

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROIMUNOLOGIA**

MARINA LIPKIN VASQUEZ

**ANÁLISE DO IMPACTO CLÍNICO DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS
ENCONTRADAS NAS LEUCEMIAS AGUDAS DA INFÂNCIA**

**NITERÓI
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARINA LIPKIN VASQUEZ

**ANÁLISE DO IMPACTO CLÍNICO DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS
ENCONTRADAS NAS LEUCEMIAS AGUDAS DA INFÂNCIA**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Neuroimunologia da Universidade
Federal Fluminense, como
requisito para obtenção do Grau
de Mestre.**

Orientadora: Dra. Ilana Zalcborg Renault

**Niterói
2007**

Vasquez, Marina Lipkin

Análise do impacto clínico das alterações genéticas encontradas nas leucemias agudas da infância / Marina Lipkin Vasquez – Niterói: UFF, 2007.

Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, 2007.

1. Leucemia aguda infantil. 2. Alterações genéticas

- I. Universidade Federal Fluminense – Instituto de Biologia.
- II. Análise do impacto clínico das alterações genéticas encontradas nas leucemias agudas da infância.

MARINA LIPKIN VASQUEZ

ANÁLISE DO IMPACTO CLÍNICO DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS
ENCONTRADAS NAS LEUCEMIAS AGUDAS DA INFÂNCIA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Neuroimunologia da Universidade
Federal Fluminense, como requisito
para obtenção do Grau de Mestre.

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

Dra. Izabel Cristina de Palmer Paixão
Instituto de Biologia – UFF

Dra. Lídia Maria Amorim
Instituto de Biologia – UFF

Dra Rocio Hassan
Centro de Transplantes de medula Óssea – INCa

Dr Martin Bonamino (revisor e suplente)
Centro de Pesquisa – INCa

Niterói
2007

À Eliane, Neyde, Rywka e Dulce,
os meus grandes exemplos

AGRADECIMENTOS

À Dra Ilana, minha orientadora no sentido próprio da palavra, por acreditar em mim e me incentivar sempre, me ensinar um pouco mais a cada dia e me fazer descobrir a essência de um verdadeiro pesquisador, que resolve problemas sozinho, que sofre sozinho, que aprende sozinho e que vence por seus próprios méritos.

À Deisy, Lyanna, Maria, Priscilla, Telminha e Vanesa, por terem agüentado meus estresses, minhas gulas, minhas estórias, por terem compartilhado momentos de muita alegria e tornado tão divertida a minha rotina no laboratório.

Aos demais amigos do laboratório de Biologia Molecular: Gustavo, Esteban, Mario, Virgínia, Rocio, Ana Paula, Fernanda, Patrícia, Marininha, Roberta e Gisele, aos antigos por todos os ensinamentos, broncas e por compartilhar grandes alegrias, e às mais novas por toda a curiosidade e empenho que tenho certeza que lhe trarão sucesso no futuro.

Aos colegas do CEMO, em especial à Dra Eliana Abdelhay pelo estímulo, e ao Dr Alexandre Mello, pela enorme ajuda com a análise estatística.

À Dra Jane Dobbin, pela ajuda com os dados clínicos, pelas proveitosas reuniões, e principalmente pela dedicação com os pacientes a qual tanto admiro e que me faz enxergar a importância do meu trabalho.

Ao corpo clínico do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, por tamanha dedicação e determinação para realizar um trabalho de excelência no Brasil, em especial à Dra Gláucia Zoen e à Dra Joana Bortollini, pela amizade e pelos dias e noites de trabalho árduo.

Ao pessoal do laboratório Progenética: Raquel, Natália, Ana, Willian, Andressa, Amanda, Flávia, Mariano, pela ajuda com as planilhas e pelos momentos divertidos no trabalho.

Aos professores e auxiliares do Programa de Pós-graduação em Neuroimunologia, em especial aos queridos Professor Roberto Paes de Carvalho e Felipe Cavalcante.

Ao amigo Martin, pelos inúmeros conselhos e incentivos.

Às minhas amigas Biba, Quita, Cassy e Deza, pela compreensão do sumiço pré-tese e por todas as palavras de força.

Ao Cris, pelo amor, pelos milhares de auxílios técnicos, por me incentivar tanto e me ajudar a alcançar todos os meus objetivos.

À minha família, pela compreensão e apoio incondicional, em especial:

À minha mami, por todo o seu amor, todos seus conselhos e por ser o exemplo de profissional em quem me espelho;

À Any, pela sua preocupação, cuidado e pela comidinha maravilhosa de sempre;

Aos meus avós, pela luta e pelo carinho imensurável;

À minha vovy pelo seu amor diário, pelas milhares de perguntas e pelas palavras doces que amolecem qualquer irritação;

À minha bisa querida, pelo seu enorme prazer de viver que tanto me contagia;

Aos meus irmãos, por aturarem meu estresse, serem sempre curiosos e por falarem orgulhosos: “minha irmã é cientista!”;

E finalmente ao meu pai, que mesmo sem saber alimenta a minha garra de vencer e me superar custe o que custar.

“É preciso ousar e não cristalizar as idéias.
A ciência é um fazer humano, portanto é cultura.
Temos o dever de sonhar e o direito de realizar”.

Fátima Brito

“A arte é importante demais para ser deixada só para os artistas
e a ciência é importante demais para ser deixada só para os cientistas”

Adrew Carrie

“Como o cientista que descobre novos saberes através de experimentos,
o artista deve experimentar com maestria o acaso,
para descobrir no desconhecido sua obra.

Como em uma fissão nuclear,
o autor une palavras para extrair dali uma energia.

E, se o artista age através do método científico,
o cientista também utiliza a arte, sobretudo a poesia,
para descrever suas descobertas”,

Affonso Romano de Sant'Ana

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
I. 1 Biologia das leucemias agudas.....	1
I.2. Mecanismos de alterações cromossômicas	3
I.3. Leucemia Linfóide Aguda (LLA).....	5
I.4. Leucemia Mielóide Aguda (LMA)	12
I.5. Alterações genéticas adicionais nas leucemias agudas	19
I.6. Importância da detecção de alterações moleculares	23
I.7. Avaliação da Doença Residual Mínima	28
II. OBJETIVOS	29
II.1 Objetivos Gerais	29
II.2 Objetivos Específicos	29
III. PACIENTES E MÉTODOS	30
III.1. Pacientes em estudo	30
III.2. Análise Citomorfológica.....	33
III.3. Análise Imunofenotípica	33
III.4. Análise Citogenética.....	34
III.5. Análise Molecular	34
III.6 Análise Estatística	56
IV. RESULTADOS	58
IV.1. Características gerais	58
IV.2. Análise Molecular.....	62
IV.3. Impacto das alterações moleculares na evolução clínica.....	84
IV.4. Avaliação da Doença Residual Mínima.....	98
V. DISCUSSÃO	100
V. 1. LLA de origem B	101
V. 2. LLA de origem T.....	105
V. 3. LMA	106
VI. CONCLUSÕES	113
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
VIII. ANEXOS	134

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura I.1: Hematopoiese	2
Figura I.2: Mecanismos de alteração genética nas LAS	4
Quadro I.1: Fatores prognósticos na LLA	6
Figura I.3: Frequência das alterações cromossômicas na LLA infantil.....	8
Quadro I.2: Classificação das LMAs de acordo com as alterações genéticas.....	13
Figura I.4: Frequência das alterações cromossômicas na LMA.....	14
Figura III.1: Análise da qualidade do RNA extraído.....	39
Quadro III.1: Reação de retrotranscrição.....	40
Figura III.2: Análise da qualidade do cDNA.....	40
Figura III.3: Desenho da reação de detecção de clonalidade por PCR FR3.....	42
Figura III.4: Desenho da reação de detecção de clonalidade por PCR FR2.....	43
Figura III.5: Desenho da reação de detecção de clonalidade por PCR TCR λ	44
Figura III.6: Desenho da reação de detecção de clonalidade por PCR TCR δ	45
Figura III.7: Desenho da reação de PCR para detecção de DIT-FLT3.....	47
Figura III.8: Desenho da reação de PCR para detecção de FLT3-D835.....	48
Quadro III.2: Reação de RT-PCR.....	49
Figura III.9: Desenho de primers para detecção dos genes de fusão	50
Figura III.10: Esquema representativo da PCR para detecção de E2A-PBX1.....	51
Figura III.11: Esquema representativo da PCR para detecção de TEL-AML1.....	52
Figura III.12: Esquema representativo da PCR para detecção de MLL-AF4	52
Figura III.13: Esquema representativo da PCR para detecção de PML-RAR α	53
Figura III.14: Esquema representativo da PCR para detecção de AML1-ETO.....	54
Figura III.15: Esquema representativo da PCR para detecção de CBF β -MYH11	54
Quadro IV.1: Leucemias agudas analisadas.....	59
Quadro IV.2: Representação esquemática da casuística	59
Figura IV.1: Detecção dos rearranjos de imunoglobulina	63
Figura IV.2 Detecção de TEL-AML1 no gel de agarose.....	65
Figura IV.3: Características dos pacientes com e sem TEL-AML1	66
Figura IV.4: Detecção de MLL-AF4 no gel de agarose	67
Figura IV.5: Características dos pacientes com e sem MLL-AF4.....	68

Figura IV.6: Detecção de PBX1-E2A no gel de agarose.....	68
Figura IV.7: Características dos pacientes com e sem PBX1-E2A.....	70
Figura IV.8: Detecção de BCR-ABL nas LLAs	70
Figura IV.9: Características das LLAs com e sem BCR-ABL	71
Figura IV.10: Características das LLAs com e sem genes de fusão.....	72
Figura IV.11: Detecção de PML-RAR α no gel de agarose	74
Figura IV.12: Características dos pacientes com e sem PML-RAR α	74
Figura IV.13: Detecção de AML1-ETO no gel de agarose.....	75
Figura IV.14: Características dos pacientes com e sem AML1-ETO	76
Figura IV.15: Detecção de CBF β -MYH11 no gel de agarose	77
Figura IV.16: Detecção de BCR-ABL na LMA.....	77
Figura IV.17: Características das LMAs com e sem genes de fusão.....	78
Figura IV.18: Detecção de DIT-FLT3 na LLA de origem B	79
Figura IV.19: Detecção de DIT-FLT3 na LMA.....	80
Figura IV.20: Características das LMAs com e sem DIT-FLT3	81
Figura IV.21 Detecção de FLT3-D835 na LLA de origem B	82
Figura IV.22: Detecção de FLT3-D835 na LMA	83
Figura IV.23: Características das LMAs com e sem FLT3-D835	84
Figura IV.24: Gráfico da probabilidade de SG na LLA de origem B.....	85
Figura IV.25: Gráfico da probabilidade de SLE na LLA de origem B	86
Figura IV.26: Gráficos da probabilidade de sobrevida em função de TEL-AML1	86
Figura IV.27: Gráficos da probabilidade de sobrevida em função das alterações de mau prognóstico na LLA de origem B.....	87
Figura IV.28: Gráfico da probabilidade de SG na LLA de origem T	89
Figura IV.29: Gráfico da probabilidade de SLE na LLA de origem T	90
Figura IV.30: Gráfico da probabilidade de SG na LMA	91
Figura IV.31: Gráfico da probabilidade de SLE na LMA.....	92
Figura IV.32: Gráficos da probabilidade de sobrevida em função das alterações de mau prognóstico na LMA	92
Figura IV.33: Gráficos da probabilidade de sobrevida na LMA em função de BCR-ABL.....	93
Figura IV.34: Gráficos da probabilidade de sobrevida na LMA em função das alterações no gene FLT3.....	94

Figura IV.35: Gráficos da probabilidade de sobrevida na presença de AML1-ETO com ou sem DIT-FLT3	95
Figura IV.36: Gráficos da probabilidade de sobrevida na presença de PML-RAR α com ou sem DIT-FLT3	96
Figura IV.37: Gráficos da probabilidade de sobrevida na presença de PML-RAR α com ou sem FLT3-D835	97

LISTA DE TABELAS

Tabela IV.1: Envio de casos pelas Instituições de origem	58
Tabela IV.2: Características das LLAs analisadas	60
Tabela IV.3: Características das LMAs analisadas	61
Tabela IV.4: Distribuição das alterações cromossômicas encontradas na LLA	64
Tabela IV.5: Características dos pacientes positivos para TEL-AML1	65
Tabela IV.6: Características dos pacientes positivos para MLL-AF4	67
Tabela IV.7: Características dos pacientes positivos para PBX1-E2A	69
Tabela IV.8: Características das LLAs positivas para BCR-ABL	71
Tabela IV.9: Distribuição das alterações cromossômicas encontradas na LMA	73
Tabela IV.10: Características dos pacientes positivas para PML-RAR α	75
Tabela IV.11: Características dos pacientes positivas para AML1-ETO	76
Tabela IV.12: Características das LMAs positivas para DIT-FLT3	81
Tabela IV.13: Características das LMAs positivas para FLT3-D835	83
Tabela IV.14: Análise multivariada do impacto de alterações genéticas na sobrevida da LLA de origem B	87
Tabela IV.15: Análise multivariada do impacto de alterações genéticas na sobrevida da LMA em função da presença de PML-RAR α e DIT-FLT3	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATRA	<i>All-Trans Retinoic Acid</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRM	Doença Residual Mínima
FAB	Classificação Franco-Americano-Britânica
FT	Fatores de Transcrição
IG	Imunoglobulina
LA	Leucemia Aguda
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
<i>MCR</i>	<i>Medical Research Council</i>
MO	Medula Óssea
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RA	Receptores de Antígenos
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa
SG	Sobrevida Global
SLE	Sobrevida Livre de Eventos
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SP	Sangue Periférico
<i>SWOG</i>	<i>Southwestern Oncology Group</i>
t(x;y)	Translocação do cromossomo x com o cromossomo y
TCR	Receptor de Células T
TMO	Transplante de Medula Óssea
TR	Translocações de Risco

RESUMO

A taxa de cura das leucemias agudas (LA) da infância vem crescendo exponencialmente nos últimos anos graças ao estabelecimento de terapias eficazes adaptadas ao risco de progressão da doença. O sucesso terapêutico é decorrente da utilização de tecnologias combinadas com o objetivo de estabelecer o diagnóstico preciso baseando-se na análise de fatores clínicos, biológicos, genéticos e moleculares. A presença de translocações cromossômicas, tais como a t(9;22), t(4;11), t(1;19), t(12;21) na LLA, e a t(15;17), t(8;21) e inv 16 na LMA, vem sendo utilizada como um dos principais fatores prognósticos. No entanto, a descoberta de alterações genéticas concomitantes, como mutações no gene *FLT3*, tem demonstrado impacto no comportamento clínico, alterando o valor conferido por alterações sabidamente de bom prognóstico e representando um paradoxo para a decisão do oncologista quanto à administração de terapia. Este trabalho teve por objetivo identificar alterações genéticas através da análise molecular e estudar o papel da presença destas na resposta clínica de cada indivíduo com LA, identificando sua frequência e impacto na patogênese de crianças brasileiras. Foram estudadas 284 crianças (0-18 anos) diagnosticadas com leucemia aguda (152 LLA de origem B, 38 LLA de origem T e 94 LMA) provenientes de várias instituições e enviadas ao laboratório de Biologia Molecular do CEMO/INCa no período de fevereiro de 2000 a agosto de 2006. Nas LLAs de origem B o gene de fusão *TEL-AML1* foi detectado em 26% dos casos, o *MLL-AF4* em 4%, o *PBX1-E2A* em 7% e o *BCR-ABL* em 9%, este último tendo uma incidência aumentada comparada à literatura. Não houve impacto significativo na probabilidade de sobrevida na presença da alteração de bom prognóstico *TEL-AML1*, nem na presença de *PBX1-E2A*. Já a presença de *MLL-AF4* ou *BCR-ABL* foi correlacionada com menor sobrevida livre de eventos. Foram identificadas alterações no gene *FLT3* em apenas dois pacientes e houve associação com leucometria aumentada, não-resposta à indução da remissão, além de uma pior sobrevida livre de eventos e global, revelando uma doença mais agressiva. Nas LLAs de origem T não foram estudadas alterações indicativas de prognóstico, mas o estudo da presença de rearranjo clonal no gene para receptor de célula T (TCR) auxiliou a definição de linhagem ao diagnóstico e foi utilizado como marcador de clonalidade ao longo do tratamento.

A taxa de sobrevida global deste grupo de pacientes sabidamente de progressão desfavorável foi de 40% em 5 anos, bastante inferior às LLAs de origem B. Já nas LMAs o gene de fusão *AML1-ETO* foi identificado em 16% dos pacientes, o *CBFβ-MYH11* e o *BCR-ABL* em 1,5% cada e o *PML-RARα* 35%, este último tendo uma incidência aumentada em relação à maioria dos países desenvolvidos. A análise das alterações no gene *FLT3* revelou 12,5% de positivos para *DIT-FLT3* e 4% para *FLT3-D835*. A *DIT-FLT3* foi encontrada em 15% das crianças em que foi detectada a presença de *PML-RARα* e em 17% das crianças com *AML1-ETO*. A *FLT3-D835* foi detectada em um paciente com *PML-RARα* e em outro com *DIT-FLT3*. A presença das alterações de bom prognóstico não teve impacto na sobrevida dos pacientes, contudo as alterações de mau prognóstico foram associadas à menor taxa de remissão e ao maior número de recaídas. Os pacientes com alterações no gene *FLT3* concomitantes às translocações de bom prognóstico tiveram leucometria aumentada, menor taxa de remissão e redução na sobrevida livre de eventos. Embora preliminar este estudo sugere incidência aumentada de *BCR-ABL* e *PML-RARα* nas crianças brasileiras, indicando a importância de um estudo multicêntrico de abrangência nacional para averiguar eventuais diferenças geográficas e o impacto do genótipo no comportamento clínico dos nossos pacientes com leucemia aguda. A presença de alterações no gene *FLT3* foi indicativa de mau prognóstico e piora na resposta clínica, tanto sozinha quanto na presença de outras alterações. Isto mostra a importância da análise molecular e sugere que a avaliação destas alterações deve ser incluída na rotina diagnóstica das leucemias agudas, para possibilitar a melhor estratificação de risco de recaída e a eficácia do tratamento.

ABSTRACT

The cure rate of patients with acute leukemia (AL) has been growing in the last decades thanks to the use of therapies adapted to the risk of relapse and target drugs. The success of treatment is the use of many combined technologies to establish the correct diagnosis, based on the clinical, biological, genetic and molecular features. The presence of chromosomal abnormalities, as t(9;22), t(4;11), t(1;19), t(12;21) in ALL, and t(15;17), t(8;21) e inv 16 in AML, has showed to be relevant to prognosis. Even though, the discovery of new genetic alterations acting on the pathogenesis, as *FLT3* mutations, have shown clinical impact and altered the standard risk conferred by some translocations presence, which means a difficult medical decision in terms of therapy administration.

With the aim of studying the impact of genetic aberrations in Brazilian children (0-18 years) we analyzed 284 acute leukemias (152 B-origin ALL, 38 T-origin ALL and 94 AML) diagnosed between 2000 and 2006 in different institutions of south-west Brazil, whose samples were sent to the Molecular Biology Laboratory at CEMO-INCa for PCR analysis. In the group of B-cell origin ALL, the fusion gene *TEL-AML1* was detected in 26% of the patients, *MLL-AF4* in 4%, *PBX1-E2A* in 7% and *BCR-ABL* in 9%, this last being more frequent than related by previous studies. The presence of *MLL-AF4* and *BCR-ABL* was associated with a worse event free survivor. The mutations in *FLT3* were detected only in two patients and it was associated with a higher white blood count at diagnosis, non-response to induction and smaller survivor taxes, meaning a more aggressive disease. In the group of T-cell origin ALL no gene abnormality associated to prognosis was studied, but the presence of clonal rearrangements of T cell receptor (TCR) helped at diagnosis to identify the cell line involved in the disease and during follow-up as a marker of minimal residual disease (MRD). The overall survivor in 5 years within this bad prognosis group was 40%, significant lower than B-origin ALL patients. In the group of AML the fusion gene *AML1-ETO* was detected in 16% of the patients, *CBF β -MYH11* and *BCR-ABL* in 1,5% each and *PML-RAR α* in 35%, this one being presented at a higher percentage than related by the most groups in developed countries. The *FLT3* gene mutations detected were 12,5% *DIT-FLT3* and 4% *FLT3-D835*. The *DIT-FLT3* was found in 15% of the children who had *PML-RAR α* and in 17% of those with *AML1-ETO*.

The *FLT3-D835* was detected in one patient with *PML-RAR α* and in other with *DIT-FLT3*. The presence of good prognosis translocations didn't show impact on the survivor rates, on the other hand the bad prognosis alterations were related to lower remission and higher relapse rates. The patients that presented both *FLT3* mutations and good prognosis chromosome translocations had a higher white blood count, lower remission rate and lower survivor rates. This study suggests the higher incidence of *BCR-ABL* and *PML-RAR α* in AL Brazilian children and indicates the importance of a multicentre study with national reach in order to identify potential geographic differences and the genotype impact on the clinical profile of our patients. The presence of mutations in the *FLT3* gene was related to a worse prognosis and worse clinical outcome, even analyzed alone or with other alterations concomitants. It shows the importance of molecular analysis and suggests them to be included on our leukemia diagnosis routine to better stratify the risk of relapse and guarantee the effectiveness of the treatment.

I. INTRODUÇÃO

I. 1 Biologia das leucemias agudas

A leucemia pode ser definida como a proliferação ou expansão incontrolada de células hematopoiéticas que não retêm a capacidade de se diferenciarem normalmente em células maduras do sangue. As leucemias resultam da expansão clonal de uma única célula tronco pluripotente que adquiriu uma série progressiva de alterações genéticas, as quais se acumulam em um único clone celular, conferindo vantagem proliferativa em relação às demais células e impedindo seu processo de diferenciação normal e morte subsequente.¹

As leucemias são classificadas a partir de dois fatores: o tipo de células afetadas e a rapidez do desenvolvimento e progressão da doença. Elas ocorrem pela transformação de um progenitor com comprometimento para a linhagem linfóide ou mielóide, sendo então classificadas como linfóides ou mielóides de acordo com critérios morfológicos e citoquímicos.² Também podem ser classificadas como agudas ou crônicas, de acordo com a fisiopatologia da doença, sendo que nas agudas as células leucêmicas pertencem ao compartimento de células progenitoras mais imaturas, enquanto que nas crônicas as células malignas se desenvolvem em estágios de maturação mais tardios.

A taxa de cura das leucemias agudas (LA) vem crescendo exponencialmente nos últimos anos graças ao estabelecimento de terapias eficazes adaptadas ao risco de progressão da doença. O sucesso terapêutico é decorrente da utilização de tecnologias combinadas com o objetivo de estabelecer o diagnóstico preciso e indicativo de prognóstico, baseando-se na análise de fatores clínicos, biológicos, genéticos e moleculares.³

O desenvolvimento da metodologia diagnóstica e a análise de grandes séries de pacientes permitiram identificar fatores prognósticos altamente relevantes, levando à reclassificação das leucemias de acordo com a origem e linhagem celular, o estágio de maturação e o tipo de anormalidade citogenética ou molecular envolvida na patogênese da doença.⁴ Destes, o cariótipo é o mais importante para distinguir os

pacientes com leucemia aguda em diferentes grupos de risco de falha terapêutica, o que permite o uso de drogas mais específicas e eficazes. Diversas alterações clonais e anomalias moleculares foram identificadas nas leucemias agudas, sendo a maioria relacionada com o descontrole de vias funcionais tais como ciclo celular, apoptose e diferenciação através da regulação transcricional^{5, 6}.

I.1.1 Relação entre leucemia e hematopoiese

A origem e a progressão das leucemias podem ser compreendidas ao se relacionar os mecanismos leucemogênicos às alterações dos mecanismos homeostáticos normais que regulam a produção e a diferenciação das células sanguíneas⁷.

Durante a hematopoiese normal, uma população de células-tronco hematopoiéticas (CTH) pluripotentes e auto-renováveis possui a capacidade de originar todos os elementos figurados do sangue: eritrócitos, monócitos, linfócitos e plaquetas (Figura I.1).

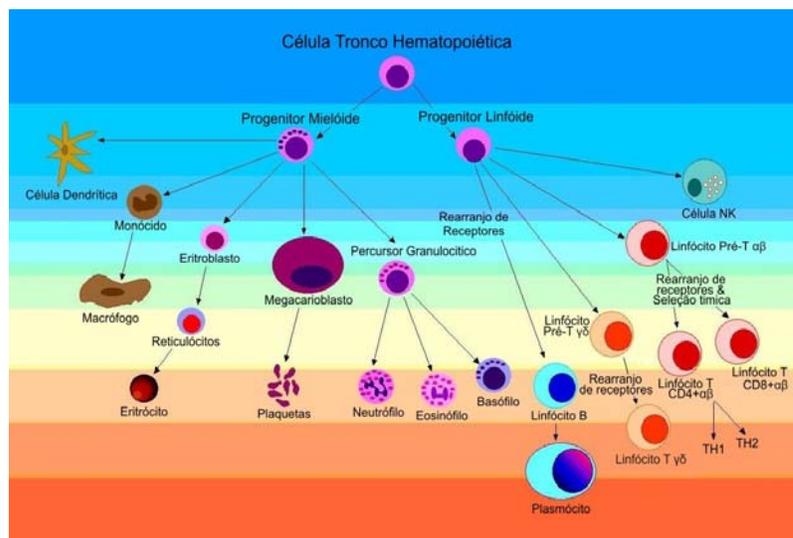


Figura I.1 - Hematopoiese. Células tronco hematopoiéticas pluripotentes originam os elementos figurados do sangue.

A progressão ao longo da cascata de diferenciação é controlada por um complexo conjunto de fatores de transcrição que regulam a expressão gênica. Este processo se desenvolve de forma autônoma e pode ser estimulado por sinais resultantes das interações celulares entre as CTH e as células do estroma, assim como da

expressão de moléculas solúveis (citocinas) ou de superfície (receptores e moléculas de adesão)⁸.

O acúmulo de alterações genéticas em genes que regulam o processo de diferenciação, proliferação, reparo e morte celular leva à aquisição de um fenótipo maligno em que as células adquirem vantagem de sobrevivência e deixam de exercer suas funções normais.⁹ Estudos recentes sugerem que a transformação maligna ocorre inicialmente em uma célula com um mínimo comprometimento para linhagem linfóide ou mielóide e não na célula tronco pluripotente, e este progenitor acumula alterações genéticas que culminarão na leucemogênese.¹⁰ A análise de clones leucêmicos pode, portanto, fornecer informações sobre o momento em que ocorreu a transformação maligna e quais são os mecanismos moleculares envolvidos. É com este intuito que são focadas as pesquisas para compreender a origem das leucemias.

1.2. Mecanismos de alterações cromossômicas

Estudos in vitro comprovam que é necessária a ação colaborativa entre pelo menos duas classes de alterações genéticas para a formação da leucemia: (1) as que conferem efeito proliferativo e vantagem de sobrevivência aos precursores hematopoiéticos e (2) as que funcionam bloqueando o processo de diferenciação normal, pela perda de função de fatores de transcrição atuantes nos precursores hematopoiéticos. Sendo assim, sugere-se que existem ao menos dois eventos moleculares alterados atuando na leucemogênese¹¹.

Diferentes mecanismos moleculares têm sido observados nas alterações genéticas encontradas em leucemias:

O primeiro (Figura 1.2 A) envolve a re-localização de um proto-oncogene celular intacto para perto de um dos genes de receptores de antígeno (Ig ou TCR), de acordo com a linhagem, altamente expressos nos tecidos linfóides. Isto resulta na expressão desregulada do gene translocado, devido à presença de potentes ativadores transcricionais específicos da linhagem linfóide¹². As t(14;18), t(8;14) e t(11;14) com a justaposição de regiões do gene IGH aos genes *Bcl-2*, *c-myc* e *Bcl-1*, respectivamente, são exemplos deste tipo de translocação na linhagem B¹³.

O segundo, mais freqüentemente encontrado na LA, envolve a fusão de dois genes, na qual os pontos de quebra se situam em íntrons de cada um dos genes envolvidos, mantendo intacta a região codificante de ambos. O resultado da translocação é a geração de transcritos e proteínas quiméricas com funções alteradas (Figura I.2 B). A primeira translocação deste tipo a ser descrita foi a t(9;22) resultando no gene de fusão *BCR-ABL*.¹⁴

O terceiro envolve mutações pontuais ou duplicações que ocorrem em genes responsáveis pelo controle da proliferação celular (Figura I.2 C). Como principal exemplo pode ser citado o gene *FLT3* o qual se encontra constitutivamente ativado em LA.¹⁵

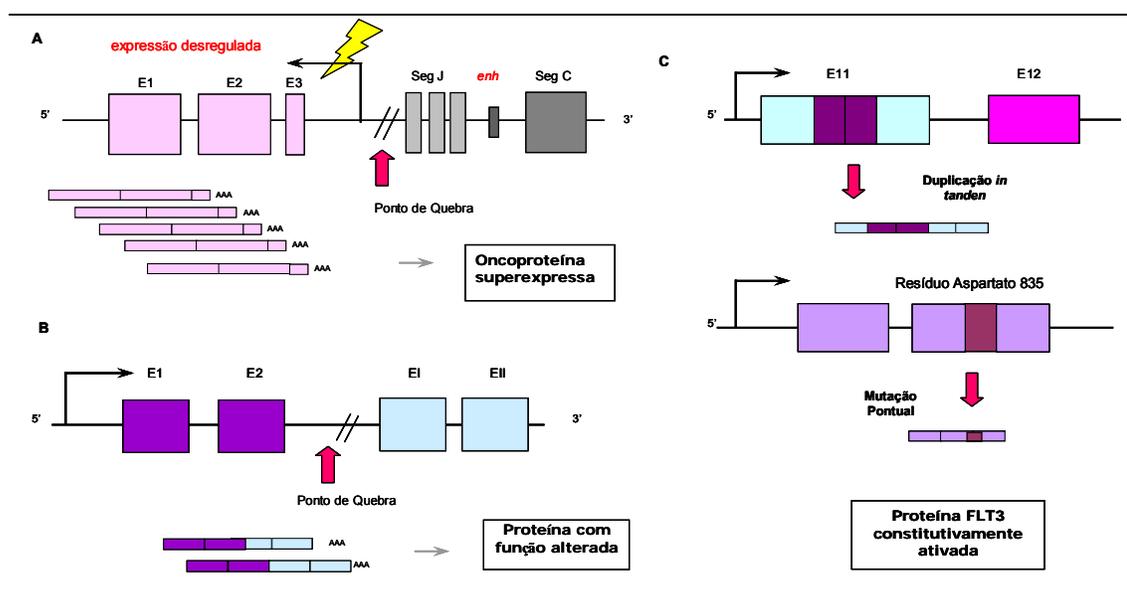


Figura I.2 – Mecanismos de alteração genética nas LAs. Adaptado de Hassan, 2000⁴⁹

O estudo das aberrações cromossômicas recorrentes e específicas, e sua associação a subtipos de leucemia definidos por linhagem, tipo celular e estágio de diferenciação, oferecem a possibilidade de identificar os genes que estão envolvidos na perda do controle dos mecanismos reguladores do ciclo celular e na aquisição do fenótipo maligno.¹⁶ Isto tem, sem dúvida, importância na caracterização dos fatores biológicos operantes na transformação e progressão maligna, mas também pode ser de grande utilidade no desenho de terapias alvo-específicas que beneficiem os pacientes.

Atualmente as alterações cromossômicas são amplamente utilizadas como fatores primários de determinação de grupos de risco para a adequação do tratamento a ser desenvolvido uma vez que contribui para a utilização de protocolos terapêuticos nos quais os pacientes são tratados de acordo com critérios prognósticos relevantes. Desta forma, um paciente de alto risco beneficia-se de uma terapêutica agressiva, enquanto aquele em que a doença é menos grave é poupado dos efeitos colaterais da terapia anti-tumoral.¹⁷ No entanto as alterações genéticas descobertas e mais recentemente associadas à patogênese da leucemia aguda, inclusive concomitantes às translocações, vêm estratificando ainda mais os subgrupos de risco clínico e possibilitando o melhor entendimento da biologia das leucemias.¹⁵

A seguir serão descritas as principais características e alterações genéticas relevantes para a classificação dos 2 subtipos de leucemia aguda: linfóide e mielóide.

