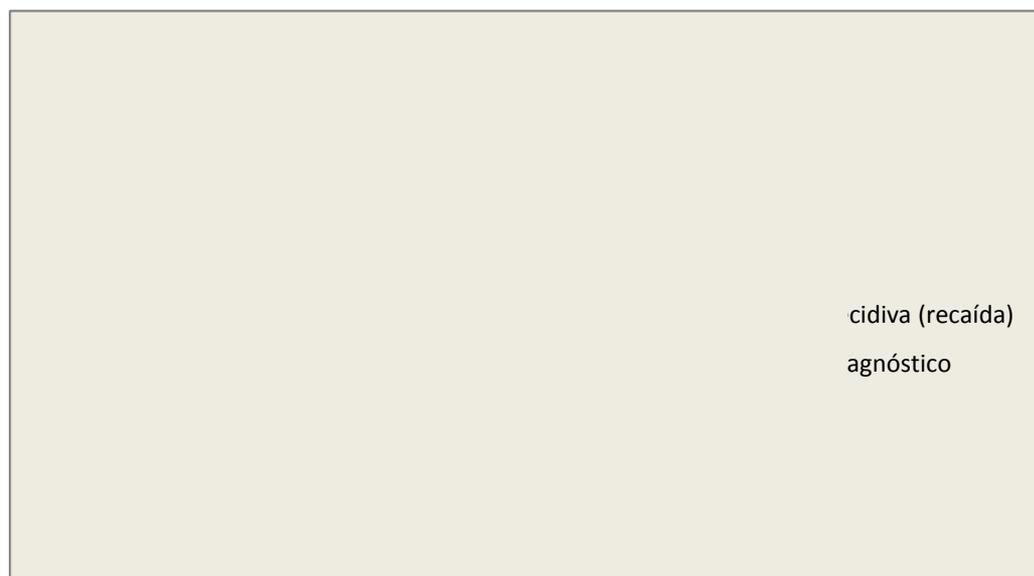


GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES CONFORME A INDICAÇÃO CLÍNICA

5.2 FREQUÊNCIAS DAS ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS

Neste estudo foram avaliados trinta pacientes. Em dezenove (64%) foram observadas alterações cromossômicas tanto na medula óssea como no sangue periférico. Sete pacientes (23%) apresentaram cariótipo normal e em quatro (13%) não foi possível a análise devido a ausência de crescimento celular (IM - índice mitótico nulo). A TAB. 7 apresenta a distribuição dos pacientes estudados de acordo com o cariótipo encontrado, perfil imunofenotípico e tipo de alteração citogenética.

TABELA 7 - CARIÓTIPO, PERFIL IMUNOFENOTÍPICO E TIPO DE ALTERAÇÃO

N	CARIÓTIPO	PERFIL IMUNOFENOTÍPICO	TIPO DE ALTERAÇÃO
1	46, XX, + mar, -20 [14] / 46, XX [06]	LLA pré-B	Numérica
2	IM=nulo	LLA pré-B	-
3	40 ~ 56, XY [cp 20] / 46, XY [05]	LLA pré-B	Numérica
4	46,XY [20]	LLA pré-B	Normal
5	46, XX [13]	LLA pré-B	Normal
6	46, XX [23]	LLA pré-B	Normal
7	46,XY, inv (9) (p12q13) [20]	LLA pré-B	Estrutural
8	48 ~ 58,XX [cp09] / 46,XX [02]	LLA pré-B	Numérica
9	46,XY [23]	LLA pré-B	Normal
10	IM=nulo	LLA-pré B	-
11	48, XY, t (1;3) (q32;q27), +16, + mar [09] / 46, XY [14]	LLA-pré B	Numérica + estrutural
12	49 ~ 87, XX ,add(14)(q32?), add(16)(p13.3)[cp30]	LLA Pré-B	Numérica + estrutural
13	49~54, XY [11] / 46,XY [04]	LLA pré-B	Numérica
14	deleção de 11q23	LLA pré-B	Estrutural
15	41~45,XY[cp13] / 46,XY[07]	LLA pré-B	Numérica
16	50~61,XX[cp07] / 46,XX[05]	LLA pré-B	Numérica
17	48~60,XY[cp22] / 46,XY[05]	LLA pré-B	Numérica
18	49~58,XY[cp09] / 46,XY[11]	LLA pré-B	Numérica
19	46,XY, dup(1)(q31q44) [12] / 46,XY, dup(13)(q13q34) [05] / 46,XY, der(21) t(7;21) (q21q36;q22.3) [04] / 46,XY [04]	LLA - B	Estrutural
20	46, XX, -7, + der 7, t(7;?)(q31;?) [30]	LLA pré-B	Numérica + estrutural
21	IM=nulo	LLA pré-B	-
22	IM=nulo	LLA -T	-
23	53~62,XX [cp07] / 46,XX[15]	LLA-B	Numérica
24	46,XX[19]	LLA pré-B	Normal
25	46,XX,t(9;22)(q34;q11), add(14)(q32)	LLA	Estrutural
26	47,XY,i(7)(q10), +21[22] / 48,XY, i(7)(q10), +mar,+21[04] / 48,XY, i(7)(q10), +8, +21 [03]	LLA pré-B	Numérica+estrutural
27	46,XY [20]	LLA -T	Normal
28	38~45,XX, del(20q), t(9;14), (q22?;q32?)	LLA pré-B	Numérica +estrutural
29	46,XY [20]	LLA pré-B	Normal
30	36~45,XY [cp23] / 46,XY [03]	LLA pré-B	Numérica

IM- índice mitótico;**mar**- marcador; **inv** – inversão;**cp** – composição de cariótipos; **t** – translocação; **add** – adição; **del** – deleção; **dup** – duplicação; **der** – derivativo; **i** – isocromossomo.

De acordo com o tipo de amostra enviada, 70% foram de aspirado de medula óssea (MO) e 40% de sangue periférico (SP). Sabe-se que no sangue periférico as células já completaram o processo de maturação. Consecutivamente, não existe possibilidade de divisão celular (mitose). A análise citogenética nesse material só é válida quando existem, no mínimo, 20 % de células imaturas (blastos). Nas amostras de SP que foram enviadas a porcentagem de blastos variou de 0 a 90%, com mediana de 27% (desvio padrão = 32%).

Dos pacientes que apresentaram algum tipo de alteração cromossômica, em 53% foram observadas alterações numéricas, em 26% correspondiam as alterações numéricas e estruturais e em 21% dos pacientes foram encontradas apenas alterações estruturais. O GRÁF.2 apresenta a classificação geral das alterações citogenéticas.

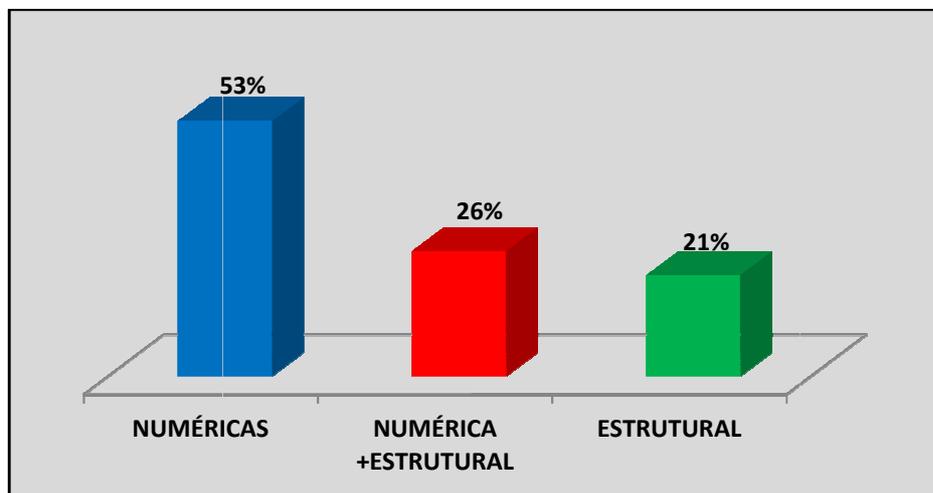


GRÁFICO 2 – CLASSIFICAÇÃO GERAL DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS

Considerando os quinze pacientes com alterações cromossômicas numéricas e numéricas com alteração estrutural adicional, a hiperdiploidia foi observada em oito pacientes (54%); hiperdiploidia com alteração adicional em dois pacientes (13%); hipodiploidia em três pacientes (20%) e, por último, hipodiploidia com alteração adicional em dois pacientes (13%). A TAB.8 subclassifica as alterações cromossômicas numéricas e numéricas com alterações estruturais adicionais encontradas.

TABELA 8 - SUBCLASSIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NUMÉRICAS

ALTERAÇÕES NUMÉRICAS	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAGEM (%)
Hiperdiploidia	8	54
Hiperdiploidia + Adicional	2	13
Hipodiploidia	3	20
Hipodiploidia + Adicional	2	13

Os nove cariótipos complexos foram assim classificados por ainda não terem sido descritos na literatura ou pelo fato de apresentarem mais de uma alteração cromossômica. É importante ressaltar que foram incluídos nesses casos cariótipos com hiper e hipodiploidia com alterações adicionais, além de células com presença de cromossomos marcadores. Foram listados na TAB. 9 os cariótipos complexos juntamente com o tipo celular envolvido e um possível prognóstico para os pacientes estudados, baseados na literatura pesquisada.

TABELA 9 - CARIÓTIPOS COMPLEXOS E POSSÍVEIS PROGNÓSTICOS

CARIÓTIPO COMPLEXO	PROGNÓSTICO
46,XY, inv (9) (p12q13) [20]	INDETERMINADO
46, XX, + mar, -20 [14] / 46, XX [06]	INDETERMINADO
48, XY, t (1;3) (q32;q27), +16, + mar [09] / 46, XY [14]	DESFAVORÁVEL
47,XY,i(7)(q10), +21[22] / 48,XY, i(7)(q10), +mar,+21[04] / 48, XY, i(7)(q10), +8, +21 [03]	DESFAVORÁVEL
49 ~ 87, XX ,add(14)(q32?), add(16)(p13.3)[cp30]	DESFAVORÁVEL
46,XY, dup(1)(q31q44) [12] / 46,XY,dup(13)(q13q34) [05] / 46,XY, der(21)t(7;21)(q21q36;q22.3) [04] / 46,XY[04]	DESFAVORÁVEL
46, XX, -7, + der 7, t(7;?)(q31;?) [30]	DESFAVORÁVEL
46,XX,t(9;22)(q34;q11), add(14)(q32)	DESFAVORÁVEL
38~45, XX, del(20q), t(9;14), (q22?;q32?)	DESFAVORÁVEL

Os pacientes foram classificados conforme a alteração cromossômica em três grupos: favorável, intermediário e desfavorável. Neste estudo o grupo favorável foi de 54%, seguido por 8% do indeterminado e 38% do desfavorável. O GRÁF. 3 permite visualizar os possíveis

prognósticos estabelecidos aos vinte e seis pacientes que apresentaram alterações citogenéticas, como também àqueles com resultado de cariótipo normal.

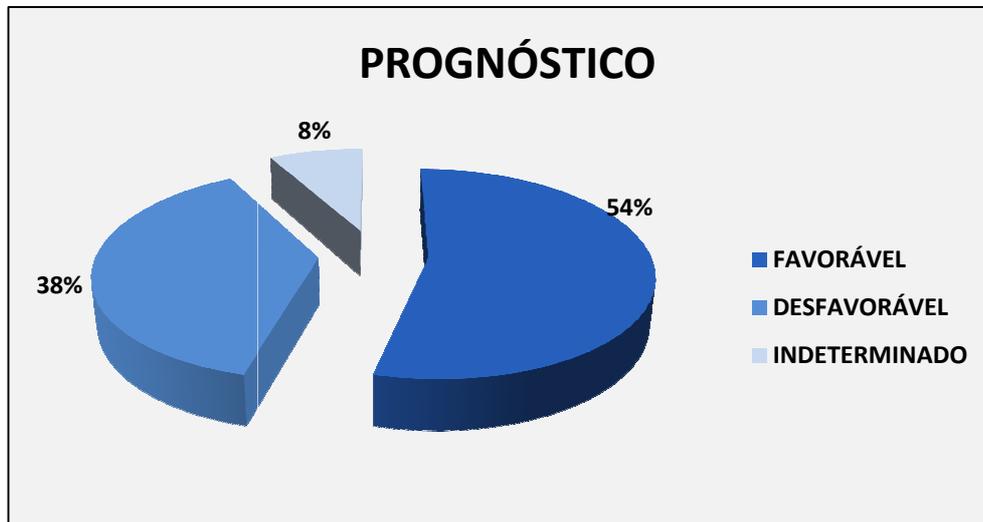


GRÁFICO 3 - DEMONSTRATIVO DO PROGNÓSTICO DOS PACIENTES ESTUDADOS

5.3 RECIDIVAS E ÓBITOS

Dos trinta pacientes estudados, cinco (17%) apresentaram recidiva da doença. Desses, três apresentaram cariótipo complexo, idade acima dos 10 anos, leucometria aumentada, valores de hemoglobina e plaquetas reduzidas e presença de blastos no SP. Os outros dois pacientes apresentaram cariótipo normal, idade entre 1 e 10 anos, contagem de leucócitos muito acima dos valores normais e ausência de blastos no SP. Foram informados seis óbitos (20%) ao término deste estudo, sendo dois pertencentes ao grupo que apresentaram recidiva da doença com cariótipo complexo e os outros quatro pacientes faleceram por motivos não relatados. Atualmente, vinte e quatro pacientes ainda estão em tratamento, pois este trabalho foi finalizado durante o acompanhamento terapêutico da maioria desses casos.

Seguem abaixo exemplos de imagens de metáfases com alterações cromossômicas complexas encontradas neste estudo a serem destacadas (FIG.14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22).