1.3. Leucemia Linfóide Aguda (LLA)

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma doença neoplásica caracterizada por um acúmulo clonal de células linfóides imaturas na medula óssea. Trata-se do câncer mais freqüente na infância. Sua incidência atinge 80% das leucemias pediátricas e 20% das leucemias do adulto.¹⁸

Segundo a classificação morfológica mais importante (FAB – Franco-Americano-Britânica, 1976)¹⁹ as LLA são divididas em três subtipos: L1, L2 e L3. Baseado no padrão de reatividade intracitoplasmática e/ou de superfície de anticorpos monoclonais, as LLA foram subclassificadas, de acordo com o grau de maturação da célula leucêmica em comparação com o caminho da diferenciação linfóide normal, em quatro subclasses de relevância clínica: leucemia precoce de origem B, que compreende a LLA pró-B e calla+ (55% de todas leucemias linfóides), leucemia pré-B (25%), leucemia B madura (1%) e leucemia de origem T (15%). Exceto pela associação entre o subtipo L3 e LLA B madura, não existe correlação direta entre os subtipos definidos pela morfologia com a classificação imunológica.²⁰

Uma série de fatores clínico-biológicos tem sido utilizada para a escolha de terapias individualizadas que reduzam o risco de recaída da doença. Entre eles estão a

leucometria, contagem de blastos, visceromegalia, envolvimento do sistema nervoso central e gônadas, origem celular (sendo as de origem T mais agressivas) e alterações genéticas numéricas e estruturais detectadas nas células ao diagnóstico por métodos citogenéticos e moleculares.²¹

O uso de terapias adequadas ao risco de recaída revolucionou o tratamento da LLA nas últimas décadas e a doença vem atingindo altos níveis de cura, chegando a 85% nos países desenvolvidos. Pacientes com prognóstico favorável recebem terapia convencional e aqueles com prognóstico desfavorável recebem terapia intensificada, alguns com indicação direta ao transplante de medula óssea (TMO).^{17,21} Atualmente, nos principais centros de excelência para o tratamento da leucemia, o fator prognóstico mais importante para a estratificação do risco de recaída é a identificação de alterações gênicas recorrentes, sendo as principais: (1) a t(12;21), que é associada ao risco baixo sendo considerada de bom prognóstico; (2) a t(1;19), associada ao alto risco de recaída, mas com valor prognóstico controverso; e (3) a t(9;22) e as mutações envolvendo o gene *MLL* (em que a t(4;11) é a mais freqüente) as quais são relacionadas ao alto risco e indicativas de mau prognóstico.²² (Quadro I.1)

Fatores de risco	Favorável	Desfavorável
Idade (anos)	≥ 1 e 9 ≤	< 1 ou >9
Sexo	Feminino	Masculino
contagem de leucócitos ao diagnóstico	< 50.000/mm ³	≥50.000/mm ³
DNA index	> 1.6	≤ 1.6
Número de cromossomos por célula	>50	<45
Blastos no dia 8 de indução	Não	Sim
Acometimento do SNC	< 5 cels/mL	> 5 cels/mL
Citogenética	Trissomia do 4 e 10	t(4;11) e t(9;22)
Genética molecular	<i>TEL-AML1</i>	<i>MLL-AF4; BCR-ABL</i>
Imunofenótipo	B precoce	B madura e T

Quadro I.1: Fatores prognósticos na LLA. Adaptado de Friedman and Weinstein, 2000²²

I.3.1 Descrição das principais alterações genéticas na LLA

I.3.1.1 Translocações cromossômicas com valor prognóstico

Muitas alterações gênicas já foram descritas em LLA, no entanto, mudanças na expressão e ativação de certos genes responsáveis por codificar fatores de transcrição (FT) têm sido reconhecidas como o mecanismo mais freqüente envolvido nesta patologia.²³

Os FT são proteínas que regulam a expressão gênica através da ligação a regiões promotoras do DNA, levando ao início ou à inibição da transcrição. Estudos com camundongos transgênicos demonstraram a importância dos FT para a hematopoiese normal, uma vez que a desregulação destes leva a alteração do ciclo celular e à perda da funcionalidade de uma ou mais linhagens.²⁴

Os produtos dos genes ativados por translocações na maioria das vezes são FT, apresentam diversos domínios de interação com o DNA e outras proteínas e são regulados no contexto dos processos de diferenciação. Estes genes têm sido chamados de “genes mestres”, pelo fato de estarem envolvidos no controle da expressão de outros genes, que por sua vez podem ser reguladores transcricionais positivos ou negativos.²⁵

As translocações nas leucemias agudas mostram uma especificidade para progenitores hematopoiéticos bloqueados em um determinado estágio de diferenciação. Esta propriedade sugere que as diferentes oncoproteínas produzidas interferem significativamente com redes transcricionais, as quais normalmente funcionam em colaboração com fatores de crescimento e seus receptores regulando a hematopoiese. Os genes alvos das translocações cromossômicas parecem situar-se funcionalmente no topo de cascatas regulatórias conservadas evolutivamente, o que é indicado pelas homologias com genes que controlam os estágios precoces do desenvolvimento. Por outro lado a translocação pode envolver genes importantes para o processo normal de diferenciação e causar a perda da função destes, prejudicado na mesma forma a normalidade do ciclo celular.^{23,26}

A seguir são descritas as translocações que serão alvo do trabalho, com o objetivo de determinar o seu valor prognóstico na LLA da infância. A freqüência das mesmas relatada na literatura científica é ilustrada no gráfico abaixo (Figura I.3).

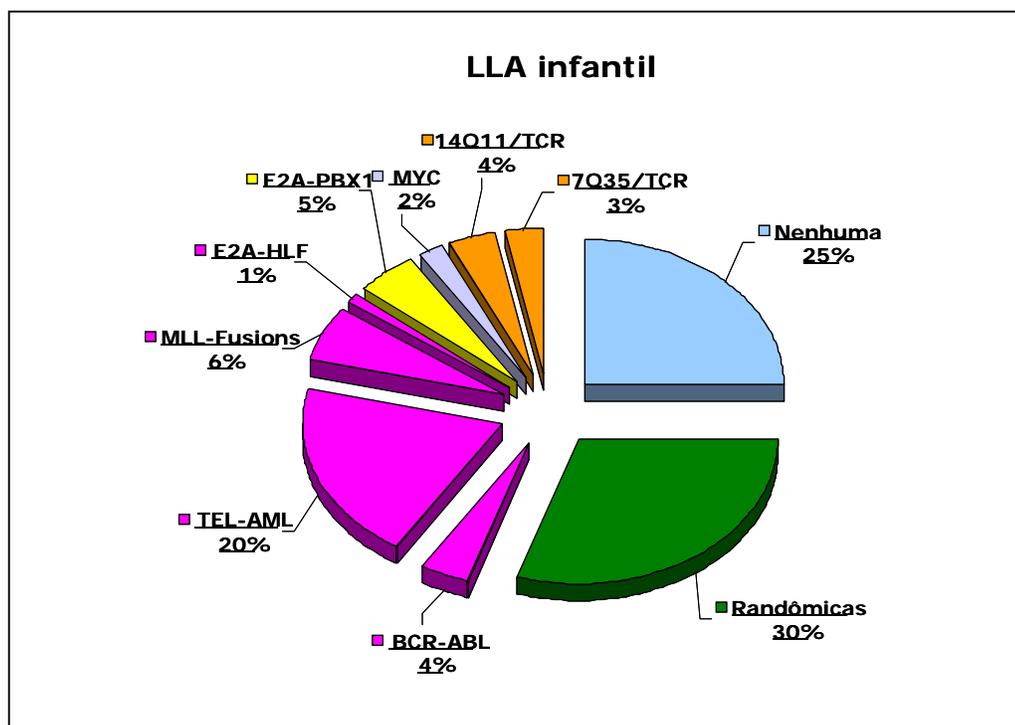


Figura 1.3: Frequência das alterações cromossômicas na LLA infantil. Adaptado de Pui et al,

t(9;22)(q34;q11) com o gene de fusão *BCR-ABL*

Resultado da fusão dos genes *BCR* (cromossomo 9q) e *ABL* (cromossomo 22q), a t(9;22) foi a primeira translocação cromossômica a ser descrita. É característica da Leucemia Mielóide Crônica e é raramente encontrado nas LMAs, mas está presente em aproximadamente 5% das LLAs de criança e em 30% das LLAs de adulto.²⁷

O produto da translocação, denominado cromossomo Filadélfia, codifica uma proteína com alta atividade de tirosina quinase que interfere na transdução de sinais celulares e altera o metabolismo e a proliferação celular, que passa a ocorrer de maneira independente dos sinais extracelulares emitidos por fatores de crescimento. Ocorre ainda o bloqueio da maquinaria de apoptose, conferindo à célula o fenótipo de resistência a terapias. Devido à existência de diferentes pontos de quebra no gene *BCR*, podem ser formadas proteínas diferentes, sendo a e1-a2 (também conhecida como p190) a proteína presente em 95% das LLAs de infância.²⁷

A presença desta alteração é considerada um fator desfavorável ao prognóstico, uma vez que os pacientes apresentam uma resposta ruim ao protocolo de tratamento convencional.²⁸ A utilização de terapias alvo-específicas inibidoras da

proteína *BCR-ABL* (GLIVEC, Mabthera), assim como a indicação ao TMO, no entanto, têm sido consideradas opções vantajosas no combate a esta doença de alto risco.^{29, 30}

t(4;11)(q21;q23) com o gene de fusão *MLL-AF4*

O gene de fusão *MLL-AF4* envolve a banda 11q23 do gene *MLL* (também denominado *ALL-1*, *HRX*, *HTRX1*) e o gene *AF4* (cromossomo 4). Ocorre frequentemente em leucemias agudas na infância e em leucemias secundárias que surgem após o tratamento com agentes quimioterápicos classificados como inibidores de DNA, estando presente em cerca de 50-70% das LLAs de lactentes e em 5% das LLAs de crianças e adultos. Tem sido associada com o fenótipo pró-B, e é indicativa de mau prognóstico.³¹

O gene *MLL* transcreve uma proteína que contém regiões homólogas ao gene *tritorax* de *Drosófila* que incluem domínios de capacidade transcricional repressora e ativadora. Uma alça de adeninas e timinas nesta região parece mediar a ligação de *MLL* ao DNA, sendo então crucial para sua atividade como FT. O gene *AF4*, por sua vez, codifica uma proteína com regiões ricas em serinas e prolinas cuja função ainda não foi bem elucidada.³²

Em ambos os genes em questão as seqüências que transcrevem os domínios funcionais encontram-se localizadas em suas regiões de quebra, desta forma, a translocação entre *MLL* e *AF4* leva à perda das atividades funcionais e alteram a expressão de genes regulados por estes, produzindo uma proteína de fusão com uma nova atividade regulatória.³³

O gene *MLL* pode se fundir a um grande número de parceiros resultando em distintas translocações que envolvem o locus 11q23. Um mecanismo de ação comum `as distintas proteínas de fusão resultantes da translocação para a região 11q23 não está estabelecido.¹³ Entretanto existem evidências que suportam um papel importante do gene parceiro do *MLL* no mecanismo molecular de transformação leucêmica, uma das hipóteses é de que muitos dos genes parceiros do *MLL* codificam proteínas envolvidas na modulação da expressão gênica, como por exemplo, as proteínas AF4, AF9 e ENL alvos da t(4;11), t(9;11) e t(11;19), respectivamente, parecem funcionar como fatores de transcrição.³⁴

t(1;19) (q23;p13) com o gene de fusão *PBX1-E2A*

A translocação t(1;19) (q23;p13) foi descrita em 1984 por diferentes grupos que estudavam LLA pré-B. Resultado da fusão dos genes *E2A* (cromossomo 19) e *PBX1* (cromossomo 1), pode ser encontrada em 5-6% das LLAs de criança e cerca de 20% das LLAs de adulto, com incidência progressivamente aumentada com a idade, quase exclusivamente em LLAs pré-B.³⁵

Em células normais, o gene *PBX* atua como fator de transcrição do gene *HOX*, que possui importante papel durante a fase de desenvolvimento embrionário devido à regulação da síntese de fatores de crescimento que determinam o posicionamento e a organização celular. Uma vez translocado com a porção 5' final do gene *E2A*, a qual possui um forte domínio transativador, é transcrita uma proteína de fusão que perde sua função original e passa a ter atividade transativadora. Desta forma, as células que possuem o gene de fusão *E2A-PBX1* ativam constitutivamente a transcrição de genes normalmente regulados por *PBX1*.³⁶

A translocação t(1;19) inicialmente foi correlacionada com a presença de características de alto risco, como a leucocitose elevada, altos níveis de desidrogenase láctica, envolvimento do SNC e baixas taxas de remissão.³⁷ No entanto, estudos clínicos subseqüentes tiveram resultados controversos e apontaram para prognósticos diversos.^{38,39} Desta forma, a mesma não vem mais sendo utilizada como indicativa de prognóstico na maioria dos protocolos terapêuticos atuais.^{40,41}

t(12;21)(p13;q22) com o gene de fusão *TEL-AML1*

A maioria dos casos citados na literatura associa a presença da translocação *TEL-AML1* ao imunofenótipo B. No entanto, alguns casos de linhagem T já foram diagnosticados. Trata-se do rearranjo mais freqüente nas LLAs em crianças, ocorrendo em aproximadamente 25% dos casos, com baixa freqüência em LLAs de adultos (<2%).⁴²

O gene *TEL* (ou *ETV6*) codifica uma proteína com um domínio amino-terminal altamente conservado que lhe confere a sua capacidade de agir como fator de transcrição. Foi inicialmente identificado como pertencente à família ETS dos FT, através da sua ligação ao receptor de fatores de crescimento em um caso de

leucemia mielomonocítica que apresentava a translocação $t(5;12)^{43}$. Sua alteração na $t(12;21)$, raramente detectada pela citogenética tradicional, foi primeiramente identificada em um ensaio de hibridização intracelular por fluorescência (*FISH*), em 1994 por Berger *et al.*⁴⁴

A proteína codificada pelo gene *AML1* (ou *CBF α 2*) funciona como FT de TCR β , ativando sua expressão. A fusão da região 5' de *TEL* com o gene *AML1* quase inteiro produz uma proteína com alvos ainda desconhecidos, porém, sabe-se que a expressão de TCR β é inibida e que ocorre a perda das atividades normais dos genes envolvidos.⁴⁴

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.⁴⁵

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.^{46, 47}

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.⁴⁸

1.3.1.2. Rearranjos nos genes de receptores de antígenos

As LLAs, por serem equivalentes malignos de precursores transformados em um dos estágios da diferenciação linfóide, são portadoras de rearranjos comuns dos genes das imunoglobulinas (Ig) e dos genes dos receptores de células T (TCR).

Quando uma célula sofre transformação maligna, ela pára em um dado estágio do processo de maturação e o rearranjo dos seus segmentos gênicos, os membros das famílias a serem utilizados, os genes descartados e a ação de enzimas que retiram e colocam nucleotídeos nas junções dos segmentos gênicos geram um perfil característico para cada clone subsequente. Desta forma, diferentes linfócitos B e T,

quando têm estas regiões amplificadas por uma reação de PCR que amplifica regiões gênicas específicas apresentam fragmentos de tamanho diferentes devido à diferença nos segmentos utilizados nos rearranjos.⁴⁹

Uma vez que os clones leucêmicos carregam os RA rearranjados do mesmo tamanho, a detecção da linhagem celular acometida, assim como a avaliação da persistência de células tumorais residuais (doença residual mínima), podem ser realizadas através da análise dos rearranjos para TCR e Ig por metodologia qualitativa ou mesmo quantitativa, não proporcionando, porém, nenhum valor prognóstico mas fornecendo uma alternativa importante em caso de ausência de alteração genética recorrente ou mesmo indefinição de linhagem por imunofenotipagem.^{50,51}

I.4. Leucemia Mielóide Aguda (LMA)

A LMA é uma leucemia relativamente rara na infância, decorrente do bloqueio no processo de diferenciação terminal que leva ao acúmulo progressivo de precursores granulocíticos e monocitóides na medula óssea e sangue periférico, com inibição da função hematopoiética normal. Trata-se de uma doença heterogênea, a qual se manifesta do ponto de vista cito-morfológico pela variabilidade no acometimento e grau de maturação dos blastos mielóides, classificados pelos critérios FAB em oito subgrupos distintos (M0-M7).⁵²

A incorporação das alterações cromossômicas como fatores primários de determinação de subgrupos representa um avanço importante nos sistemas de classificação da LMA. A classificação da OMS define 4 subgrupos (1) LMA com translocações citogenéticas recorrentes, (2) LMA com displasia de múltiplas linhagens, (3) LMA e Síndromes Mielodisplásicas relacionadas com terapia e (4) LMA não classificada.⁵³

Atualmente o principal fator prognóstico da LMA, assim como na LLA, é a presença de alterações cromossômicas as quais permitem distingui-la em três grupos de risco: favorável, intermediário e desfavorável. As duas linhas de classificação mais utilizadas são descritas a seguir (Quadro I.2).

Risco	Critério do SWOG	Critério de MRC: idênticos aos de SWOG, exceto:
Favorável	t(15;17) com qualquer outra alteração inv 16 com qualquer outra alteração t(8;21) sem del(9q) ou cariótipo complexo	t(8;21) com qualquer outra alteração
Intermediário	cariótipo normal +8,-Y,+6, del (12p)	Alterações do 11q23 del(9q), del(7q) sem outras alterações cariótipo complexo (3<x<5) Alterações de prognóstico desconhecido
Desfavorável	-5/del(E), -7/del(7q) t(8;21) com del(9q) ou cariótipo complexo inv(3q), alterações 11q23, 20q,21q,del(9q), t(6;9), t(9;22) alterações 17p cariótipo complexo (mais de 3 alterações)	Cariótipo complexo (mais de 5 alterações)
Desconhecido	Todas as outras aberrações clonais, com menos de 3 alterações	Categoria não reconhecida

Quadro I.2: Classificação das LMAs de acordo com a presença de alterações citogenéticas.

SWOG: Southwestern Oncology Group; MRC: Medical Research Council. Adaptado de Rowe JM et al, 2001

Ambas a classificações concordam em alguns pontos: o grupo de risco favorável inclui as alterações t(15;17), t(8;21) e Inv16 / t(16;16), e o grupo desfavorável inclui pacientes com anormalidades nos cromossomos 5 / 7 / 3(q-), na região 11q23, a t(9;22) ou cariótipo complexo. No entanto, a maioria dos pacientes com LMA apresenta cariótipo normal ou alterações citogenéticas não recorrentes de significado desconhecido, sendo classificada como de risco intermediário e constituindo um grupo heterogêneo em relação à resposta clínica.⁵⁴ Desta forma, a maior parte dos casos de LMA não apresenta marcadores citogenéticos e tem sido crescente a busca de novos parâmetros de valor prognóstico.⁵⁵

I.4.1. Descrição das principais alterações genéticas na LMA

I.4.1.1. Translocações cromossômicas

Várias alterações cromossômicas foram descritas na LMA e algumas alterações recorrentes associam-se a um subtipo FAB particular. A incidência das principais alterações na LMA pode ser observada no gráfico abaixo (Figura I.4):

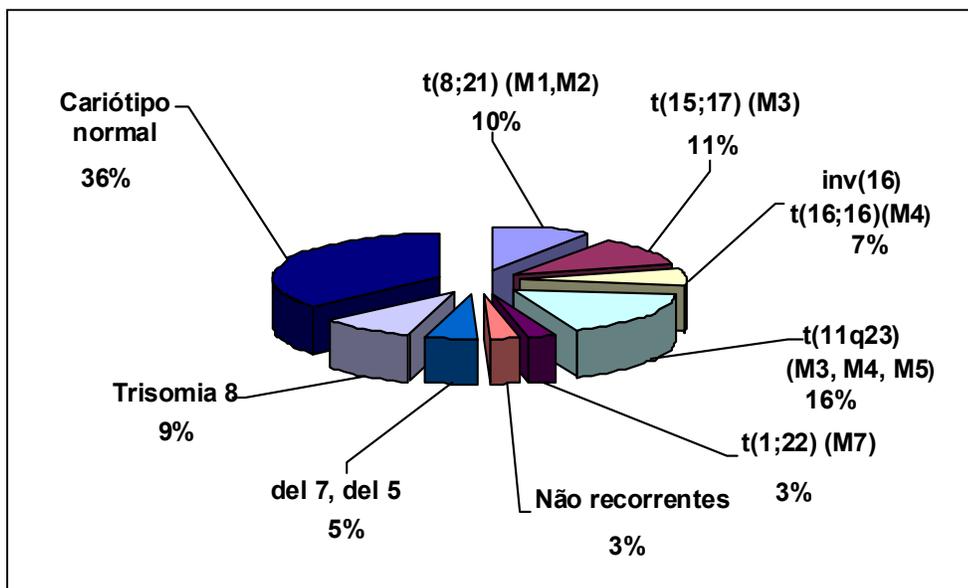


Figura 1.4: Frequência das alterações cromossômicas na LMA infantil. Adaptado de Giles et al,2002⁵⁵

A partir da clonagem dos genes presentes nas translocações cromossômicas recorrentes na LMA foi possível caracterizar três grupos distintos com base nos mecanismos moleculares envolvidos: (1) o fator de ligação ao núcleo (“Core Binding Factor” / *CBF*), (2) o receptor α do Ácido Retinóico, (*RAR α*) e (3) o gene *MLL* (Myeloid / Lymphoid Leukemia).⁵⁶

1.4.1.1. a. Translocações envolvendo genes codificantes de CBF

As translocações que envolvem genes que codificam fatores de transcrição com atividade nuclear envolvem principalmente os genes *AML1* - “Acute Myeloid Leukemia” 1 e *CBF β* - “Core Binding Factor” subunidade β , os quais produzem subunidades de um complexo regulador da transcrição, essencial para a ativação de vários genes.⁵⁷

CBF é um heterodímero formado pela subunidade α ou *AML1* que, em condições normais, se liga diretamente com o DNA através de um complexo formado com a subunidade *CBF β* , que estabiliza a ligação de *AML1*. A ativação da transcrição por *CBF* ocorre devido ao remodelamento da cromatina, causado pelo aumento do estado de acetilação das histonas, levando à ativação dos promotores de genes envolvidos na diferenciação mielóide, tais como *IL-3*, *GM-CSF*, *M-CSF* e *MPO*.⁵⁷

A alteração da transcrição gênica normal pode ocorrer pela perda da função do complexo regulador devido ao efeito repressor das proteínas de fusão formadas pela t(8;21), com a translocação do gene *AML1* no cromossomo 21 ao gene *ETO* no cromossomo 8, e pela inv(16), com a fusão do gene *CBF β* na região 16q ao *MYH11*. É interessante notar que as leucemias que envolvem o fator de transcrição CBF estão associadas a bom prognóstico, favorecendo a hipótese de que mecanismos moleculares similares têm as mesmas conseqüências funcionais.⁵⁸ Ambos os processos serão detalhados a seguir:

t(8;21) (q22;q22)

A t(8;21) é uma das alterações citogenéticas mais freqüentes nas LMAs, especialmente em crianças. Está presente em maioria no subtipo FAB M2 mas também pode ser encontrada em pacientes com morfologia FAB M1, M4 e LMA secundária. Ela ocorre em cerca de 12% das LMAs de novo em crianças e 5 a 8% em adultos jovens, tendo sido associada em diversos estudos a um prognóstico favorável.⁵⁹

A t(8;21) foi descrita por Rowley em 1973⁶⁰ e resulta na fusão do gene *AML1* (cromossomo 21q22), também conhecido como *CBF α 2* - “Core Binding Factor”, subunidade α 2, com o gene *ETO* – “Eight Twenty One” (cromossomo 8q22), com a formação de um gene de fusão (*AML1-ETO*) no derivativo do cromossomo 8. Produtos de fusão resultantes da translocação recíproca no derivativo do cromossomo 21 (*ETO-AML1*) não foram identificados. O ponto de quebra no cromossomo 21q ocorre entre os éxons 5 e 6, enquanto no cromossomo 8q22 a quebra ocorre acima do éxon 2.⁶¹

O transcrito *AML1-ETO* pode ser detectado por reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) em todos os pacientes que apresentem a t(8;21) e em alguns pacientes sem evidência da translocação pela análise do cariótipo.⁶²

A presença destas translocações crípticas indica a necessidade de análise do transcrito de fusão *AML1-ETO* por RT-PCR em todos os pacientes com LMA, à exceção daqueles com morfologia sugestiva de leucemia promielocítica aguda.⁶³

inv(16) (p13q22) / t(16;16) (p13; q22)

A inv(16) e menos frequentemente a t(16;16) foi observada em 10-12% das LMAs infantis e em 8-10% do adultos.⁶⁴ Apesar da maior parte dos casos ter sido identificada em pacientes do grupo FAB LMA-M4Eo, esta alteração pode ser encontrada em casos de LMA M2, M4 ou M5 e é caracterizada por um prognóstico favorável⁶⁴. Estudos recentes mostram que até 30% dos casos com inv(16) não apresentam as características clássicas M4Eo e tem clinica heterogênea.⁶⁵

A inv(16) e a t(16;16) resultam na fusão do gene *CBF β* (cromossomo 16q22) com o gene da cadeia pesada da miosina do músculo liso (*MYH11* – *Myosine Heavy Chain 11* - cromossomo 16p13). Esta fusão incomum entre um fator de transcrição e uma proteína citoplasmática leva à re-localização do FT para fora do núcleo, levando à perda da regulação da transcrição normal.

Vários ensaios de RT-PCR foram desenvolvidos para a detecção do transcrito de fusão *CBF β -MYH11* e tem sido detectada a grande heterogeneidade molecular destes transcritos em amostras de diferentes pacientes. Isto se deve a pontos de quebra variáveis tanto no gene *CBF β* quanto no *MYH11*, além de *splicing* alternativo subsequente.³⁵ Isto torna a análise citogenética difícil e mostra a importância do uso da biologia molecular para fazer um diagnóstico preciso da LMA com inv(16) ou t(16;16).⁶⁶

1.4.1.1. b. Translocações envolvendo o receptor α do Ácido Retinóico (*RAR α*)

As alterações envolvendo o gene *RAR α* também afetam a ativação de genes específicos pelo remodelamento da cromatina. Este gene codifica um receptor nuclear, dependente de ácido retinóico, com domínio de ligação ao DNA e outro domínio responsável pela ligação ao ácido retinóico e pela dimerização do receptor. A regulação positiva de *RAR α* em presença de ácido retinóico é feita pela ligação de co-ativadores a *RAR α* . Esta interação leva ao aumento de acetilação das histonas, com remodelamento da cromatina, e conseqüente aumento da transcrição. Em contraste, a regulação negativa de *RAR α* é mediada por um co-repressor (NcoR) que recruta um complexo repressor cuja atividade diminui a acetilação das histonas, e inibe a transcrição.

Na maior parte dos casos de Leucemia Promielocítica Aguda (LPA, M3/M3v), o gene de fusão encontrado é o *PML-RAR α* resultado da t(15;17). Entretanto, a LPA não é uma doença homogênea do ponto de vista molecular podendo apresentar a fusão do gene *PLZF* com o gene *RAR α* resultando na t(11;17). *PML-RAR α* e *PLZF-RAR α* se ligam constitutivamente a NcoR, levando a repressão da transcrição.⁶⁷

A administração de ácido all-*trans* retinóico (ATRA) vem sendo realizada com sucesso na LPA, uma vez que a adição de ATRA em doses farmacológicas promove a dissociação entre *PML-RAR α* e seus repressores, o recrutamento de co-ativadores, o remodelamento da cromatina e ativação da transcrição. Entretanto, *PLZF-RAR α* apresenta dois sítios de ligação a NcoR, e mesmo em presença de ATRA ocorre o recrutamento do complexo repressor e a inibição da transcrição é mantida. Isso se reflete na resposta terapêutica dos pacientes portadores da t(11;17) como uma resistência à indução com o ATRA.⁶⁸

t(15;17)(q22q21)

A t(15;17) foi descrita em 1977⁶⁹ e resulta da fusão do gene *PML* – “Promyelocitic Leukemia” (cromossomo 15q22) com o gene *RAR α* (cromossomo 17q21) gerando os transcritos de fusão *PML-RAR α* e *RAR α -PML*, nos cromossomos derivativos 15 e 17 respectivamente. Três pontos de quebra genômica diferentes podem ocorrer no gene *PML*: íntron 3 (*bcr3* – “breakpoint cluster region 3”), íntron 6 (*bcr1*) e éxon 6 (*bcr2*). Desta forma, apesar de o ponto de quebra no gene *RAR α* ocorrer sempre no segundo íntron, há grande heterogeneidade de transcritos *PML-RAR α* detectados na LPA, podendo ser curto (*bcr3*, 40% dos casos), longo (*bcr1*, 55%) e variável (*bcr2*, 5%). A t(15;17) é detectada em cerca de 5 a 15% da LMA de infância e em 12 a 14% de adultos jovens. Valores discrepantes de incidência de LPA em alguns grupos populacionais revelam que a diferença geográfica pode ter um papel importante na leucemogênese.^{70,71,72} A doença caracteriza-se por uma síndrome hemorrágica grave e trata-se de uma emergência clínica. A descoberta da sensibilidade dos blastos com a t(15;17) ao ATRA revolucionou o tratamento dos pacientes, o que torna os torna o subtipo de LMA com maior potencial de cura.⁷³ Sendo assim, uma vez que a análise morfológica e imunofenotípica não são suficientes para distinguir as LPAs e a citogenética convencional não detecta 100% dos casos de t(15;17), torna-se essencial ao diagnóstico a análise por RT-PCR para que sejam

identificados os pacientes que se beneficiarão com ATRA e que deverão ser acompanhados para avaliação de DRM ao longo do tratamento.⁷⁴

Translocações variantes

Apesar de a LPA estar associada em sua grande maioria à t(15;17), cerca de 10% dos casos não apresentam esta translocação. Em torno de 1% dos casos estão associadas à t(11;17)(q23;p11), que resulta na fusão do gene *PLZF* (cromossomo 11q23) com o gene *RARα* e se caracteriza por ausência de resposta ao ATRA. Foram descritos ainda outros genes parceiros como *NPM* (“Nucleophosmin”), *NuMa* (“Nuclear Mitotic Aparatus”) e o *STAT5b* (“Signal Transducer and Activator of Transcription 5b”), associados a t(5;17)(q35;q21), t(11;17)(q13q21) e der(17) respectivamente. Estudos recentes demonstraram a boa resposta dos pacientes com fusões envolvendo NPM e NuMa ao ATRA.⁷⁵

I.4.1.1.c. Translocações envolvendo o gene *MLL*

O gene *MLL* codifica uma proteína de estrutura complexa com um domínio de ligação ao DNA e outro com homologia a reguladores de genes homeóticos (reguladores de processos básicos do desenvolvimento), o que sugere seu papel de regulador de importantes genes essenciais para o desenvolvimento normal e a hematopoiese. O gene *MLL* foi identificado nas translocações recorrentes envolvendo o cromossomo 11 locus q23 (11q23), descritas em síndromes mielodisplásicas e leucemias agudas, especialmente nas LLAs de lactentes como já foi abordado na descrição da t(4;11).⁷⁶

Nas LMAs as alterações envolvendo *MLL* podem ser encontradas em qualquer subtipo FAB, mas predominam no subtipos M4 e M5 e são frequentemente associadas à LMAs secundárias a terapias. Existem ainda relatos de duplicação parcial ou em tandem do gene *MLL*, tendo sido o primeiro marcador observado em LMAs com citogenética normal. A detecção das alterações que envolvem o gene *MLL* por PCR não é recomendada pela imensa diversidade dos genes parceiros, e deve ser feita preferencialmente por *FISH*, com exceção das LLAs com t(4;11).⁷⁷

Estudos clínicos demonstraram associação entre a presença de rearranjos na região 11q23 e a evolução desfavorável da doença, frequentemente associados à má

resposta à terapia, no entanto há relatos de evolução favorável de pacientes com translocações envolvendo a mesma região do gene, o que sugere a presença de alterações genéticas secundárias.⁷⁸

I.5. Alterações genéticas adicionais nas leucemias agudas

Embora a identificação de alterações cromossômicas seja a base para a abordagem diagnóstica atual, sozinhas elas não são suficientes para o aparecimento das leucemias agudas.⁷⁹ Torna-se cada vez mais evidente que alterações que desregulam genes como *FLT3* e *c-KIT*, *N-RAS* e *K-RAS*, alterando seus produtos tirosinas quinases envolvidos na regulação de vias intracelulares de transdução de sinais de morte e proliferação celular, atuam em colaboração com os fatores de transcrição resultantes das translocações e são necessárias para a aquisição do fenótipo maligno da leucemia aguda.