48, XY, t (1;3) (q32;q27), +16, + mar

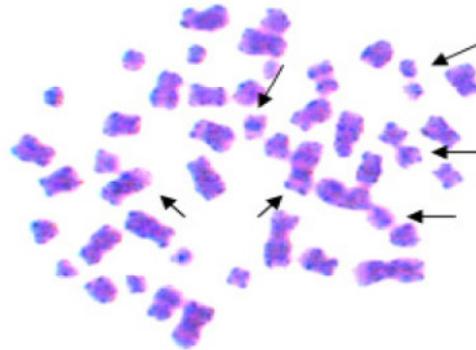
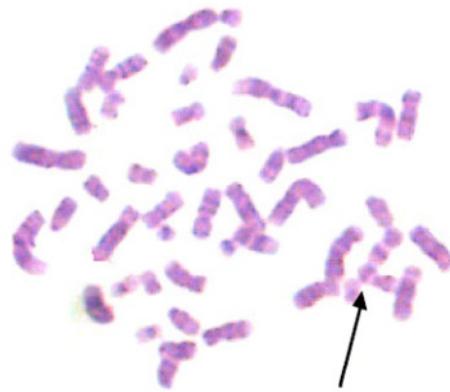


FIGURA 14 - Representa um caso de LLA em recaída com uma alteração ainda não descrita na literatura. Ocorreu uma translocação entre os cromossomos 1 e 3, entre as regiões q32 e q27, trissomia do cromossomo 16 e presença de um cromossomo marcador.



del(11)(q23)

FIGURA 15 - Representa um cariótipo com deleção no braço longo do cromossomo 11, na região q23, de uma recém-nascida com LLA Pré-B (Lactente).

46,XY, dup(1)(q31q44) [12] / 46,XY, dup(13)(q13q34) [05] / 46,XY, der(21) t(7;21) (q21q36;q22.3) [04] / 46,XY [04]

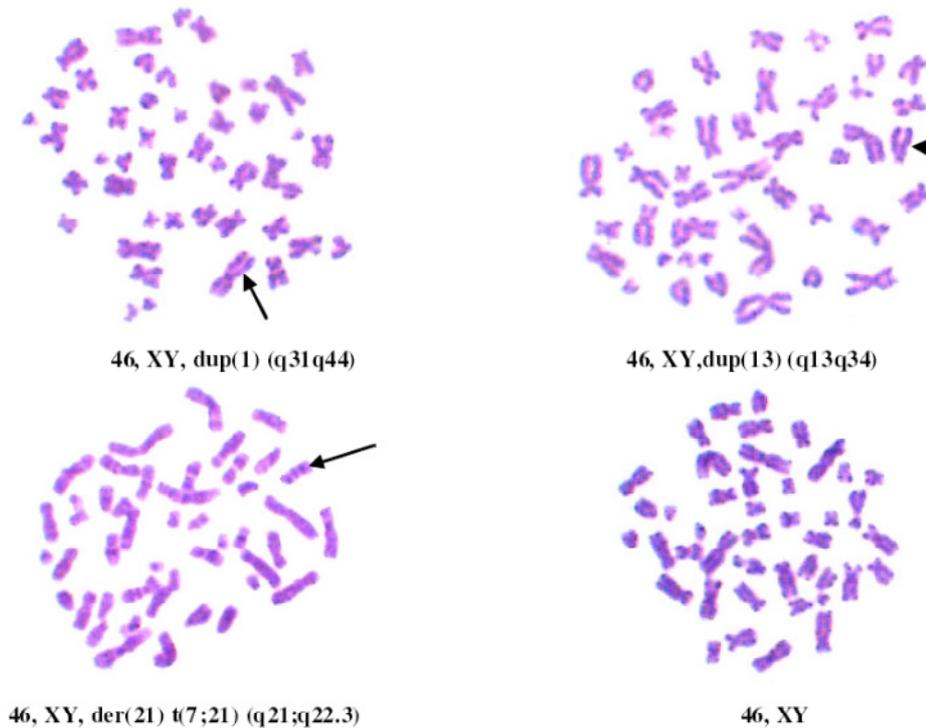


FIGURA 16 - Representa um cariótipo complexo de uma criança com LLA Pré-B (L1) ainda não descrito na literatura.

Esse cariótipo apresenta quatro clones diferentes:

- Duplicação da região q31q44 do braço longo do cromossomo 1;
- Duplicação da região q13q34 do braço longo do cromossomo 13;
- Translocação entre os cromossomos 7 e 21, envolvendo as regiões q21 e q22.3, originando um derivativo do cromossomo 2;
- Cariótipo normal.

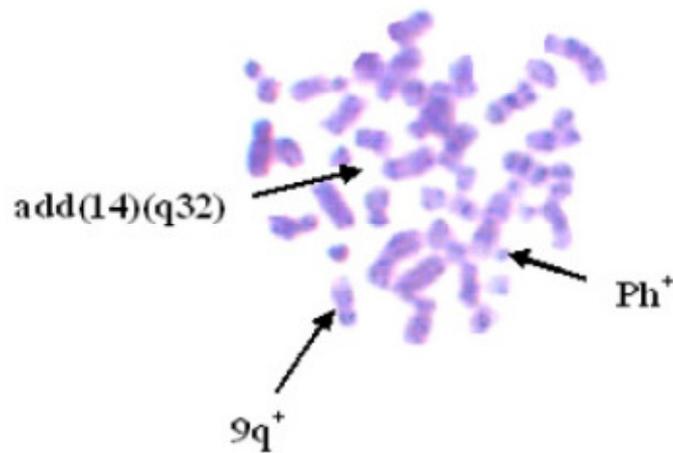


FIGURA 17 - Representa um cariótipo complexo com material adicional no braço longo do cromossomo 14 e a presença do cromossomo Filadélfia (Ph) em 100% das metáfases analisadas. LLA (L1) diagnóstico.

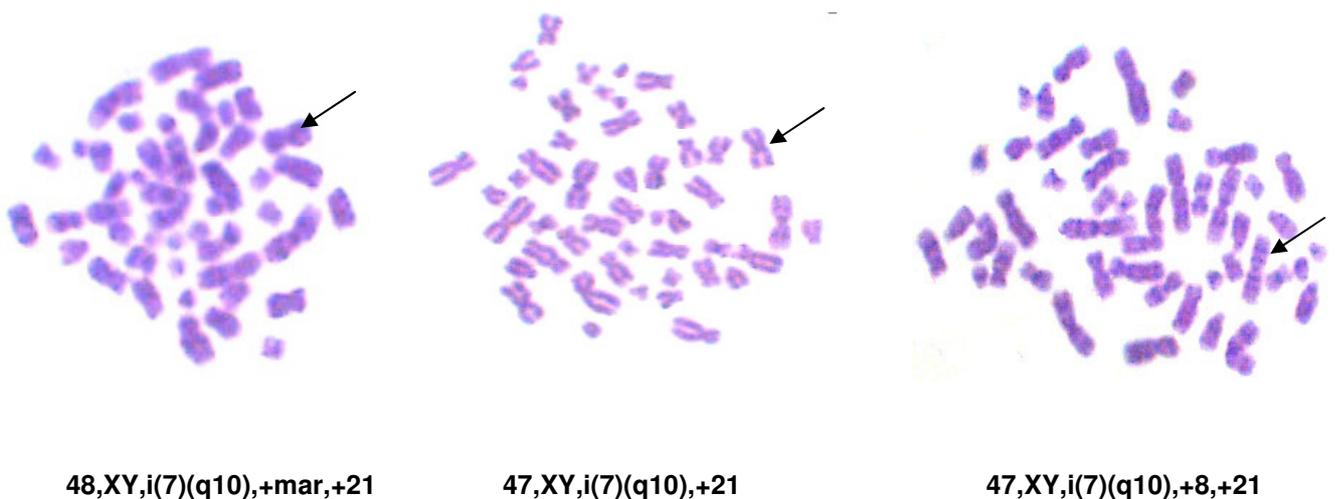
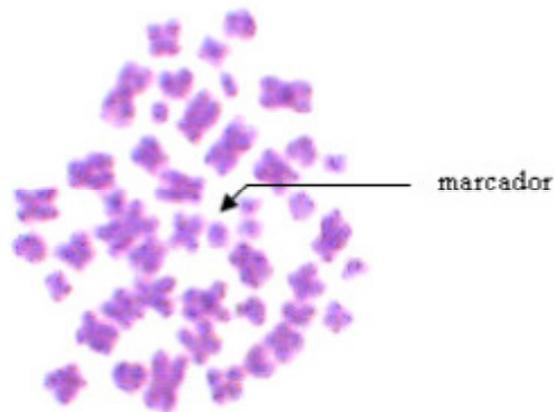


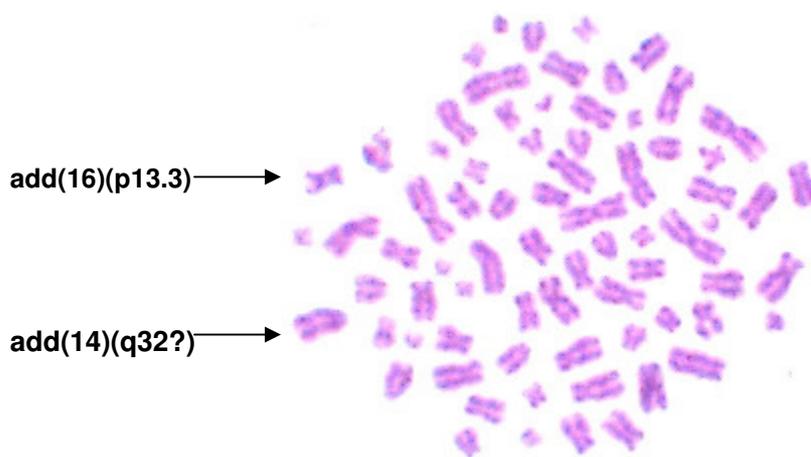
FIGURA 18 - Representa um cariótipo complexo formado por três clones celulares de um paciente com síndrome de Down com LLA Pré-B (L1). Foi observado isocromossomo 7 em todas as metáfases analisadas. Quatro metáfases apresentaram cromossomo marcador e em três a trissomia do cromossomo 8.



46, XX, + mar, -20

FIGURA 19 - Representa um cariótipo de uma paciente com LLA Pré-B com dois clones celulares. Um com ausência do cromossomo 20 e presença de um cromossomo marcador e o outro apresentando cariótipo normal.

Obs: Não foi possível confirmar por PCR se este cromossomo marcador apresentava ou não alguma região do cromossomo 20 ausente.



Hiperdiploida

FIGURA 20 - Representa um cariótipo complexo de uma paciente com LLA Pré-B (L1) com as seguintes alterações:

- 49 ~ 87, XX [cp30] = Hiperdiploidia com composição de cariótipo variando entre 49 a 87 cromossomos, em um total de trinta metafases observadas;

- **add(16)(p13.3)** = Material adicional de origem desconhecida no segmento terminal do braço curto do cromossomo 16, na banda p13.3 (essa alteração foi observada em 100% das metáfases analisadas);
- **add(14)(q32?)** = Material adicional de origem desconhecida no segmento terminal do braço longo do cromossomo 14, na banda q32? (essa alteração foi observada em 33,3% das metáfases analisadas).

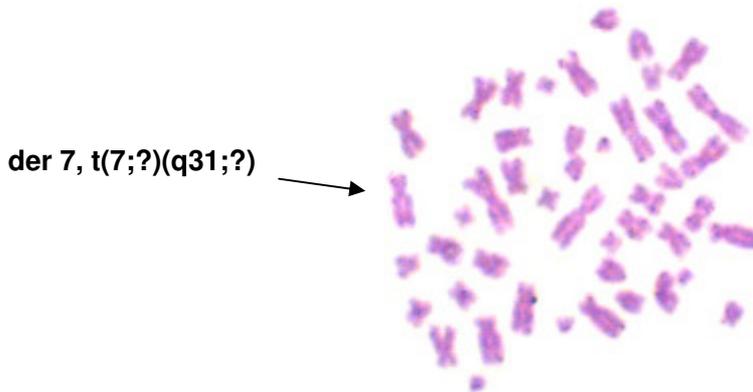


FIGURA 21 - Representa um cariótipo complexo de uma paciente com LLA Pré-B, com um derivativo do cromossomo 7 formado através de uma translocação do cromossomo 7, com um seguimento cromossômico desconhecido.

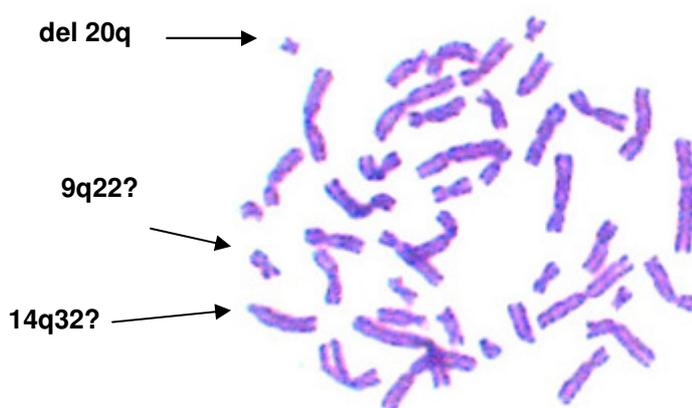


FIGURA 22 - Representa um cariótipo complexo de uma paciente com LLA Pré-B (L2) com as seguintes alterações:

- Hipodiploidia com composição de cariótipo variando entre 38 a 45 cromossomos, em um total de trinta metáfases observadas;
- Deleção no braço longo do cromossomo 20, (**del20q**);
- Translocação envolvendo os cromossomos 9 e 14, com as possíveis regiões translocadas 9q22? e 14q32? , **t(9;14)(q22?; q32?)**.

6 DISCUSSÃO

As leucemias são, mundialmente, as neoplasias malignas mais comuns na infância, correspondendo a aproximadamente 33% de todas as doenças malignas em menores de 14 anos ⁽¹⁰⁹⁾. Incidem na população de 0 a 14 anos com uma frequência de 1/25.000 indivíduos/ano, e o risco de desenvolver a doença nos primeiros 10 anos é de 1/2.880. Nos Estados Unidos da América (EUA), entre 1992 e 2004, foi constatada uma taxa de incidência de leucemia em menores de 14 anos de 41,4/1 milhão de pessoas anos, e de LLA de 31,9/1 milhão de pessoas anos ⁽²⁸⁾. Na Inglaterra e no País de Gales a incidência média de leucemia em menores de 14 anos passou de 38,3, entre 1971 a 1975, para 46,1/1 milhão de pessoas ao ano, no período de 1996 a 2000 ⁽²⁹⁾. Na Europa, crianças menores de 14 anos de idade apresentaram no período de 1978 a 1982 uma taxa de 40/1 milhão, que aumentou para 45/1 milhão de pessoas ao ano, entre 1993 e 1997, sendo que a LLA ocorreu em 81% dos casos ⁽³⁰⁾.

A faixa etária predominante neste estudo foi de pacientes entre um e dez anos (67%), sendo 37 % entre dois e cinco anos, com média de idade de 7 anos e meio. Esses dados estão de acordo com os descritos na literatura, que relatam maior prevalência de leucemias em indivíduos nessa faixa etária ^(14, 103). Perez-Vera et al., ⁽¹¹⁰⁾ encontraram 78% dos pacientes nessa faixa etária, enquanto Udayakumar et al. ⁽¹¹¹⁾ observou em 76%. Um estudo feito por Lichtvan em 2007 ⁽¹¹²⁾, observou que 78% dos pacientes apresentavam entre um e dez anos, sendo 38% entre dois e cinco anos.

Pesquisas e estudos mostram que a LLA acomete mais crianças do sexo masculino do que do sexo feminino, na proporção de 1,2:1. Esse fato foi observado em estudos feitos por Coebergh et al., e Swaminathan et al., ^(30, 113). Os trinta casos analisados neste estudo apresentaram a proporção de 1,3 do sexo masculino (57%), em relação a 1 do feminino (43%). A TAB. 10 demonstra a frequência do sexo masculino por alguns autores em pacientes com LLA.

TABELA 10 - FREQUÊNCIA DO SEXO MASCULINO EM PACIENTES COM LLA

ANO	AUTORES	FREQUÊNCIA DO SEXO MASCULINO (%)
1997	Chessells et al	57
2001	Pérez-vera et al	63
2004	Mirra et al	53
2007	Udayakumar et al	64

Estudos feitos por Ries et al., 1999 e Linet et al., 2003 ^(114, 115) nos EUA, observaram um número crescente de ocorrências de LLA em crianças da cor branca em comparação às de

cor negra. Concordando com esses autores, Linabery e Ross ⁽²⁸⁾ observaram essa mesma tendência em relação ao sexo. Pollock et al., em 2000 ⁽¹¹⁶⁾, observou que 79% das crianças com LLA eram da cor branca. Neste estudo a cor pele predominante foi a branca com 50%, em seguida a parda com 33% e, por fim, a negra com 17%. Dados esses que corroboram com a literatura.

No exame físico os achados mais freqüentes foram hepatomegalia (73%), esplenomegalia (70%) e linfadenomegalia (37%). Margolin, Steuber e Poplack ⁽⁴⁶⁾ relataram casos de LLA que apresentaram hepatomegalia em 68% dos casos, esplenomegalia em 63% e linfadenomegalia em 50%. Medrone et al., em um estudo realizado em São Paulo, encontrou hepatomegalia em 50% dos pacientes, esplenomegalia em 50% e linfonodomegalia em 22%.

De acordo com o WHO (*World Health Organization Classification of Tumours*), a leucometria em pacientes com leucemia linfoblástica aguda pode se apresentar diminuída, normal ou bastante elevada ^(117, 118). Neste estudo 60% apresentaram valores abaixo de 10 000/ μ L e 40% acima de 10 000/ μ L. Desses, 10% estavam acima de 50 000/ μ L. Trabalhos encontrados na literatura mostram que crianças com LLA apresentam, na sua maioria, contagem de leucócitos acima de 10 000/ μ L. Um estudo feito por Ma et al. em 1997 ⁽¹¹⁹⁾, observou que 20% dos pacientes apresentavam leucometria acima de 50 000/ μ L. Outro estudo realizado na Inglaterra por Chessels et al. em 1997 ⁽¹²⁰⁾, mostrou que 21% dos pacientes apresentavam valores acima de 50.000/ μ L. Este estudo concorda com alguns trabalhos encontrados na literatura, além de seguir os parâmetros adotados pela WHO e por Friedman e Weinstein. ^(117, 121).

Um exemplo a ser comparado foi um estudo do *Children's Cancer Study Group* ⁽¹²²⁾, realizado em 4455 crianças com LLA que apresentavam leucometria abaixo de 10 000/ μ L em 51%, entre 10 000 e 50 000/ μ L em 30% e 19% acima de 50 000/ μ L.

Hemoglobina menor que 10g/dL está presente em 80% dos pacientes. Mesmo com concentrações reduzidas de hemoglobina, a anemia é normocítica e normocrômica e a contagem de reticulócitos é baixa ⁽¹¹⁷⁾. Em relato feito por Margolin, Steuber e Poplack ⁽⁴⁶⁾, 80% dos pacientes estudados com LLA apresentaram valores de hemoglobina menor que 10 g/dL. Swaminathan et al., em 2008 ⁽¹¹³⁾, observaram que 75% das crianças abaixo de dez anos apresentavam hemoglobina abaixo de 10 g/dL. Considerando os valores de hemoglobina encontrados, 73% apresentaram valores inferiores a 10 g/dL. Os valores observados para a hemoglobina neste estudo foram coerentes com achados da literatura.

A contagem de plaquetas reduzida está presente na maioria dos pacientes, sendo o valor menor que 100.000/ μ L em aproximadamente 75% dos casos ⁽²⁷⁾. Neste trabalho foi observado trombocitopenia na maioria dos casos, correspondendo a 83%. Estudo realizado por Popescu et al. ⁽⁸⁴⁾, encontrou 75% dos casos com contagem de plaquetas abaixo de 100.000/ μ L, assim como Margolin, Steuber e Poplack ⁽⁴⁶⁾.

Em relação à imunofenotipagem, 93% dos pacientes apresentavam LLA de linhagem B e 7% LLA de linhagem T. Entre as LLA de linhagem B, a maioria dos casos (83%) foi classificada como pré-B. O percentual reduzido de pacientes com LLA-T pode estar associado à proporção de pacientes adolescentes analisados acima de 10 anos. Rego et al., em 1996 ⁽¹²³⁾, em Ribeirão Preto, avaliaram 153 crianças, sendo 82% LLA de linhagem B; Dworzak et al., em 2003 ⁽¹²⁴⁾, na Áustria, encontraram LLA de linhagem B em 87% dos casos e Udayakumar et al., em 2007 ⁽¹¹¹⁾, 83%, sendo 7% de LLA de linhagem T. Leite et al., em 2007 ⁽¹²⁵⁾, estudaram 108 pacientes pediátricos. Desses, 81% eram de linhagem B e 19% LLA-T. Farias e Castro, em 2004 ⁽¹²⁶⁾, observaram um percentual de 80% de LLA de linhagem B e 20% de linhagem T.

Após a descoberta por Casperson et al. ⁽¹²⁷⁾ e Seabright ⁽¹²⁸⁾ das técnicas de bandeamento, os estudos citogenéticos nas leucemias agudas demonstram que poderiam ser encontradas cerca de 50% de anomalias cromossômicas ⁽¹¹²⁹⁾. Vários estudos prospectivos e consecutivos, utilizando técnicas de bandeamento, já mostraram que a incidência de anomalias cromossômicas varia entre 55-94%, e algumas alterações encontradas são específicas para determinado subtipo celular caracterizado por imunofenotipagem. A TAB. 11 abaixo sumariza os principais trabalhos com as frequências das anormalidades cromossômicas nas LLAs infantis presentes na literatura.

TABELA 11 - SUMÁRIO DA FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES CITOGÊNICAS

ANO	AUTORES	FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES CITOGÊNICAS
1989	Secker-Walter et al.,	55%
1993	Grupo Cooperativo Francês de citogenética Hematológica	71%
2002	Silva et al.,	92%
2010	Moorman et al.,	75%
2010	Kowalczyk et al.,	61,8%

**Os pacientes estudados pelos autores na tabela acima apresentavam faixa etária entre 1 e 10 anos.*

De acordo com o estudo realizado por Kowalczyk et al.,⁽¹³³⁾ 13,5% dos pacientes apresentaram índice mitótico nulo, enquanto que em 24,7% foi observado cariótipo normal. Silva et al., em 2002, observaram que 92% dos pacientes apresentaram algum tipo de anormalidade cromossômica, 7% apresentaram cariótipo normal e 1% das amostras analisadas apresentaram ausência de crescimento celular. Pérez-Vera et al., em 2001⁽¹¹⁰⁾, encontraram, através da análise citogenética, 22% dos pacientes com cariótipo normal e 74% com alguma alteração citogenética. Semelhante aos trabalhos mencionados acima, o estudo em questão encontrou 64% com alteração citogenética, 23% com cariótipo normal e 13% com ausência de crescimento celular nas amostras analisadas. Segundo a literatura, portadores de LLA com citogenética normal apresentam melhor prognóstico com 90% de sobrevida em cinco anos. Uma hipótese para essa taxa de sobrevida alta pode ser a presença da t(12;21) nesses pacientes. Essa translocação é conhecida por conferir melhor prognóstico e dificilmente pode ser detectada pela CC⁽⁸⁷⁾.

As alterações numéricas estavam presentes em 53% dos casos estudados, 21% apresentavam alteração numérica e estrutural e 21% alterações estruturais. Pérez-Vera et al., em 2001⁽¹¹⁰⁾, avaliaram 131 pacientes e encontraram alterações numéricas em 40%, alterações estruturais em 19% e ambas em 15% dos pacientes. Estudo feito por Raimondi em 2000⁽¹⁰⁶⁾ detectou apenas alterações numéricas em 46% dos casos e, nos demais, houve associação de alterações numéricas e estruturais. Silva, et al (2002)⁽¹³⁰⁾ analisaram 91 pacientes pediátricos e observaram que 45% apresentavam alterações cromossômicas numéricas, 21% numéricas e estruturais e 34% com alterações estruturais. Prado Jr et al. (2006)⁽¹³⁴⁾ encontraram alteração numérica em 51%, enquanto que em 37% foram de alterações estruturais.

Considerando os quinze pacientes estudados com alterações cromossômicas numéricas e numéricas com alteração estrutural, a hiperdiploidia foi observada em dez pacientes (67%), dos quais 54% apresentaram apenas hiperdiploidia e 13% com hiperdiploidia e alteração adicional. A hipodiploidia foi encontrada em 33% dos pacientes. Desses, 13% apresentaram alteração estrutural. Os tipos de alterações estruturais adicionais encontradas foram translocação, adição, duplicação e presença de cromossomo marcador.

Pui et al. (1989)⁽⁸⁸⁾ avaliaram crianças com diagnóstico de LLA e encontraram hiperdiploidia em 26% pacientes. Em 62% destes casos foram detectadas também alterações cromossômicas estruturais. Dos 28 casos que não responderam ao tratamento, 22 apresentavam alterações cromossômicas estruturais, mostrando associação significativa dessas alterações com falha do tratamento. Raimondi (2000)⁽¹⁰⁶⁾ estudou 182 crianças com LLA apresentando hiperdiploidia com 51 a 67 cromossomos. Silva et al., em 2002,

analisaram noventa e um pacientes com alterações citogenéticas. Dessas, 56% apresentaram hiperdiploidia e 34% com alteração adicional. De acordo com Secker-Walker et al., (1989)⁽¹³²⁾ e Pui et al., (1989)⁽⁸⁸⁾, a hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos está relacionada com um melhor prognóstico. Martin et al., em 1996⁽⁹⁰⁾, evidenciaram respostas ainda melhores ao tratamento nos pacientes com trissomias dos cromossomos 4 e 10.

Nesse estudo os pacientes com hiperdiploidia sem alteração adicional apresentavam boa resposta terapêutica, interferindo estatisticamente no prognóstico dos pacientes. A hipodiploidia é uma alteração numérica pouco frequente que confere um mau prognóstico. Cinco pacientes apresentaram hipodiploidia. Dois desses casos apresentaram alteração adicional, sendo um com recidiva e em tratamento e o outro foi a óbito após terapia inicial. Por haver um número limitado de relatos de pacientes com hipodiploidia, são necessários mais estudos para definir o prognóstico, apesar de alguns estudos demonstrarem que esses pacientes apresentam evolução desfavorável^(90, 136). Resultados de outros autores que apresentaram semelhança com este estudo estão descritos na TAB. 12 abaixo.

TABELA 12 - SUMÁRIO DAS PLOIDIAS EM CRIANÇAS COM LLA (%)

ANO	AUTOR	HIPERDIPLOIDIA	HIPODIPLOIDIA	PSEUDODIPLOIDIA
1996	Petkovic et al.,	31	6	26
2001	Harrison	44	8	29
2002	Nordgren et al.,	36	3	34
2006	Prado Jr et al.,	37	14	41
2007	Udayakumar et al.,	30	4,5	22

Dentre os nove cariótipos complexos encontrados, alguns merecem destaque por ainda não terem sido descritos na literatura. Dentre esses, uma translocação entre os cromossomos 9 e 22 (Ph⁺), com adicional no cromossomo 14; duplicações nos cromossomos 1q e 13q, além de um derivativo do cromossomo 21 que foi translocado com o cromossomo 7, formando um derivativo do cromossomo 7. O importante a ressaltar sobre esses casos complexos é que, segundo dados da literatura, são considerados de prognóstico desfavorável. Um dos possíveis motivos seria devido a perda, troca ou ganho de genes, que podem promover, muitas vezes, resistência aos tratamentos. A presença do cromossomo Filadélfia (Ph⁺) ou translocação 9 e 22 é geralmente encontrada em cerca de 3 a 5% das amostras de LLA pediátrica, e é considerada uma alteração de mau prognóstico⁽¹³⁹⁾. Observou-se a presença de um cromossomo marcador em três cariótipos analisados. Os cromossomos marcadores são reordenamentos complexos formados, geralmente, por heterocromatina centromérica, mas

podendo chegar a conter partes de genes de algum cromossomo. É praticamente impossível estabelecer uma relação precisa entre a presença desse tipo de cromossomo e o fenótipo do paciente. Assim, a caracterização de cada cromossomo marcador torna-se imperativa para essa correlação ⁽¹⁴⁰⁾.