Recentemente demonstrou-se que mutações no gene *FLT3*, que codifica um receptor tirosina quinase, é uma das alterações genéticas mais frequentes nas LMAs, tendo sido posteriormente descrito também nas LLAs, com menor frequência. O gene que codifica a proteína FLT3 (“Fms-like tyrosine kinase-3”, também conhecido como FLK-2 de fetal liver kinase-2” e STK-1 de “human stem cell kinase-11”) foi clonado pela primeira vez em 1991 por 2 grupos independentes e tem muitas seqüências semelhantes aos demais receptores de tirosina quinase do tipo III. Este subgrupo de proteínas da família TRKIII que inclui ainda *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) e KIT, é caracterizado por um domínio extracelular composto de 5 domínios do tipo imunoglobulina (Ig-like) e por um domínio citoplasmático do tipo tirosina quinase.⁸⁰

O gene codifica uma proteína de 993 aminoácidos no homem e 1000 no rato, sendo expressa em células hematopoiéticas imaturas, placenta, gônadas e cérebro. O ligante de FLT3 foi clonado em 1993 e trata-se de uma proteína transmembrana do tipo 1 ou proteína livre homodimérica solúvel, sendo expressa em células do microambiente da medula óssea, incluindo fibroblastos, linhagens precursoras de células mielóides e linfóides. Tanto as formas solúvel quanto transmembrana podem

ativar o domínio tirosina quinase do receptor FLT3 e estimular o crescimento de células progenitoras na medula e no sangue.⁸¹

Em condições normais, a transcrição do gene *FLT3* codifica uma proteína monomérica constituída por um domínio extracelular, uma região transmembrana, um domínio justamembrana (JM) e dois domínios tirosina-quinase intracelulares. Em presença de ligante ocorre a dimerização de monômeros seguida da fosforilação de substratos efetores de vias intracelulares de transdução de sinal. As principais vias acometidas pela ativação do *FLT3* são a *PI3K* (*phosphatidylinositol 3-Kinase*), as vias do *RAS/MAPK* (*mitogen-activated Kinase protein*) e *STAT5* (*signal transducers and activators of Transcription 5*), resultando no aumento proliferativo e inibição da apoptose.⁸²

Estudos recentes apontam para a alta expressão da proteína FLT3 selvagem nas LAs, principalmente nas LLAs B (97%), além das LMAs (87%) e das LLAs T(13%) porém não se sabe o mecanismo de atuação uma vez que estudos mostraram não haver aumento da expressão de FLT3 ligante.^{80,83}

As alterações no gene *FLT3* podem ser de 2 tipos: duplicações internas em tandem (DIT) ou mutações pontuais. Ambas resultam na ativação constitutiva do receptor independente de ligante e ativação das vias de transdução de sinais subseqüentes, ocasionando proliferação celular e bloqueio da diferenciação em estágios precoces do processo de maturação. Recentemente foram descritas alterações menos frequentes em outras regiões do gene, nos éxons 14, 17 e 20, também conferindo a auto-ativação do receptor.^{84,85,86}

1.5.1. Duplicação interna em tandem no gene *FLT3*

A alteração mais freqüente é a Duplicação Interna em *Tandem* (DIT) nos éxons 14 e 15 de *FLT3* (previamente descritos como éxons 11 e 12), que ocorre em 15-35% dos pacientes com LMA e em 5-10% das LLAs.^{80,87} O grupo do Dr Nakao foi o primeiro a descrever em 1996 a duplicação em tandem no domínio justamembrana (JM) de um alelo de *FLT3* em pacientes com LMA.⁸⁸ A *DIT-FLT3* pode variar de local dentro dos éxons 14 e 15 ou íntron 14, mas ocorre sempre *in-frame*, ou seja, não altera o marco de leitura, e produz uma proteína com domínio JM sem a capacidade auto-inibitória, levando à auto-ativação do receptor.

O modelo molecular do funcionamento da proteína alterada foi descrito através de estudos *in-vitro* os quais demonstraram a dimerização descontrolada do domínio JM produzido por *DIT-FLT3*, o qual perde a capacidade auto-inibitória e permite a dimerização dos receptores independente de ligante, resultando na auto-fosforilação e promovendo crescimento autônomo das células mutantes.⁸⁹

Foram realizados vários estudos para a determinação do valor prognóstico de *DIT-FLT3* nos pacientes com leucemia aguda.⁹⁰

Na LMA a *DIT-FLT3* foi descrita em 5-15% das crianças e 25-35% dos adultos.⁷⁹ Foi observada em todos os subtipos FAB, mas nos adultos sua prevalência não é randômica, sendo rara na LMA M2 e mais prevalente nas LMAs de cariótipo normal e na M3. Nas crianças a associação com cariótipo normal ou com FAB M3 é reduzida e especula-se a maior frequência nos subtipos M1/M2. A importância clínica das mutações em *FLT3* na LMA foi estabelecida a partir da estreita correlação entre a presença de *DIT-FLT3* com leucocitose, alto percentual de blastos e pior resposta terapêutica.^{91, 92}

Estudos realizados em pacientes com LMA que apresentavam outras alterações de bom prognóstico como a t(8;21) e inv 16 encontraram baixa incidência de *DIT-FLT3* e associação com leucocitose, o que indica que a *DIT* exerce um efeito biológico proliferativo nos casos de LMA que supostamente tinham baixo risco de recaída devido à presença destes genes de fusão. No entanto, nem todos os grupos identificaram alteração de sobrevida na presença das alterações em conjunto. Alguns grupos detectaram ainda a presença de *DIT-FLT3* concomitante à duplicação parcial em tandem do gene *MLL* (*PTD-MLL*), a qual apresenta valor prognóstico ruim quando detectada sozinha e ainda pior com ambas as alterações.⁹³

Sendo assim o valor prognóstico de *DIT-FLT3* associado a outras alterações ainda não foi bem estabelecido uma vez que a literatura traz trabalhos com *DIT* associado a altos níveis de recaída, com os níveis de remissão iguais aos do grupo sem esta alteração, ou até mesmo associado à boa resposta clínica.^{94, 95}

Foram também observadas diferenças quanto ao valor prognóstico da *DIT-FLT3* quando comparada a LMA do adulto e da criança. Estas foram atribuídas ao mecanismo molecular de perda do alelo selvagem contribuindo para a agressividade do clone leucêmico. As duplicações em *FLT3* são encontradas na maioria dos casos em heterozigose, mas existem casos de homozigose. Acredita-se que este seja um evento pós-leucêmico que confira resistência às células, sendo assim a variação na

relação entre alelo mutado e alelo selvagem (taxa alélica) pode ser a explicação para o valor prognóstico adverso encontrado.⁹⁶ Recentemente um estudo multicêntrico com a colaboração de vários países relatou a incidência de *DIT* em 600 crianças (12%) e não encontrou diferença evolução clínica em relação ao grupo controle sem a alteração. No entanto o estudo da taxa alélica revelou impacto significativo da perda do alelo selvagem na sobrevida dos pacientes com a duplicação.⁹⁷

Na LLA de origem B, por outro lado, a presença *DIT-FLT3* foi descrita em baixa incidência (1% nos adulto e crianças), com valor prognóstico associado ao baixo índice de remissão.⁹⁸

Na LLA de origem T a incidência de *DIT-FLT3* descrita na literatura é baixíssima, porém Van Vlierberghe et al. relatou 2-3% de *DIT-FLT3* em crianças com LLA T, com prognóstico adverso.⁹⁹

1.5.2. Mutações pontuais no gene *FLT3*

As mutações pontuais no gene *FLT3* acometem a alça de ativação do segundo domínio quinase, e a mutação mais comum resulta da substituição de um resíduo de ácido aspártico na posição 835 do éxon 20 por um resíduo de tirosina (D835).¹⁰⁰ A alça de ativação é um componente comum aos receptores tirosina quinase e tem como função bloquear o acesso de ATP e do substrato ao domínio quinase quando o receptor está inativo. Com uma mutação pontual nesta região o receptor se encontra auto-ativado e assim como na presença de *DIT*, o controle da cascata de sinalização promovido por *FLT3* é perdido, levando à proliferação celular e bloqueio da diferenciação.¹⁰¹

A mutação foi descrita em cerca de 5-10% dos pacientes com LMA e têm sido relacionada ao pior prognóstico. Não foi encontrada associação com nenhum subtipo FAB específico e há relatos de detecção em pacientes com t(15;17) ou mesmo com *DIT-FLT3*. No caso da presença das duas alterações em *FLT3*, a baixa incidência (1,7%) relatada dificulta a avaliação do valor clínico, no entanto o prognóstico ruim parece prevalecer e estudos *in-vitro* sugerem a aquisição de resistência a terapias convencionais e alvo-específicas para o receptor.

Em bebês e crianças com LLA de origem B a mutação pontual de *FLT3* foi detectada na presença concomitante de alterações no gene *MLL* (15-18% dos casos com esta

alteração), ainda com valor prognóstico controverso.¹⁰² Foi também relatada associação de mutações pontuais em *FLT3* e crianças com cariótipo hiperdiploide (25-28%), com + 50 cromossomos, que normalmente é associado a um bom prognóstico. Na presença da mutação o risco de recaída aumentou, mostrando mais uma vez o papel proliferativo de FLT3.⁹⁴

Na LLA T um trabalho com adultos sugere a associação da presença de *FLT3-D835* com a expressão de CKIT/CD117 pelo clone leucêmico, conferindo pior prognóstico.

De maneira geral as alterações em *FLT3* são mais freqüentes nas LMAs (10-45% dos casos) e têm sido consideradas o fator prognóstico independente de maior valor, já sendo incorporada para determinação de risco e intensificação terapêutica nos protocolos recém atualizados utilizados nos países desenvolvidos.^{103,104} Por mais que haja discordâncias quanto à agressividade da doença, todos os estudos revelaram maior leucometria e menor taxa de remissão na presença da alteração.

Alguns estudos avaliam também a possibilidade de utilização das alterações em *FLT3* como marcadores tumorais para identificação de doença residual mínima. O fato é que foram observados ganhos e perdas de mutações no decorrer do tratamento, o que restringe o valor de *FLT3* como marcador indicativo de recaída.^{105,106}

I.6. Importância da detecção de alterações moleculares

Estudos *in vitro* comprovaram que tanto as translocações cromossômicas quanto as alterações em genes codificantes de receptores tirosina quinase, como o *FLT3*, sozinhas não são capazes de produzir a transformação maligna e ocasionar a leucemia. Isto reforça a teoria dos dois eventos de Knudson ("Two Hit Model")¹¹ e tem levado à busca por potenciais terapias alvo-específicas que restabeleçam a normalidade de ambas as vias de sinalização desreguladas na doença.

Novos fármacos destinados à inibição da via de ativação de FLT3 têm sido testados e a combinação com as terapias atuais seria preditiva do sucesso terapêutico das leucemias agudas, em substituição aos pesados regimes quimioterápicos atuais. No entanto, a aquisição de mutações no decorrer do tratamento tem representado um

empecilho aos fármacos testados, o que deve ser sanado em breve com o avanço das pesquisas com leucemias.¹⁰⁷

I.6.1 Utilização de métodos moleculares ao diagnóstico

Uma vez que as alterações genéticas são os principais fatores prognósticos utilizados no estabelecimento de terapias atuais contra a leucemia aguda, é fundamental a análise molecular de alterações genéticas ao diagnóstico. A importância da biologia molecular se deve à independência desta metodologia do sucesso de culturas celulares e obtenção de metáfases, que provoca falhas frequentes na análise citogenética, além da possibilidade de detectar alterações crípticas. A t(12;21) foi um dos primeiros exemplos descritos desta situação, na qual, mediante o emprego de métodos moleculares, foi observado que 15 a 25% dos pacientes com LLA apresentam esta alteração cromossômica. Outras translocações para as quais foram evidenciados alguns casos com a mesma situação são a t(8;21), a t(4;11), e a t(15;17).

Os métodos moleculares mais utilizados para a identificação de marcadores de prognóstico e grupos de risco terapêutico nas leucemias agudas são baseados na Reação em Cadeia da polimerase (PCR) a partir do DNA ou RNA (RT-PCR). O PCR pode ser de dois tipos: qualitativo para detecção ou quantitativo para aferição de carga tumoral utilizando, preferencialmente, a tecnologia de PCR em tempo real (*Real-time PCR*).

A aplicação de tais métodos no diagnóstico das leucemias agudas proporciona a detecção, desde o início, de marcadores tumorais específicos e universais que apresentam valor prognóstico e são utilizados para classificar os diferentes grupos de leucemia no momento do diagnóstico.

O trabalho colaborativo de 10 grupos europeus durante um período de 4 anos resultou na uniformização diagnóstica de RT-PCR qualitativo para detecção dos diversos genes de fusão.³⁵ A padronização gerou uma estratégia baseada em dois PCRs para cada gene de fusão (PCR *nested*) onde a sensibilidade final obtida varia de 10^{-3} a 10^{-5} . Esta uniformização diagnóstica foi o primeiro passo para que estudos multicêntricos pudessem ser estabelecidos. O mesmo grupo de laboratórios posteriormente uniformizou a detecção de mutações no gene *FLT3*. assim como a

quantificação dos genes utilizados como marcadores tumorais, permitindo a melhor análise do comportamento da doença ao longo do tratamento e a detecção precoce de DRM.

I. 6.1.1 Dinâmica do método de reação em cadeia da polimerase (PCR)

O método de PCR permite amplificar um segmento de DNA localizado entre duas regiões de seqüência conhecida. Essencialmente, trata-se de uma síntese de DNA *in vitro* a partir de dois oligonucleotídeos utilizados como iniciadores da reação (*primers*). O processo consiste em uma série de reações catalisadas por uma enzima DNA polimerase termoestável (*Taq* Polimerase) em condições físico-químicas específicas e ciclos térmicos pré-definidos. Os iniciadores são complementares aos extremos 5' e 3' de seqüências que flanqueiam a sequencia de DNA alvo da amplificação.

A PCR tem início a partir da desnaturação da dupla fita de DNA a 90-95°C, em presença de um excesso de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores e dos quatro deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP e dGTP). A seguir, a temperatura diminui até que um valor apropriado para a ligação complementar dos iniciadores com as seqüências correspondentes (temperatura de *annealing*) seja atingido. Logo após, a extensão do produto é obtida pela ação da *DNA polimerase*, na temperatura ideal para sua atividade.

A sucessão destas três etapas (desnaturação, *annealing* e polimerização) é conhecida como “ciclo”. O processo de PCR é baseado na repetição destes ciclos e, dado que os produtos de um ciclo servem como moldes para o próximo, a amplificação é exponencial. Em teoria, o método de PCR permite a amplificação de até 10 milhões de cópias de uma seqüência determinada de DNA a partir de poucas moléculas iniciais.

I.6.1.1.1 Detecção de clonalidade pela amplificação dos rearranjos das regiões variáveis dos genes de receptores de antígeno (RA)

Nas últimas décadas, vários métodos de PCR dirigidos à análise dos genes das IGs

e dos TCRs foram desenvolvidos, utilizando DNA extraído de células mononucleares do sangue periférico ou medula óssea de pacientes com suspeita de leucemia.¹⁰⁸

Estes métodos, embora se diferenciem na eleição da seqüência e localização dos oligonucleotídeos iniciadores, compartilham os mesmos princípios: (a) o DNA dos genes em configuração nativa não é amplificado, devido às longas distâncias entre os segmentos gênicos não rearranjados; (b) o produto da amplificação das populações policlonais estará formado por inumeráveis “amplicons” ou produtos de tamanhos diferentes (correspondentes aos diferentes rearranjos existentes na população) que irão gerar um rastro quando submetidos a eletroforese; (c) sendo os genes de RAs produtos específicos de linhagem e as leucemias originadas de um mesmo clone, de acordo com as propriedades intrínsecas do método de PCR, o rearranjo clonal será amplificado preferencialmente, gerando uma banda discreta visível sobre um fundo de bandas policlonais (pertencentes às populações de linfócitos normais).⁵⁰

A sensibilidade do método de PCR é diferente de acordo com o propósito da análise. Na determinação de rearranjos gênicos monoclonais, a amplificação não é específica para o DNA neoplásico, sendo que a possibilidade do diagnóstico dependerá da visualização de um sinal de amplificação discreto (proveniente da população monoclonal) sobreposto a um *background* difuso (população policlonal). A sensibilidade do método nestas condições dependerá do set de *primers* e número relativo de células mono e policlonais incorporadas na reação. A sensibilidade final estabelece a possibilidade de se detectar uma célula monoclonal, dentre 10^2 - 10^3 células policlonais.¹⁰⁹

I. 6.1.1.2 Detecção de genes de fusão por reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR)

As translocações representam outra forma de rearranjo gênico (intercromossômico), mas, contrariamente aos rearranjos dos genes de RAs, estas não ocorrem nas células normais (não nos níveis de detecção dos métodos aplicados ao diagnóstico).¹¹⁰

Nas leucemias agudas, a maior parte das aberrações cromossômicas com genes de fusão possui regiões de quebra muito distantes, difíceis de serem detectadas por PCR de DNA. Para isto seria necessário detectar o ponto de quebra específico de

cada paciente. Entretanto, a maioria dos genes de fusão é transcrita em RNA mensageiro, que pode servir de alvo para uma PCR após a transcrição reversa (RT-PCR) do RNA em DNA complementar (cDNA).

O método de RT-PCR permite detectar com extrema sensibilidade e especificidade os equivalentes moleculares de translocações cromossômicas, em virtude do conhecimento atual das seqüências gênicas envolvidas e da possibilidade de desenhar oligonucleotídeos iniciadores complementares a estas. Desta forma, tem-se vantagem em relação à análise citogenética convencional, pela sua rapidez e segurança na detecção dos equivalentes moleculares.¹¹¹

Este método, em virtude da sua sensibilidade, constitui a ferramenta mais apropriada para detecção da doença residual mínima, permitindo detectar precocemente a presença de células residuais (presença de baixa carga tumoral), aumentando as chances do sucesso de eventuais intervenções terapêuticas.¹¹²

Neste trabalho, foi tomado como referência o método de RT-PCR proposto pelo programa europeu de unificação de critérios de diagnóstico e acompanhamento da doença residual mínima nas leucemias agudas "Biomed-1 Concerted Action" (Van Dongen *et al*, 1999), visando obter resultados comparáveis aos grandes centros de diagnóstico e tratamento de doenças hematológicas.

1.6.1.1.3. Detecção das alterações em FLT3

As alterações no gene *FLT3* foram detectadas através PCR a partir de DNA utilizando primers específicos para a duplicação ou para a mutação pontual, flanqueando a região de conhecida instabilidade genômica em que ambas aparecem. Apesar de a literatura apontar para problemas da utilização deste método durante o acompanhamento para monitorar a carga tumoral, os pacientes que recaíram foram analisados para a presença das alterações.

I.7. Avaliação da Doença Residual Mínima

Os métodos moleculares empregados também se mostram úteis para a obtenção de marcadores aplicáveis à detecção de doença residual mínima (DRM), entendida como a persistência de células malignas ao longo do tratamento não detectada por métodos menos sensíveis como o hemograma ou mielograma.¹¹³

O acompanhamento molecular do curso clínico do paciente requer a identificação de marcadores tumorais os quais são seguidos ao longo da aplicação dos protocolos terapêuticos para avaliar a existência de DRM, que pode vir a ser causa da recaída da doença. Nos grandes centros para diagnóstico e tratamento das leucemias nos países desenvolvidos é realizado um seguimento freqüente dos marcadores identificados ao diagnóstico: uma nova avaliação molecular é realizada ao final da indução da remissão e de tempos em tempos para a avaliação temporária da consolidação e manutenção. É então reavaliado o risco de recaída e o paciente em remissão medular é periodicamente examinado para o controle da doença. Uma vez detectada a recaída molecular, a terapia é retomada ou intensificada para prevenir a recaída hematológica.

Mesmo nestes locais o gene *FLT3* não é utilizado como marcador de DRM pela instabilidade de suas mutações. Alguns grupos já vêm realizando de rotina o acompanhamento molecular da LLA por PCR em tempo real para rearranjos de receptores de antígenos, o que fornece uma excelente opção uma vez que nem todos os pacientes apresentam outro marcador ao diagnóstico, possibilitando inclusive a análise de LLA de origem T.¹¹⁴

No Brasil a possibilidade de diagnóstico molecular é restrita aos institutos das grandes cidades e o acompanhamento molecular de todos os pacientes representa um enorme custo mesmo para os laboratórios mais importantes do país. Sendo assim, o envio seqüencial de material é prioridade dos pacientes que se beneficiam de terapia alvo-específica para *BCR-ABL* ou *PML-RAR α* . Estudos pilotos, no entanto, tentam implementar nos pacientes que têm acesso à análise cito-molecular o PCR em tempo real para avaliar DRM nas LLAs¹¹⁵, o que espera-se que seja expandido para os demais centros no país para que seja introduzida a mentalidade de acompanhamento da DRM como fator crucial para intensificação terapêutica.¹¹⁶

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivos Gerais

- Aplicação de uma abordagem diagnóstica integrada para caracterizar o perfil genético de crianças com leucemia aguda (LA), visando identificar marcadores biológicos com valor clínico;
- Estabelecimento do valor prognóstico de cada marcador molecular encontrado na LA.

II.2 Objetivos Específicos

- Análise da presença de translocações de risco, por RT-PCR para detecção dos transcritos de fusão *BCR-ABL*; *MLL-AF4*; *TEL-AML1*; *PBX1-E2A*; *PML-RAR α* , *AML-1-ETO*, *CBF β -MYH11*.
- Detecção das alterações do gene *FLT3* visando determinar o valor prognóstico da presença da duplicação em *tandem*, de mutações pontuais e de perda do alelo selvagem em pacientes com LMA e com LLA.
- *Screening* de marcadores a serem utilizados para o acompanhamento da DRM.

III. PACIENTES E MÉTODOS

III.1. Pacientes em estudo

Foram estudadas amostras de 328 crianças com suspeita diagnóstica de leucemia aguda *de novo* ou secundária encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Transplantes de Medula Óssea do Instituto Nacional de Câncer (CEMO-INCa), no período entre fevereiro de 2000 a agosto de 2006, provenientes em sua maioria dos seguintes serviços:

1. Serviço de Hematologia do Instituto Nacional de Câncer (INCa), Rio de Janeiro/RJ;
2. Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF-UFRJ);
3. Serviço de Hematologia do Hospital Pedro Ernesto (HUPE) da Universidade Estadual do Rio de Janeiro;
4. Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes da Universidade Federal do Espírito Santo (HUCAM-HUFES);
5. Serviço de Hematologia do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HI), Vitória/ES
6. Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), Belo Horizonte, MG;

Das 328 crianças enviadas, 284 tiveram diagnóstico confirmado e foram incluídas neste estudo.

III.1.1. Tipo de estudo e critérios de Inclusão

Este estudo foi do tipo não seqüencial e retrospectivo para as crianças dos centros de origem 2, 3, e 6 e seqüencial e prospectivo para os pacientes provenientes do centro de origem 1,4 e 5. Os critérios de inclusão considerados foram: (1) pacientes entre 0-18 anos, (2) confirmação diagnóstica de leucemia aguda, (3) disponibilidade de material para análise molecular e (4) disponibilidade de dados clínicos na instituição de origem, tais como leucometria, percentagem de blastos, análise morfológica ao diagnóstico, datas de nascimento, remissão, recaída e óbito.

III.1.2. Critérios de Exclusão

Foram excluídos deste grupo de estudo os pacientes que apresentaram as seguintes condições: (1) Pacientes classificados pela análise imunofenotípica e molecular como leucemia mieloide crônica, linfoma linfoblástico, anemia de fanconi, anemia aplástica, síndrome mieodisplásica e linfoma de Burkitt; (2) Ausência de amplificação para os genes constitutivos de tamanho necessário para o sucesso da abordagem molecular para evitar a obtenção de resultados falso-negativos por PCR devido à qualidade da amostra; (3) Impossibilidade de obtenção de dados clínicos dos centros de origem.

III.1.3. Características das amostras

Foram utilizadas amostras de aspirado de medula óssea (MO) e sangue periférico (SP) de 284 crianças com confirmação diagnóstica de LA, posteriormente definidos como de origem linfóide ou mielóide de acordo com a positividade para marcadores de linhagem celular obtidos por citometria de fluxo. Como população controle foram utilizados 10 doadores de MO de pacientes do CEMO no INCa. Linhagens celulares positivas para os rearranjos dos genes que codificam a porção variável da cadeia pesada da imunoglobulina (IGH) (CEMO-1)¹¹⁷ e para os genes de fusão analisados (RSI, REH, ACC-42, K562, KASUMI e NB4)¹¹⁸ foram utilizadas como controles positivos para as alterações gênicas.

As amostras recebidas foram obtidas ao diagnóstico provenientes do mielograma de rotina dos centros de origem, realizado nos pacientes com suspeita de LA.

As amostras provenientes de outros estados foram enviadas dentro de caixas de isopor, em temperatura ambiente, devidamente identificadas, via correio e chegando ao laboratório no máximo 24 horas após a coleta.

O material foi enviado em seringa heparinizada após a retirada da agulha ou em tubo com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) para evitar coagulação. Nos casos de aspirado seco, amostras de SP foram utilizadas sempre que o percentual de blastos estivesse acima de 40%.

As amostras foram encaminhadas dos centros de origem com o protocolo de envio preenchido pelo médico contendo seus dados clínicos relevantes. Ao chegarem, todas as amostras receberam numeração específica do laboratório. Os dados de acompanhamento dos pacientes foram fornecidos pelos centros de origem ou obtidos pela análise dos prontuários.

III.1.4. Definições

Para a análise das características dos pacientes e o impacto destas na resposta a terapia, seus dados clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e citogenéticos foram registrados em planilhas.

Aos efeitos de análise, as alterações moleculares foram consideradas de bom ou mau prognóstico conforme relatado previamente na literatura.

Nas LLAs de origem B a presença dos genes de fusão *BCR-ABL*, *MLL-AF4* ou *PBX1-E2A* foi considerada de mau prognóstico e a presença do gene *TEL-AML1*, de bom prognóstico.

Nas LMAs a presença dos gene de fusão *BCR-ABL* foi considerada de mau prognóstico e os *AML1-ETO*, *CBF β -MYH11* e *PML-RAR α* de bom prognóstico.

Alterações no gene *FLT3* foram consideradas de mau prognóstico de maneira geral.

Nos dois tipos de LA os protocolos de tratamento foram adaptados ao risco de recaída de acordo com os fatores prognósticos obtidos ao diagnóstico. O tratamento da LA consiste em 4 blocos: indução da remissão, tratamento profilático do SNC, consolidação e manutenção.

Na LLA as dosagens e drogas variaram de acordo com a utilização do protocolo BFM-95 (Berlim-Frankfurt-Munster, 1995) ou do GBTLI-93 (Grupo Brasileiro, 1993), dependendo da instituição. Os protocolos no total chegam a quase 5 anos de tratamento.

Na LMA os protocolos utilizados pelas diferentes instituições foram baseados no protocolo alemão BFM, constituído de uma pré-fase (feita em pacientes com contagem de leucócitos acima de 100.000/mm³ ou visceromegalia considerável) e três fases (indução da remissão, consolidação, manutenção). A terapia de manutenção se estende até completados dois anos de tratamento, contados a partir do início da fase de indução¹¹⁹. Os pacientes positivos para t(15;17) receberam ATRA. Para ambas as leucemias agudas, em caso de recaída ou não resposta foi utilizado o protocolo BFM para recaída, além da indicação ao TMO.

A remissão clínica completa foi definida pela análise morfológica da MO quando esta apresentava menos de 5% de blastos. A análise morfológica da MO para avaliação da remissão foi realizada ao final do período de indução, de acordo com os pareceres dos médicos da instituição de origem.

A sobrevida global foi definida como o período entre o diagnóstico e a morte do paciente pela doença ou por qualquer outro motivo (pneumonia, infecção associada, cardiopatia). A sobrevida livre de eventos foi definida como o período entre a remissão e a recaída hematológica. Os pacientes que tiveram perda de seguimento ou abandono de tratamento foram censurados na data da última visita.

III.2. Análise Citomorfológica

O diagnóstico morfológico foi realizado na instituição de origem pelos médicos assistentes de acordo com os critérios do grupo FAB.

III.3. Análise Imunofenotípica

Amostras provenientes do Hospital Infantil foram analisadas pela equipe técnica do Laboratório Progenética, as demais amostras do Espírito Santo foram analisadas pela Dra Virgínia Pires no Laboratório de Biologia Molecular do CEMO. As amostras do Rio de Janeiro e Minas Gerais foram analisadas pela equipe do Laboratório de Imunologia do CEMO.

A classificação imunológica das leucemias baseou-se na imunofenotipagem de células em suspensões incubadas com anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados a um determinado fluorocromo através de imunofluorescência direta com leitura por

citometria de fluxo. Essa metodologia é capaz de detectar antígenos intracitoplasmáticos ou de membrana, de acordo com o tipo de preparação da amostra. O perfil imunofenotípico dos pacientes foi estudado por citometria a partir de suas amostras de MO ou SP. A técnica foi realizada por imunofluorescência direta, por intermédio de AcMo contra antígenos celulares de superfície e intracitoplasmáticos, após o tratamento das amostras de acordo com os processos convencionais. Foram realizadas duplas e triplas marcações, combinando AcMo conjugados aos fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou clorofil-peridina (PerCP). Cada amostra foi processada com um controle apropriado (IgG1 de camundongo conjugado com cada um dos fluorocromos), utilizado para definir a fluorescência negativa. A fluorescência foi lida no FACScan (FACScan, Beckton Dickinson).

III.4. Análise Citogenética

Amostras provenientes do Hospital Infantil foram analisadas pela equipe técnica do Laboratório Progenética, as demais amostras foram analisadas pela equipe do Laboratório de Citogenética do CEMO.

Resumidamente, as células neoplásicas foram colocadas em cultura (direta, 24 e 48 horas) e, após administração de colchicina por 50 minutos, 6 horas ou 12 horas foram analisadas por bandeamento GTG (banda G, tripsina, Giemsa). Os cariótipos foram descritos de acordo com o ISCN, 1995 (“International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 1995”)¹²⁰.

III.5. Análise Molecular

As amostras das 185 crianças com LLA foram avaliadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de rearranjo clonal nos genes dos receptores de antígeno de células B e T (IG e TCR). Das 148 LLAs de origem B, 106 possuíam material amplificável e foram analisadas por PCR após transcrição reversa (RT-PCR) para a detecção dos genes de fusão *PBX1-E2A*, *TEL-AML1*, *MLL-AF4* e *BCR-ABL*. Das 95 crianças com LMA, 75 possuíam material e foram analisadas para a detecção dos genes de fusão *BCR-ABL*, *AML1-ETO*, *CBFβ-MYH11* e *PML-RARα*,

também por RT-PCR. As alterações no gene FLT3 foram realizadas em 84 LMAs, 92 LLA de origem B e 22 LLA de origem T.

III. 5.1. Manipulação e processamento das amostras

Os materiais primários a partir dos quais se obtiveram os resultados apresentados neste trabalho foram o DNA e o RNAm extraídos de:

(1) células mononucleares isoladas de amostras de SP ou MO, por centrifugação em gradiente de Ficoll; (2) células crescidas em cultura.

III. 5.1.1. Separação de células mononucleares por centrifugação em gradiente de densidade

As amostras de SP e MO, previamente diluídas com igual volume de PBS, foram colocadas sobre um mesmo volume de Ficoll-Histopaque[®]-1077 (Sigma) e centrifugadas durante 20 minutos a 2000 rpm, a 20°C. Após centrifugação, o anel de células mononucleares obtido na interface foi recolhido e transferido a outro tubo e lavado pelo menos duas vezes com PBS. O resultado da centrifugação, “pellet”, foi ressuspendido em 1 mL de PBS e uma alíquota foi utilizada para cálculo do número de células/ amostra após contagem em câmara de Neubauer.

III. 5.1.2 Cultura de linhagens celulares

Neste trabalho, foram manipuladas células das linhagens celulares: ACC-45, REH, RSI, K562, KASUMI e NB4, gentilmente cedidas pelo Dr. Vanderson Rocha (Hôpital Saint Louis, Paris – França), utilizadas como fonte de RNA, servindo de controles positivos na análise dos genes de fusão *E2A-PBX1*, *TEL-AML1*, *MLL-AF4*, *BCR-ABL*, *AML1-ETO* e *PML-RAR α* respectivamente.

As células foram cultivadas em suspensão e mantidas à concentração de 1×10^6 células/mL em meio de cultivo completo RPMI-1640 (Sigma) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 100 UI/mL de penicilina (Sigma) e 50 μ g/mL de estreptomicina (Sigma), em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C em condições de esterilidade.

As células foram congeladas em recipientes apropriados, utilizando-se 1 mL de SFB contendo 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), a uma concentração de $1-2 \times 10^6$ células/mL, num total de $2-4 \times 10^6$ células/tubo. O processo de congelamento foi realizado gradualmente, até atingir uma temperatura de -80°C . Os tubos foram armazenados em nitrogênio líquido. O descongelamento foi realizado através da adição de 15 mL de RPMI-1640 suplementado com SFB (20%), seguido de centrifugação durante 7 minutos a 1200 rpm e lavagem em tampão PBS.

Repiques repetidos, nas mesmas condições descritas, foram realizados para a extração de DNA e/ou RNA.

III. 5.2 Métodos de extração de DNA

A extração do DNA, substrato das reações de PCR, das suspensões de células mononucleares e culturas foi realizada utilizando-se o reagente comercial para isolamento de DNA genômico DNAzol[®] (Gibco BRL) ou, nos casos de número insuficiente de células para ressuspensão em DNAzol[®], o reagente TRIzol[®] (Gibco BRL).

III. 5.2.1 Isolamento de DNA de alto peso molecular por DNAzol[®]

Uma alíquota das suspensões de células mononucleares e culturas, contendo de 1 a 3×10^7 células/mL, foi ressuspensa em 1 mL de DNAzol[®]. O processo de extração foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante em que o DNA foi precipitado a partir da adição de 0,5 mL de etanol absoluto (Merck) a 4°C . Após duas lavagens com etanol 95%, foi solubilizado em 300 a 500 μL de NaOH 8 mM, neutralizado com HEPES 0,1 M e armazenado em geladeira.

III. 5.2.2 Isolamento de DNA de alto peso molecular por TRIzol[®]

Amostras de pacientes que apresentavam celularidade insuficiente para ressuspensão em DNAzol[®], reagente específico para isolamento do DNA de alto peso molecular, e com diagnóstico para grupos de risco associados a translocações específicas que seriam analisadas por RT-PCR tiveram as células separadas para a extração de RNA em Trizol. De acordo com as recomendações do fabricante, após

remoção completa da fase aquosa (descrição no item III. 5.3), o DNA foi precipitado da interface e da fase fenólica com etanol absoluto e transferido para outro eppendorf. Para eliminar resquícios de Trizol, foi incubado com citrato de sódio 0.1M em etanol 10% durante uma hora e, após centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos, solubilizado em 300 a 500 µL de NaOH 8 mM, neutralizado com HEPES 0,1 M e armazenado em geladeira.