Detectou-se um cariótipo no grupo dos complexos diferenciado dos demais por ser de um paciente com síndrome de Down e apresentar três clones celulares. Silva et al., ⁽¹³⁰⁾ encontraram, igualmente a este estudo, um cariótipo de um paciente com síndrome de Down (SD) envolvendo quatro clones. De acordo com a literatura, crianças com SD apresentam risco 10 a 20 vezes maior de desenvolverem leucemia quando comparados a pacientes sem a trissomia do 21. A primeira pesquisa sistemática mostrando sobre risco aumentado de leucemia em indivíduos com síndrome de Down (SD) foi publicada por Krivit e Good, em 1957 ⁽¹⁴¹⁾, após vários relatos de casos isolados. Em seguida, foram realizados numerosos estudos documentando o alto risco relativo de leucemia infantil associado com síndrome de Down, citado na publicação da IARC (*International Agency for Research on Cancer World Health Organization - 1999*).

Os pacientes com síndrome de Down (SD) geralmente são acometidos por leucemia mielóide aguda, principalmente do subtipo FAB - M7. Todavia, já foram encontrados vários casos de SD com LLA. Os pacientes com SD que desenvolvem LLA apresentam uma toxicidade aumentada ao metotrexato, que pode estar relacionada a uma maior entrada do medicamento em todos os tecidos. A redução do carreador de folato, que produz o transporte de metotrexato, é codificada por um gene localizado no cromossomo 21. O acúmulo de metotrexato nos linfoblastos está associado ao número de cópias do cromossomo 21 ⁽¹⁴²⁾. Embora a sobrevida nas LLAs tenha melhorado sensivelmente, ainda não é igual à sobrevida em LMA. Esse achado é único na criança com síndrome de Down (SD), enquanto que crianças não-Down com LLA, têm melhores taxas de sobrevida do que aquelas com LMA ⁽¹⁴³⁾.

Atualmente, o prognóstico (estratificação) da LLA ocorre de duas formas: a primeira, por estratificação estática, que inclui as características clínicas como idade, raça, contagem inicial de leucócitos em sangue periférico ao diagnóstico, expressão imunológica da doença e alterações cromossômicas específicas nas células leucêmicas; a segunda, por estratificação dinâmica, na qual é avaliada a resposta da doença ao tratamento ⁽¹⁰⁹⁾.

De acordo com os estudos do SWOG (*Southwest Oncology Group*) e MRC (*Medical Research Council*), os pacientes são estratificados conforme a alteração citogenética específica em três grupos: favorável, intermediário e desfavorável, com nítidas diferenças na

sobrevida. No grupo SWOG a sobrevida projetada de oito anos é de 55% para o grupo de cariótipo favorável, 38% para o grupo intermediário e 11% para o grupo de prognóstico desfavorável⁽¹⁴⁴⁾.

Um trabalho mais recente, publicado em fevereiro de 2007, realizado por Schultz et al.,⁽¹⁴⁵⁾ analisou os fatores prognósticos do *Pediatric Oncology Group* (POG) e do *Children's Cancer Group* (CCG). Foram avaliadas, retrospectivamente, 6238 crianças com diagnóstico de LLA de linhagem B, representando a maior análise de fatores prognósticos realizada até o momento, na tentativa de validar marcadores prognósticos identificados em amostras menores. Nesse estudo, idade e contagem inicial de leucócitos mostraram ter importância no prognóstico. Porém, sexo, raça, presença de hepatoesplenomegalia e massa mediastinal, assim como a classificação FAB, não interferiram na resposta ao tratamento. Em relação às anormalidades cromossômicas a presença de cromossomo Filadélfia, hipodiploidia extrema (menos de 44 cromossomos) e presença de anormalidades em 11q23 (gene MLL) foram confirmados como fatores de pior prognóstico, enquanto a fusão TEL-AML1 foi indicativa de melhor prognóstico⁽¹⁴⁵⁾.

Seguindo a mesma linha deste estudo, Quixabeira e Saddi⁽¹⁴⁶⁾ classificaram as leucemias de acordo com o prognóstico, linhagem celular envolvida e alterações citogenéticas. Observou-se hiperdiploidia e t(12;21) em LLA-B, com prognóstico favorável. A t(9;22) em LLA-B e deleção em 11q23 apresentou prognóstico desfavorável. Além de outras alterações que ainda não foram possíveis identificar a classificação do prognóstico.

Os fatores prognósticos deste estudo tiveram como base a idade, leucometria, presença de blastos no SP e, principalmente, as alterações cromossômicas. Alguns dos pacientes que apresentaram alteração citogenéticas complexas foram classificados como sendo de prognóstico desfavorável. Segundo dados da literatura, são considerados complexos os cariótipos que apresentarem mais de uma alteração cromossômica e/ou que não tenha sido ainda descrita. O prognóstico foi considerado favorável nos pacientes que apresentaram hiperdiploidia ou com cariótipo normal, além da idade entre um e seis anos e/ou contagem de leucócitos próximos da normalidade. O prognóstico intermediário foi estabelecido para os pacientes com cariótipos que apresentaram apenas uma alteração cromossômica estrutural, com idade entre um e seis anos, contagem de leucócitos superior a 20 000/ μ l e resposta ao tratamento avaliada pela presença de blastos no SP. O grupo de pacientes que pertenciam ao prognóstico desfavorável apresentou cariótipo complexo, idade acima de 10 anos e presença de blastos acima de 25% no SP.

7 CONCLUSÕES

- Em relação ao hemograma, a maioria dos pacientes apresentou hemoglobina abaixo de 10 g/dL (73%), contagem de leucócitos inferior a 10.000/ μ L (60%) e contagem de plaquetas abaixo de 150.000/ μ L (83%), igualmente aos relatos da literatura.
- A principal faixa etária estudada foi entre um e dez anos (67%). Desses, 37% eram de crianças entre dois e cinco anos. O sexo masculino (57%) e a cor da pele branca (50%) foram os mais prevalentes, ratificando dados da literatura.
- Sabe-se que existem vários achados clínicos relacionados à LLA. Porém, neste estudo foram informados como os mais frequentes a hepatomegalia (73%), a esplenomegalia (70%) e a linfadenopatia (37%).
- A hiperdiploidia foi à alteração cromossômica numérica mais comum encontrada (67%). Dessas, 13% apresentaram alteração adicional. Foram analisados cinco casos com hipodiploidia (33%), dos quais dois (13%) apresentaram alteração estrutural adicional.
- Os pacientes com alterações numéricas que apresentaram alteração adicional foram estratificados como pertencentes ao grupo de cariótipo complexo e de prognóstico desfavorável.
- Neste estudo foi possível identificar como fatores prognósticos as alterações cromossômicas, a contagem de leucócitos e a idade, permitindo, assim, estratificar os pacientes em grupos de risco (favorável, indeterminado e desfavorável).
- Foram observadas alterações complexas ainda não descritas na literatura que, de acordo com dados clínicos e laboratoriais, indicaram prognóstico desfavorável.
- Foram registrados cinco casos de recidiva (17%). Desses, três faziam parte do grupo de cariótipo complexo com prognóstico desfavorável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GOASGUEN, J.E. et al. *Biologic Diagnosis of Leukemias*. 6. ed. Philadelphia: [s.n.]. 1996. 357p.
2. GREAVES, M. F. Aetiology of acute leukaemia. *Br. J. Cancer*, n. 67, p. 413–423, 1993.
3. FIALKOW, P. J. the use of cell markers in the study of human hematopoitic neoplasia. *Adv Cancer Resp*, n. 49, p. 127- 67, 1987.
4. GOLDMAN, L.; BEMMET, J. C.; CECIL, J. *Tratado de medicina interna*. 21. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2001.
5. WEIR, E. G. et al. Leukemia : Acute bilineal leukemia: a rare disease with poor outcome. *Official Journal of the Leukemia Society of America*, Reino Unido, v.21, n.11, p. 2264-70, 2007.
6. RABELLO-MORAES, A. C. et al. Comparação de duas metodologias para a avaliação da expressão de ABCB1 e ABCC1 em células de pacientes com leucemia aguda. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, Santa Catarina, v.31, n.5, p.110, Nov.2009.
7. LOEB, L. A. Mutator Cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 5, p. 3075-3079, 1991.
8. CORSETTI, M. T.; CALABI, F. Lineage specific expression of runt box polypeptides in primitive and definitive hematopoiesis. *Blood* 1997; v. 89, p. 2359-2368, 1997.
9. THORSTEINSDOTTIR U.; SAUVAGEAN G.; HUMPHRIES K. Hox homeobox genes as regulators of normal and leukemic hematopoiesis. *Hematol./Oncol. Clin. N. Am.* v. 11, p. 1221-1237, 1997.
10. CARAKUSHANSKY G. *Doenças Genéticas em Pediatria*. [S.I]: Ed. Guanabara Koogan. 2001, p. 349.
11. CATOVSY, D.; MATUTES, E. The classification of acute leukemia. *Leukemia*, [S.I], v.6, p. 1-6, 1992.
12. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Ministério da Saúde. Estimativa de Câncer 2010. Disponível em: <www.inca.gov.br/estimativa/2010>. Acesso em 16 fev. 2011.
13. SWAMINATHAN, R.; RAMA, R.; SHANTA, V. Childhood cancers in Chennai, Índia, 1990 – 2001: incidence and survival. *Int J Cancer*. v. 122, p. 2607–11, 2008.
14. SILVERMAN, L. B. et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood*, v. 97, p. 1211-1218, 2001.

15. THOMPSON, M. W. et al. *Thompson e Thompson: genética médica*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 460 p.
16. GRIMWADE, D.; WALKER, H.; OLIVER, F.; WHEATLEY, K.; HARRISON, C.; HARRISON, G. et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML; analysis of 1612 patients entered into the MRC AML10 trial. *Blood*, v. 92, p. 2322-2333. 1998.
17. POPESCU, N. C.; ZIMONJIC, D. B. Molecular cytogenetic characterization of cancer cell alterations. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1997.
18. PEJOVIC, T. et al. Simple numerical chromosome aberrations in well- differentiated malignant epithelial tumors. *Cancer, Genet. Cytogenet.*, 1990.
19. CAVALCANTI JÚNIOR., G. B. et al. Importância da aplicação de anticorpos monoclonais no diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *Rev Bras Anal Clín*, v.29, n.3, p.159-167, 1997.
20. BENE, M. C. Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunol Lett*, v.98, p. 9-21, 2005.
21. HOFFMAN, R.; BENZ EJ, J. R.; SHATTIL, S. J.; FURIU, B.; COHEN, H. *Hematology: basic principles and practice*. 3. ed. New York: Church Livingstone, 2000.
22. SCHEINBERG, D. A.; MASLAK, P.; WEISS, M. Acute leukemias. In: DEVITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. *Cancer: principles and practice of oncology*. 6 ed. New York: Cambridge University Press, v. 1. p. 1772-1791, 2001.
23. HUNTLY BRIAN J P; GILLILAND D GARY Cancer biology: summing up cancer stem cells. *Nature*. v. 435, n. 7046, p. 1169-70, 2005.
24. LITCHTMAN, M. A. Acute myelogenous leukemia. *Williams Hematology* 5. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1995. p.272-98.
25. CHESSELLS, J. Acute leukaemia in childhood. In: SOUHAMI, R.; TANNOCK, I.; HOHENBERGER, P.; HORIOT, J. C. *Oxford Textbook of Oncology*. New York: Oxford University Press, 2002. p. 1504-1516.
26. FOSP - *Fundação Oncocentro de São Paulo*. Boletim do Registro Hospitalar de Câncer: leucemias. São Paulo: FOSP, 2006, Ano VI, n. 27.
27. MIRRA, A. P.; LATORRE, M. R.D.O.; VENEZIANO, D. B. *Incidência, mortalidade e sobrevida do câncer da infância no Município de São Paulo*. São Paulo: Registro de Câncer de São Paulo, 2004.
28. LINABERY, A. M.; ROSS, J. A. Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992– 2004). *Am Cancer Society*. v. 112, n. 2, p. 416-32, 2008.
29. SHAH, A.; COLEMAN, M. P. Increasing incidence of childhood leukaemia: a controversy re-examined. *Br J of Cancer*.,v. 97, p. 1009 –12, 2007.