III. 5.2.3 Avaliação da qualidade do DNA extraído

A integridade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese de alíquotas dos extratos de DNA, em gel de agarose 0,8%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo e visualização sob luz ultravioleta. Nesta avaliação foi considerado DNA de alto peso molecular aquele com intensidade da fluorescência limitada à zona superior do gel, desta forma, DNAs com baixo índice de degradação foram utilizados para as reações de PCR específicas.

III. 5.3 Extração de RNA

Para possibilitar a detecção dos genes de fusão, é utilizado como fonte primária o RNAm que será posteriormente transcrito em cDNA para a realização do RT-PCR. Sendo assim, células mononucleares foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque[®]) e o RNA total foi extraído utilizando-se o reagente comercial para isolamento de RNA total TRIZOL[®] (Gibco BRL), baseado no método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi.¹²¹

III. 5.3.1 Considerações gerais

As ribonucleases (RNAses) são enzimas extremamente estáveis, presentes em virtualmente todas as células vivas e que atuam num amplo espectro de pH, com mínima necessidade de co-fatores.¹²² Desta forma, para evitar a degradação do RNA pelas RNAses, foram cumpridas no decorrer deste trabalho algumas medidas sistemáticas:

1. Todo o material utilizado na extração e manipulação do RNA foi armazenado separadamente e usado exclusivamente para esta finalidade;
2. Todo o material utilizado na extração e manipulação do RNA, bem como a bancada de trabalho foram descontaminados utilizando o reagente RNase Away™ (MBP), inibidor potente da atividade ribonucleásica;
3. Foram utilizadas luvas descartáveis durante a preparação dos reagentes e materiais a serem utilizados, bem como durante a extração e manipulação do RNA, limpas com água e etanol para retirar o excesso de talco e trocadas freqüentemente no decorrer destes procedimentos;
4. Foi utilizada água deionizada tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1% (v/v), inibidor inespecífico da atividade ribonucleásica, para o preparo de reagentes e solubilização do RNA.¹²³

III. 5.3.2 Isolamento de RNA por TRizol®

Uma alíquota das suspensões celulares (obtidas por separação por gradiente de densidade) ou das culturas de linhagens, contendo 5×10^6 células/mL, foi ressuspendida em 1 mL do reagente Trizol® e armazenadas a -20°C . A extração do RNA foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante: os lisados foram descongelados durante 5 minutos para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos; em seguida adicionou-se 300 μL de clorofórmio (Merck) para cada 1mL de Trizol usado e centrifugou-se a 12.000 rpm em 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido a um novo eppendorf e o RNA foi precipitado utilizando-se 500 μL de isopropanol (Merck), a -20°C , por centrifugação a 12000 rpm, 10 min. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75% de água com DEPC, solubilizado em água com DEPC e armazenado a -80°C .

III. 5.3.3 Quantificação e avaliação da qualidade do RNA extraído

A quantificação do RNA foi realizada por leituras a 260 nm, utilizando-se um espectrofotômetro GeneQuant II (Pharmacia Biotech). Considerou-se uma unidade de densidade ótica (DO) como equivalente a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNA.¹²⁴ A pureza das amostras foi avaliada por leitura a 280 nm (faixa de absorção das proteínas),

considerando-se como pura uma amostra de RNA com valor DO 260/280 próximo a 2,0.

A integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese de 1 µL de RNA, em gel de agarose 0.8%, contendo 0.5 µg/mL de brometo de etídeo e visualização sob luz ultravioleta. As frações predominantes do RNA ribossômico (RNAr), 28S (aproximadamente 5kb) e 18S (aproximadamente 2kb), servem como marcadores naturais de peso molecular quando o RNA é submetido à eletroforese e, em mamíferos, a banda 28S tem cerca do dobro da intensidade da 18S. A visualização das frações das duas subunidades de RNAr foi considerada evidência da integridade do RNA (Figura III.1). Uma amostra previamente quantificada com a concentração de 1,5 µg/µL foi utilizada como controle para a avaliação da qualidade do RNA em gel de agarose.

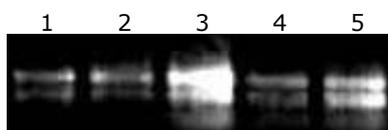


Figura III.1: Análise da qualidade do RNA extraído.

Slots 1 a 4: amostras com 1,1; 1,3; 2,7; 1,2µg de RNA; Slot 5: amostra padrão de 1,5 µg.

III. 5.4. Síntese de DNA complementar

A síntese de DNA complementar (cDNA), também chamada de retrotranscrição, foi padronizada com base no protocolo proposto pelo programa europeu de unificação de critérios de diagnóstico e acompanhamento da doença residual mínima nas leucemias agudas "Biomed-1 Concerted Action".³⁵ Um micrograma de RNA total purificado foi retrotranscrito para cDNA mediante a utilização de 1U de transcriptase reversa (Superscript[®]) e iniciadores randômicos Random Primers[®] (Gibco). O protocolo de retrotranscrição está detalhado no quadro III.1.

RETROTRANSCRIÇÃO (20 µL)*
1 µg de RNA
tampão RT (20 mM Tris HCl, 50mM KCl, pH 8.3)
MgCl ₂ : 5 mM
DTT: 10 mM
Iniciadores randômicos: 5 µM
RNAguard®: 20 unidades
Transcriptase reversa: 1 unidade
dNTP: 1 mM

Quadro III.1: Reação de retrotranscrição

* Perfil Térmico proposto por Van Dogen *et al*³⁵

Para averiguar a qualidade do cDNA foi realizada a amplificação do gene BCR, funcional e constitutivo de células normais, por reação de PCR *Multiplex*, de acordo com as especificações publicadas por Otazu *et al.*¹²⁵, como será descrito no item III. 5.5.5.2. Desta forma, a visualização do gene amplificado no gel de agarose confirma a síntese e a qualidade do cDNA, assegurando os resultados negativos posteriormente obtidos (Figura III.2). A ausência do gene indica falha na reação de RT a qual deve ser repetida alterando-se a quantidade de RNA na reação.

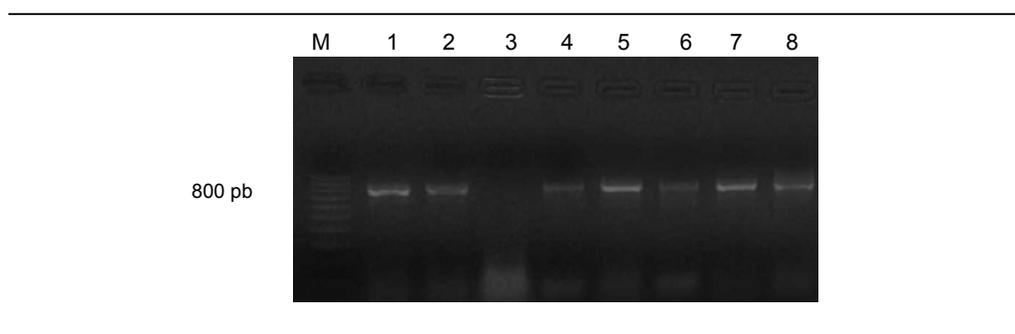


Figura III.2: Detecção do gene constitutivo BCR

Slot 1- controle positivo de cDNA; Slots 2, 4 a 8- amplificação do gene constitutivo BCR para avaliação da qualidade do cDNA; Slot 3: BCR não amplificou; M - controle de peso molecular

III.5.5. Métodos de PCR

III. 5.5.1. Considerações Gerais

Devido à grande sensibilidade da técnica de PCR é necessário um rígido controle para evitar contaminação entre amostras ou com produtos previamente amplificados (*amplicons*)¹²⁶. Por isto foram tomadas precauções durante o trabalho:

1. Todos os materiais e reagentes utilizados na preparação das reações de PCR permaneceram sempre em ambientes fisicamente separados do setor de processamento dos produtos amplificados.
2. Foram utilizados materiais descartáveis, ponteiros especiais com filtro e micropipetas automáticas, diferenciadas para os procedimentos pré e pós-amplificação.
3. As pipetas foram descontaminadas antes de cada processo com água destilada e álcool isopropílico 70%.
4. Foram utilizadas luvas descartáveis, sendo freqüentemente substituídas durante todos os procedimentos pré e pós-amplificação.

III. 5.5.2. PCR para a detecção de clonalidade

Para o estudo de clonalidade nas LLAs foram analisados os rearranjos dos genes das Imunoglobulinas e do TCR em células B e T respectivamente. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para as regiões conservadas dos diferentes segmentos (V (D) J) presentes no rearranjo dos genes em reações de PCR para amplificar estas regiões a partir de DNA genômico.

III. 5.5.2.1 PCR para a detecção de rearranjos da região variável do gene IGH

Foram realizadas técnicas para a amplificação da região variável do gene IGH, utilizando *primers* consenso, aproveitando a característica das regiões V_H e J_H, que apresentam seqüências conservadas. Os segmentos V do gene da IgH possuem regiões conservadas (FR, *framework*) flanqueando as regiões de hipervariabilidade ou CDR. Iniciadores complementares às regiões FR_{II}/J_H e FR_{III}/J_H, que flanqueiam

respectivamente as regiões de hipervariabilidade CDRII e CDRIII, foram utilizados como pode ser observado no esquema das figuras a seguir.

Os rearranjos do gene da cadeia pesada das imunoglobulinas (IgH) são amplificados utilizando-se *primers* que flanqueiam a região CDRIII (PCR FR3-JH). Em casos negativos, realiza-se uma reação “semi-nested” para amplificar a região CDRII (FR2-JH).

Todas as amostras foram submetidas à amplificação com um par de *primers* para um gene constitutivo (G3PDH) para testar se o DNA é amplificável, evitando resultados falso negativos.

PCR FR3/JH

O método de PCR FR3/JH permite a amplificação da região CDRIII_H dos segmentos variáveis do locus da IgH. Foram utilizados dois *primers* consenso (*con*): FR3*con* complementar à região 3' dos genes V_H e o J_H*con*, complementar à seqüência conservada na região 3' dos 6 genes J_H (Figura III.3). O tamanho esperado dos produtos está na faixa de 90 a 150 pb. Em todas as reações foi incorporado, como controle positivo, DNA de alto peso molecular da linhagem celular CEMO-1. Esta reação de PCR é capaz de detectar uma célula leucêmica em 1000 células normais (sensibilidade 1×10^{-3}).

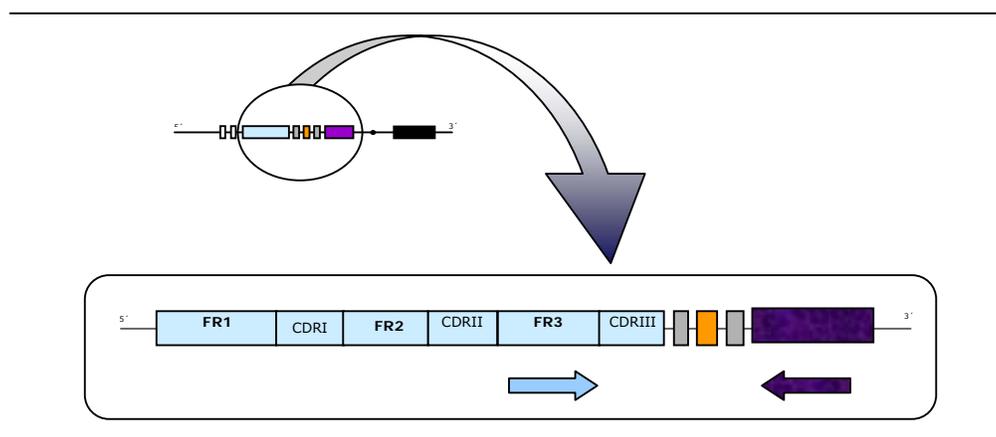


Figura III.3 PCR FR3. Amplificação da região compreendida entre FR3 e JH do locus da IgH. As setas indicam a localização dos primers para a reação de PCR.

PCR FR2/JH

Através do método PCR FR2/JH amplifica-se a região compreendida entre FR1_H e J_H. O produto esperado está na faixa de 200 a 260 pb. A reação foi realizada em duas etapas, na qual o produto de amplificação da primeira etapa foi utilizado como substrato para a segunda, utilizando *primers* mais internos (*nested PCR*). Na primeira etapa foram utilizados os *primers* FR2con e LJH e na segunda etapa, além de FR2con, foi utilizado outro iniciador mais interno, VLJH¹²⁷ (Figura III.4). Foram usados como controlos positivos, DNAs de alto peso molecular extraídos da linhagem REH. A sensibilidade do método permite a detecção de uma célula leucêmica em 100-1000 células normais ($1 \times 10^{-2} / 10^{-3}$).

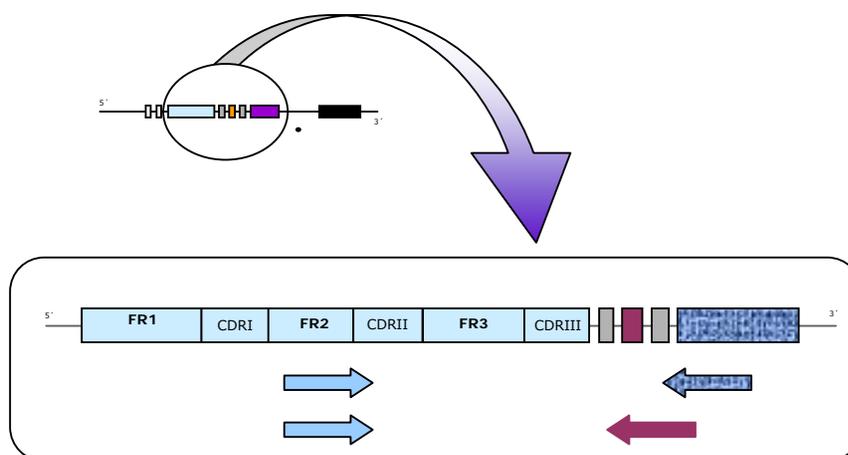


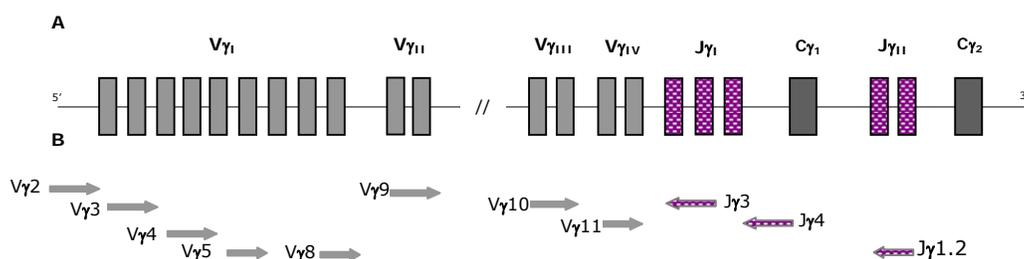
Figura III.4 PCR FR2. Amplificação da região compreendida entre FR2 e JH do locus da IgH. As setas indicam a localização dos primers para ambas etapas da reação.

III. 5.5.2.2. PCR para a detecção de rearranjos dos genes que codificam TCR

Considerando-se que o rearranjo do gene do TCR é análogo ao rearranjo do gene da IgH e, portanto, um excelente marcador neoplásico, abordagens semelhantes às utilizadas para a detecção dos rearranjos envolvendo os genes da IgH podem ser usadas para a detecção de monoclonalidade de origem T, assim como de origem B imatura. Foram, então, utilizados dois métodos a fim de se amplificar estes rearranjos.

PCR TCR γ

A primeira estratégia utilizada foi uma reação multiplex, na qual uma mistura de *primers* para os diversos segmentos V γ e J γ foi utilizada para a detecção de monoclonalidade, dentro de condições ideais para o funcionamento.⁴⁹ Foram empregados oligonucleotídeos complementares aos segmentos variáveis (V) funcionais do gene TCR γ . Estes são agrupados em quatro famílias: V γ I (que inclui os segmentos V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5 e V γ 8), V γ II (segmento V γ 9), V γ III (segmento V γ 10) e V γ IV (segmento V γ 11). Os oligonucleotídeos *anti-sense* foram complementares aos segmentos J γ : J3, J4 e J1.2 (Figura III.5). Para eliminar uma eventual interferência entre os iniciadores, as amplificações foram realizadas em duas reações separadas, uma incluindo a mistura dos segmentos V γ 2, V γ 3, V γ 4 e V γ 8 junto com os três J γ (Mix I) e a outra reunindo os *primers* V γ 5, V γ 9, V γ 10 e V γ 11 com os J γ (Mix II). Os produtos esperados se encontram na faixa de 200 a 250 pb.



(A) Configuração no estado germinal do gene TCR γ .

O complexo gênico do gene TCR γ está formado por vários segmentos V (variáveis) divididos em quatro famílias (V γ I, V γ II, V γ III e V γ IV), além de duas famílias (J γ I e J γ II) de segmentos J (junção) e duas famílias (C γ I e C γ II) de segmentos C (constantes).

(B) PCR V γ /J γ Mix:

localização do anelamento dos primers. Foram utilizados iniciadores específicos para praticamente todos os segmentos V γ (excluindo-se apenas os pseudogenes) e iniciadores para os segmentos J γ .

Figura III.5: Desenho da reação de detecção de clonalidade por PCR TCR γ

PCR TCR δ

Para amplificar os rearranjos do gene TRC δ , foram utilizados *primers* complementares aos seguimentos gênicos mais frequentemente envolvidos em rearranjos nas LLAs de origem B.

Na reação foram utilizados iniciadores para rearranjos incompletos típicos do perfil imunomolecular de leucemia B (iniciadores 5' V δ 2,D δ 2 e 3' D δ 3)

A Figura III.6 mostra a localização e combinações possíveis dos iniciadores no processo de amplificação. Os tamanhos esperados para cada rearranjo foram: V δ 2-D δ 3 (813 pb) e D δ 2-D δ 3 (406 pb).

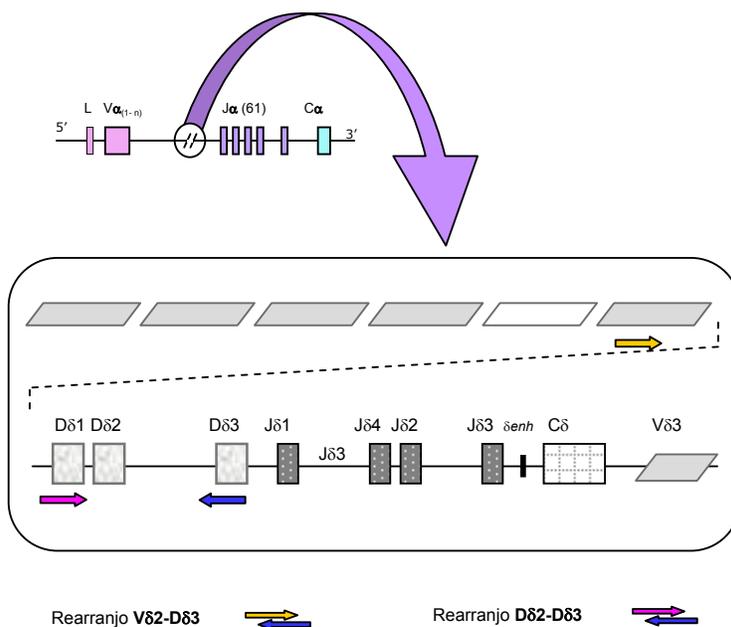


Figura III.6: Desenho da reação de detecção de clonalidade por PCR TCR δ

III. 5.5.2.3 Condições das reações de PCR para detecção de clonalidade

As condições de cada uma das reações foram estabelecidas seguindo especificações padrão.¹²⁸ Todas as reações foram desenhadas para um volume final de 50 μ L, utilizando tampão de PCR (Gibco ou Pharmacia) contendo 50 mM KCl e 10 mM Tris H-Cl pH 8,3; MgCl₂ (Gibco) a uma concentração final entre 1,5 e 2,5

mM; dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Pharmacia) (200 μ M de cada um); *primers* (0,2 a 0,25 μ M de cada um) e água deionizada estéril para completar o volume da reação. Em todos os casos foi incorporado, por reação, 200 ng a 1 μ g DNA e 1U de Taq DNA polimerase (Gibco).

Todas as reações de PCR foram realizadas em um termociclador PTC-100TM (MJ Research). Os perfis térmicos de cada PCR utilizada seguiram as diretrizes gerais para a amplificação com a Taq DNA polimerase: uma etapa inicial de desnaturação a 95-96°C por dois minutos, seguida de 35 a 40 ciclos com desnaturação a 94°C por um minuto, temperatura e tempo de anelamento otimizados para cada grupo de *primers* e extensão a 72°C por dois minutos; seguida de um ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos e uma etapa final a 4°C.

Os resultados foram definidos graças à incorporação dos seguintes controles: (1) *controle negativo*; DNA obtido a partir de SP ou MO de doadores saudáveis; (2) *controle positivo*; DNA obtido de linhagens celulares portadoras de rearranjos gênicos indicando origem clonal e (3) *controle final da reação de PCR*, contendo todos os componentes da reação de PCR com exceção do DNA substrato.

Os produtos das reações de PCR FR3/JH, FR2/JH, TCR γ e TRC δ foram interpretados após eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e coloração com nitrato de prata.

III. 5.5.3 PCRs para genes constitutivos

Com o objetivo de descartar falsos negativos nas análises dos rearranjos gênicos, foi testada a capacidade de amplificação das diferentes amostras de DNA. Este teste foi feito através de reações de PCR multiplex (PCR Mx) para o gene constitutivo Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (G₃PDH). Os resultados foram avaliados em gel de agarose 2%, tendo sido incorporados às reações controles de DNA de alto peso molecular e controles de PCR (sem DNA).

III. 5.5.4 PCR para mutações no gene *FLT3*

As alterações no gene FLT3 foram detectadas a partir de DNA utilizando método de PCR.

III. 5.5.4.1 Detecção de *DIT-FLT3*

Foram utilizados iniciadores previamente descritos, para amplificação dos exons 14 e 15 do gene *FLT3*. Foram amplificados 100ng de DNA num volume final de 50 μ L contendo 50mM KCL, 10mM Tris-HCL(tampão Gibco), 2mM MgCL₂ (Gibco), 200 μ M de cada DNTP(Pharmacia), iniciadores 11F e 12R (0,5 μ M de cada), 1U de Taq-DNA polimerase(Gibco) e água deionizada estéril para completar o volume.

A reação consistiu de incubação inicial de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, seguidos de extensão final de 72°C por 8 minutos. Foi utilizado um termociclador PTC-100™ (MJ Research).

Os resultados foram avaliados em gel de agarose 3%, contendo 0.5 μ g/mL de brometo de etídeo (Gibco) e visualizados sob luz ultravioleta.

As amostras normais apresentavam apenas uma banda de 329pb correspondente ao gene selvagem. Os fragmentos maiores que o selvagem foram considerados mutantes e apresentavam tamanhos variados devido ao número diferente de duplicações em tandem presentes. A detecção de dois ou mais fragmentos diferentes do tamanho esperado para o alelo selvagem foi interpretada como presença de mais de um alelo mutado, com número diferente de duplicações em cada um. A Figura III.7 mostra a estrutura do gene e a localização dos primers utilizados:

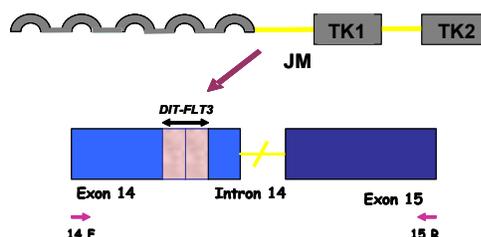


Figura III.7: Desenho da reação de PCR para *DIT-FLT3* e localização dos primers forward (F) e reverse(R) no gene. Adaptado de Parcels et al, 2006⁸¹

III. 5.5.4.2 Detecção de *FLT3-D835*

A análise da mutação D835 no gene *FLT3* foi realizada usando primers previamente descritos para amplificação do exon 20 do gene. Foram amplificados 100ng de DNA

num volume final de 50 μ L contendo 50mM KCL, 10mM Tris-HCL(tampão Gibco), 2mM MgCL₂ (Gibco), 200 μ M de cada DNTP (Pharmacia), iniciadores D835F e D835R (0,5 μ M de cada), 1U de Taq-DNA polimerase (Gibco) e água deionizada estéril para completar o volume.

A reação consistiu de incubação inicial de 94^oC por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94^oC por 30 segundos, anelamento a 55^oC por 1 minuto e extensão a 72^oC por 2 minutos, seguidos de extensão final de 72^oC por 8 minutos. Foi utilizado um termociclador PTC-100TM (MJ Research).

Os resultados foram avaliados em gel de agarose 3%, contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo (Gibco) e visualizados sob luz ultravioleta, visualizando-se uma banda única de 114pb em todos os casos amplificados.

Sabendo-se que a seqüência codificante de D835 compreende GATA, sítio de atividade endonuclease da enzima ECO RV, foi utilizada a técnica de RFLP (*restriction fragment lenght polymorphism*) para a detecção da mutação pontual de *FLT3*.

A digestão de 10 μ L do produto amplificado foi realizada com a enzima de restrição ECO RV (New England Biolabs) por 12 horas a 37^o de acordo com recomendações do fabricante. Utilizou-se 2,5U de enzima e 2 μ L de seu buffer para cada de 10 μ L de produto, completando-se com água deionizada para um volume final de 15 μ L. Os produtos digeridos foram posteriormente analisados em gel de agarose 3%.

As amostras sem a mutação sofriam digestão completa pela enzima, resultando em duas bandas de 68 e 46 pb. As amostras com mutação apresentaram a banda de 114pb parcial (heterozigoto) ou totalmente não digerida (homozigoto), em virtude da mutação de uma base alterada no sítio enzimático. A Figura III.8 esquematiza a reação de RFLP-PCR.

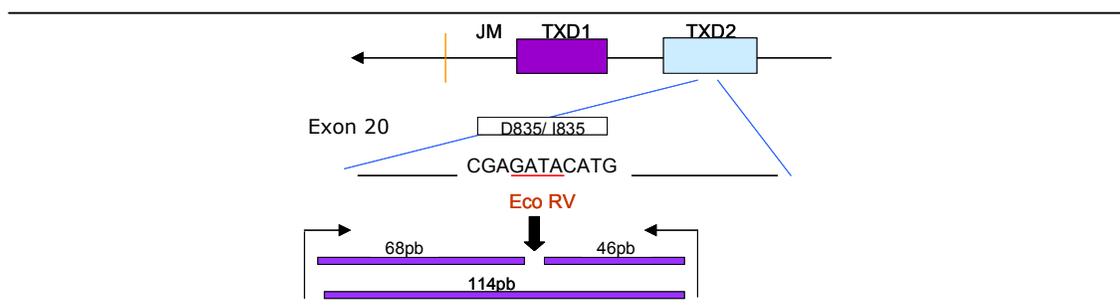


Figura III.8: Desenho da reação de PCR para *FLT3*-D835 e digestão enzimática para detecção da mutação. Adaptado de Yamamoto et al.¹⁰⁰

III. 5.5.5. Método de RT-PCR

III. 5.5.5.1. Considerações gerais

Seqüências específicas dos cDNAs são amplificadas através de PCR para observar a presença de translocações. Todas as reações foram padronizadas para permitir a detecção de cada translocação de interesse, a partir de 1 µg de RNA e com seqüências de *primers* e perfil térmico propostos pelo protocolo Biomed-1³⁵, à exceção da reação para a detecção do gene de fusão *BCR-ABL*.

As reações de PCR para a detecção dos genes de fusão *MLL-AF4*, *TEL-AML1*, *PBX1-E2A*, *PML-RAR α* , *AML1-ETO* e *CBF β -MYH11* equivalentes moleculares das t(4;11), t(12;21), t(1;19), t(15;17), t(8;21) e inv 16 respectivamente, constaram de 2 etapas (PCR nested), em que o produto da primeira, realizada com *primers* mais externos (A e B), foi reamplificado na segunda etapa, utilizando *primers* mais internos (C e D) de modo a obter maior sensibilidade (10^{-4} a 10^{-6}), como mostra o esquema da figura III.9.

Na primeira etapa acrescenta-se o cDNA a um *mix* contendo tampão para RT (com KCl e Tris HCl), MgCl₂, H₂O, DTT, dNTP, enzima Taq DNA polimerase e os *primers* mais externos. A segunda etapa envolve o produto da primeira etapa e o *mix* difere do anterior apenas pelos *primers* mais internos, como descrito no quadro III.2.

Padronização da reação de RT-PCR*	
PRIMEIRA ETAPA (50 µL)	SEGUNDA ETAPA (50 µL)
2-3 µL de cDNA	1 µL de produto da 1ª etapa
<i>Primers</i> externos: 400 nM	Mesmos reagentes da 1ª etapa, com <i>primers</i> mais internos.
dNTP: 200 µM	
tampão PCR (20 mM Tris HCl, 50 mM KCl, pH 8.3)	
MgCl ₂ : 2.5 mM	
Taq: 1 unidade	

Quadro III.2: Reação de RT-PCR

* Perfil Térmico: proposto por Van Dongen *et al*³⁵

As reações consistiram de incubação inicial a 95°C por 30 segundos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 65°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Foi utilizado um termociclador PTC-100™ (MJ Research).

Os resultados foram avaliados em gel de agarose 3%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo (Gibco) e visualizados sob luz ultravioleta.

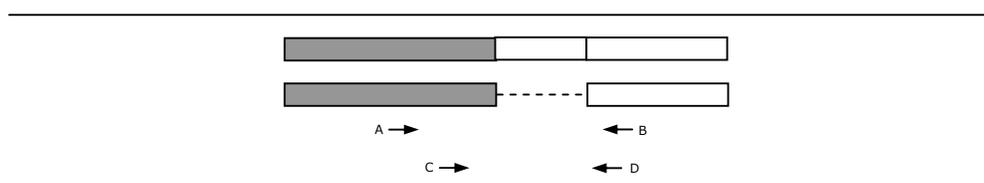


Figura III.9: Desenho de primers para detecção dos genes de fusão. Para cada gene de fusão, são utilizados 2 iniciadores externos (A e B), 2 internos (C e D). Retirado de Van Dongen, 1999.³⁵

Em todas as reações foram incluídos controles negativos (cDNA obtido a partir de SP ou MO de doadores sadios); controles positivos (cDNA obtido de linhagens celulares positivas para cada um dos genes de fusão em estudo) e controles de PCR (contendo todos os componentes da reação de PCR, exceto o cDNA substrato).

III. 5.5.5.2. RT-PCR para o gene de fusão *BCR-ABL*

Foi utilizada uma reação de PCR *Multiplex* para a detecção do gene constitutivo BCR, usado para determinar a amplificabilidade dos cDNAs (Figura III.2) e para a detecção do gene de fusão *BCR-ABL*. O perfil térmico e os reagentes utilizados seguiram o protocolo já estabelecido neste laboratório para a avaliação do cromossomo Filadélfia em Leucemia Mielóide Crônica seguindo as especificações previamente publicadas.¹²⁹

III. 5.5.5.3. RT-PCR para o gene de fusão *E2A-PBX1*

Para a detecção do gene de fusão *E2A-PBX1* foram utilizados *primers* em ninho 5' complementares à região codificante do gene *E2A* (exon 13) e *primers* em ninho 3' complementares à região codificante do gene *PBX1* (exon 2). O produto da reação é visualizado em bandas de 373 e 289pb para a primeira e segunda etapas, respectivamente. Foi descrita a presença de um transcrito variante em cerca de 5 a 10% dos casos positivos para t(1;19)(q23;p13) decorrente de *splicing* alternativo nos exons envolvidos.³⁵

A figura III.10 mostra um esquema da estrutura dos genes *E2A* e *PBX1* e a localização dos iniciadores usados.

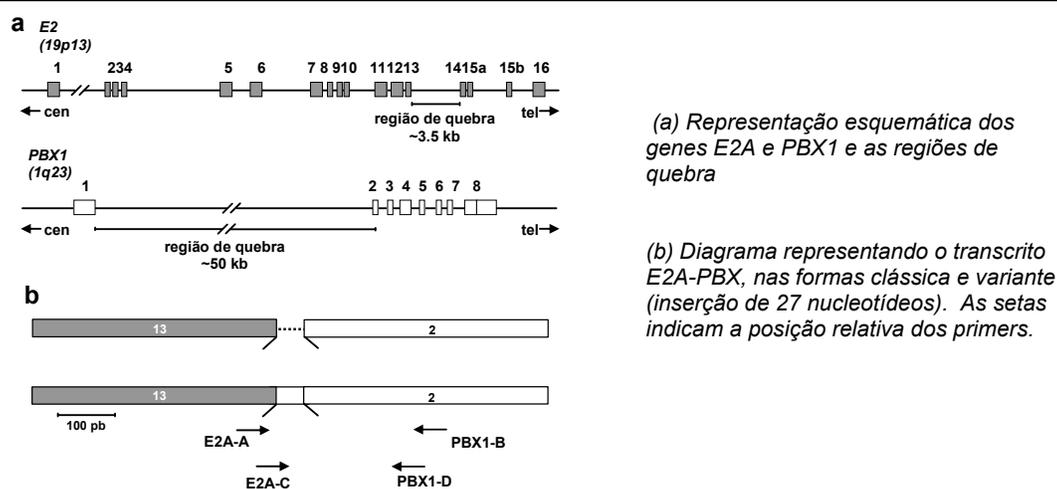


Figura III.10 Esquema representativo da PCR para detecção de *E2A-PBX1*³⁵

III. 5.5.5.4. RT-PCR para o gene de fusão *TEL-AML1*

Para a detecção do gene de fusão *TEL-AML1* foram utilizados *primers* em ninho 5' complementares à região codificante do gene *TEL* (exon 5) e *primers* em ninho 3' complementares à região codificante do gene *AML1* (exon 2). O produto da reação é visualizado em bandas de 298 e 181pb para a primeira e segunda etapas, respectivamente. Foi descrita a rara presença de um transcrito variante em decorrência de *splicing* alternativo no exon 2 do gene *AML1*, resultando na presença de duas bandas para o mesmo paciente. Com baixa frequência também ocorre a

junção de uma região com ponto de quebra diferente no íntron 2 de AML1 com o exon 5 de TEL, originando, no entanto uma proteína de fusão com a mesma estrutura do transcrito mais freqüente.³⁵

A Figura III.11 mostra um esquema da estrutura dos genes *TEL* e *AML1* e a localização dos iniciadores usados.

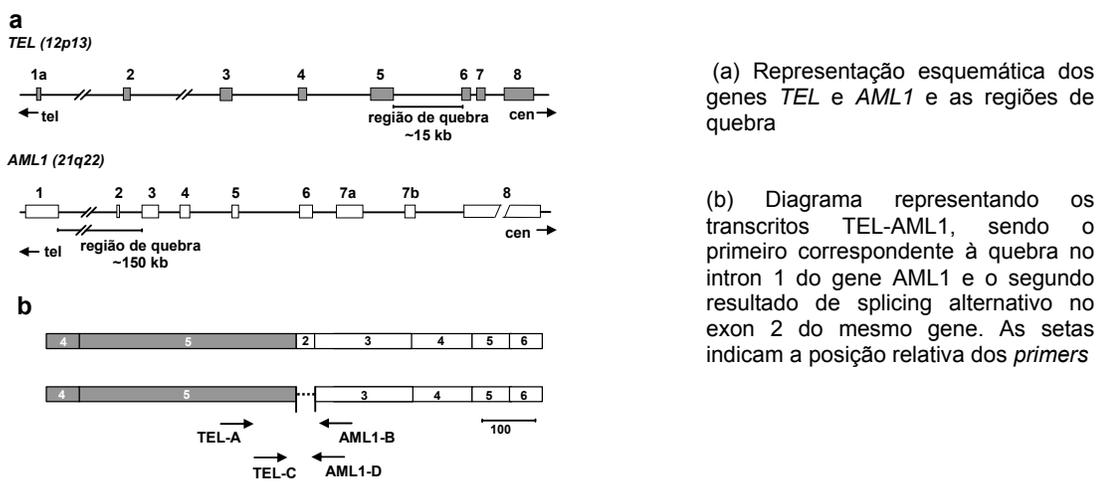


Figura III.11 Esquema representativo da PCR para detecção de *TEL-AML1*³⁵

III. 5.5.5.5. RT-PCR para o gene de fusão *MLL-AF4*

Para a detecção do gene de fusão *MLL-AF4* foram utilizados *primers* em ninho 5' complementares à região codificante do gene *MLL* (exon 8) e *primers* em ninho 3' complementares à região codificante do gene *AF4* (exon 7). Diferente de outros genes de fusão, o *MLL-AF4* apresenta cerca de dez transcritos diferentes em virtude da existência de diferentes pontos de quebra nos íntrons envolvidos. Os *primers* utilizados foram desenhados para abranger os tamanhos possíveis dos transcritos gerados.³⁵ O produto da reação mais freqüentemente encontrado é visualizado em bandas de 559 e 502pb para a primeira e segunda etapas, respectivamente. A Figura III.12 mostra um esquema da estrutura dos genes *MLL* e *AF4* e o gene de fusão gerado.

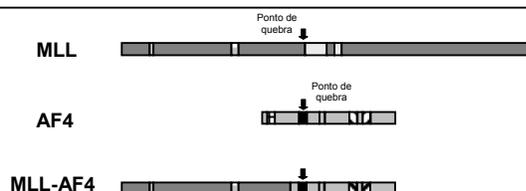


Figura III.12: Representação esquemática simplificada dos genes *MLL* e *AF4* com suas regiões de quebra e o transcrito *MLL-AF4*

III. 5.5.5.6. RT-PCR para o gene de fusão *PML-RAR α*

Para a detecção do gene de fusão *PML-RAR α* foram utilizados *primers* em ninho 5' complementares à região codificante do gene *PML* (exons 3, 5 e 6) e *primers* em ninho 3' complementares à região codificante do gene *RAR α* (exon 3). Esta estratégia permite amplificar os transcritos resultantes dos pontos de quebra bcr1, bcr2 e bcr3 no gene *PML*.³⁵

A Figura III.13 mostra um esquema da estrutura dos genes *PML* e *RAR α* , a localização dos iniciadores usados e a frequência dos diferentes transcritos encontrados.

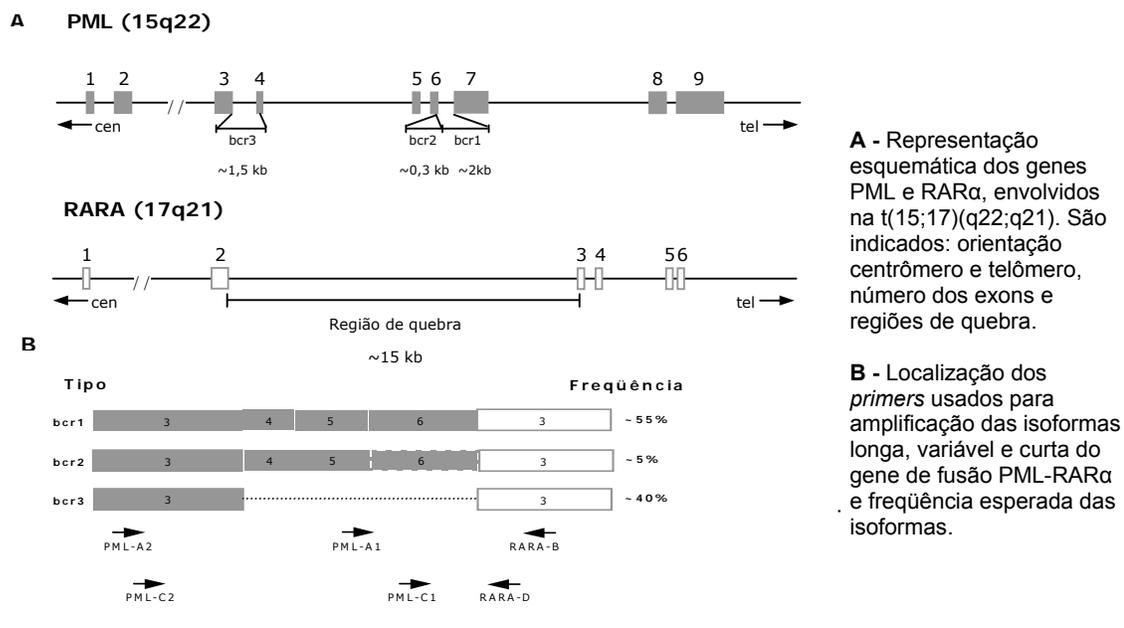


Figura III.13 Esquema representativo da PCR para detecção de *PML-RAR α* ³⁵

III. 5.5.5.7 - RT-PCR para o gene de fusão *AML1-ETO*

Para a detecção do gene de fusão *AML1-ETO* foram utilizados *primers* em ninho 5' complementares à região codificante do gene *AML1* (exon 4) e *primers* em ninho 3' complementares à região codificante do gene *ETO* (exon 3). O produto da reação é geralmente uma banda única, mas produtos de tamanho não correspondente ao esperado, de intensidade variável, podem ser visualizados (Figura III.14).³⁵

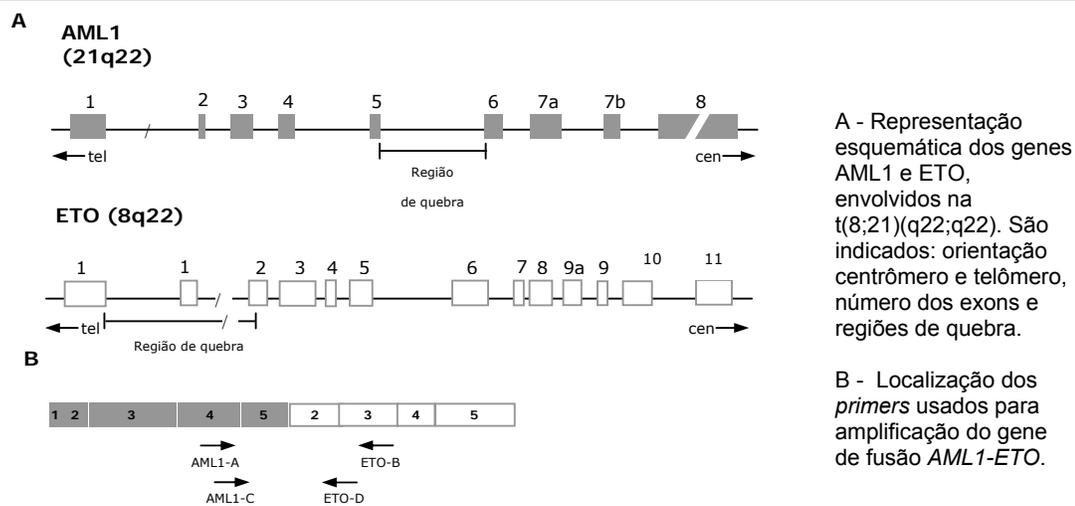


Figura III.14 Esquema representativo da PCR para detecção de AML1-ETO.³⁵

III. 5.5.5.8 - RT-PCR para o gene de fusão CBF β -MYH11

Para a detecção do gene de fusão *CBF β -MYH11*, foram utilizados *primers* 5' complementares à região codificante de gene *CBF β* (exon 4) e *primers* em ninho 3' complementares à região codificante de gene *MYH11* (exons 9 e 12). Esta estratégia permite amplificar 10 transcritos diferentes do gene de fusão *CBF β -MYH11*.³⁵

A Figura III.15 mostra um esquema da estrutura do gene *MYH11*, a localização dos iniciadores usados e a frequência dos transcritos tipo A, D e E, que representam aproximadamente 98% dos pacientes.

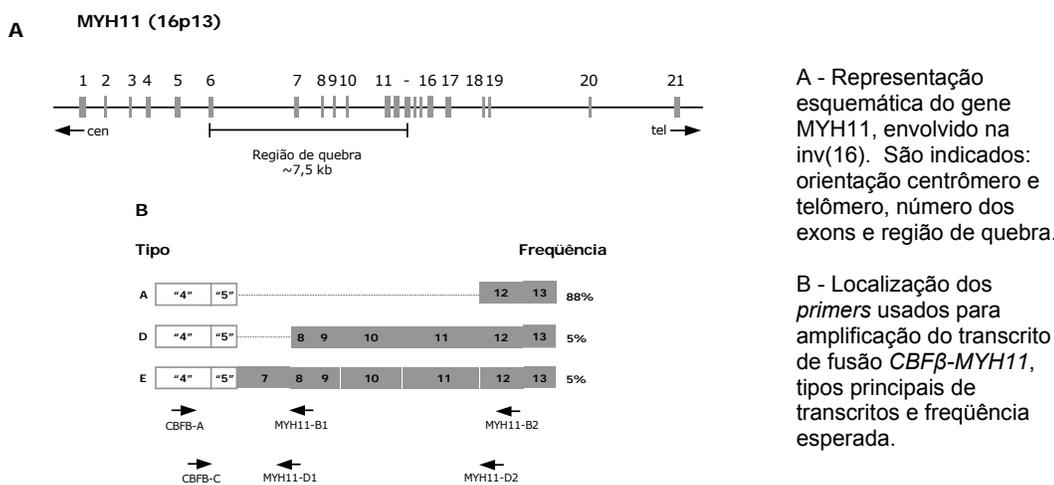


Figura III.15 Esquema representativo da PCR para detecção de CBF β -MYH11.³⁵

III. 5.6 Eletroforese e Preparo de géis

III. 5.6.1 Géis de agarose

A eletroforese em gel de agarose para a separação de fragmentos de DNA e cDNA amplificados por PCR foi realizada utilizando as seguintes condições:

Os géis foram preparados com a concentração de 2% de agarose (2mg para 100ml de tampão TAE 1x), com o objetivo de separar moléculas de DNA linear na faixa de 0,1 a 2 Kb. Foi acrescentado Brometo de etídeo na concentração de 0,5 mg/mL para corar o gel. O tampão de corrida utilizado foi o mesmo que compõe o gel, TAE 1X.

As amostras foram aplicadas nos poços do gel com o auxílio do tampão azul à base de glicerol. Foi utilizado o marcador de 100 pares de bases (Gibco) como padrão de peso molecular.

A eletroforese foi realizada a 90 V por aproximadamente 1,5 horas, utilizando-se tanques de eletroforese submarina do tipo Horizon 20.25 (cuba de 20 x 25 cm), 11.14 (cuba de 11 x 14 cm) e 58 (minigel, 6.5 x 8 cm) ligados à uma fonte de corrente contínua de tipo Life Tech Model 250 (Life Technologies Inc.).

III. 5.6.2 Géis de Poliacrilamida

Os géis de poliacrilamida não desnaturantes foram utilizados para separar produtos de PCR de pequeno comprimento (entre 100 e 300 pb) ou para separar fragmentos amplificados com pouca diferença de tamanho.

O preparo foi realizado utilizando-se uma mistura de acrilamida e bis-acrilamida (29:1) 30% e tampão TAE 1X, para uma concentração final de 8%. Para catalisar a polimerização do gel foram adicionados persulfato de amônio (PSA) 10% a uma concentração final de 0,001% (v/v) e o iniciador TEMED a uma concentração final de 0,067% (v/v).

A mistura foi cuidadosamente vertida no dispositivo formado por duas placas de vidro, dois espaçadores e um pente. Após o tempo necessário para a polimerização (cerca de 30 minutos), as amostras foram aplicadas com o auxílio do tampão azul a base de glicerol.

A eletroforese foi realizada a 180 V, por aproximadamente 3 horas, em um aparelho de eletroforese vertical modelo V16, acoplado a uma fonte de corrente contínua de

tipo Life Tech Model 250 (Life Technologies Inc.). Uma vez completa a corrida, cujo tempo variou de acordo com o tamanho das bandas esperadas, o gel foi processado para a coloração com prata.

O gel foi primeiramente imerso em solução fixadora por 10 minutos sob constante agitação. Após a fixação, foi incubado com solução de prata por 10 minutos, ao término dos quais foi lavado com água destilada. Adicionou-se então a solução reveladora até que os fragmentos pudessem ser visualizados com a nitidez e contraste necessários. O gel foi incubado mais uma vez em solução de fixação por 10 minutos e após lavagem com água destilada, acondicionado sobre papel absorvente para sua posterior estocagem.

A composição das soluções aqui mencionadas encontra-se descrita na seção anexos VIII.4 (Tampões e Soluções).

III. 5.7. Imagens e fotografias

Os géis de agarose foram fotografados sobre um transiluminador UV de onda curta utilizando um dispositivo fotográfico ULTRALUM/Polaroid GelCam com filtro E-49 (Polaróide). As exposições foram realizadas com filmes polaróides branco e preto do tipo 554 x 5”(Sigma). Foi ainda utilizado o sistema EDAS Computer 586 (Stratagene®) para fotografar géis de agarose. Os géis de poliacrilamida revelados foram secos em cartolina e posteriormente escaneados em um equipamento ScanJet 4C (Hewlett Packard).

III.6 Análise Estatística

Testes estatísticos foram realizados usando o programa SPSS (*SPSS Inc*, EUA) e o programa EPI-Info (Dean et al, 1996).

Um banco de dados com os resultados obtidos foi criado e inserido no programa SPSS 14.0 para posterior realização das análises estatísticas.

A correlação entre os achados moleculares e os fatores de risco foi realizada utilizando o teste χ^2 ou o teste exato de Fisher (two-sided) para variáveis categóricas e o teste t de *Student* para variáveis contínuas.

As curvas de sobrevida foram analisadas e construídas de acordo com o método de Kaplan-Meier (Kaplan and Meier, 1958) e o significado estatístico utilizando o teste *log-rank*. As análises multivariadas dos fatores associados com a sobrevida global e livre de eventos foram realizadas utilizando a regressão de Cox.

As associações foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

IV.1. Características gerais

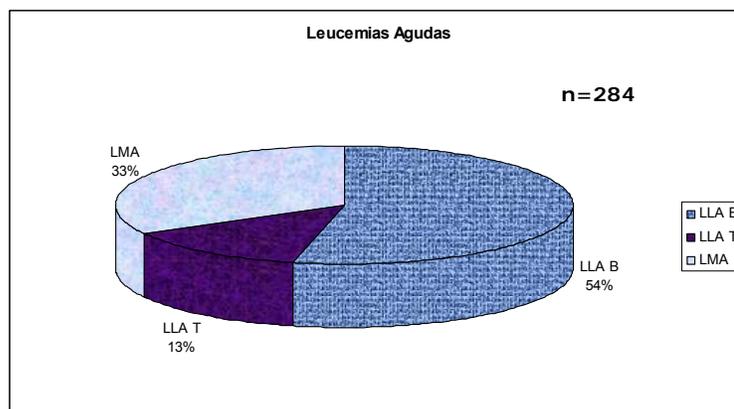
Um total de 328 crianças (0-18 anos) com suspeita diagnóstica de leucemia aguda foi encaminhado das instituições de origem (tabela IV.1) entre fevereiro de 2000 e agosto de 2006 para o Laboratório de Biologia Molecular do CEMO/INCa para análise molecular. Destes, 284 tiveram diagnóstico confirmado e foram incluídos neste estudo (quadro IV.2), sendo 152 LLA de origem B, 38 LLA de origem T e 94 LMA (quadro IV.1).

Os pacientes foram classificados segundo o critério FAB e receberam protocolo de tratamento GBTLI ou BFM, de acordo com a instituição de origem, além das terapias alvo-específicas para LMA com o uso de Glivec e ATRA na presença das translocações *BCR-ABL* e *PML-RAR α* respectivamente.

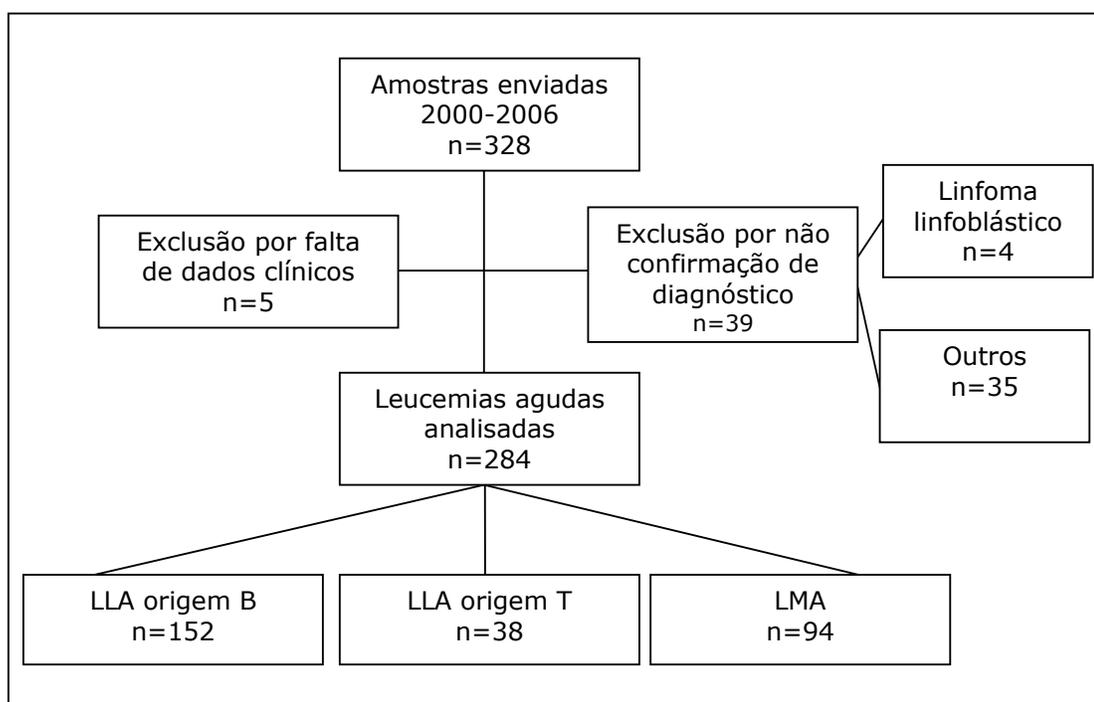
O envio de amostras provenientes das instituições do estado do Espírito Santo foi prospectivo e seqüencial, porém algumas não puderam ser enviadas devido a dificuldades com o transporte. Os pacientes do Rio de Janeiro e de Minas Gerais foram analisados prospectivamente, mas não sequencialmente, uma vez que alguns casos diagnosticados não foram enviados para análise.

Tabela IV.1. Envio de casos pelas instituições de origem

Instituição	Casos recebidos
INCA	78
UFRJ	5
HUPE	2
HI	182
HUCAM	3
UFMG	9
outros	5
Total	284



Quadro IV.1: Leucemias agudas analisadas



Quadro IV.2: Representação esquemática da casuística

A análise das características clínico-biológicas dos pacientes será separada por patologia para o melhor entendimento e significado dos resultados e as tabelas com a apresentação dos 284 pacientes analisados separados por subtipo de LA encontram-se em anexo (VIII.1, VIII.2 e VIII.3).

IV.1.1. LLA

Foram incluídos nesta análise 139 pacientes com LLA provenientes do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, em um estudo prospectivo e seqüencial, e 51

pacientes tratados do setor de Hematologia do Instituto Nacional de Câncer no Rio de Janeiro os quais fazem parte de um estudo prospectivo e seqüencial para o estudo do protocolo brasileiro de tratamento de LLA (GBTLI). Amostras originadas em outros centros não foram incluídas por terem sido enviadas ao laboratório esporadicamente apenas quando houve a necessidade clínica de confirmação diagnóstica, podendo, portanto, prejudicar de forma tendenciosa a análise da incidência de alterações moleculares no grupo em estudo.

Dentre as 190 LLAs estudadas, 38 foram de origem T e 152 de origem B.

A mediana de idade do grupo de LLA T (25M/13F) foi de 10,4 anos (1,5-17) e a de leucometria de 89.000 células/mm³ (var 9.700-704.000). As crianças foram tratadas com protocolo GBTLI 99 (60%) ou BFM 95 (40%). 89% dos casos receberam terapia intensificada de alto risco. Os 4 pacientes que receberam terapia convencional apresentavam baixa leucometria e não havia envolvimento de gônadas, SNC ou visceromegalia. Vinte e nove dos 38 casos (76%) alcançaram remissão completa, incluindo todos aqueles que não receberam terapia intensificada.

Já no grupo de crianças com LLA B (82M/70F) a mediana de idade foi 5,5 anos (0,3-17,3) e a de leucometria 15.250 células/mm³ (1.100-212.000). Foram utilizados os protocolos GBTLI 99 (60%) ou o BFM 95 (40%). As crianças foram estratificadas de acordo com critérios clínico-biológicos em três diferentes grupos de risco de falha terapêutica, significando intensificação ou não do protocolo convencional utilizado. Sendo assim, 43% foram classificadas como de baixo risco, 16% de médio e 41% de alto. Ao todo 94% alcançaram remissão completa ao final da indução. A tabela IV.2 descreve as características destes pacientes

Tabela IV.2: Características clínicas das LLAs analisadas

	LLA B	LLA T
Pacientes	152	38
Mediana idade (intervalo)	5,5 (0,3-17,3)	10,4 (1,5-17)
Idade menor que 1ano (%)	7 (4,5%)	0
Sexo (%)		
Masc	82 (54%)	25 (66%)
Fem	70 (46%)	13 (44%)
Leucometria mediana (cels/ mm ³)	15.250 (1.100-212.000)	89.000 (9.700-704.000)
Subtipo FAB ⁺		
L1	53%	39%
L2	35%	51%
L3	2%	0
Inconclusivo*	10%	

⁺FAB - Classificação Franco-Americano-Britânica;

* pacientes com morfologia duvidosa ou inconclusiva

IV.1.2. LMA

Foram analisados 94 pacientes (56M/38F) com diagnóstico de LMA *de novo* ou secundária provenientes dos centros parceiros e incluídos em um estudo prospectivo, porém nem sempre consecutivo. A mediana de idade foi de 9,3 anos (0-18) e de leucometria de 15.900 células/mm³ (var 1.400-310.000). Cinco crianças estudadas são portadoras de síndrome de Down. Um paciente foi diagnosticado como leucemia bifenotípica e foi incluído neste estudo por ter sido tratado como LMA (NI LMA=10). Os pacientes com leucemia promielocítica (LPA) posteriormente confirmados para a presença do transcrito *PML-RAR α* receberam o tratamento com ATRA. A tabela IV.3 descreve as características das LMAs em estudo:

Tabela IV.3: Características clínicas das LMAs analisadas

LMA	
Num pacientes	94
Mediana idade (intervalo)	9,3 (0-18)
Idade menor que 1ano (%)	6 (6,5%)
Sexo (%)	
Masc	56 (60%)
Fem	38 (40%)
Leucometria mediana (cels/mm ³)	15.900 (1.400-310.000)
Subtipo FAB	
M0	3 (3%)
M1	11 (12%)
M2	18 (20%)
M3	27 (30%)
M3v	2 (2%)
M4	13 (14%)
M5	6 (6,5%)
M6	1 (1%)
M7	5 (5,5%)
Bif*	1
Sec SMD	3
NA	4

NA=não avaliado/Sec SMD- LMA secundária a síndrome mielodisplásica

* Leucemia bifenotípica tratada como LMA;

IV.2. Análise Molecular

IV.2.1. Detecção de rearranjos nos genes de receptores de antígenos

As leucemias com suspeita de envolvimento de linhagem linfóide foram encaminhadas para PCR para amplificação de rearranjo nos genes da cadeia pesada de imunoglobulina (IgH) e receptor de células T (TCR).

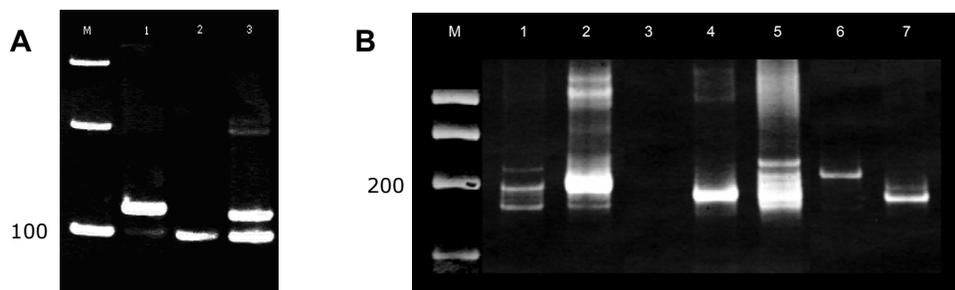
Os produtos das reações de PCR FR3/JH, FR2/JH, TCR δ e TRC γ foram interpretados após eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e coloração com nitrato de prata. Os resultados de cada experimento em particular foram avaliados em função dos controles positivos da reação. Na interpretação dos resultados foram seguidas as seguintes normas:

1. O produto de amplificação de um rearranjo monoclonal é visualizado como uma banda diferente e intensa sobre um fundo produzido pela amplificação dos múltiplos rearranjos dos linfócitos não neoplásicos.
2. Um padrão de rastro ou *smear* na área de tamanhos esperados de amplificação foi considerado policlonal.
3. Um padrão com duas bandas foi considerado como biclonalidade.
4. Um padrão com mais de duas bandas foi considerado oligoclonal, onde duas, três ou mesmo quatro bandas mais intensas são observadas, como consequência de mais de um grupo de células com um mesmo rearranjo. Este padrão de resultado caracteriza a presença de mais de um clone, podendo representar um quadro de instabilidade no genoma do clone leucêmico, o que leva ao surgimento de diferentes subclones com distintas variações gênicas na região do rearranjo analisada por PCR;
5. A ausência total de produtos no gel foi considerada como falha da amplificação, necessitando repetição da reação.

IV.2.1.1. PCR para rearranjo do gene de IgH

Das 152 amostras de LLAs B em estudo, 21 (14%) não foram avaliadas por indisponibilidade de material suficiente para amplificação do DNA. Nas 131 amostras analisadas, 14 (11%) não apresentaram amplificação para rearranjo monoclonal de IgH e 117 (89%) tiveram o rearranjo amplificado por PCR,

indicando a presença de populações monoclonais. Destes 117 positivos, 109 (93%) apresentaram rearranjo monoclonal, 7 (6%) apresentaram rearranjo monoclonal bialélico e 1 (1%) apresentou rearranjo oligoclonal (NI LLA:118). Vale ressaltar que, do total de positivos, 3 (2,5%) foram negativos por PCR FR3-JH, mas amplificados por PCR FR2-JH. A figura IV.1 mostra géis com resultados das reações de PCR FR3-JH e FR2-JH para os rearranjos de imunoglobulina.



(A) **FR3-JH** Slot 1- controle positivo para o rearranjo monoclonal bialélico (2ª banda fraca); slot 2- paciente possui apenas uma banda de rearranjo monoclonal; slot 3- paciente possui duas bandas indicando clonalidade bialélica; M – padrão de peso molecular. (B) **FR2-JH** Slot 1 - controle positivo para o rearranjo monoclonal bialélico; slot 2- amostra de doador como controle negativo; slot 3 - falha na amplificação do DNA; slots 4,6 e 7 – pacientes possuem apenas uma banda de rearranjo monoclonal; slot 5- paciente positivo para rearranjo oligoclonal; M – padrão de peso molecular.

Figura IV.1. Detecção dos rearranjos de Ig.

IV.2.1.2. PCR para rearranjo do gene TCR

Das LLAs B em estudo, apenas 29 foram investigadas quanto ao rearranjo TCR. No PCR para TCR δ 14 (48%) amostras foram negativas, 14 (48%) foram positivas para o rearranjo V δ 2D δ 3, característico de LLA-B precoce, e uma (4%) apresentou o rearranjo D δ 2D δ 3 característico de LLA-T (NI LLA:150). No PCR para TCR γ 8 amostras foram positivas, sendo que destas 5 (62,5%) eram também positivas para TCR δ V δ 2D δ 3, 1 (12,5%) era positiva para IGH e as outras 2 (25%) foram confirmadas como de origem B pela imunofenotipagem (NI LLA:41 e 96), tendo sido nestes pacientes o gene do TCR γ o único marcador molecular detectado.

A análise das LLAs de origem T para a presença de rearranjo clonal no gene de TCR foi realizada em 32 pacientes, investigados quanto ao rearranjo TCR γ , cuja reação de PCR revelou 25 (78%) positivos e 7 (22%) negativos. Estes pacientes no entanto foram classificados como de origem T pela identificação de antígenos de superfície característicos da linhagem através de imunofenotipagem.

Dos 7, 4 apresentaram anomalias detectadas por citogenética convencional envolvendo os cromossomos 2, 7 e 9.

IV. 2.2. Detecção dos genes de fusão

IV. 2.2.1. LLA de origem B

A presença dos genes de fusão *TEL-AML1*, *MLL-AF4*, *PBX1-E2A* e *BCR-ABL* foi investigada em 104 dos 152 pacientes com LLA B, uma vez que 48 (31%) foram considerados não avaliáveis, devido à pequena quantidade de células no aspirado enviado ou à degradação do material extraído, impossibilitando a amplificação do gene constitutivo BCR. Foi detectado o gene de fusão *TEL-AML1* em 27 (26%) pacientes, o *MLL-AF4* em 4 (3,8%), o *PBX1-E2A* em 7 (6,7%), o *BCR-ABL* em 9 (8,7%) e 57 pacientes (54,8%) foram negativos para a pesquisa dos 4 genes de fusão (Tabela IV.4). Nenhum paciente apresentou mais de uma translocação.

Tabela IV.4: Distribuição das alterações cromossômicas encontradas na LLA

Gene de fusão	n (%)
<i>TEL-AML1</i>	27 (26)
<i>MLL-AF4</i>	4 (3,8)
<i>PBX1-E2A</i>	7 (6,7)
<i>BCR-ABL</i>	9 (8,7)
Negativo para os 4 genes de fusão	57 (54,8)
Total	104 (100)
NA*	48
Total	152

NA: não avaliável/ *48 pacientes foram considerados não avaliáveis devido à impossibilidade de amplificar o cDNA ou à ausência de material para extração de RNA.

IV. 2.2.1.1. *TEL-AML1*

O gene de fusão *TEL-AML1*, equivalente molecular da t(12;21), foi detectado em 27 (26%) dos 104 pacientes avaliáveis (figura IV.2). Dentre os positivos, 25 apresentaram rearranjo monoclonal para o gene de IGH, sendo 3 destes também positivos para o rearranjo TCR δ B e 2 não tinham marcador de clonalidade, desta forma a positividade para esta translocação serviu como marcador molecular de prognóstico e eventual detecção de DRM. Por se tratar de uma translocação críptica,

não foi detectada pela citogenética convencional, no entanto, em um paciente foi detectada ainda a deleção do cromossomo 12.