30. COEBERGH, J. W. W.; REEDIJK, A. M. J.; VRIES, E. D. E.; MARTOS, C.; JAKAB, Z.; STELIAROVA-FOUCHER, E. et al. Leukaemia incidence and survival in children and adolescents in Europe during 1978–1997: report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer.*, v. 42, p. 2019–36, 2006.
31. SWAMINATHAN, R.; RAMA, R.; SHANTA, V. Childhood cancers in Chennai, India, 1990–2001: incidence and survival. *Int J Cancer.*, v. 122, p. 2607–11, 2008.
32. RIBEIRO, K. B.; LOPES, L. F.; CAMARGO, B. Trends in childhood leukemia mortality in Brazil and correlation with social inequalities. *Am Cancer Society.*, v. 110, n. 8, p. 1823-31, 2007.
33. GREAVES, M. F. Aetiology of acute leukaemia. *Br. J. Cancer*, n. 67, p. 413–423, 1997.
34. LINET, M. S.; DEVESA, S. S.; MORGAN, G.J.; The leukemias. In: SCHOTTENFELD, D.; FRAUMENI, Jr. J. F. *Cancer epidemiology and prevention*. 3. ed. New York: Oxford University Press, 2006. p. 841-871.
35. BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect.*, v.115, n.1, p. 138-45, 2007.
36. GREAVES, M. F. et al. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood*, [S.l.], v. 102, p. 2321-2333, 2003.
37. ZIPF, T. F.; BERG, S.; ROBERTS, W. M.; POPLACK, D. G.; STEUBER, C. P.; BLEYER, W. A. Childhood leukemias. In: ABELOFF, M. D.; ARMITAGE, J. O.; UCHTER, A. S.; NIEDERHUBER, J. E. *Clinical oncology l. 2* ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. p. 2402-2429.
38. FASCHING, K. et al. Presence of clone-specific antigen receptor gene rearrangements at birth indicates an in utero origin of diverse types of early childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, v. 95, p. 2722-2724, 2000.
39. MAHONEY, M. C.; MOYSICH, K. B.; MCCARTHY, Jr P. L.; MCDONALD, R. C.; STEPANENKO, V. F.; DAY, R. W. et al. The Chernobyl childhood leukemia study: background & lessons learned. *Environ Health.*, v.3, n.1, p. 12, 2004.
40. NOSHCHENKO, A. G.; MOYSICH, K. B.; BONDAR, A. Patterns of acute leukemia occurrence among children in the Chernobyl region. *Int J Epidemiol.*, v.30, p. 125-9, 2001.
41. BUCCHERI, V.; LORENZI, T. F. Patologia dos leucócitos: doenças proliferativas linfadenopatias reacionais. In: LORENZI, T. F. *Atlas de hematologia: clínica hematológica ilustrada*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 351-398.
42. FREEDMAN, M.D.; STEWART, P.; KLEINERMAN, R.A.; WACHOLDER, S.; HATCH, E. E.; TARONE, R. E. et al. Household solvent exposures and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Public Health.*, v.91, n. 4, p. 564-7, 2001.

43. SHU, X. O.; STEWART, P.; WEN, W. O.; HAN, D.; POTTER, J. D.; BUCKLEY, J. D. et al. Parental occupational exposure to hydrocarbons and risk of acute lymphocytic leukemia in offspring. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, v.8, p. 783-91, 1999.
44. GREAVES, M. F. Molecular genetic, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer*, v. 35, p. 1941-1953, 1999.
45. GAJJAR, A. et al. Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, v. 96, p. 3381-3384, 2000.
46. MARGOLIN, J. F. et al. Acute Lymphoblastic Leukemia. In: PIZZO, P. A.; POPLACK, D. G. *Principles and practice of pediatric oncology*. [S.l.]: Lippincott Williams and Wilkins. 2005. p. 539-590.
47. SILVERMAN, L. B; SALLAN, S. E. Acute Lymphoblastic Leukemia. In: NATHAN, D. G. et al. *Hematology of Infancy and Childhood*. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2003, p. 1135- 1166.
48. BLEYER, W. A. Central nervous system leukemia. *Pediatr Clin North Am*, v. 35, p. 789-814, 1988.
49. KAY, H.E. Testicular infiltration in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, v. 53, p. 537-542, 1983 .
50. WEINSTEIN, H. J.; TARBELL, N. J. Leukemias and lymphomas of childhood. In: DEVITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. *Cancer: principles and practice of oncology*. 6 ed. New York: Cambridge University Press, 2001. p. 1653-1668.
51. ZAGO, M. A. et al. *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu, 2001.
52. BENNETT, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M. T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A. G.; GRALNICK, H. R. et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann Intern Med.*, v. 103, p. 626-9, 1985.
53. BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T. et al. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol*, v.33, p. 451-458, 1976.
54. BAIN, B.J. Diagnóstico em leucemias. Rio de Janeiro, *Revinter*, p.47-97, 2003.
55. BENE, M. C.; CASTOLDI, G.; KNAPP, W. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia.*, v. 9, p. 1783-1786, 1995.
56. OLIVEIRA, B. M.; DINIZ, M. S.; VIANA, M. B. Leucemias agudas na infância. *Rev Med Minas Gerais*, Belo Horizonte, v.14 (1 Supl. 1): S33-S9, 2004.
57. INFANTE-RIVARD, C. et al. Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and with gene polymorphisms. *Epidemiology*, v. 10, p. 481-487, 1999.

58. PERRILLAT, F. et al. Day-care, early common infections and childhood acute leukaemia: a multicentre French case-control study. *Br J Cancer*. v. 86, p. 1064-1069, 2002.
59. REYNOLDS, P. et al. Birth characteristics and leukemia in young children. *Am J Epidemiol*, v. 155, p. 603-613, 2002.
60. MURRAY, L. et al. Association of early life factors and acute lymphoblastic leukaemia in childhood: historical cohort study. *Br J Cancer*, v. 86, p. 356-361, 2002.
61. GAJJAR, A. et al. Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, v. 96, p. 3381-3384, 2000.
62. STOCK, W. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia: risk-adapted strategies. *Hematology*, p. 87-96, 1999.
63. LORENZI, T. *Manual de Hematologia*. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999.
64. BEUTLER, E. et al. *Hematology*. 6 th. ed. USA: International Edition, 2001.
65. SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VALDIMAN, J. *WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4. ed. Lyon: Editora International Agency for Research on Cancer, 2008.
66. OMS- Organização Mundial de Saúde. *Classificação Internacional de Doenças para Oncologia*; tradução Fundação Oncocentro de São Paulo. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 2005.
67. THOMPSON, M. W. et al. *Thompson e Thompson: genética médica*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 460.
68. MOTULSKY, V. *Genética humana: problemas e abordagens*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
69. MOOREHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.*, v. 20, p. 613-616, 1960.
70. ARNOLD, J. Beobachtungen über Kernteilungen in den Zellen der Geschwülste. *Virchows Arch Pathol Anat*, v. 78, p. 279, 1879.
71. FLEMMING, W. Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen. III. *Arch Mikrosk Anat*. v. 20, 1882.
72. VOGEL, W. H et al. *Advanced practice oncology and palliative care guidelines*. Philadelphia: Lippincott, 2003. 378 p.
73. WIEMAN, H. L. The chromosomes of human spermatocytes. *Amer. J. Anat.*, v. 21, n. 1, 1917.

74. PAINTER, T. S. The Y chromosome in mammals. *Science*. v.53, p. 503-504, 1921.
75. TJIO, H.J, LEVAN, A. The chromosome numbers of man. *Hereditas*. v. 42, p.1-6, 1956.
76. VOGEL, W. H et al. *Advanced practice oncology and palliativecare guidelines*. Philadelphia: Lippincott, 2003. p. 378.
77. FORD, C.E.; HAMERTON, J.L The chromosome of man. *Nature*. v.178, p. 1020-1023, 1956.
78. GARDNER, R. J. M.; SUTHERLAND, G. R. *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. 3. rd. ed. New York: Oxford, 2004. p. 577.
79. CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp. Cell Res.*, v. 60, p. 315-319, 1970.
80. SHAFFER, L.G.; TOMMERUP, N. *ISCN: Ann International System for Human Cytogenetics Nomenclature*. Washington, 2005. p. 130.
81. BEIGUELMAN, B. *Citogenética Humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p. 328.
82. ALTERAÇÕES cromossômicas no cariótipo humano. Disponível em: <<http://mutacoes.tripod.com/cariotipohumano.htm>>. Acesso em 22 mar. 2010.
83. RAIMONDI, S. C. et al. Hyperdiploid (47-50) acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood*, New York, v. 79, p. 3245-3252, 1993.
84. POPESCU, N. C.; ZIMONJIC, D. B. Molecular cytogenetic characterization of cancer cell alterations. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1997.
85. CATOVSY, D.; MATUTES, E. The classification of acute leukemia. *Leukemia*, [S.l], v.6, p. 1-6, 1992.
86. MURRAY, L. et al. Association of early life factors and acute lymphoblastic leukaemia in childhood: historical cohort study. *Br J Cancer*, v. 86, p. 356-361, 2002.
87. ZEN, P. R. G. et al. Prevalence of TEL/AML1 fusion gene in brazilian pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 151, p. 68-72, 2004.
88. PUI, C. H. et al. Prognostic importance of structural abnormalities in children with hyperdiploid (>50 Chromosomes) acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, v. 73, p. 1963-1967, 1989.
89. ITO, C. et al. Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 a 56 chromosomes: a distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. *Blood*, v. 93, p. 315-320, 1999.
90. MARTIN, P. L. et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization, cytogenetic analysis, and DNA index analysis to detect chromosomes 4 and 10 aneuploidy in

pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *J Pediatr Hematol Oncol*, v. 18, p. 113-121, 1996.

91. CHARRIN, C. et al. A report from the LALA-94 and LALA SA groups on hypodiploidy with 30 to 39 chromosomes and near-triploidy: 2 possible expressions of a sole entity conferring poor prognosis in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*, v. 104, p. 2444-2451, 2004.

92. PRADO JR, P.C. et al. Análise de alterações citogenéticas em crianças com leucemia linfóide aguda. X Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, Salvador – BA, 2006, p. 64 (abstract).

93. PUI, C. H, CRIST, W. M.; LOOK, T. Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, v. 76, p. 1449-1463, 1990.

94. BERGER, R. Cytogenetics in adult acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*, v. 5, p. 68-86, Mar. 1998.

95. FADERL, S. et al. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, v. 111, n. 91, p. 3995-4019, Jun 1998.

96. LI, S. et al. The P190, P210, and P230 forms of the *BCR/ABL* oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med*, v. 9, n. 189, p. 1399-412, May 3 1999.

97. BORKHARDT, A.; CAZZANIGA, G.; VIEHMANN, S.; VALSECCHI, M. G.; LUDWIG, W. D.; BURCI, L.; MANGIONI, S.; SCHRAPPE, M.; RIEHM, R.; 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*, v. 90, n. 2, p. 571-577, 1997.

98. SEEGER K. Treatment response and residual-disease monitoring in initial and relapsed *TEL-AML1* positive childhood ALL. *Leukemia*, v. 15, p. 280-82, 2001.

99. RUBNITZ, J.; WICHLAN, D.; DEVIDAS, M.; SHUSTER, J.; KURTZBERG, J.; BELL, B.; HUNGER, S.; CHAUVENET, A.; PUI, C. H.; CAMITTA, B.; PULLEN, J. J. Prospective analysis of *TEL* and *MLL* gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006, p.108, (abstract 218).

100. PANZER-GRÜMAYER, E. R.; CAZZANIGA, G.; VAN DER VELDEN, V. H. J.; DEL GIUDICE, L.; PEHAM, M.; MANN, G.; ECKERT, C.; SCHRAUDER, A.; GERMANO, G.; HARBOTT, J.; BASSO, G.; BIONDI, A.; VAN, DONGEN, J. J.M.; GADNER, H.; HAAS, O. A.; Immunogenotype changes prevail in relapses of young children with *TEL-AML1*-positive acute lymphoblastic leukemia and derive mainly from clonal selection. *Clinical Cancer Research* 2005; v.1, n.11, p. 7720-27, 2005.

101. ÓRFÃO, A. *Imunofenotipaje de leucemias agudas por citometria de fluxo*. Serviço de Citometria, Universidad de Salamanca., 2004.

102. FELIX, C. A.; LANGE, B. J. Leukemia in infants. *Oncologist*, v. 3, n. 4, p. 225-40, Jun 1999.
103. BIONDI, B. et al. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood*, v. 96, p. 24-33, 2000.
104. ROWLEY, J. D. The role of chromosome translocations in leukemogenesis. *Seminars in Hematology*, v. 4, n. 36, p. 59-72, Oct 7 1999.
105. FRIEDMANN, A. M.; WEINSTEIN, H. J. The role of prognostic features in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncologist*, v. 4, n. 5, p. 321-8, Aug 2000.
106. RAIMONDI, S. C. et al. Fluorescence in situ hybridization: molecular probes for diagnosis of pediatric neoplastic diseases. *Cancer Invest*, v. 18, p. 135-147, 2000.
107. ISCN (2005), An International System for Human Cytogenetics Nomenclature. Ed. By Mitelman, F. S. Karger Verlag, 2005.
108. DE. BRAEKELEER. M.; MOREL. F.; LE. BRIS. M. J.; HERRY. A.; DOUET-GUILBERT. N. The MLL gene and translocations involving chromosomal band 11q23 in acute leukemia. *Anticancer Res.* v.25, p. 1931- 44, 2005.
109. PETRIDOU, E.; TRICHOPOULOS, D. Leukemias. In: ADAMI, H. O.; HUNTER, D.; TRICHOPOULOS, D. *Textbook of cancer epidemiology*. New York, NY: Oxford, 2002. p. 556-572.
110. PÉREZ-VERA, P. et al. Cytogenetics in acute lymphoblastic leukemia in Mexican children: an institutional experience. *Arch Med Res*, v. 32, p. 202-207, 2001.
111. UDAYAKUMAR, A. et al. Cytogenetic profile of childhood acute lymphoblastic leukemia in Oman. *Arch Med Res*, v.38, p.305-312, 2007.
112. LICHTVAN, L. C. L. *Citogenética Nas Leucemias Linfoides Agudas*. 2007. 164 f. (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
113. SWAMINATHAN R, RAMA R, SHANTA V. Childhood cancers in Chennai, India, 1990- 2001: incidence and survival. *Int J Cancer.*, v.122, p. 2607-11, 2008.
114. RIES, L. A.G.; SMITH, M.A.; GURNEY, J. G.; LINET, M.; TAMRA, T.; YOUNG, J. L. et al. *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995*. Bethesda: National Cancer Institute, 1999.
115. LINET, M. S.; WACHOLDER, S.; ZAHM, S. H. Interpreting epidemiologic research: lessons from studies of childhood cancer. *Pediatrics.*, v. 112, n.1, p.218-32, 2003.
116. POLLOCK, B.H. et al. Differences of the survival of childhood, Pediatric oncology group study. *J Clin Oncol*, v. 18, p. 813-23, 2000.

117. SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J.W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon, 2008.
118. RIZZATTI, E. G.; ZAGO, M. A. Aplicações da biologia molecular às leucemias agudas. *Ser Monog Esc Bras Hemat*, n. 9, p. 1-14, 2002.
119. MA, S. K. Clinical presentation, hematologic features and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol*, v. 15, p. 141-49, 1997.
120. CHESSELLS, J.M. Pitfalls in the diagnosis of childhood leukemia. *British Journal of Haematology*, v.114, p. 506-11, 2003.
121. FRIEDMAN, A. M and WEINSTEIN, H. J. The role of prognostic features in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *The Oncologist*, v. 5, p. 321-28, 2000.
122. MILLER, D. R.; MILLER, L.P. Acute lymphoblastic leukemia in children: na update of clinical, biological, and therapeutic aspects. *Crit Rev Oncol Hematol*, v. 10, p.131-164, 1990.
123. REGO, E. M. et al. *Subpopulações linfocitárias na medula óssea normal de crianças e adultos. Significado clínico da heterogeneidade da intensidade de expressão do antígeno cd10 na leucemia linfóide aguda do subtipo comum*. 1997. Tese (Doutorado em Medicina) – USP, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
124. DWORZAK, M. N., PANZER-GRÜMAYER, E. R. Flow cytometric detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*, v. 44, p. 1445-1455, 2003.
125. LEITE, E. P. et al. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com leucemia linfóide aguda. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant*, Recife, v. 7, n. 4, p. 413-421, 2007.
126. FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M de. Diagnóstico laboratorial das leucemias agudas. *J. Bras. Patol. Med. Lab* .; v. 40, n. 2 Apr. 2004
127. CASPERSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C.; MODEST, E. J. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma(Berl)*, v. 30, p. 215-227, 1970.
128. SEABRIGHT, M. A Rapid Banding Technique for Human Chromosome. *Lancet* ., v. 2, p. 971-972, 1971.
129. FITZGERALD, P. H.; CROSSEN, P. E.; HAMER, J. W. Abnormal karyotypic clones in human acute leukemia: their nature and clinical significance. *Cancer*, v. 31, p. 1069-1077, 1970.
130. SILVA, M. L. M. Cytogenetic analysis of 100 consecutive newly diagnosed cases of acute lymphoblastic leukemia in Rio de Janeiro. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, v. 137, p. 85–90, 2002.

131. MOORMAN, A. V.; ENSOR, H. M.; RICHARDS, S. M.; SCHWAB, L. C. C.; VORA, A.; MITCHELL, C. D.; HARRISON, C. J.; Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised Trial. *Lancet Oncol.*, v. 11, p. 429–38, 2010.
132. SECKER-WALKER, L. M.; CHESSELLS, J. M.; STEWART, E. L.; SWANSBURY, G. J.; RICHARDS, S.; LAWLER, S. D. Chromosomes and other prognostic factors in acute lymphoblastic leukaemia a long-term follow-up. *British Journal of Haematology.*, v.72, p.336-342, 1989.
133. KOWALCZYK, J. R.; BABICZ, M.; GAWORCZYK, A.; LEJMAN, M.; WINNICKA, D.; STYKA, B.; Structural and numerical abnormalities resolved in one-step analysis: the most common chromosomal rearrangements detected by comparative genomic hybridization in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics.*, v. 200, n. 2, p. 161-166, 2010.
134. PRADO JR, P.C. et al. Análise de alterações citogenéticas em crianças com leucemia linfóide aguda. X Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, Salvador – BA, 2006, p. 64 (abstract).
135. GROUPE FRANÇAIS DE CYTOGÉNÉTIQUE HÉMATOLOGIQUE. Collaborative study of karyotypes in childhood acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia.*, v. 7, p. 10-19, 1993.
136. RAIMONDI, S. C. et al. Reassessment of the prognostic significance of hypodiploidy in pediatric patient with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, v.98, p. 2715-2722, 2003.
137. HARRISON, C. J. The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Reviews.*, v. 15, p. 49-58, 2001.
138. NORDGREN, A. et al. Spectral Karyotyping and interphase FISH reveal abnormalities not detected by conventional G-banding. *Eur J Haematol.*, v. 68, p. 31-41, 2002.
139. RIST, W. et al. Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical and cytogenetic characteristics and treatment outcome. A Pediatric Oncology Group study. *Blood*, v. 76, p. 489-494, 1990.
140. LAUS, A. C. *Caracterização Citogenética Molecular de cromossomos Marcadores Extranumerários*. 2008. 143f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)- Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2008.
141. KRIVIT, W.; GOOD, R. A. Simultaneous occurrence of mongolism and leukemia. *Am J Dis Child.*, v. 94, p. 289-98, 1957.
142. BELKOV, V.M.; KRYNETSKI, E.Y.; SCHUETZ, J.D. et al. Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. *Blood.*, v. 93, p. 1643- 1650, 1999.

143. HASLE, H. Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. *Lancet Oncology*, v. 2, p. 429-436, 2001.
144. SLOVAK, M. L.; KOPECKY, K. J.; CASSILETH, D. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/ Eastern Cooperative Oncology group study. *Blood*, v.96, p. 4075-83, 2000.
145. SCHULTZ, K. R.; PULLEN, D. J.; SATHER, H.N.; SHUSTER, J.J. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood*. v. 109, n. 3, p. 926-35, 2007.
146. QUIXABEIRA, V. B. L.; SADDI, V. A. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. *Rer Bras Anal Clí.*, v. 40, n. 3, p. 199-202, 2008.

APÊNDICE A – PROTOCOLO DE COLETA DE MEDULA ÓSSEA E SANGUE PERIFÉRICO PARA ANÁLISE CROMOSSÔMICA

CONSIDERAÇÕES GERAIS

- ✓ Preencher corretamente a guia de requisição do exame com letra legível colocando o tipo de amostra que será coletada, idade, indicação clínica, dados laboratoriais e caso haja algum resultado anterior de citogenética colocar como observação;
 - ✓ O paciente não deve estar sob medicação quimioterápica. Caso contrário, suspender a Medicação por pelo menos 72 horas antes da coleta;
 - ✓ Coletar apenas em seringa heparinizada ou tubo a vácuo tampa verde heparinizado (vide procedimento de coleta);
 - ✓ A estabilidade da amostra é de 24 horas quando mantida sob refrigeração (2 a 8°C);
 - ✓ Enviar a amostra sob refrigeração com gelo reciclável em isopor, tomando o cuidado de não deixar a amostra em contato direto com o gelo para evitar destruição celular;
 - ✓ Horário de recebimento das amostras no laboratório:
- *De segunda à quinta-feira das 6:00 às 16:00 e na sexta-feira até às 10:00h.*
 - *Caso seja feita alguma coleta fora desses horários, entrar em contato com Dra. Erica Gil.*

ESTE HORÁRIO É ESTABELECIDO PARA FORNECER UM PROCEDIMENTO DE CULTURA CELULAR CORRETO (24 – 48h), CASO CONTRÁRIO, INVIABILIZARÁ O DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO.

MÉDULA ÓSSEA

- Coletar de 2 a 5 ml de aspirado de medula óssea coletado por especialista com seringa ATÓXICA* heparinizada (0,1 ml se Liquemine® Roche® de preferência (caso não tenha, usar heparina sódica) para 5 ml de aspirado) ;
- Cuidado para não colocar heparina a mais do que o necessário por que pode deixar a amostra muito diluída, ou pouca heparina por que pode coagular a amostra. *Estas situações podem interferir na análise citogenética;*

- Homogeneizar o material já coletado na seringa com delicadeza;
- Deve-se trocar a agulha que foi coletada por uma nova com protetor, e envolvê-lo com esparadrapo ou micropore para não haver problemas no transporte;

CUIDADO PARA NÃO CONTAMINAR A NOVA AGULHA!!!

- Encaminhar para o setor de citogenética do laboratório DNA Center de acordo com o horário estabelecido (aos cuidados de Dra. Erica Gil)
- Lembrar de identificar corretamente a amostra com nome, indicação clínica, idade, dados laboratoriais, etc.

IMPORTANTE: Nos casos de neoplasias hematológicas quando se deseja fazer um cariótipo no sangue periférico, o mesmo só será viável quando a porcentagem de blastos circulantes for $\geq 20\%$ para que seja realizada com sucesso a cultura de células.

CAUSAS DE ÍNDICE MITÓTICO BAIXO OU NULO

- ❖ Quantidade insuficiente de amostra;
- ❖ Amostra hipocelular;
- ❖ Amostra hemolisada e / ou coagulada causada por pouca heparina;
- ❖ Amostra viscosa causada pelo excesso de heparina;
- ❖ Toxicidade de algumas marcas de heparina sódica utilizada na coleta;
- ❖ Medula óssea ou sangue periférico hipocelular com poucas células imaturas (blastos $\geq 20\%$)
- ❖ Algumas desordens hematológicas que causam baixo índice mitótico: Tricoleucemia, Leucemia Linfóide Crônica, etc;
- ❖ Uso de medicamentos quimioterápicos ou para a terapia de indução de remissão completa;
- ❖ Demora em enviar a amostra ao laboratório.

APÊNDICE B – PROTOCOLO DE REGISTRO DAS AMOSTRAS

LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA

DATA DE ENTRADA:	Nº REGISTRO:
DATA DA ENTREGA:	FONE:
NOME:	IDADE:
PROCEDÊNCIA:	MÉDICO:
INDICAÇÃO CLÍNICA:	
EXAME DE CITOGENÉTICA ANTERIOR:	
Leucometria:	Hb:
	plaquetas:

CULTURA

DATA:	HORA:
QUANTIDADE E ASPECTO DA AMOSTRA :	SP() MO()
LEUCOMETRIA:	
CULTURA:	MEIO + PHA + SP ou MO TUBOS
RETIRADA DA CULTURA ⇒ DATA:	HORA:
HORA DA COLCHICINA:	
TUBO 1 ⇒ COLCHICINA:	IM: MET:
TUBO 2 ⇒ COLCHICINA:	IM: MET:
OBS.:	

BANDEAMENTO

WRIGHT ()	TRIPSINA ()
DATA DA CONFECÇÃO DA LÂMINA:	
DATA DO BANDEAMENTO:	
TEMPO DO BANDEAMENTO:	
Resultado:	
Responsável técnico:	liberado:

ANEXO 1: Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Hospital Universitário Onofre Lopes (CEP-HUOL- Protocolo 083/07).



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO ONOFRE LOPES (CEP-HUOL)**

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes (CEP-HUOL), devidamente reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/MS), analisou o projeto:

Título: Determinação da expressão de marcadores celulares e moleculares da resistência às drogas nas leucemias.

Protocolo – 083/07

Pesquisador Responsável: Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior.

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, incluindo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes da Resolução 196/96 e complementares, do Conselho Nacional de Saúde, em reunião plenária do CEP-HUOL realizada no dia 31 de agosto de 2007. Toda e qualquer alteração no projeto/protocolo de pesquisa, assim como eventos adversos que venham a ocorrer deverão ser comunicados oficialmente e imediatamente ao CEP-HUOL. O relatório final do projeto ou a cópia de sua publicação deverá ser encaminhado ao CEP-HUOL após o término do estudo, conforme cronograma, com a respectiva cópia da folha de rosto.

Natal, 31 de agosto de 2007.


Prof. Aldo da Cunha Medeiros
Coordenador do CEP – HUOL

ANEXO 2 – FUNÇÃO DAS PRINCIPAIS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NA CULTURA CELULAR

1 Efeito da Colchicina sobre as células

A colchicina é um alcalóide extraído do cólquico, uma planta da família das Liliaceae, o *Colchicum autumnale*. É um potente bloqueador da divisão celular. É tóxico quando ingerido ou inalado, podendo causar efeito teratogênico. Estudos prévios demonstraram que as células não se dividem de forma sincronizada, implicando, conseqüentemente, na dificuldade de se obter um número ideal de cromossomos em metáfase em determinados momentos. Diante da necessidade da obtenção de uma quantidade suficientemente grande de cromossomos em metáfase, passou-se a adicionar colchicina nas células em divisão. O seu uso permitiu acumular grande número de células metafásicas durante as constantes divisões. A ação da colchicina fundamenta-se no fato de que ela bloqueia a anáfase, uma vez que atua inibindo a formação de fusos acromáticos, ligando-se aos microtúbulos do fuso e provocando sua ruptura, o que permite o acúmulo de células com cromossomos metafásicos, mostrando cromátides irmãs bem separadas. Esta configuração dos cromossomos depende tanto do tempo de atuação da colchicina quanto de sua concentração. Assim, se o tempo de atuação ou de concentração deste alcalóide for excessivo, observa-se que, além dos cromossomos sofrerem contração em demasia e distorção, também pode ocorrer a denominada endo-reduplicação, isto é, os cromossomos se duplicarem sem que haja divisão nuclear.

Efeito das soluções hipotônicas

Desde a década de 30 alguns autores verificaram que através do tratamento de células em divisão em meio de cultura hipotônico, poder-se-ia obter dispersão dos cromossomos, resultando em encurtamento e separação das cromátides. Por outro lado, foi verificado que o uso de uma solução hipotônica antes da fixação do material em cultura promovia uma melhor dispersão dos cromossomos metafásicos em sinergismo com o efeito da colchicina. A composição química da solução hipotônica, bem como seu tempo de atuação, varia com o tipo celular estudado. No caso de cultura de leucócitos, por exemplo, pode-se usar uma solução de cloreto de potássio (KCL) a 0,075 M que, além do efeito hipotônico, ajuda a promover a descondensação dos cromossomos, ou uma solução de citrato de sódio ou de potássio a 1%, que alia o efeito hipotônico à capacidade de evitar a formação de grumos celulares.