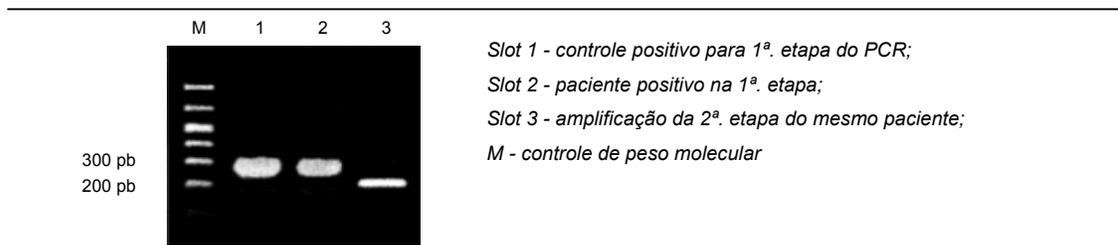


Figura IV.2: RT-PCR para amplificação da t(12;21)

Os 27 pacientes positivos para a t(12;21) foram agrupados para análise de tratamento e sobrevida. A tabela IV.5 mostra as características individuais destas crianças. Este grupo foi chamado de “bom prognóstico” e comparado com o grupo de pacientes sem esta alteração (n=77).

Tabela IV.5 Características dos pacientes positivos para a presença do gene de fusão TEL-AML1

NI	Idade (anos)	Cito	Imuno	IgH	TCR -δB	TCR -γ	NI	Idade (anos)	Cito	Imuno	IgH	TCR -δB	TCR -γ
1	ND	Normal	Calla	P			79	14,1	Falha	Pré B	P		
6	ND	Normal	NR	NR			81	3,1	Falha	Calla	P		
7	3,2	NR	Calla	P			85	4,6	Normal	Calla	P		
14	5,2	Normal	Calla	P	P	N	105	3,9	Falha	Calla	P	N	P
16	1,9	Normal	NR	P			107	7,8	Normal	Calla	P		
34	6,3	Normal	Pré B	PP			109	8,5	Normal	Calla	P		
39	4,8	Falha	Pró B	P			112	4,5	Del(12)	Calla	PP	P	P
44	2,4	Falha	Pró B	P			121	2,5	Falha	Calla	P		
45	3,3	Normal	NR	PP			123	2,3	Normal	Calla	P		
50	8,2	Falha	Pré B	P			132	5,8	Falha	Calla	NR		
52	11,9	Falha	Pré B	P			133	14,5	Normal	Pré B	P		
71	5,1	Falha	Calla	P	P	P	141	4,7	Falha	Calla	P		
72	5,8	Normal	pró B	P			145	15,5	Normal	NR	P		
74	4,4	Normal	Calla	P									

NI= número de identificação; P= positivo; N=negativo; Sexo 1=masculino/2=feminino; Cito=citogenética;

Imuno= imunofenotipagem; ND= dados não disponíveis; NR= não realizado.

Idade

Não foi observada associação entre idade e presença da alteração de bom prognóstico ($p=0,53$), apesar de a mediana de idade ser menor neste grupo (4,7) que no grupo sem esta alteração (5,8) (Figura IV.3 A).

Leucometria

A contagem de leucócitos ao diagnóstico foi significativamente menor no grupo com a alteração de bom prognóstico (mediana de 9.400/mm³) que no grupo sem esta alteração (mediana de 18.900/mm³) ($p=0,04$) (Figura IV.3B).

Sexo

Não foi observada associação entre sexo e presença da alteração de bom prognóstico ($p=0,95$)

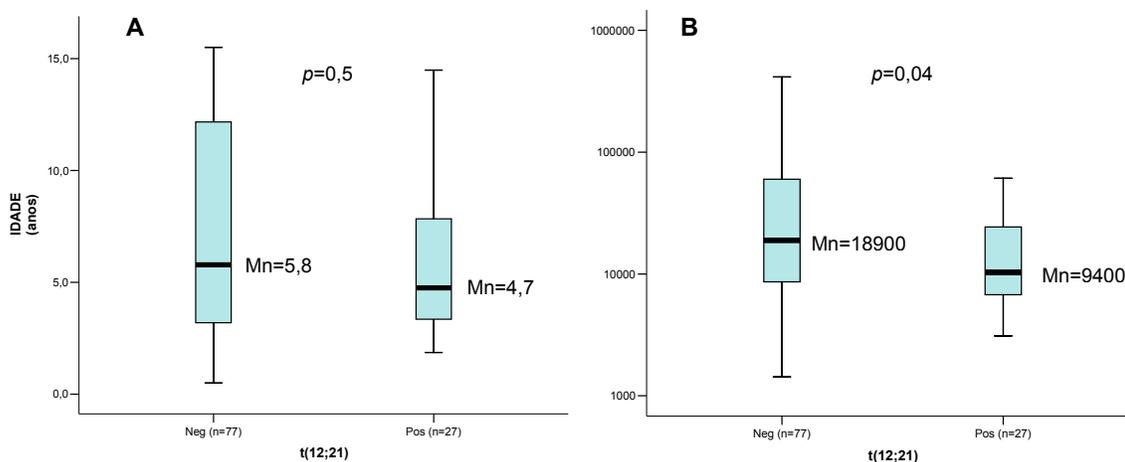


Figura IV.3: Comparação entre idade (A) ou leucometria ao diagnóstico (B) e presença de TEI-AML1

IV. 2.2.1.2. MLL-AF4

Em 4 pacientes (3M/1F) foi detectado o gene de fusão *MLL-AF4*, equivalente molecular da t(4;11) (figura IV.4), sendo que apenas 2 destes obtiveram positividade para a detecção de clonalidade por PCR FR3-JH. Os outros dois (NI LLA:31 e 149) não apresentaram rearranjo para os genes de RA detectáveis pelos métodos de

PCR utilizados. Nestes casos, a t(4;11) foi utilizada como único marcador molecular relevante para a análise clínica. A translocação foi detectada por métodos citogenéticos convencionais em 2 (50%) dos 4 positivos. As características dos pacientes com a t(4;11) são descritas a seguir e resumidas na tabela IV.6.

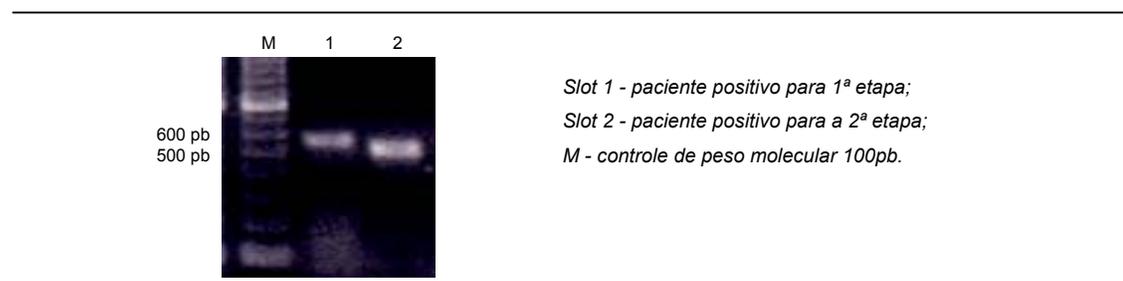


Figura IV.4: RT-PCR para amplificação da t(4;11)

Tabela IV.6. Características dos pacientes positivos para a presença do gene de fusão MLL-AF4

NI	Sexo	Idade (anos)	Cito	Imuno	IGH	TCR- δ B	TCR- γ
10	F	0,8	47,XX, t(4;11) (q21;q23) + mar	Pró B	P	NR	NR
18	M	0,8	Normal	Calla	P	N	N
31	M	14,9	Falha	Pré B	N	NR	NR
149	M	0,5	46,Xy, t(4;11) (q21;q23)	Pró B	N	N	N

NI=número de identificação; P= positivo; N=negativo; Sexo M=masculino/F=feminino; Cito=citogenética; Imuno= imunofenotipagem; ND= dados não disponíveis; NR= não realizado.

Idade

Foi observada uma tendência à menor idade nos pacientes com a t(4;11) (mediana de 0,8 anos) do que no grupo sem esta alteração (mediana de 5,6 anos) ($p=0,09$) (Figura IV.5.A).

Leucometria

A contagem de leucócitos ao diagnóstico foi significativamente maior no grupo com a t(4;11) (mediana de 151.000/mm³) que no grupo sem esta alteração (mediana de 16500/mm³) ($p=0,003$)(Figura IV.5. B).

Sexo

Não foi observada associação entre sexo e presença da t(4;11) ($p=0,63$).

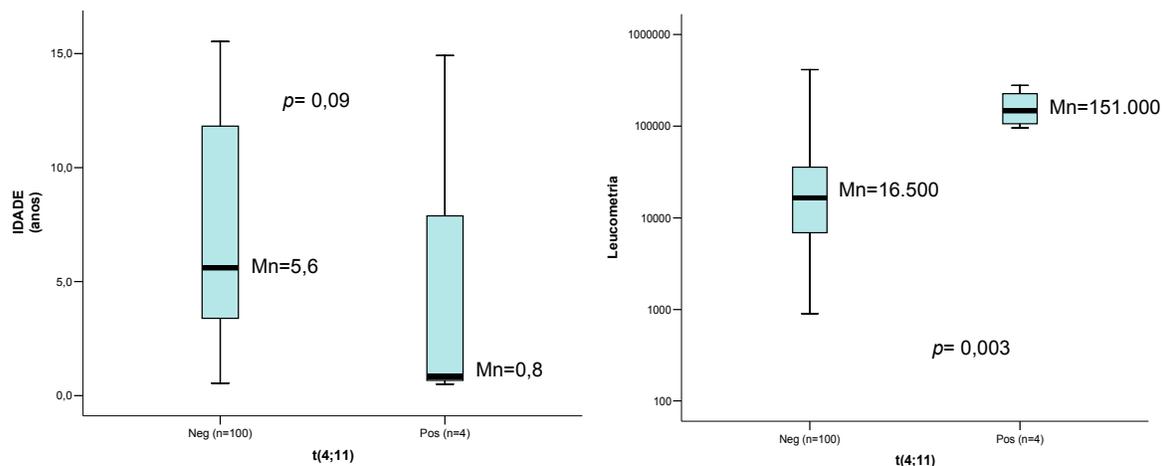


Figura IV.5.: Comparação entre idade (A) ou leucometria ao diagnóstico (B) e presença da t(4;11)

IV. 2.2.1.3. PBX1-E2A

A presença do gene de fusão *PBX1-E2A*, equivalente molecular da t(1;19), foi detectada em 7 pacientes (6M/1F) (figura IV.6), dos quais 6 foram também positivos nas reações de PCR para a detecção de rearranjo de IgH clonal e um deles também era positivo para TCR δ B. Para o outro paciente (NI LLA:51) em que não foi registrada a presença de rearranjo clonal no genes de RA, a t(1;19) foi utilizada como único marcador molecular relevante para a análise clínica. A translocação foi detectada por métodos citogenéticos convencionais em 3 (43%) dos 7 positivos, tendo sido ainda associada a um destes positivos a t(1;12). As características dos pacientes com a t(1;19) são descritas a seguir e resumidas na tabela IV.7.

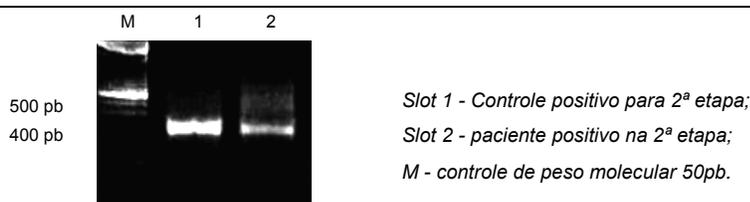


Figura IV.6 RT-PCR para amplificação da t(1;19).

Idade

Não foi observada associação entre idade e presença do gene de fusão ($p=0,74$) apesar de a mediana de idade ser menor nos pacientes com a t(1;19) (4,6) do que no grupo sem esta alteração (5,6), fato que provavelmente ocorreu ao acaso (Figura IV.7A).

Leucometria

A contagem de leucócitos ao diagnóstico não foi significativamente diferente no grupo com a t(1;19) (mediana de 24.900/mm³) e no grupo sem esta alteração (mediana de 15.900/mm³) ($p=0,17$)(Figura IV.7.B).

Sexo

Não foi observada associação entre sexo e presença da t(1;19) ($p=0,13$).

Tabela IV.7. Características dos pacientes positivos para a presença do gene de fusão

NI	Sexo	Idade (anos)	Cito	Imuno	IgH	TCR- δ B
36	F	14,2	NR	Calla	P	NR
48	M	2,7	Normal	Pró B	P	NR
51	M	13,2	Normal	Pré B	N	N
60	M	4,6	der19 t(1;19) (q12;p13)	Calla	P	NR
61	M	2,2	47,XY,t(1;19)(q23;p13), der(12)t(1;12)(q?q24),+mar	Pré B	P	N
110	M	0,5	46,XY, t(1;19)(q23;p13)	Calla	P	P
137	M	12,3	Falha	Pró B	P	NR

PBX1-E2A. NI=número de identificação; P= positivo; N=negativo; Sexo M=masculino/F=feminino; Cito=citogenética; Imuno= imunofenotipagem; ND= dados não disponíveis; NR= não realizado.

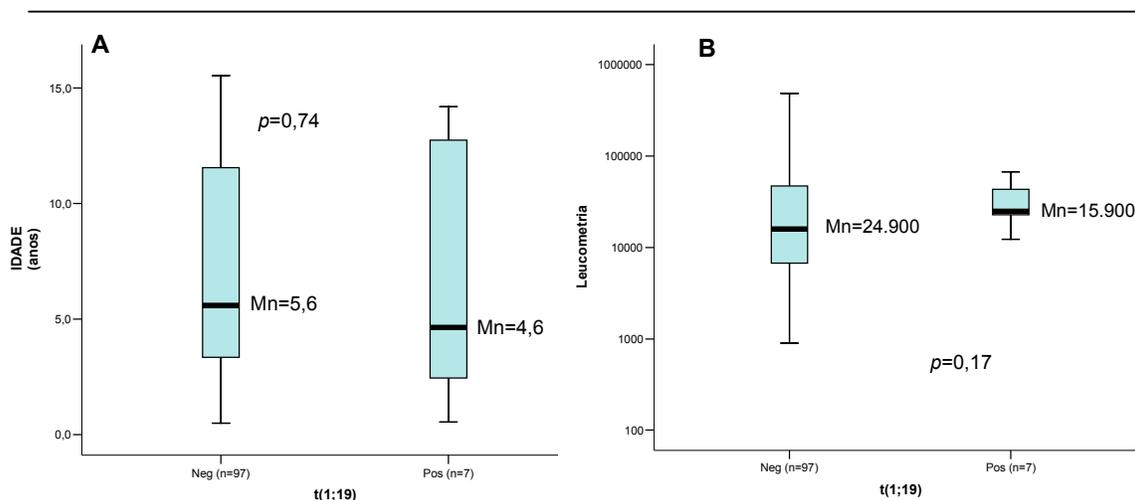
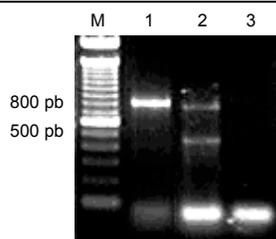


Figura IV.7: Comparação entre idade (A) ou leucometria ao diagnóstico (B) e presença da t(1;19)

IV. 2.2.1.4. BCR-ABL

O gene de fusão *BCR-ABL*, equivalente molecular da t(9;22), foi detectado em 9 pacientes (4M/5F) (figura IV.8) e todos demonstraram origem clonal ao serem submetidos a PCR para rearranjo em genes de RA. Em um destes pacientes (NLLA:150), os PCRs para IgH foram negativos e a clonalidade foi detectada por PCR TCR δ , no entanto, sendo amplificado o rearranjo do *locus* D δ 2D δ 3, típico de leucemia de origem T. Três casos positivos (33%) também foram detectados através de citogenética, 1 deles tendo adição do cromossomo 19 (p13) somado à deleção do 20. Foi ainda detectada por citogenética, associado à translocação positiva na biologia molecular, a t(5;14)(q31;q32). As características dos pacientes com a t(9;22) são descritas a seguir e resumidas na tabela IV.8.



Slot 1 - amplificação do BCR em doador saudável;
 Slot 2 - paciente positivo para o transcrito e1a2 (495pb);
 Slot 3 - controle negativo da reação;
 M - controle de peso molecular 100pb.

Figura IV.8: RT-PCR para amplificação da t(9;22).

Idade

Não foi observada associação entre idade e presença de *BCR-ABL* ($p=0,75$) apesar de a mediana de idade ser maior nos pacientes com a $t(9;22)$ (5,8) do que no grupo sem esta alteração (5,5), fato que provavelmente ocorreu ao acaso (Figura IV.9.A).

Leucometria

A contagem de leucócitos ao diagnóstico foi significativamente maior no grupo com a $t(9;22)$ (mediana de 89.600/mm³) que no grupo sem esta alteração (mediana de 15.000/mm³) ($p=0,001$) (Figura IV.9.B).

Sexo

Não foi observada associação entre sexo e presença da $t(9;22)$ ($p=0,49$).

Tabela IV.8. Características dos pacientes positivos para a presença do gene de fusão *BCR-ABL*

NI	Sexo	Idade	Citogenética	Imuno	IGH	TCR- δ B
3	F	5,8	46,XX, $t(9;22)$ (q34;q11)	Calla	P	
8	F	5,2	Falha	pró B	P	
32	M	9,9	45,XY, $t(9;22)$ (q34;q11), Add (19)(p13), del 20	Calla	P	
95	M	3,6	Normal	pró B	P	
125	F	4,9	Falha	pré B	P	
127	F	13,9	Falha	Calla	P	
144	M	11,6	Falha	pró B	P	
146	M	7,3	46,XY, $t(9;22)$ (q34;q11)	Pro B	P	
150	F	0,8	46,XX, $t(5;14)$ (q31,q32)	pró B	N	P(D δ 2D δ 3)

NI=número de identificação; P= positivo; N=negativo; Sexo M=masc/F=fem; Imuno= imunofenotipagem; ND= não disponível; NR= não realizado.

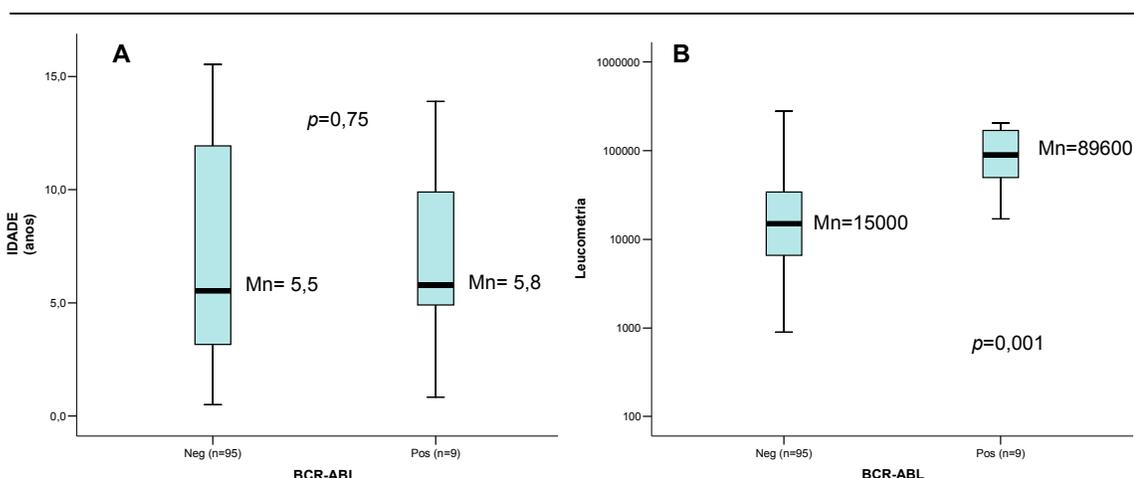


Figura IV.9: Comparação entre idade (A) ou leucometria ao diagnóstico (B) e presença da $t(9;22)$

IV. 2.2.1.5. Amostras negativas para os 4 genes de fusão

Do total de 104 pacientes analisados 57 (55%) foram negativos para todas as 4 translocações de risco. Destes, 54 foram positivos para PCR de IgH, 1 foi positivo para TCR δ B e dois não tiveram marcador de clonalidade.

Foi realizada a comparação das características dos pacientes ao diagnóstico de acordo com a presença de translocações de bom ou mau prognóstico e a ausência de alterações, demonstrando-se não haver diferença entre as medianas de sexo ou idade dos pacientes dos 3 grupos. No entanto, ocorreu associação significativa do grupo sem alterações com uma contagem de leucócitos intermediária (mediana de 14.000/mm³), quando comparada aos grupos com as translocações de baixo (mediana de 9.400/mm³) e alto (mediana de 71.900/mm³) risco de recaída ($P < 0,001$) (Figura IV.10).

A análise citogenética das amostras negativas para os genes de fusão revelou 4 pacientes com cariótipo hiperdiploide, um hiperdiploide com cariótipo complexo, um hiperdiploide com trissomia dos cromossomos 4 e 10, um hipodiploide, uma t(2;8)(p11;q34), uma deleção do cromossomo 9 (p23), uma deleção do cromossomo 10 (q24), uma adição do cromossomo 8, e uma deleção do cromossomo 1 associado a t(1;14)(q21;q13). Desta forma, dentre os 57 pacientes, 12 (21%) tinham alguma anomalia no cariótipo.

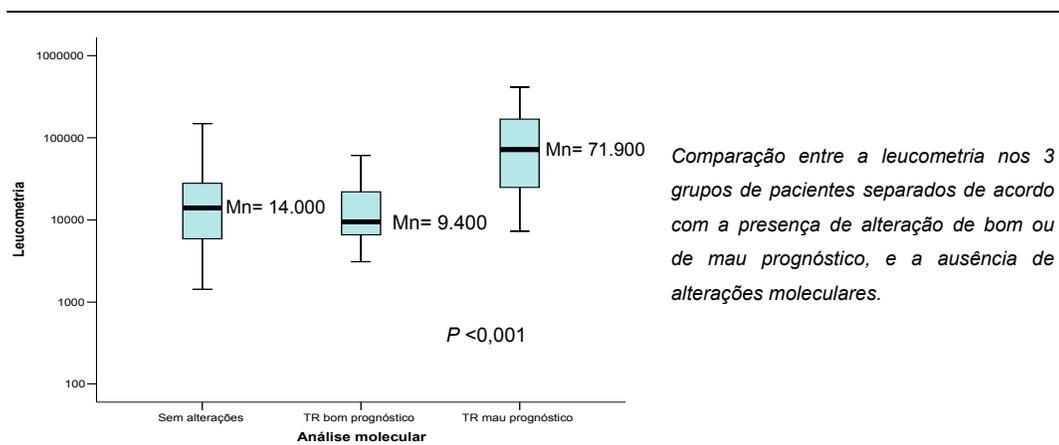


Figura IV.10: Características das LLAs com e sem genes de fusão

IV .2.2.2 LMA

A presença dos genes de fusão *PML-RAR α* , *AML1-ETO*, *CBF β -MYH11* e *BCR-ABL* foi investigada em 75 dos 94 pacientes com LMA, uma vez que 19 (20%) foram considerados não avaliáveis, devido à pequena quantidade de células no aspirado enviado ou à degradação do material extraído, impossibilitando a amplificação do gene constitutivo BCR conforme anteriormente mencionado. Foi detectado o gene de fusão *PML-RAR α* em 26 (35%) pacientes, o *AML1-ETO* em 12 (16%), o *CBF β -MYH11* em 1 (1,5%), o *BCR-ABL* em 1 (1,5%) e 35 pacientes (46%) foram negativos para a pesquisa dos 4 genes de fusão (Tabela IV.9). Nenhum paciente apresentou mais de uma translocação.

Tabela IV.9. Distribuição das LLAs B de acordo com a presença dos genes de fusão *PML-RAR α* , *AML1-ETO*, *CBF β -MYH11* e *BCR-ABL*.

Gene de fusão	n (%)
<i>PML-RARα</i>	26 (35)
<i>AML1-ETO</i>	12 (16)
<i>CBFβ-MYH11</i>	1 (1,5)
<i>BCR-ABL</i>	1 (1,5)
Negativo para os 4 genes de fusão	35 (46)
Total	75 (100)
NA*	19
Total	94

NA: não avaliável

*19 pacientes foram considerados não avaliáveis devido à impossibilidade de amplificar o cDNA ou à ausência de material para extração de RNA.

IV .2.2.2.1 *PML-RAR α*

O gene de fusão *PML-RAR α* , equivalente molecular da t(15;17), foi detectado em 26 pacientes (13M,13F) (figura IV.11) sendo 24 (92%) do subtipo FAB M3 e 2 (8%) do subtipo M3v. Dentre os casos positivos, 9 também foram detectados através de citogenética, 2 deles tendo cariótipo complexo.

As características dos pacientes com a t(15;17) são resumidas abaixo e descritas na tabela IV.10.

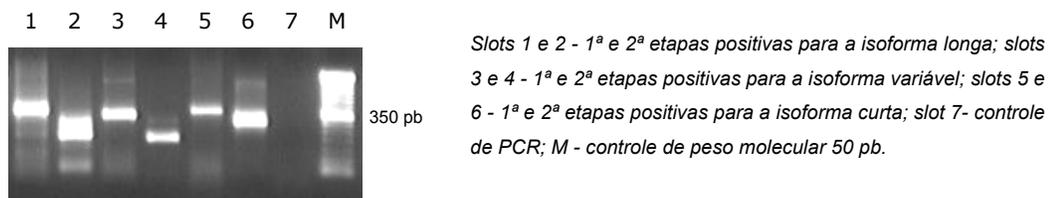


Figura IV.11: RT-PCR para amplificação da t(15;17).

Idade

Não foi observada associação entre idade e presença da alteração t(15;17) ($p=0,50$) apesar de a mediana de idade ser maior nestes pacientes (9,7) do que no grupo sem esta alteração (8,6), fato que provavelmente ocorreu ao acaso (Figura IV.12.A).

Leucometria

A contagem de leucócitos ao diagnóstico foi significativamente menor no grupo com a t(15;17) (mediana de 4.145/mm³) que no grupo sem esta alteração (mediana de 28.900/mm³) ($p=0,001$) (Figura IV.12.B).

Sexo

Não foi observada associação entre sexo e presença da t(15;17) ($p=0,22$).

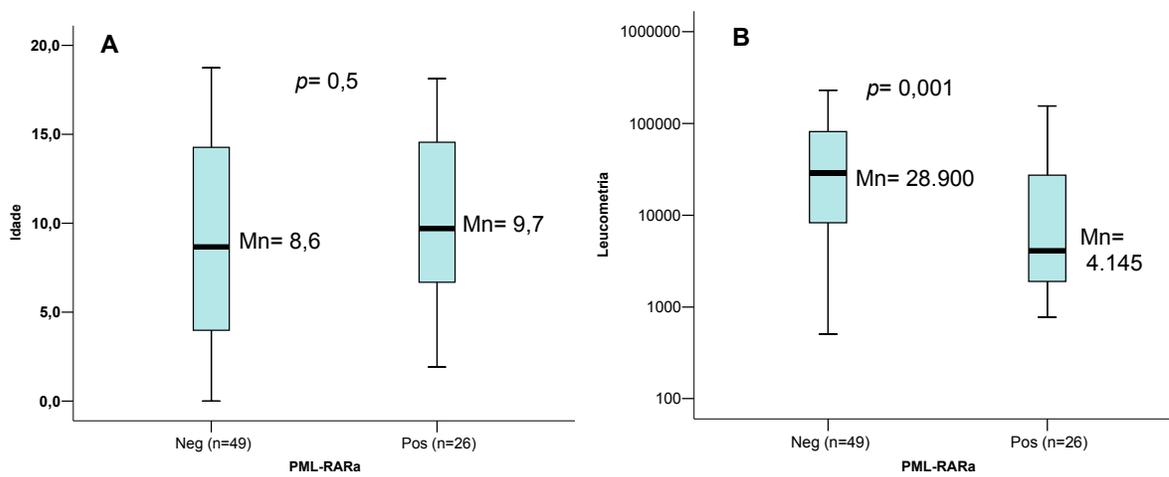


Figura IV.12: Comparação entre idade (A) ou leucometria ao diagnóstico (B) e presença da t(15;17)

Tabela IV.10. Características dos pacientes positivos para a presença do gene de fusão PML-RAR α

NI	Idade	FAB	Cito	Leuco	NI	Idade	FAB	Cito	Leuco
1	16,7	M3v	46,XY,t(15;17)(q22;q12)	7280	38	3,3	M3	NR	ND
3	6,8	M3	NR	2400	39	4,8	M3	NR	33.600
5	8,7	M3	Normal	1470	43	ND	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q12)	ND
12	4,2	M3	t(15;17) complexo	2900	46	6,7	M3	NR	55.500
15	11	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q12)	777	50	15,2	M3	NR	68.000
17	14,6	M3	NR	ND	52	5,8	M3	NR	39.200
24	13,4	M3	NR	1900	61	8	M3	NR	ND
25	8,8	M3	46,XY,t(15;17)(q22;q12)	3300	67	17	M3	NR	27.300
27	14,6	M3	NR	1400	77	9,7	M3	Normal	4.830
29	12,7	M3	t(15;17) complexo	10000	80	1,9	M3	NR	154.800
32	5,1	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q12)	7200	81	8	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q12)	5.240
33	12,5	M3	Falha	1000	92	18,1	M3	NR	1.700
36	17,8	M3	NR	3460	91	10,8	M3v	46,XY,t(15;17)(q22;q12)	2.800

NI=número de identificação; Sexo 1=masculino/2=feminino; FAB= Classificação Franco-Alemã-Britânica; Cito=citogenética; Leuco= leucócitos/mm³; ND= dados não disponíveis; NR= não realizado.

IV. 2.2.2.2. AML1-ETO

O gene de fusão *AML1-ETO*, equivalente molecular da t(8;21), foi detectado em 12 crianças (5M,7F) (figura IV.13) sendo 8 (67%) do subtipo M2, 3 (25%) do subtipo M4 e uma LMA secundária à SMD (8%). Sete casos positivos (58%) também foram detectados através de citogenética, um deles tendo cariótipo complexo. As características dos pacientes com a t(8;21) são resumidas abaixo e descritas na tabela IV.11.

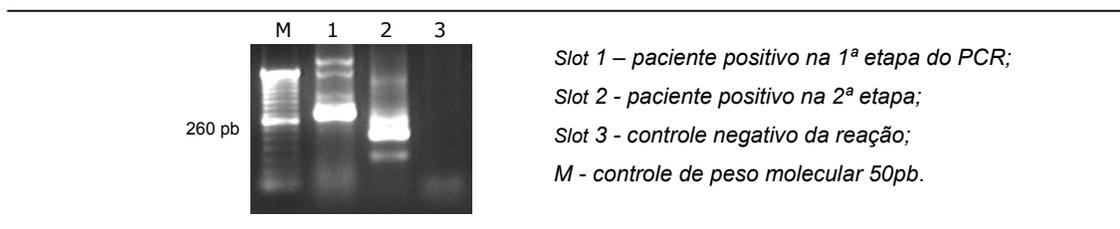


Figura IV.13: RT-PCR para amplificação da t(8;21)

Idade

Não foi observada associação entre idade e presença da alteração t(8;21) ($p=0,88$) apesar de a mediana de idade ser maior nestes pacientes (9,5) do que no grupo sem esta alteração (8,9), fato que provavelmente ocorreu ao acaso (Figura IV.14.A).

Leucometria

A contagem de leucócitos ao diagnóstico não foi associada à presença da t(8;21) (mediana de 14.950/mm³), quando comparada ao grupo sem esta alteração (mediana de 19.150/mm³) ($p=0,58$) (Figura IV.14.B).

Sexo

Não foi observada associação entre sexo e presença da t(8;21) ($p=0,20$).

Tabela IV.11. Características dos pacientes positivos para a presença do gene de fusão AML1-ETO.

NI	Sexo	Idade	FAB	CITO	Leuco
6	M	8,2	sec SMD	46, XY, t(8;21) (q22;q22)	9.800
13	F	16,7	M2	NR	4.800
18	F	10,8	M2	46, XX, t(8;21) (q22;q22)	19.900
45	M	7,8	M2	NR	15.500
48	F	12,9	M2	46, XX t(8;21) (q22;q22)	14.600
55	F	14,7	M4	46, XX, t(8;21) (q22;q22)	28.600
56	M	3,3	M2	NR	3.000
69	M	13	M2	45, X, -Y, t(8;21) (q22;q22)	14.800
70	F	3,9	M2	46, XY, t(8;21) (q22;q22)	15.900
72	F	8,3	M4	48, XX, +8, +21	15.100
86	F	8,2	M4	Falha	35.600
93	M	11,6	M2	46, XY, t(8;21) (q22;q22)	5.000

NI=número de identificação; Sexo M=masculino/F=feminino; FAB= Classificação Franco-Americano-Britânica; Cito=citogenética; Leuco= leucócitos/mm³; ND= não disponíveis; NR= não realizado.