Efeito do fixador no pré-tratamento das células

A importância do processo de fixação e, conseqüentemente, do uso de agentes fixadores ideais, fundamenta-se no fato de que a qualidade morfológica, a estabilidade dos cromossomos e suas respostas aos corantes são dependentes da adequação e eficiência da fixação. O objetivo da fixação é “matar” o tecido, conservando todas as estruturas presentes e, evitando assim, causar qualquer distorção ou dano dos componentes a serem estudados.

Um bom fixador deverá satisfazer a pelo menos quatro requisitos fundamentais. Primeiramente, deverá ter um poder de rápida penetração, interrompendo instantaneamente a atividade vital, de forma que todas as estruturas presentes sejam mantidas nas suas respectivas fases de atividade. Com a morte da célula ocorrem mudanças para a preservação da estrutura cromossômica, como por exemplo, a autólise das proteínas, que é causada por enzimas que agem em sentido reverso em conseqüência do meio que se torna ácido. Como resultado ocorre a destruição do complexo protéico em aminoácidos simples, fato este que pode ser prevenido pela ação do fixador. No segundo requisito, igualmente importante, é a propriedade de causar precipitação de cromatina. O terceiro requisito consiste na capacidade de prevenir a decomposição das estruturas, evitando a ação bactericida, para que se possa obter material permanente. E o quarto requisito está relacionado à “preparação” dos cromossomos para uma resposta adequada e perfeita coloração, a fim de que as diferenças na incorporação dos corantes dêem resultados contrastantes, que nos permitam observar aos mínimos detalhes da morfologia cromossômica

O ácido acético, um fixador simples, reprime o encolhimento e preserva a estrutura dos cromossomos sem distorção. A fixação dos cromossomos é feita com soluções mistas, compostas de diferentes agentes fixadores que, em associação, produzem efeitos melhores. Diante desse fato, a maioria dos laboratórios faz uso de uma solução mista de ácido acético glacial e metanol na proporção 1:3.

INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DO RIO GRANDE DO NORTE

Erica Aires Gil¹, Geraldo Barroso Cavalcanti Junior²

¹ Pós-Graduando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

² Prof. Adjunto III da Disciplina de Imunologia Clínica do DACT / UFRN.

RESUMO

Nós investigamos amostras de crianças Northeriograndense com leucemia linfóide aguda (LLA) através da análise citogenética. Foram observados 30 casos de LLA na infância de cinco instituições do Rio Grande do Norte. A frequência de alterações cromossômicas foi de 64%. Os dados clínicos-laboratoriais, o perfil cariotípico e as alterações citogenéticas recorrentes encontradas neste estudo não diferem dos achados descritos na literatura. Conclui-se que a partir deste trabalho foi possível demonstrar a importância do estudo citogenético no diagnóstico e na identificação de fatores prognósticos nos pacientes pediátricos com LLA do Rio Grande do Norte. Os resultados obtidos neste estudo são de extrema importância e ressaltam que pesquisas desta natureza devem ser realizadas com maior frequência em nosso Estado.

Palavras-Chave: Leucemia Linfóide Aguda, alterações Cromossômicas, Citogenética.

INTRODUÇÃO

A leucemia linfoblástica aguda é uma doença caracterizada pela proliferação clonal anormal dos precursores linfóides que perdem a capacidade de diferenciação ⁽¹⁾. É a neoplasia maligna mais comum na infância, corresponde a 80% de todas as leucemias ⁽²⁾. Embora a LLA possa ocorrer em qualquer idade, sua incidência é maior entre crianças de 2 a 5 anos, numa porcentagem de cerca de 70%, diminuindo entre adolescentes e adultos jovens, entre os quais a incidência das leucemias agudas é de 20%, voltando a crescer após os 60 anos de idade ⁽²⁾. Entre crianças, a doença é mais comum naquelas de cor da pele branca e do sexo masculino ^(3, 4). Na maioria dos casos, a LLA surge sem motivo aparente, embora algumas vezes possam se identificar possíveis causas, como: radiação ionizante, vírus oncogênicos, fatores genéticos e congênitos, algumas substâncias químicas e fármaco, predisposição a doenças hematológicas, etc ⁽⁴⁾. O diagnóstico da LLA é baseado na morfologia, imunofenotipagem e análise citogenética das células da medula óssea ou do sangue periférico (blastos > 20%) ⁽²⁾.

A citogenética neste estudo foi fundamental no diagnóstico, conduta terapêutica, classificação dos grupos de risco e prognóstico (associado à idade e contagem de leucócitos) ⁽⁵⁾. O principal objetivo deste trabalho é analisar e classificar pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda no estado do Rio Grande do Norte, através do estudo do citogenético juntamente com dados clínico-laboratoriais.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização do estudo

Foram analisadas no período de Janeiro de 2009 a novembro de 2010 amostras de medula óssea ou sangue periférico (quando a quantidade de blastos foi acima de 20% no SP) de trinta pacientes com diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (LLA) de ambos os sexos, com faixa etária entre 4 meses a 17 anos, atendidos nos seguintes serviços: Hospital Infantil Varela Santiago, Natal-RN, LIGA Norte-Riograndense Contra o Câncer, Natal-RN, Centro de Oncologia e Hematologia de Mossoró, Mossoró-RN, Clínica DNA Center, Natal-RN. A análise citogenética nas células da medula óssea e/ou do sangue periférico foi realizada no laboratório de análises clínicas DNA Center. O diagnóstico citoquímico, morfológico e imunofenotípico foram fornecidos pelo setor de hematologia do HEMONORTE.

Obtenção das amostras, cultura celular e bandeamento

Para a obtenção dos cromossomos metafásicos em amostras de medula óssea e/ou sangue periférico (blastos > 20%) foi utilizado o método descrito por Raimondi et al.(2000) ⁽⁶⁾, com modificações. A medula óssea (MO) foi coletada por punção medular em seringa heparinizada pelo médico e o sangue periférico (SP) foi obtido por punção venosa em seringa ou frasco a vácuo heparinizado. A amostra enviada para análise citogenética foi colocada em dois tubos falcon contendo meio de cultura (RPMI - 7mL, soro fetal bovino - 3mL e 100µL de Lglutamina). Este material foi mantido em estufa a 37°C durante 23 horas, logo após foram acrescentados 20 a 100 µL de colchicina (dependendo da leucometria) na cultura, que foi mantida a 37°C por mais uma hora em estufa. Em seguida, o material foi submetido a uma solução hipotônica (KCL 0,075mol/L) seguida de fixação com solução de ácido acético e metanol (3:1) por três vezes. Foram feitas lâminas destinadas à análise cromossômica por bandeamento G pela técnica de tampão Sorensen-Wright. Posteriormente foram analisadas metáfases e a captura das imagens foi feita por câmera fotográfica. As anormalidades cromossômicas foram descritas de acordo com a ISCN 2009 ⁽⁷⁾.

RESULTADOS

Características gerais e laboratoriais dos pacientes

No exame físico os achados mais frequentes foram hepatomegalia (73%), esplenomegalia (70%) e linfadenopatia (37%). Em relação à imunofenotipagem, 93% dos pacientes apresentavam LLA de linhagem B e 7% LLA de linhagem T. Entre as LLA de linhagem B, a maioria dos casos (83%) foi classificada como pré-B. O percentual reduzido de pacientes com LLA-T pode estar associado à proporção de pacientes adolescentes nesta amostra estavam acima de 10 anos.

A faixa etária deste estudo foi de pacientes entre um e dez anos (67%), dos quais 37 % pertenciam a faixa entre dois e cinco anos, com média de idade de 7 anos e meio. Em relação ao sexo a proporção foi de 1,3: 1 (M/F). A cor da pele predominante foi a branca, com 50% seguida da parda (33%) e da negra (17%). Considerando os valores de hemoglobina encontrados, 73% apresentaram valor inferior a 10 g/dL. Na contagem de leucócitos, 60% dos

pacientes apresentaram valores abaixo de 10 000/ μ L e 40% acima desse valor. Desses, 10% estavam acima de 50 000/ μ L. Foi observado trombocitopenia em 83% dos casos analisados. Logo abaixo, a TAB. 1 mostra as características analisadas: idade, sexo, cor, hemoglobina, leucometria e contagem de plaquetas.

Tabela 1 – Características gerais e laboratoriais dos pacientes

N	SEXO	IDADE	COR	HEMOGLOBINA	LEUCOMETRIA	PLAQUETAS
1	F	4	branca	7,3	20200	32000
2	F	7	branca	12	11000	44000
3	M	5	parda	5,9	34700	33000
4	M	16	branca	13	4600	63000
5	F	6	branca	7,5	3100	32000
6	F	4	negra	8	4300	283000
7	M	3	negra	9	5800	336000
8	F	5	branca	10,2	7800	165000
9	M	12	branca	14	4400	249000
10	M	16	negra	8	1500	12000
11	M	17	parda	15	2800	19000
12	F	15	branca	8	3000	52000
13	M	8	parda	11,3	3200	44900
14	F	4meses	negra	7,8	96600	65000
15	M	3	parda	9,2	21900	55000
16	F	3	negra	7,3	7900	26000
17	M	5	parda	6,8	35900	54000
18	M	2	branca	5,7	6300	7000
19	M	3	branca	8,4	50900	37000
20	F	1	parda	5,4	45700	26000
21	M	17	parda	7,1	60000	12000
22	F	7	parda	9,4	33200	83000
23	F	3	branca	7,5	5600	45000
24	F	6	branca	9,4	25000	38000
25	F	17	branca	11,3	6.500	18.000
26	M	2	branca	8,5	7400	45000
27	M	4 meses	parda	10	13500	60000
28	M	6	branca	7,8	2.100	42.000
29	M	5	branca	6,9	5600	77000
30	M	16	parda	11,5	5300	160000

N: pacientes admitidos consecutivamente; idade em anos ou meses; sexo F:feminino, M: masculino, Cor: branca, parda e negra; Hemoglobina em g/dL, Leucometria em μ l

Frequências das Alterações Cromossômicas

Neste estudo foram avaliados trinta pacientes. Em dezenove (64%) foram observadas alterações cromossômicas tanto medula óssea como no sangue periférico. Sete pacientes (23%) apresentaram cariótipo normal e em quatro (13%) não foi possível a análise devido à ausência de crescimento celular (índice mitótico nulo). Dos pacientes que apresentaram algum tipo de alteração cromossômica, em 58% foram observadas somente alterações numéricas, em 21% correspondiam a alterações numéricas e estruturais e em 21% pacientes foram encontradas apenas alterações estruturais. Considerando os quinze pacientes com alterações cromossômicas numéricas e numéricas com alteração estrutural adicional, a hiperdiploidia foi observada em

oito pacientes (54%); hiperdiploidia com alteração adicional em dois pacientes (13%); hipodiploidia em três pacientes (20%) e, por último, hipodiploidia com alteração adicional em dois pacientes (13%). O GRÁF.2 representa a proporção de alterações citogenéticas encontradas neste estudo. Na TAB. 2 é possível observar o resultado citogenético das amostras analisadas.

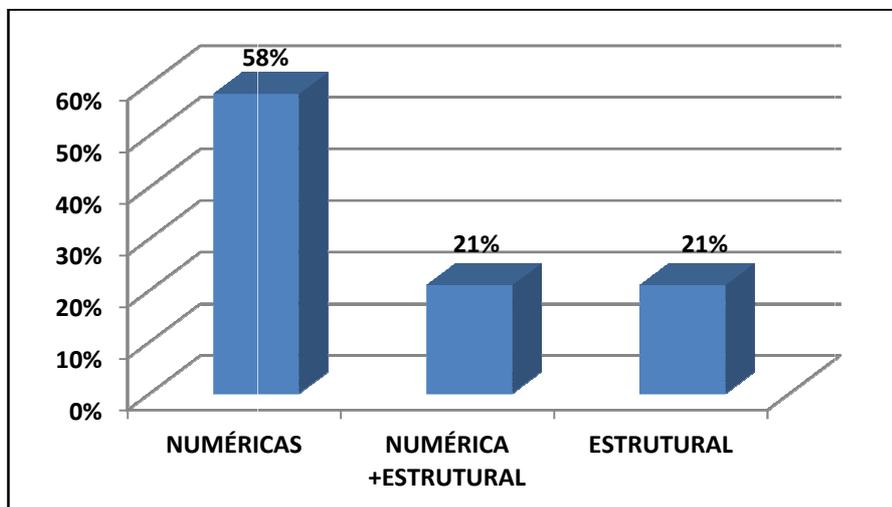


Gráfico 4 – Classificação geral das alterações citogenéticas

Tabela 2 – Sumário da análise citogenética realizada nas trinta amostras estudadas

Resultado da CC	Pacientes	Porcentagem %
Normal	7	23
Sem mitose	4	13
Hiperdiploidia	8	54
Hiperdiploidia + adicional	2	13
Hipodiploidia	3	20
Hipodiploidia + adicional	2	13
Pseudodiploidia	4	21

CC: citogenética convencional;

Cinco de trinta pacientes apresentaram recidiva da doença. Desses, três apresentaram cariótipo complexo, contagem de leucócitos aumentada e presença de blastos no SP. Seis pacientes foram a óbito ao término, sendo dois pertencentes ao grupo dos que apresentou recidiva e quatro faleceram por outros motivos.

Foram observados nove cariótipos complexos ainda não descritos na literatura. É importante ressaltar que foram incluídos nesses casos cariótipos com hiper e hipodiploidia com alterações adicionais, além de células com presença de cromossomos marcadores. A TAB. 3 mostra esses cariótipos complexos juntamente com o tipo celular envolvido e um possível prognóstico para os pacientes estudados baseados em dados da literatura.