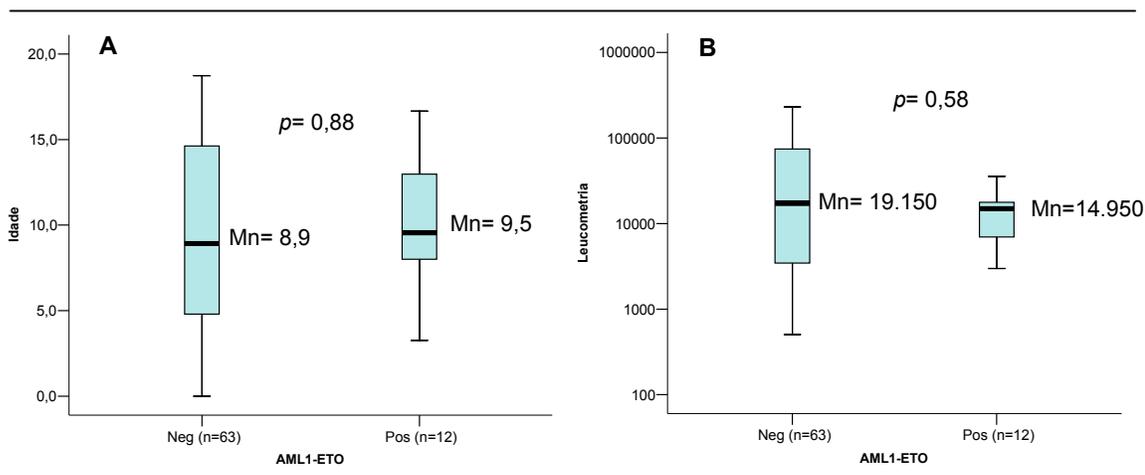


Figura IV.14: Comparação entre idade (A) ou leucometria ao diagnóstico (B) e presença da t(8;21)

IV. 2.2.3. *CBFβ-MYH11*

O paciente (M/18 anos) que apresentou o gene de fusão *CBFβ-MYH11* (figura IV.15) era do subtipo FAB M4 e apresentava leucometria ao diagnóstico de 134.000 células/mm³.

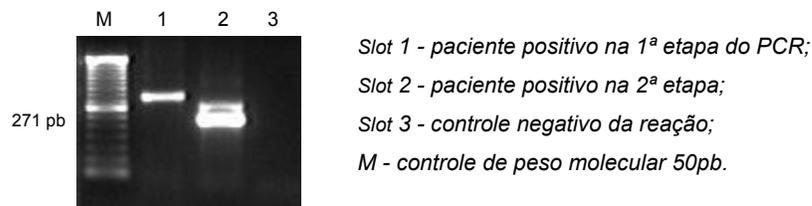


Figura IV.15. RT-PCR para amplificação da inv 16

IV. 2.2.4. *BCR-ABL*

O paciente (M/16,6 anos) que apresentou o gene de fusão *BCR-ABL* (figura IV.16) era do subtipo FAB M2 e apresentava leucometria ao diagnóstico de 43.200 células/mm³.

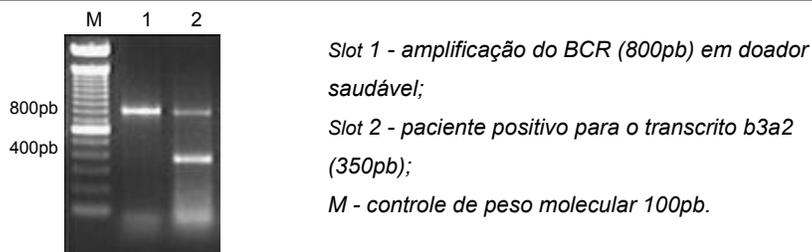


Figura IV.16: RT-PCR para amplificação da t(9;22).

IV. 2.2.5. Amostras negativas para os 4 genes de fusão

Do total de 75 pacientes analisados 35 (46,5%) foram negativos para todas para as 4 translocações de risco.

Foi realizada a comparação das características dos pacientes ao diagnóstico de acordo com a presença de translocações de bom ou mau prognóstico e a ausência de translocações, demonstrando-se não haver diferença entre as medianas de idade dos pacientes dos 3 grupos. No entanto, foi observada uma tendência de associação

entre o sexo feminino e a presença de alterações de bom prognóstico ($p=0,03$) (figura IV.17 A). Ocorreu também associação significativa do grupo sem alterações com uma contagem de leucócitos aumentada (mediana de $53.850/\text{mm}^3$) quando comparada ao grupo com as translocações de baixo risco (mediana de $7.200/\text{mm}^3$) e inferior ao paciente com a translocação de alto risco de recaída ($43.200/\text{mm}^3$) ($p=0,006$) (Figura IV.17 B).

A análise citogenética destas amostras revelou 3 pacientes com alterações na região 11q23 incluindo duas deleções e uma adição, uma $t(10;11)$ complexa, uma adição no cromossomo 10, uma adição no cromossomo 9, uma deleção do cromossomo 12 e dois pacientes com trissomia do 21 (síndrome de Down). O estudo posterior de alterações no gene *FLT3* revelou ainda 4 pacientes positivos (descrição a seguir) dentro do grupo de pacientes negativos para as translocações de risco e com citogenética normal. Desta forma, dentre os 35 pacientes, 13 (37%) tinham alguma anomalia no cariótipo.

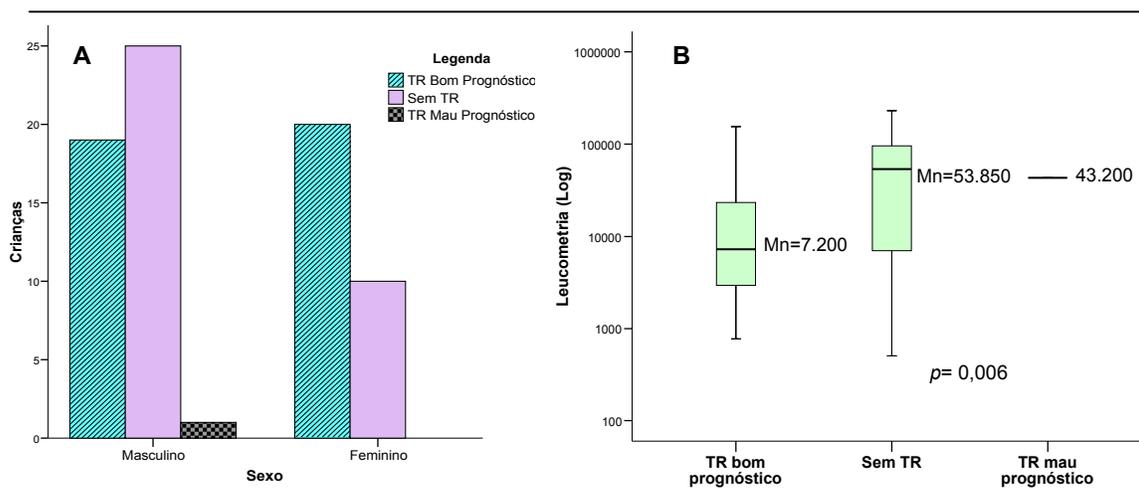


Figura IV.17: Comparação entre sexo (A) ou leucometria ao diagnóstico (B) em função da presença ou ausência de translocações de risco (TR)

IV.2.3. Detecção das alterações no gene *FLT3*

IV.2.3.1. Duplicação interna em tandem (*DIT-FLT3*)

IV.2.3.1.1. LLA de origem B

A presença da duplicação interna em tandem do gene *FLT3* (*DIT-FLT3*) foi avaliada em 131 pacientes com LLA B, uma vez que 21 foram considerados não avaliáveis devido à impossibilidade de amplificar o DNA. A *DIT* foi detectada em apenas 1 uma criança (M/13,5 anos) classificada como FAB L1, com 414.000 leucócitos/mm³ ao diagnóstico a qual apresentava também positividade para os PCRs de IgH e TCR δ B, cariótipo normal e imunofenotipagem inconclusiva (n=64). A figura IV.18 mostra a detecção de *DIT* por PCR, a qual apresentou as bandas correspondentes ao alelo selvagem e ao alelo mutado com igual intensidade.



Figura IV.18: PCR para amplificação da *DIT-FLT3*

IV.2.3.2. LLA de origem T

Foram avaliados 32 pacientes e não foi encontrada a *DIT-FLT3*.

IV.2.3.3. LMA

A *DIT-FLT3* foi avaliada em 80 pacientes com LMA e foram detectados 10 (12,5%) positivos (3M/7F), dos quais 3 eram do subtipo FAB M1, 3 do subtipo M3, uma do subtipo M3v e 3 do subtipo M4. A figura IV.19 mostra o gel de agarose com as amostras positivas.

Das 10 crianças com a *DIT*, as 4 classificadas como M3/M3v apresentaram a t(15;17), as 2 classificadas como M4 apresentaram a t(8;21) sendo uma delas associada à trissomia dos cromossomos 8 e 21, e 1 apresentava a mutação pontual *D835-FLT3*. Em uma criança *DIT-FLT3* positiva não foi possível a pesquisa de genes de fusão pela ausência de material (RNA). Os 2 demais casos com *DIT* que foram negativos para a presença de TR foram analisados por citogenética

convencional e um apresentou cariótipo normal e o outro, falha na obtenção de metáfases.

Uma criança foi negativa para a *DIT* ao diagnóstico (NI=86), porém sua amostra de recaída foi positiva para a presença da alteração.

A análise cuidadosa da intensidade dos fragmentos amplificados nos 9 casos positivos ao diagnóstico para a *DIT-FLT3* revelou: (a) um paciente não a tinha banda correspondente ao alelo selvagem não-mutado; (b) 5 pacientes apresentavam a banda correspondente ao alelo selvagem mas com intensidade menor que a banda correspondente à duplicação; (c) 3 pacientes permaneciam com a banda correspondente ao alelo selvagem com intensidade igual à banda correspondente ao alelo duplicado.

As características destes 10 pacientes serão resumidas a seguir e descritas na tabela IV.12.

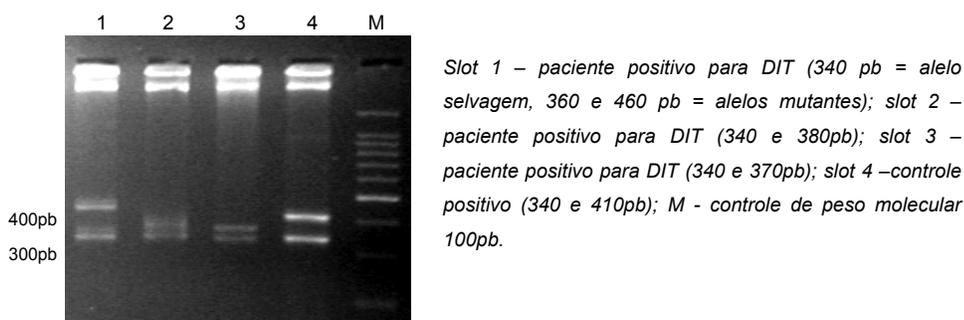


Figura IV.19: PCR para amplificação da *DIT-FLT3*

Idade

Não foi observada associação estatisticamente significativa entre idade e presença da *DIT-FLT3* ($p=0,25$) apesar de a mediana de idade ser maior nestes pacientes (12,3) do que no grupo sem esta alteração (8,7) (Figura IV.20.A).

Leucometria

Foi observada uma tendência à maior contagem de leucócitos ao diagnóstico nos pacientes com a *DIT-FLT3* (mediana de $60.300/\text{mm}^3$), quando comparada ao grupo sem esta alteração (mediana de $11.000/\text{mm}^3$) ($p=0,09$) (Figura IV.20.B).

Sexo

Foi observada uma tendência de associação entre o sexo feminino e a presença da *DIT-FLT3* ($p=0,08$) (Figura IV.20.C).

Alterações moleculares de bom prognóstico

A presença de alterações consideradas de bom prognóstico na LMA (*PML-RAR α* , *AML1-ETO*, *CBF β -MYH11*) não se associou com a *DIT-FLT3* ($p=0,5$). Também não houve diferença estatisticamente significativa na prevalência de *DIT-FLT3* entre as crianças com o gene *PML-RAR α* e aquelas sem esta alteração ($p=0,4$).

Tabela IV.12: Características dos pacientes positivos para a presença de *DIT-FLT3*

NI	Sexo	Idade	FAB	Citogenética	Outras alterações	Leuco
14	F	16,8	M1	Normal		78.800
17	F	14,6	M3	NR	<i>PML-RARα</i>	NR
21	M	13,9	M4	Normal	<i>FLT3-D835</i>	60.300
34	M	13	M1	NR		47.000
47	F	11,7	M1	Falha		95.900
50	F	15,2	M3	NR	<i>PML-RARα</i>	68.000
72	F	8,3	M4	48,XX, +8, +21	<i>AML1-ETO</i>	15.100
86	F	8,2	M4	Falha	<i>AML1-ETO</i>	35.600
80	F	1,9	M3	NR	<i>PML-RARα</i>	154.800
91	M	10,8	M3v	46,XY,t(15;17)(q22;q12)	<i>PML-RARα</i>	2.800

NI=número de identificação; Sexo M=masculino/F=feminino; FAB= Classificação Franco-Americano-Britânica; Leuco= leucócitos/mm³; NR= não realizado.

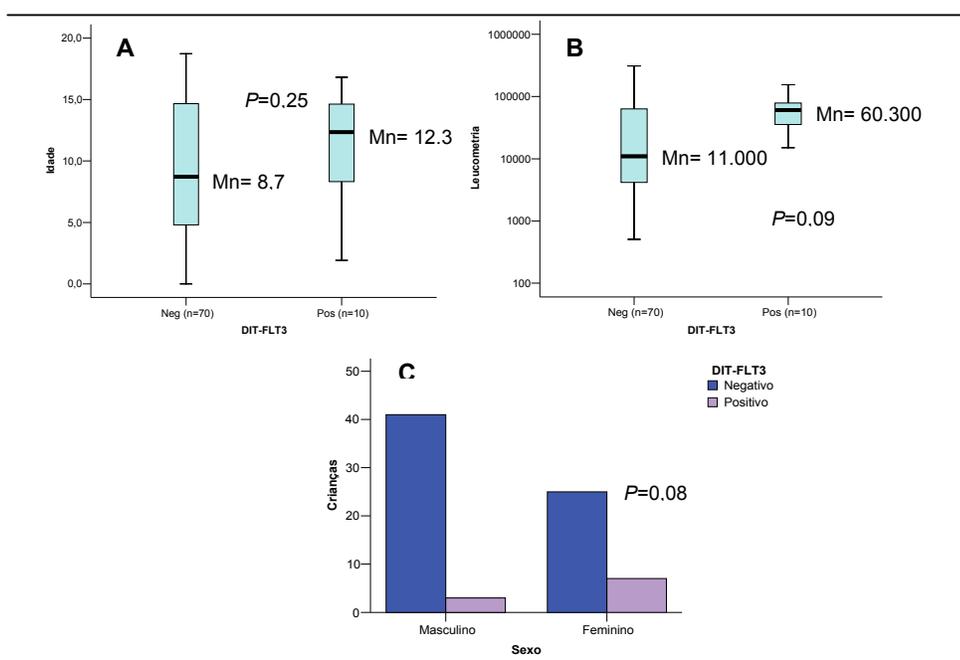


Figura IV.20: Comparação entre idade (A) ou leucometria ao diagnóstico (B) ou sexo (C) e presença da *DIT-FLT3*

IV.2.3.2. Mutação pontual

IV.2.3.2.1. LLA de origem B

A presença da mutação pontual no gene *FLT3* no locus 835 (*FLT3-D835*) foi avaliada em 131 pacientes com LLA B, uma vez que 21 foram considerados não avaliáveis devido à impossibilidade de amplificar o DNA. A mutação foi detectada em apenas 1 uma criança (F/15,6 anos) a qual apresentava leucometria ao diagnóstico de 7300 células/mm³, positividade para o PCR de IgH, cariótipo com a t(2;14)(q23;q32) associado e imunofenotipagem inconclusiva (n=77). A figura IV.21 mostra o gel de agarose com o produto de PCR antes e depois da digestão enzimática (RFLP).

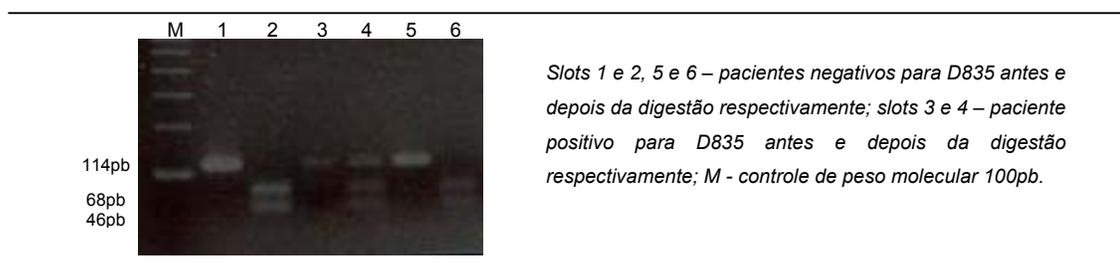


Figura IV.21: PCR para amplificação de *FLT3-D835*

IV.2.3.2.2. LLA de origem T

Foram avaliados 32 pacientes e não foi encontrada a *FLT3-D835*.

IV.2.3.2.3. LMA

A presença de *FLT3-D835* foi avaliada em 80 pacientes com LMA e foram detectados 3 (4%) positivos (1M/2F), dos quais 1 era do subtipo FAB M0 e tinha cariótipo normal, 1 do subtipo M3 positivo para a t(15;17) e 1 do subtipo M4, cariótipo normal e positivo também para a *DIT-FLT3* (tabela IV.13). A figura IV.22 mostra o gel de agarose com os produtos da digestão enzimática (RFLP).

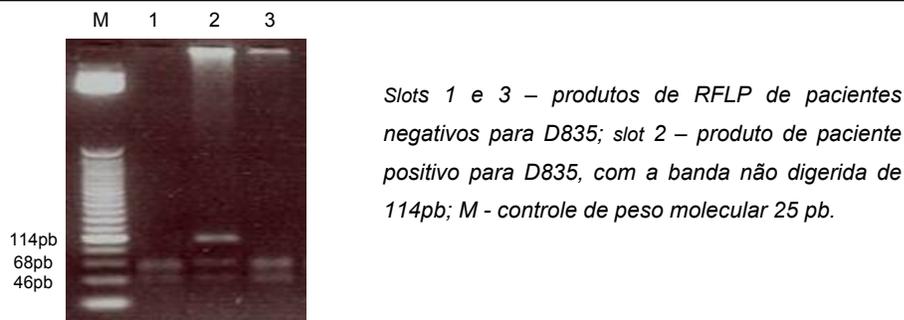


Figura IV.22: PCR para amplificação de FLT3-D835

Idade

Não foi observada associação estatisticamente significativa entre idade e presença da mutação *FLT3-D835*, com mediana de 12,4 anos no grupo com a mutação e de 10,7 anos no grupo sem esta alteração ($p=0,65$) (Figura IV.23.A).

Leucometria

Em relação à contagem de leucócitos ao diagnóstico, não houve diferença estatisticamente significativa nos pacientes com a *FLT3-D835* (mediana de $60.300/\text{mm}^3$), quando comparada ao grupo sem esta alteração (mediana de $23.600/\text{mm}^3$) ($p=0,98$) (Figura IV.23.B).

Sexo

Não foi observada associação entre sexo e presença da *FLT3-D835* ($p=0,55$).

Tabela IV.13: Características dos pacientes positivos para a presença da mutação FLT3-D835

NI	Sexo	Idade	FAB	Citogenética	Outras alterações	Leuco
63	F	9,8	M0	Normal		87.000
21	M	13,9	M4	Normal	<i>DIT-FLT3</i>	60.300
33	F	12,5	M3	Falha	<i>PML-RARα</i>	1.000

NI=número de identificação; Sexo M=masculino/F=feminino;

FAB= Classificação Franco-Americano-Britânica; Leuco= leucócitos/ mm^3 ; NR= não realizado.

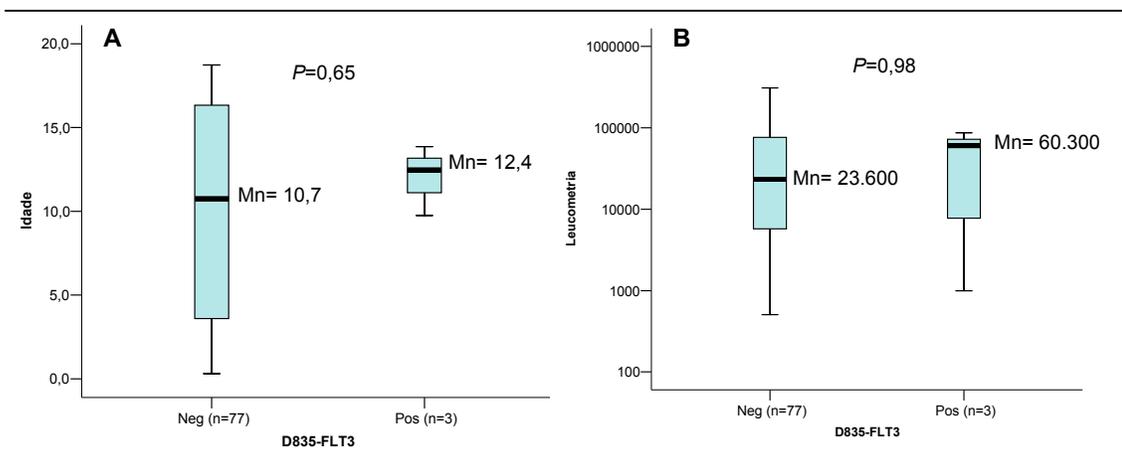


Figura IV.23: Comparação entre idade (A) ou leucometria ao diagnóstico (B) ou sexo (C) e presença da FLT3-D835.

IV.3. Impacto das alterações moleculares na evolução clínica

IV.3.1. LLA B

IV.3.1.1. Fatores que influenciaram a taxa de remissão completa

No grupo de crianças com LLA de origem B estudado (n=152) a taxa de remissão completa foi de 95%.

Não foi observada associação entre a contagem de leucócitos ao diagnóstico e remissão completa ($p=0,1$) e da mesma forma a associação entre remissão e idade não foi estatisticamente significativa ($p=0,4$), apesar de a mediana no grupo que alcançou a remissão ter sido menor do que a mediana do grupo que não alcançou (5 vs 10 anos).

A taxa de remissão completa não esteve associada à presença da translocação de bom prognóstico (*TEL-AML1*) ($p=0,3$). A presença das translocações de mau prognóstico (*BCR-ABL*, *MLL-AF4*, *PBX1-E2A*) também não influenciou a taxa de remissão uma vez que a maioria dos pacientes alcançou a remissão completa, com exceção de uma criança com a *t(1;19)*, fato que pode ter ocorrido ao acaso. A presença de alterações no gene *FLT3*, no entanto, teve impacto significativo, pois ambos pacientes positivos não entraram em remissão ($p=0,004$).

IV.3.1. 2. Análise de Sobrevida

O tempo mediano de acompanhamento dos pacientes foi de 27 meses, no entanto, ao considerarmos apenas os pacientes vivos no momento da análise (88%), o tempo mediano de acompanhamento foi de 31 meses. A probabilidade estimada de sobrevida global foi de 77% em 5 anos (figura IV.24). Todos os pacientes foram censurados para a análise de sobrevida na data da última consulta de acompanhamento.

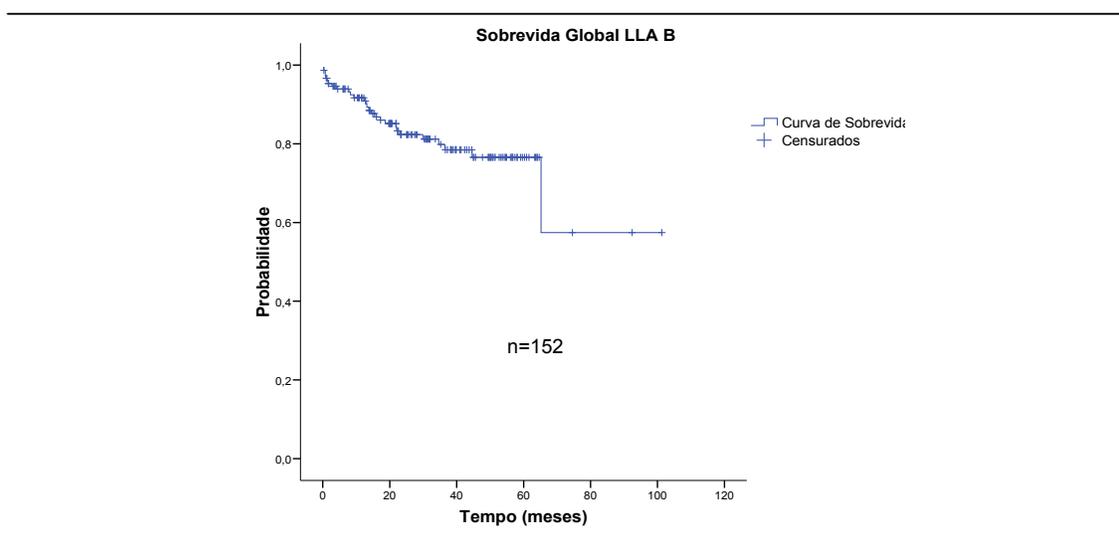


Figura IV.24: Curva de probabilidade de sobrevida global das 152 LLAs analisadas

A análise de sobrevida livre de eventos, calculada pelo tempo desde o diagnóstico até a primeira recaída hematológica, revelou uma mediana de 25 meses e probabilidade de 61% de sobrevida livre de doença em 5 anos (figura IV.25). É importante ressaltar que os pacientes que faleceram antes da avaliação de recidiva foram censurados na data do óbito. Um paciente foi excluído desta análise uma vez que não foi possível determinar a data correta de recaída hematológica.

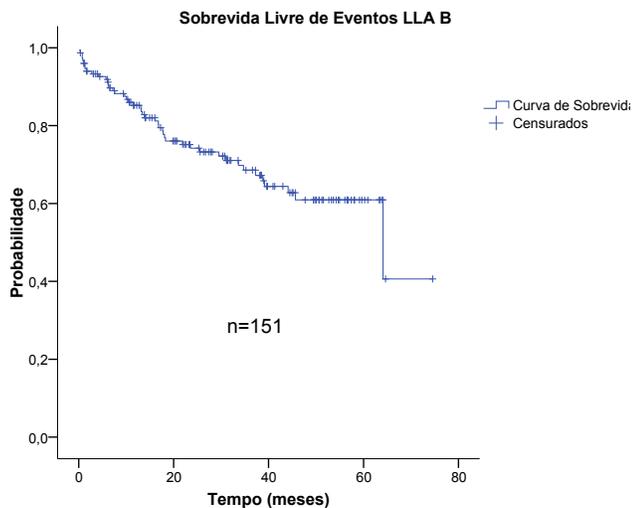


Figura IV.25.: Curva de probabilidade de sobrevida global das 152 LLAs analisadas
* Um paciente foi excluído da análise

A sobrevida global atingida utilizando-se o protocolo GBTLI foi de 84%, e a do BFM de 64%, fato que não pode ser considerado uma vez que a escolha do protocolo de tratamento foi tendenciosa, uma vez que o uso de GB é condicionado à não administração de qualquer medicação prévia.

Não houve correlação entre a presença da alteração molecular de bom prognóstico (*TEL-AML1*) e a sobrevida global (mediana de 33 vs 22 meses nos grupos com e sem a alteração, respectivamente, $p=0,16$), assim como ocorreu em relação à sobrevida livre de evento (28 vs 18, $p=0,27$), apesar de as medianas de sobrevidas serem maiores na presença da translocação e o gráfico mostrar curvas bem diferentes (figura IV.26).

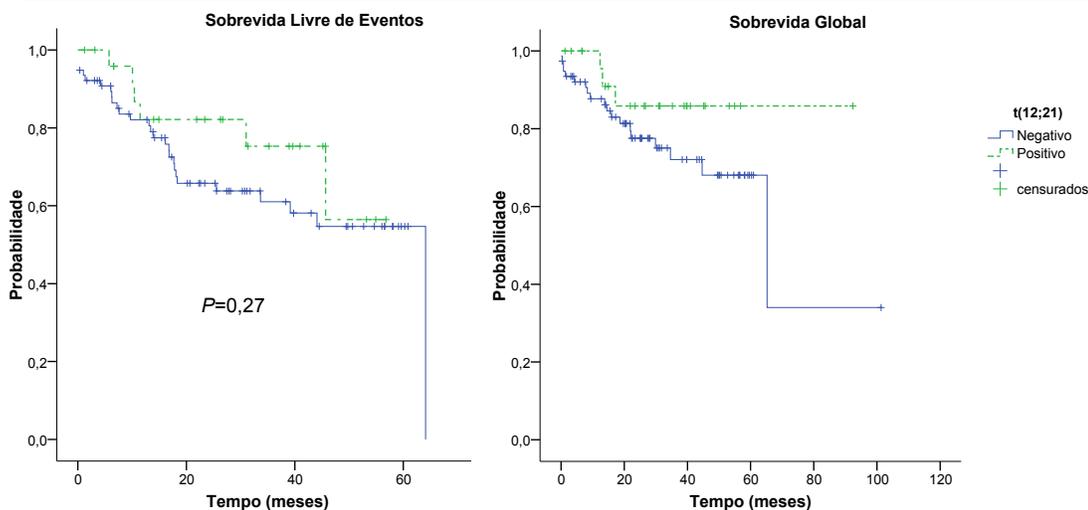


Figura IV.26: Curvas de probabilidade de sobrevida livre de eventos (A) e global (B) em função da presença da *t(12:21)*

A presença de alterações de mau prognóstico (*BCR-ABL*, *PBX1-E2A* e *MLL-AF4*), por sua vez, foi correlacionada com a menor taxa de sobrevida global em 5 anos (55% vs 80%, $p=0,01$) assim como de sobrevida livre de evento (32% vs 66%, $p=0,006$) (Figura IV.27).

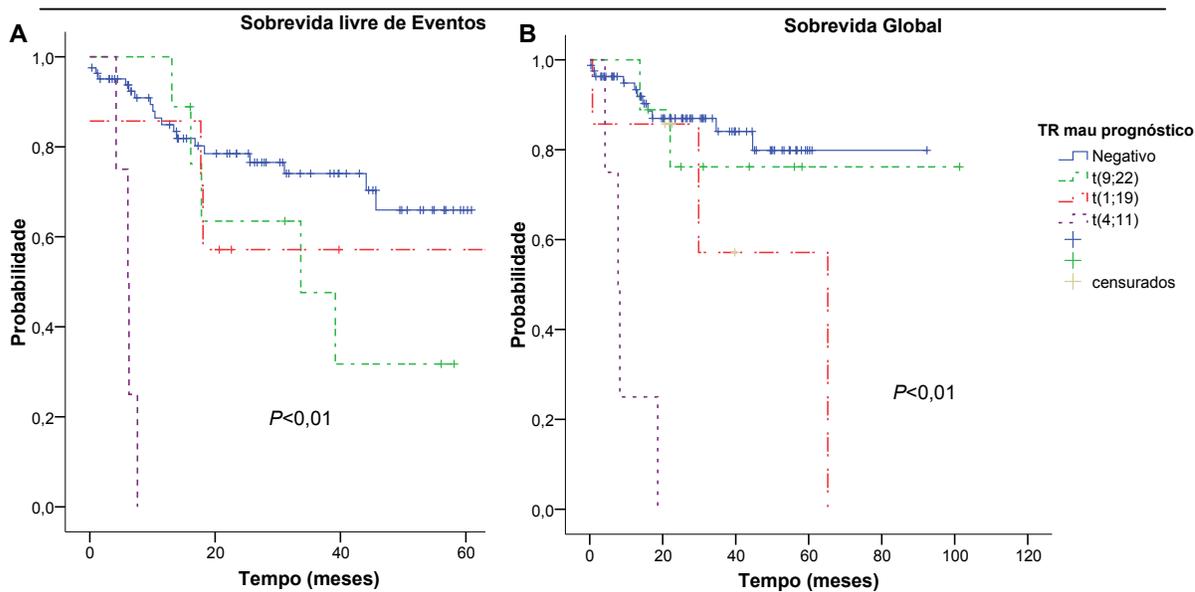


Figura IV.27: Curvas de probabilidade de sobrevida livre de eventos (A) e global (B) em função da presença das TR de mau prognóstico

O método de regressão logística múltipla foi utilizado para analisar a sobrevida dos pacientes com LLA B em função das seguintes variáveis: *TEL-AML1*, translocações de mau prognóstico, *BCR-ABL*, *MLL-AF4*, *E2A-PBX1* separadamente, e alterações em *FLT3*. Após a análise somente a presença de *BCR-ABL*, *MLL-AF4* e *FLT3* mostraram associação com a sobrevida (Tabela IV.14).

Tabela IV.14; Análise multivariada do impacto de alterações genéticas na sobrevida da LLA de origem B

Alteração	Sobrevida	p (sig)	exp β	Intervalo de confiança 95%	
				Menor	Maior
TR mau prognóstico	SLE	0,008	0,37	0,18	0,77
	SG	0,010	0,33	0,13	0,81
<i>BCR-ABL</i>	SLE	0,030	0,36	0,14	0,91
	SG	0,32	0,52	0,14	1,89
<i>MLL-AF4</i>	SLE	0,012	0,2	0,06	0,70
	SG	0,001	0,11	0,03	0,41
Alt <i>FLT-3</i>	SLE	0,000	0,038	0,007	0,20
	SG	0,000	0,025	0,004	0,14

Exp β : razão de taxas, para o cálculo de risco relativo; p: probabilidade; SLE: sobrevida livre de evento; SG: sobrevida global.