Tabela 3 - Cariótipos Complexos, Tipo Celular e Prognóstico

CARIÓTIPO COMPLEXO	TIPO CELULAR	PROGNÓSTICO
46,XY, inv (9) (p12q13) [20]	LLA pré-B (L1)	Indeterminado
46, XX, + mar, -20 [14] / 46, XX [06]	LLA pré-B (L1)	Indeterminado
48, XY, t (1;3) (q32;q27), +16, + mar [09] / 46, XY [14]	LLA pré-B (L2)	Desfavorável
47,XY,i(7)(q10), +21[22] /48,XY, i(7)(q10), +mar,+21[04] / 48, XY, i(7)(q10), +8, +21 [03]	LLA pré-B (L1)	Desfavorável
49 ~ 87, XX ,add(14)(q32?), add(16)(p13.3)[cp30]	LLA pré-B (L1)	Desfavorável
46,XY, dup(1)(q31q44) [12] / 46,XY,dup(13)(q13q34) [05] / 46,XY, der(21)t(7;21)(q21q36;q22.3) [04] / 46,XY[04]	LLA pré-B (L3)	Desfavorável
46, XX, -7, + der 7, t(7;?)(q31;?) [30]	LLA pré-B (L1)	Desfavorável
Cariótipo complexo. Ph+, add14q32	LLA pré-B (L1)	Desfavorável
38~45, XX, del(20q), t(9;14), (q22?;q32?)	LLA pré-B (L2)	Desfavorável

inv - inversão; mar – cromossomo marcador; t – translocação; i – isocromossomo; add – adicional; dup – duplicação; der – derivativo; Ph⁺ - cromossomo Filadélfia; del – deleção; p – braço curto do cromossomo; q – braço longo do cromossomo.

DISCUSSÃO

As leucemias são, mundialmente, as neoplasias malignas mais comuns na infância, correspondendo a aproximadamente 33% de todas as doenças malignas em menores de 14 anos ⁽¹¹³⁾. Incidem na população de 0 a 14 anos em uma frequência de 1/25.000 indivíduos/ano, e o risco de desenvolver a doença nos primeiros 10 anos é de 1/2.880. A faixa etária predominante é em geral entre dois e cinco anos. Pesquisas e estudos mostram que a LLA acomete mais crianças do sexo masculino do que do sexo feminino, na proporção de 1,2:1. Esse fato foi observado em vários estudos feitos por Coebergh et al., e Swaminathan et al., ^(32, 117).

De acordo com o WHO (*World Health Organization Classification of Tumours*), os dados laboratoriais de pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda podem apresentar leucometria diminuída, normal ou bastante elevada, Hemoglobina menor que 10g/dL está presente em 80% dos pacientes ao diagnóstico, a contagem de plaquetas reduzida está presente na maioria dos pacientes, sendo o valor menor que 100.000/ μ L em aproximadamente 75% dos casos ⁽²⁹⁾. ^(121, 122).

Após a descoberta por Casperson et al. ⁽¹³¹⁾ e Seabright ⁽¹³²⁾ das técnicas de bandeamento, os estudos citogenéticos nas leucemias agudas demonstram que poderiam ser encontradas cerca de 50% de anomalias cromossômicas ⁽¹³³⁾. Vários estudos prospectivos e consecutivos utilizando técnicas de bandeamento, já mostraram que a incidência de anomalias cromossômicas varia entre 55-94%, e algumas alterações encontradas são específicas para determinado subtipo celular caracterizado por imunofenotipagem.

A análise cromossômica da leucemia linfoblástica aguda é eficiente não só para um diagnóstico mais refinado, mas também para a compreensão dos mecanismos envolvidos na

malignidade e na descoberta de genes de importância biológica. O estudo das alterações nas células neoplásicas é de grande utilidade para diagnóstico, classificação, orientação terapêutica e prognóstico das leucemias agudas. Essas anormalidades estão relacionadas aos clones malignos e podem desaparecer durante a remissão hematológica e reaparecem com a recidiva, algumas vezes demonstrando evidência de novas alterações supostas ao clone anormal original ⁽³⁴⁾.

Alterações numéricas

Hiperdiploidia – É a anormalidade cariotípica mais comum, com a presença de numerosas trissomias somando mais de 50 cromossomos. As características comumente associadas são cor branca, idade entre dois e 10 anos, contagem inicial de leucócitos baixa, ausência de células T, LLA pré-B precoce e expressão de CD10. Esse perfil ocorre em 25% em crianças com LLA ^(85,90). Essa alteração é rara em recém nascidos e em pacientes adultos.

Hipodiploidia – É encontrada em aproximadamente 8% dos casos de LLA infantil e caracteriza-se pela presença de menos de 46 cromossomos. Subdivide-se em três categorias: 41-45 cromossomos, 30-40 e menos de 30 (near-haploidia). Mais de 80% dos casos apresentam 45 cromossomos, o que ocorre pela perda de um cromossomo inteiro, translocações não balanceadas ou pela formação de cromossomos dicêntricos ⁽⁹³⁾.

Anormalidades cromossômicas estruturais de destaque neste estudo

Pseudodiploidia - Caracteriza-se por um número de 46 cromossomos por célula, porém com anormalidades estruturais, principalmente translocações. Corresponde a aproximadamente 40% dos casos de LLA pediátrica, sendo o maior grupo em relação à ploidia. As alterações estruturais mais comuns envolvem o braço curto do cromossomo 12, em 10% a 12% dos casos, e a translocação mais encontrada é a t(1;19)(q23;p13), em 5% a 6% dos pacientes. O prognóstico neste grupo era desfavorável até o desenvolvimento da quimioterapia com múltiplas drogas ^(85,94). Algumas translocações, como t(9;22) e t(4;11), são exceções que, independentemente do esquema de tratamento, continuam representando pior prognóstico, com doença altamente resistente aos quimioterápicos ^(85,90).

t(9;22)(q34;q11) - Conhecida como cromossomo Philadelphia (Ph), ocorre a fusão gênica BCR-ABL ^(7,8) que codifica uma proteína quimérica com atividade tirosinaquinase muito elevada, resultando em proliferação celular e leucemogênese ^(97,98,99). O cromossomo Ph está presente em 25% dos pacientes adultos com LLA e em 2% a 4% dos casos pediátricos ^(97,98,99). Quase todos os casos de LLA Ph⁺ estão associados ao imunofenótipo de linfócitos pré-B, B-comum com CD10 positivo (antígeno CALLA), CD 19⁺ e TdT ^(97,98).

Anormalidades envolvendo 11q23 - Rearranjos cromossômicos envolvendo o gene MLL estão associados com a LLA em lactentes (< 1 ano), ocorrendo em cerca de 85% dos casos ⁽¹⁵²⁾ com incidência baixa em crianças e adultos (<10%). Entre as translocações envolvendo o gene MLL, a t (4; 11) é resultante de um rearranjo MLL-AF4 ^(98,105,106), ocorre em 60% das LLAs em lactentes e menores de 1 ano, 2% em crianças e entre 3% e 6% em adultos ^(18,28). O gene MLL foi identificado em leucemias de linhagem mista ou leucemias bifenotípicas ⁽¹⁰⁷⁾.

t(12;21)(p13;q22) - Ocorre a fusão dos genes TEL e AML1. Trata-se do rearranjo mais freqüente nas LLAs em crianças, ocorrendo em aproximadamente 25% dos casos, com baixa freqüência em LLAs de adultos (< 2%). Não é visível pela citogenética convencional, sendo detectada por FISH ou RT-PCR ^(100,101). No presente estudo não foi possível visualizá-la.

A presença de cariótipos complexos envolvendo alterações numéricas e estruturais é um achado na citogenética vista em torno de 30% dos casos de LLA. Estas alterações são geralmente consideradas de prognóstico desconhecido e/ou desfavorável. Neste estudo foram encontrados nove cariótipos ainda não descritos na literatura. Em sua grande maioria, eles foram classificados com prognóstico desfavorável por apresentarem fatores de risco relevantes como, idade acima de dez anos, contagem de leucócitos superior a 50 000/ μ L.

CONCLUSÃO

A análise por citogenética convencional foi de grande importância na detecção de anormalidades cromossômicas em pacientes pediátricos do nosso estado. Através deste estudo foi possível investigar, diagnosticar, caracterizar e comparar essas alterações com outras encontradas na literatura.

REFERÊNCIAS

1. GOASGUEN, J.E. et al. *Biologic Diagnosis of Leukemias*. 6. ed. Philadelphia: [s.n.]. 1996. 357p.
2. GREAVES, M. F. Molecular genetic, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer*, v. 35, p. 1941-1953, 1999.
3. SWAMINATHAN, R.; RAMA, R.; SHANTA, V. Childhood cancers in Chennai, India, 1990 – 2001: incidence and survival. *Int J Cancer*. v. 122, p. 2607–11, 2008.
4. SILVERMAN, L. B. et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood*, v. 97, p. 1211-1218, 2001.
5. GOLDMAN, L.; BEMMET, J. C.; CECIL, J. *Tratado de medicina interna*. 21. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2001.
6. RABELLO-MORAES, A. C. et al. Comparação de duas metodologias para a avaliação da expressão de ABCB1 e ABCC1 em células de pacientes com leucemia aguda. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, Santa Catarina, v.31, n.5, p.110, Nov.2009.
7. REYNOLDS, P. et al. Birth characteristics and leukemia in young children. *Am J Epidemiol*, v. 155, p. 603-613, 2002.
8. RAIMONDI, S. C. et al. Fluorescence in situ hybridization: molecular probes for diagnosis of pediatrics neoplastic diseases. *Cancer Invest*, v. 18, p. 135-147, 2000.
9. SHAFFER, L.G.; TOMMERUP, N. ISCN: *Ann International System for Human Cytogenetics Nomenclature*. Washington, 2005. p. 130.
10. PETRIDOU, E.; TRICHOPOULOS, D. Leukemias. In: ADAMI, H. O.; HUNTER, D.; TRICHOPOULOS, D. *Textbook of cancer epidemiology*. New York, NY: Oxford, 2002. p. 556–572.
11. COEBERGH, J. W. W.; REEDIJK, A. M. J.; VRIES, E. D. E.; MARTOS, C.; JAKAB, Z.; STELIAROVA-FOUCHER, E. et al. Leukaemia incidence and survival in children and adolescents in Europe during 1978–1997: report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer*., v. 42, p. 2019–36, 2006.
12. SWAMINATHAN R, RAMA R, SHANTA V. Childhood cancers in Chennai, India, 1990– 2001: incidence and survival. *Int J Cancer*., v.122, p. 2607–11, 2008.
13. MIRRA, A. P.; LATORRE, M. R.D.O.; VENEZIANO, D. B. *Incidência, mortalidade e sobrevida do câncer da infância no Município de São Paulo*. São Paulo: Registro de Câncer de São Paulo, 2004.
14. SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J.W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon, 2008.

15. RIZZATTI, E. G.; ZAGO, M. A. Aplicações da biologia molecular às leucemias agudas. *Ser Monog Esc Bras Hemat*, n. 9, p. 1-14, 2002.
16. FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M de. Diagnóstico laboratorial das leucemias agudas. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*; v. 40, n. 2 Apr. 2004
17. CASPERSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C.; MODEST, E. J. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma(Berl)*., v. 30, p. 215-227, 1970.
18. SEABRIGHT, M. A Rapid Banding Technique for Human Chromosome. *Lancet* ., v. 2, p. 971-972, 1971.
19. RAIMONDI, S. C. et al. Hyperdiploid (47-50) acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood*, New York, v. 79, p. 3245-3252, 1993.
20. PUI, C. H. et al. Prognostic importance of structural abnormalities in children with hyperdiploid (>50 Chromosomes) acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, v. 73, p. 1963-1967, 1989.
21. CHARRIN, C. et al. A report from the LALA-94 and LALA SA groups on hypodiploidy with 30 to 39 chromosomes and near-triploidy: 2 possible expressions of a sole entity conferring poor prognosis in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*, v. 104, p. 2444-2451, 2004.
22. PRADO JR, P.C. et al. Análise de alterações citogenéticas em crianças com leucemia linfóide aguda. X Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, Salvador – BA, 2006, p. 64 (abstract).
23. CATOVSY, D.; MATUTES, E. The classification of acute leukemia. *Leukemia*, [S.l.], v.6, p. 1-6, 1992.
24. THOMPSON, M. W. et al. *Thompson e Thompson: genética médica*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 460 p.
25. BERGER, R. Cytogenetics in adult acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*, v. 5, p. 68-86, Mar. 1998.
26. FADERL, S. et al. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, v. 111, n. 91, p. 3995-4019, Jun 1998.
27. LI, S. et al. The P190, P210, and P230 forms of the *BCR/ABL* oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med*, v. 9, n. 189, p. 1399-412, May 3 1999.
28. DE. BRAEKELEER. M.; MOREL. F.; LE. BRIS. M. J.; HERRY. A.; DOUET-GUILBERT. N. The MLL gene and translocations involving chromosomal band 11q23 in acute leukemia. *Anticancer Res*. v.25, p. 1931- 44, 2005.

29. FELIX, C. A.; LANGE, B. J. Leukemia in infants. *Oncologist*, v. 3, n. 4, p. 225-40, Jun 1999.
30. BIONDI, B. et al. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood*, v. 96, p. 24-33, 2000.
31. SEEGER K. Treatment response and residual-disease monitoring in initial and relapsed *TEL-AML1* positive childhood ALL. *Leukemia.*, v. 15, p. 280-82, 2001.
32. RUBNITZ, J.; WICHLAN, D.; DEVIDAS, M.; SHUSTER, J.; KURTZBERG, J.; BELL, B.; HUNGER, S.; CHAUVENET, A.; PUI, C. H.; CAMITTA, B.; PULLEN, J. J. Prospective analysis of TEL and MLL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006, p.108, (abstract 218).