A probabilidade de SLE foi 5 vezes menor na presença de *MLL-AF4* e quase 3 vezes menor na presença de *BCR-ABL*. Este último, porém, não teve impacto na sobrevida global, enquanto a presença de *MLL-AF4* significou probabilidade de SG 9 vezes menor que os demais. A probabilidade de SLE na presença de alterações no gene *FLT3* foi 26 vezes menor do que na sua ausência e a probabilidade de SG foi 40 vezes menor.

O impacto das alterações em *FLT3* foi analisado em comparação com a leucometria ao diagnóstico com o intuito de evitar interferência do papel da leucometria no cálculo da sobrevida. No grupo com leucometria inicial baixa (<20.000/ μ L) um paciente apresentou a mutação pontual de *FLT3*. O método de Kaplan Meier revelou taxa de SLE em 5 anos de 62% nos pacientes sem alteração em *FLT3* e 0% no grupo com a mutação ($p < 0,001$), além de taxa de SG de 80% contra 0% na presença da mesma. Já no grupo de leucometria inicial alta (>20.000/ μ L) um paciente apresentou a duplicação em *FLT3* e a análise estatística revelou taxa de SLE em 5 anos de 44% nos pacientes sem alteração em *FLT3* e 0% no grupo com a mutação ($p < 0,001$), além de SG de 67% contra 0% na presença de *DIT-FLT3*. A análise multivariada confirmou o impacto das alterações em *FLT3* na SLE e SG independente da leucometria inicial ($p \leq 0,01$).

IV.3.2. LLA T

IV.3.2.1. Fatores que influenciaram a taxa de remissão completa

No grupo de crianças com LLA de origem T estudado (n=38) a taxa de remissão completa foi de 71%.

Não foi observada associação entre a contagem de leucócitos ao diagnóstico e remissão completa (medianas de 87.400 vs 90.200, no grupo que não entrou e o que entrou em remissão respectivamente)($p=0,8$) e da mesma forma a associação entre remissão e idade não foi estatisticamente significativa (com medianas de 11 vs 10 anos).

IV.3.2. 2. Análise de Sobrevida

O tempo mediano de acompanhamento dos pacientes foi de 21 meses, no entanto, ao considerarmos apenas os pacientes vivos no momento da análise (45%), o tempo mediano de acompanhamento foi de 31 meses. A probabilidade estimada de sobrevida global foi de 40% em 5 anos (figura IV.28). Todos os pacientes foram censurados para a análise de sobrevida na data da última consulta de acompanhamento.

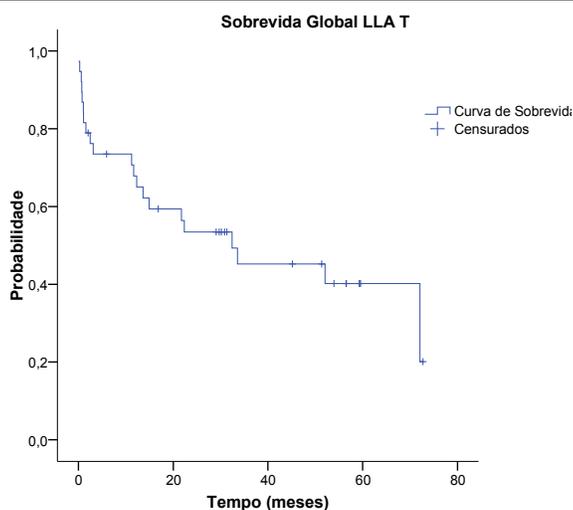


Figura IV.28: Curva de probabilidade de SG na LLA de origem T

A análise de sobrevida livre de eventos, calculada pelo tempo desde o diagnóstico até a primeira recaída hematológica, revelou uma mediana de 15 meses e probabilidade de 8% de sobrevida livre de doença em 5 anos (figura IV.29).

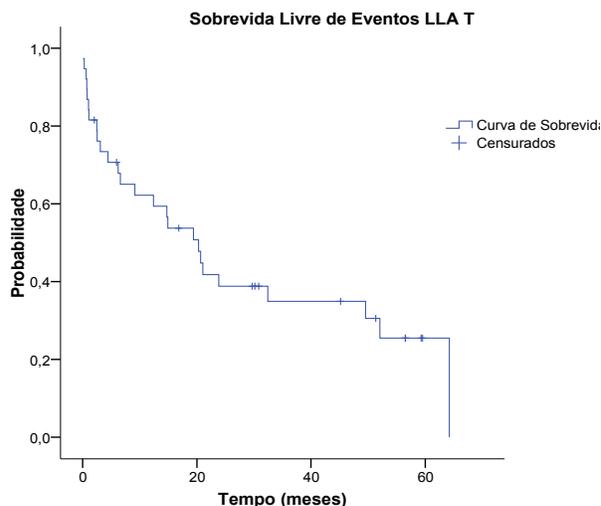


Figura IV.29: Curva de probabilidade de SLE na LLA de origem T

IV.3.3. LMA

IV.3.3. 1. Fatores que influenciaram a taxa de remissão completa

No grupo de crianças com LMA estudado ($n=94$) a taxa de remissão completa foi de 84%. Foi observada associação estatisticamente significativa entre idade ao diagnóstico e remissão completa ($p=0,03$), com mediana de 8,3 anos no grupo que alcançou remissão e de 14,5 anos no grupo que não alcançou. A associação entre remissão e contagem de leucócitos ao diagnóstico não foi estatisticamente significativa ($p=0,09$), apesar de a mediana no grupo que alcançou a remissão ($9.800/\text{mm}^3$) ter sido menor do que a mediana do grupo que não alcançou ($68.000/\text{mm}^3$).

A análise separada dos pacientes com síndrome de down revelou associação significativa com a menor idade, comparado às demais LMAs. Todos os 5 pacientes com síndrome de Down entraram em remissão.

A taxa de remissão completa não esteve associada à presença de alterações de bom prognóstico (*PML-RAR α* , *AML1-ETO*, *CBF β -MYH11*) sendo de 89% no grupo com as alterações e de 86% no grupo sem as mesmas ($p=0,46$). A presença de alterações de mau prognóstico (*BCR-ABL*, *DIT-FLT3* e *FLT3-D835*), no entanto,

influenciou a taxa de remissão uma vez que o número de pacientes que entrou em remissão completa foi menor no grupo com as alterações (60%) do que o grupo sem estas (91%) ($p=0,01$). Uma análise separada do grupo de pacientes com alterações no gene *FLT3* revelou taxa significativamente menor de remissão (58%) em relação ao grupo sem estas alterações (93%) ($p=0,007$), tendo a *DIT-FLT3* sido mais fortemente associada à menor taxa de remissão (60% vs 91%, $p=0,02$) do que a mutação *FLT3-D835* (66% vs 88%, $p=0,41$), provavelmente devido ao número reduzido de pacientes neste grupo ($n=3$).

IV.3.3. 2. Análise de Sobrevida

O tempo mediano de acompanhamento dos pacientes foi de 17 meses, no entanto, ao considerarmos apenas os pacientes vivos no momento da análise (69%), o tempo mediano de acompanhamento foi de 26 meses. A probabilidade estimada de sobrevida global foi de 56% em 5 anos (figura IV.30). Todos os pacientes foram censurados para a análise de sobrevida na data da última consulta de acompanhamento.

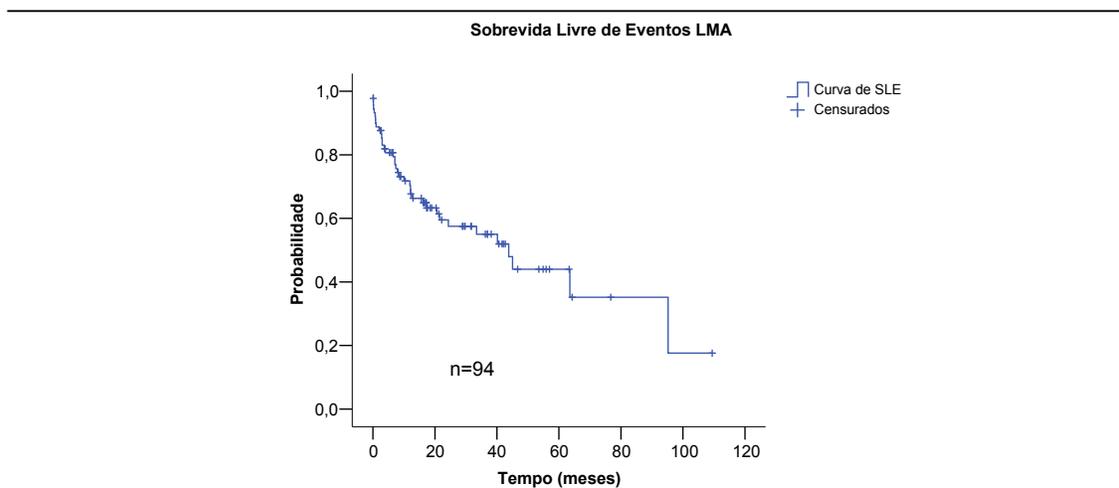


Figura IV.30: Curva de probabilidade de sobrevida global das 94 LMAs

A análise de sobrevida livre de eventos revelou uma mediana de 43 meses e probabilidade de 44% de sobrevida livre de doença em 5 anos (figura IV.31). É importante ressaltar que os pacientes que faleceram antes da avaliação de recidiva foram censurados na data do óbito. Quatro pacientes foram excluídos desta análise uma vez que não foi possível determinar a data correta de recaída hematológica.

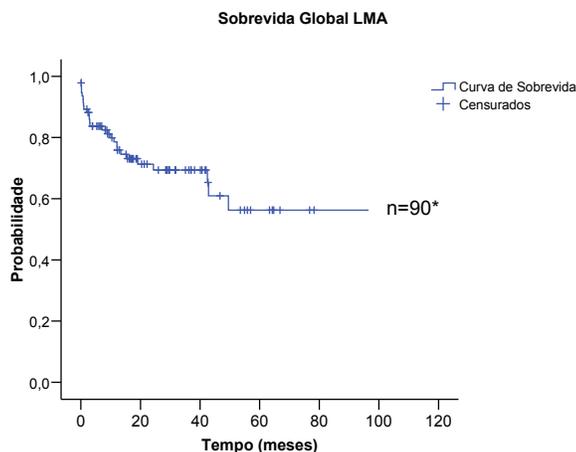


Figura IV.31: Curva de probabilidade de sobrevida livre de evento das LMAs analisadas *Quatro pacientes foram excluídos da análise

Não houve correlação entre a presença de alterações moleculares de bom prognóstico (*PML-RAR α* , *AML1-ETO*, *CBF β -MYH11*) e a sobrevida livre de evento (17 vs 12 meses nos grupos com e sem alterações, respectivamente, $p=0,24$), assim como ocorreu em relação à sobrevida global (mediana de 43 vs 21 meses, $p=0,23$). A análise separada da presença de cada uma destas translocações também não demonstrou correlação com a sobrevida dos pacientes em estudo.

A presença de alterações de mau prognóstico (*BCR-ABL* e alterações em *FLT3*), por sua vez, foi correlacionada com a menor taxa de sobrevida global (61 vs 79, $p=0,001$) assim como de sobrevida livre de evento (50 vs 70, $p<0,001$) (Figura IV.32).

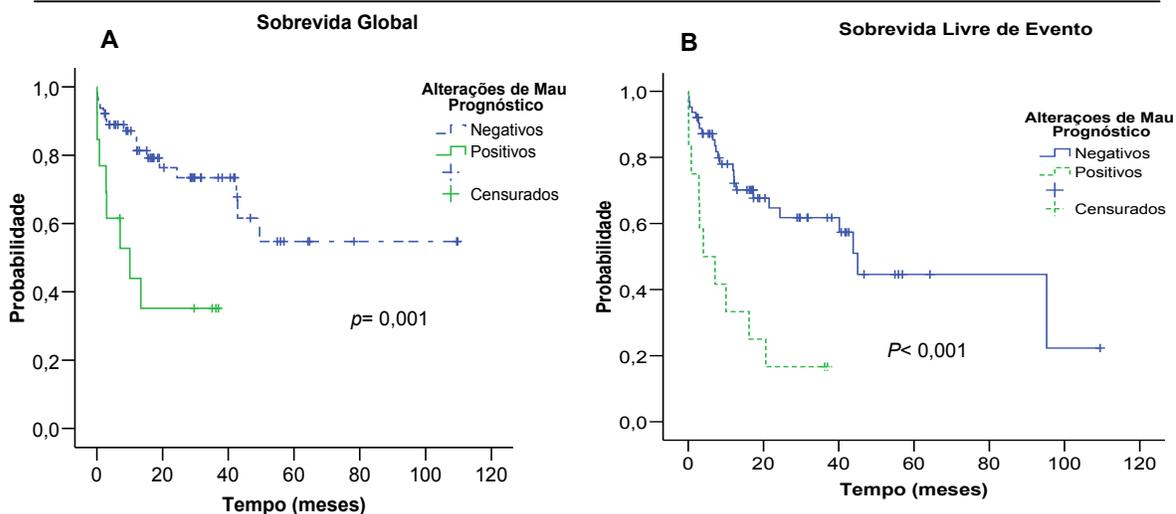


Figura IV.32: Curva de probabilidade de sobrevida livre de evento em função da presença de alterações de mau prognóstico

Analisando as alterações de mau prognóstico separadamente, foram construídas curvas para avaliar o impacto de *BCR-ABL* e das alterações no gene *FLT3*.

Observa-se no gráfico abaixo (figura IV.33) uma enorme diferença nas sobrevidas global e livre de evento em relação à presença ou ausência do gene de fusão *BCR-ABL*, visto que o único paciente em que a mesma foi detectada recaiu e faleceu, no entanto, não é possível descartar a possibilidade de o fato ter ocorrido ao acaso.

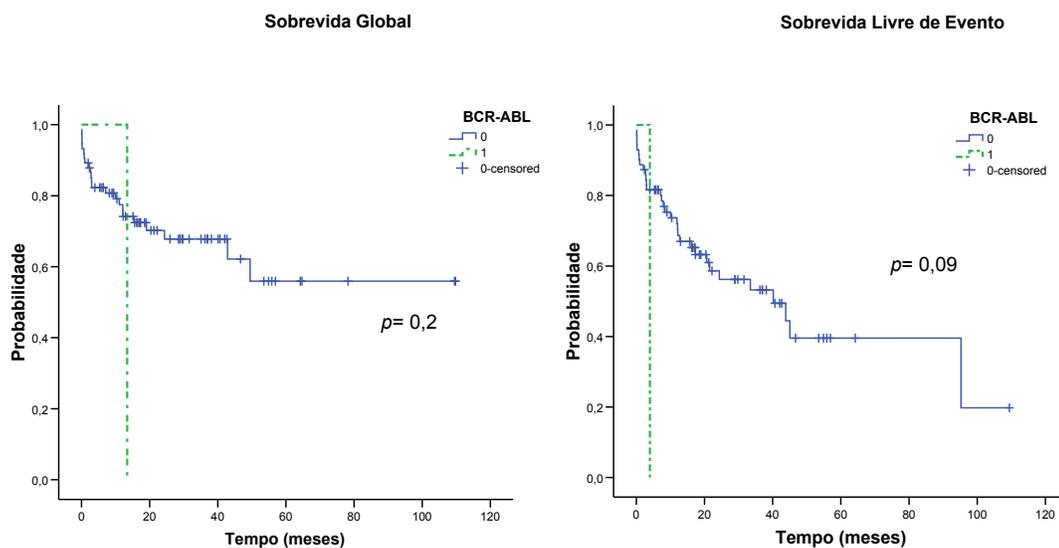


Figura IV.33: Curvas de probabilidade de sobrevida global (A) e de sobrevida livre de eventos (B) em função da presença ou ausência de *BCR-ABL*.

Foi também analisado o impacto da presença de alterações no gene *FLT3* na sobrevida dos pacientes com LMA. A mediana de sobrevida global foi significativamente menor na presença de *DIT-FLT3* em relação ao grupo negativo para a presença de alterações no gene (7 vs 17 meses) e a taxa de sobrevida global em 3 anos caiu de 53% para 36% ($p=0,005$). Da mesma forma, a presença de *DIT* indicou redução da mediana de sobrevida livre de evento (0 vs 16 meses) ($p<0,001$). O impacto da presença de *FLT3-D835* sozinho ou associado à *DIT-FLT3*, embora não significativo devido ao tamanho da amostra, revela a tendência de redução da taxa de sobrevida global em comparação com o grupo negativo para as mesmas (36% vs 70% em 3 anos, $p=0,3$), assim como ocorre com a sobrevida livre de eventos (11% vs 68% em 3 anos, $p=0,5$) (Figura IV.34)

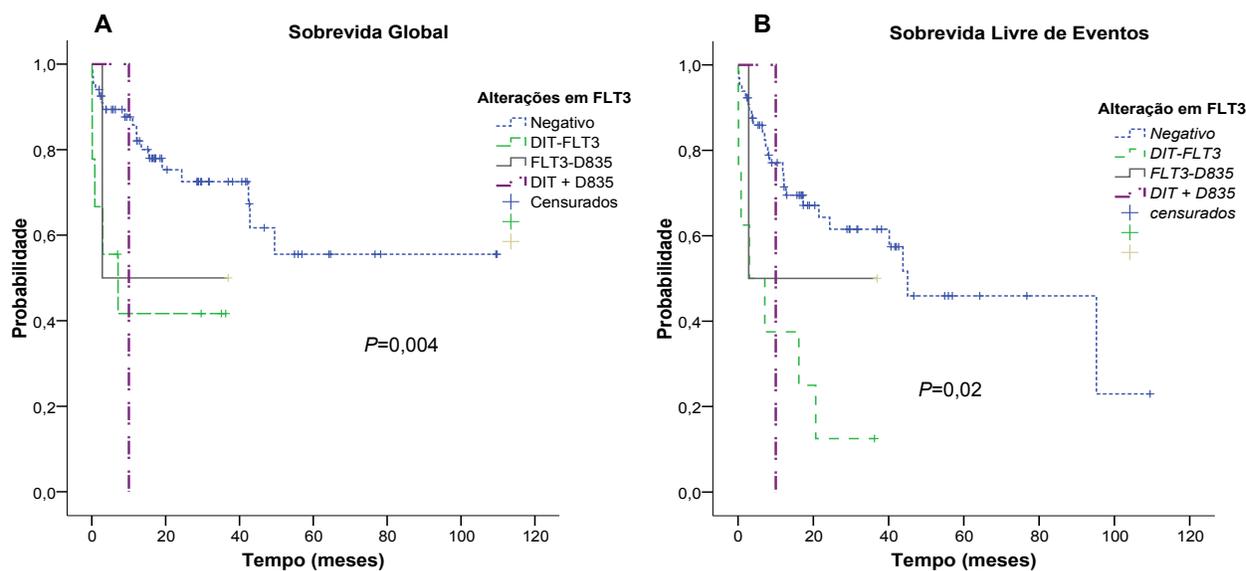


Figura IV.34: Curvas de probabilidade de sobrevivida global (A) e de sobrevivida livre de eventos (B) em função da presença ou ausência de alterações no gene *FLT3*.

O impacto das diferentes alterações em *FLT3*, no entanto, precisa ser avaliado de forma minuciosa uma vez que alguns pacientes apresentam alterações de bom prognóstico concomitantes. A seguir serão avaliados os casos separadamente de acordo com a outra alteração detectada:

DIT-FLT3* x *AML1-ETO

A presença de *AML1-ETO* não foi significativamente associada à maior probabilidade de sobrevivida livre de eventos ou com a global, apesar de o gráfico apontar para uma tendência à melhor resposta no grupo com a translocação (figura IV.35.A). Porém, ao analisar este grupo de pacientes em função da presença de *DIT-FLT3*, foi observada uma tendência à maior probabilidade de recaída no grupo com as duas alterações do que no grupo apenas com a translocação. Os 2 pacientes com *DIT-FLT3* recaíram, mas não morreram, e tiveram mediana de sobrevivida livre de evento de 18 meses, enquanto os demais apenas com *AML1-ETO* tiveram mediana de 38 meses ($p=0,07$) (figura IV.35.B), porém não houve diferença significativa entre a sobrevivida global dos dois grupos ($p=0,5$)

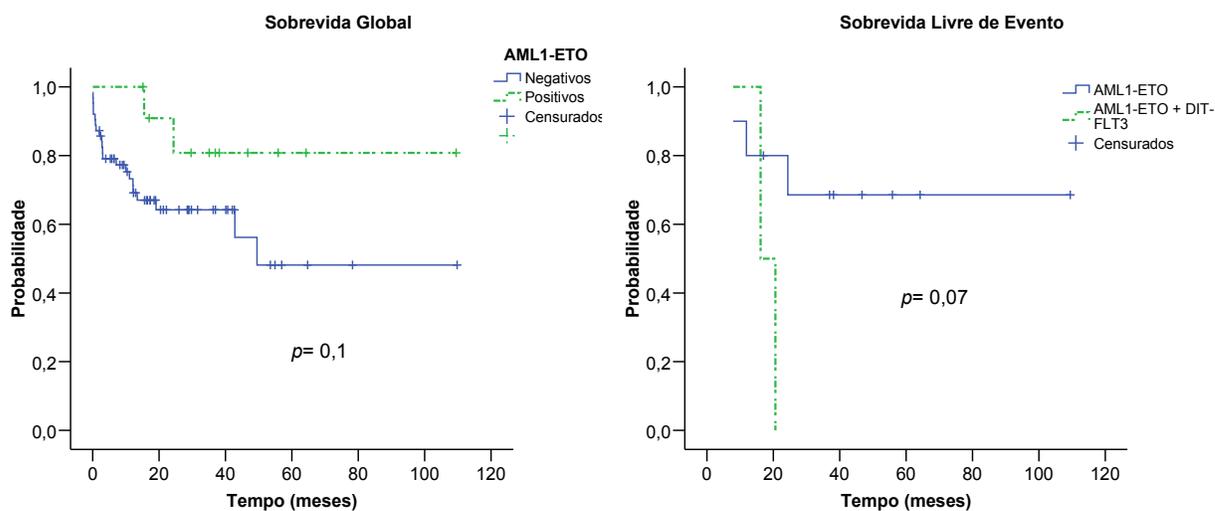


Figura IV.35: (A) Curva de probabilidade de sobrevida global comparando pacientes com e sem a AML1-ETO. (B) Curva de probabilidade de sobrevida livre de eventos em crianças com AML1-ETO em função da presença ou ausência de DIT-FLT3.

DIT-FLT3 x PML-RAR α

A presença da t(15;17) não alterou significativamente a sobrevida global ou livre de eventos dos pacientes em relação aqueles que não as têm, apesar de a sobrevida global mediana apontar para tendência à melhor resposta no grupo com a translocação (15 vs 17 meses). Do total de pacientes com a translocação (n=26), todos os 5 que não entraram em remissão faleceram em até 1 mês após o diagnóstico, incluindo 3 casos com *DIT-FLT3* concomitante (3 de 4). Ainda outras 3 crianças recaíram tardiamente e faleceram, após um ano ou mais de tratamento. Estas recaídas tardias seguidas de óbito são responsáveis pela queda abrupta da curva de *PML-RAR α* nos gráficos de sobrevida.

A análise da presença de *DIT-FLT3* nos pacientes *PML-RAR α* positivos revelou impacto no comportamento clínico, pois tanto a SLE quanto a SG foram significativamente menores nos pacientes com ambas as alterações (figura IV.36). A taxa de sobrevida livre de eventos em 3 anos caiu de 60% na presença de *PML-RAR α* para 25% nos casos com *DIT-FLT3* concomitante (mediana 16 vs 0 meses, $p=0,01$) e, da mesma forma, a taxa de sobrevida global em 3 anos caiu de 80% para 25% (mediana 16 vs 0 meses, $p=0,001$)

Porém é essencial ressaltar que 2 das 4 crianças com as duas alterações faleceram nas primeiras 42 horas e não puderam se beneficiar com o efeito do ATRA, com isso

é impossível definir se o óbito ocorreu pela maior agressividade da doença ou pelo alto risco de morte por hemorragia anterior à remissão. Este fato, porém, não altera o valor prognóstico independente conferido pela presença da duplicação nestes pacientes através da análise multivariada de Cox (tabela IV.15), a qual revelou que a probabilidade de SLE foi 6 vezes menor na presença de *DIT-FLT3* e a probabilidade de SG foi 8 vezes menor.

A comparação entre os 4 pacientes com *DIT-FLT3* e *PML-RAR α* e os demais pacientes apenas positivos para *DIT-FLT3* por sua vez revelou que não há diferença de resposta entre ambos. A comparação destes com o grupo *DIT-FLT3* negativo demonstrou o impacto independente na pior resposta ao tratamento, ou seja, a presença de *PML-RAR α* não conferiu melhor prognóstico aos casos positivos para a *DIT-FLT3*.

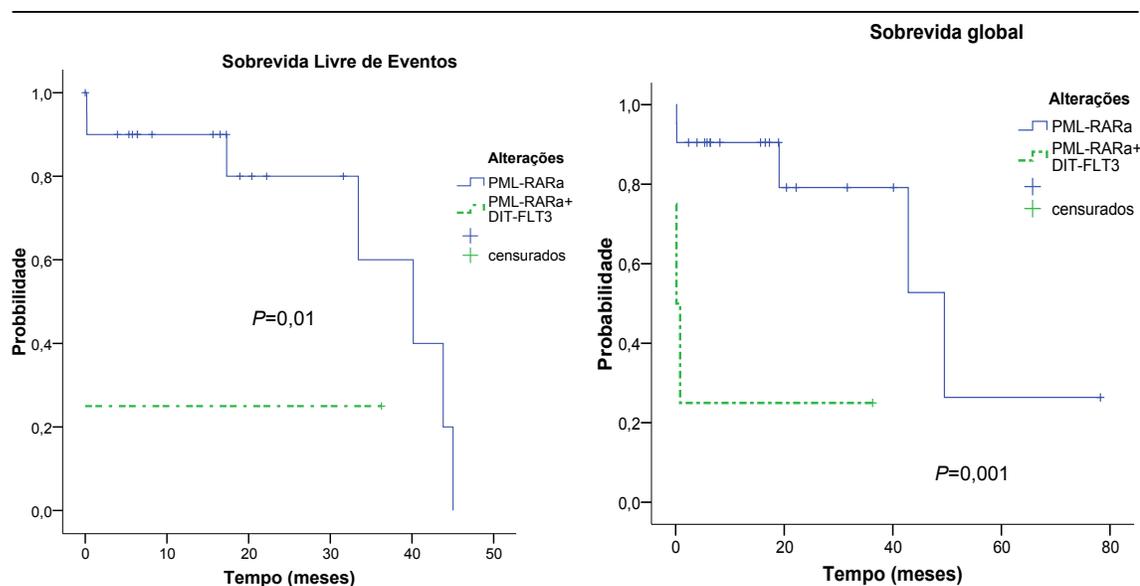


Figura IV.36: (A) Curva de probabilidade de sobrevida global e (B) de sobrevida livre de eventos em crianças com *PML-RAR α* em função da presença ou ausência de *DIT-FLT3*.

Tabela IV.15: Análise multivariada do impacto de alterações genéticas na sobrevida da LMA em função da presença de *PML-RAR α* e *DIT-FLT3*

<i>PML-RARα</i> +	<i>p</i> (sig)	exp B	Intervalo de confiança 95%	
			Menor	Maior
<i>DIT-FLT3</i>				
SLE	0,03	0,17	0,04	0,83
SG	0,01	0,12	0,02	0,61

FLT3- D835 x PML-RAR α

O paciente com *FLT3-D835* e *PML-RAR α* não recaiu nem morreu, enquanto os outros 2 com a mutação mas sem a translocação morreram, um nem chegando a entrar em remissão (SG=85 dias) e outro recaído e falecendo (SG= 301 dias). No entanto, o impacto deste paciente em relação aos demais com a translocação não pôde ser calculado, pois o tempo de seguimento foi curto (caso censurado em 37 meses), além do fato não haver como afirmar estatisticamente o valor do seguimento de um só paciente uma vez que sua evolução poderia ter tomado qualquer rumo ao acaso.

Apesar disto, o gráfico com a probabilidade de sobrevida do único paciente com a *FLT3-D835* e *PML-RAR α* demonstra que ele teve percurso melhor que os outros que apresentavam apenas a translocação (figura IV.37).

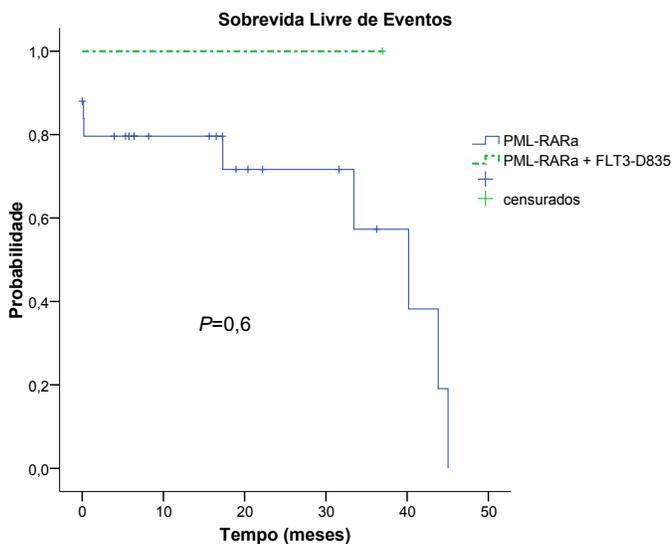


Figura IV.37: Curva de sobrevida livre de eventos comparando os casos positivos para *PML-RAR α* na presença ou ausência de *FLT3-D835*

DIT-FLT3 x FLT3-D835

Não houve diferença significativa de probabilidade de sobrevida na presença de ambas as alterações em *FLT3* em relação ao grupo apenas com *DIT-FLT3*. O mesmo ocorreu quando a comparação foi realizada com os demais casos apenas com *FLT3-D835*. No entanto a comparação com o grupo de pacientes negativos

para as 2 alterações confirma o prognóstico desfavorável visto que o paciente com *DIT-FLT3* e *FLT3-D835* positivos recaiu e faleceu.

Análise da intensidade de alelos de *FLT3*

Foi analisado o impacto da diferença de intensidade das bandas correspondentes aos alelos do gene *FLT3* visualizadas em gel de agarose na sobrevida dos pacientes com *DIT-FLT3*. Apenas um paciente (n=47) teve perda total do alelo selvagem e este nem ao menos entrou em remissão (SG= 7 meses). Os casos com perda de intensidade da banda correspondente ao alelo selvagem tiveram SLE menor, em comparação aos casos sem redução de intensidade da banda (mediana de 20 vs 0 meses, $p= 0,1$), assim como menor SG (mediana de 35 vs 3 meses, $p= 0,26$), mas não foi obtido significado estatístico provavelmente em virtude da pequena amostragem de pacientes.

IV.4. Avaliação da Doença Residual Mínima

As amostras de pacientes foram enviadas quando houve sinal de recaída hematológica, salvo aqueles que se beneficiavam de terapias alvo-específicas como GLIVEC e ATRA que foram sequencialmente enviados desde a avaliação da remissão para monitorar os níveis de *BCR-ABL* e *PML-RAR α* .

Foram analisados os marcadores detectados ao diagnóstico e a presença destes foi comparada ao comportamento clínico subsequente, em geral associado à recaída clínica.

As crianças com LLA de origem T não foram testadas para a presença de translocações de risco, mas a análise citogenética detectou alterações no cariótipo de algumas, as quais foram utilizadas junto a detecção de rearranjo de TCR para a detecção de DRM.

As crianças com LLA B que se apresentaram algum marcador (rearranjo clonal de IgM, TCR, genes de fusão ou alteração em *FLT3*) foram testadas para a presença destes no acompanhamento. Quando havia sido detectada mais de uma alteração a prioridade era para a análise do gene de fusão, pois a técnica de RT-PCR tem maior sensibilidade que a PCR convencional.

Algumas amostras de pacientes que não puderam ser enviadas ao diagnóstico ou que não tiveram material avaliável foram enviadas na recaída e testadas para todas as alterações em estudo. Em um destes casos foi detectada a presença de *TEL-AML1*, que passou a servir como marcador de seu clone leucêmico.

Nas LMAs os pacientes contaram apenas com as translocações de risco ou com as alterações no gene *FLT3* previamente detectadas como marcadores de DRM. Assim como na LLA as amostras de pacientes que não foram analisadas ao diagnóstico foram testadas para todas as alterações em estudo na recaída. Um caso positivo para a t(8;21) ao diagnóstico (NI: 86) foi também analisada a presença de a *DIT-FLT3* na recaída, que havia sido negativa ao diagnóstico. Novamente foi detectada a t(8;21) e também foi encontrada a *DIT-FLT3*.

V. DISCUSSÃO

Segundo as estimativas de incidência de câncer no Brasil, publicadas pelo INCA, as leucemias atingiram 5.330 homens e 4.220 mulheres no ano de 2006. O câncer infantil representou cerca de 0,5 a 3% de todas neoplasias, no entanto ainda não há dados oficiais do Ministério da Saúde sobre a incidência da leucemia aguda nas crianças brasileiras. Apesar disto, um enorme esforço tem sido realizado para cadastrar todos os casos para que se possa avaliar a incidência da doença, caracterizá-la em termos de eventuais diferenças geográficas e acompanhar sua evolução. Com este intuito foi criado em 2002 o projeto Central Informatizada de Oncologia Pediátrica (CIOPE) de abrangência nacional, destinada à formação e manutenção de banco de dados com classificação específica de câncer pediátrico. A Central tem ainda o objetivo de promover o intercâmbio de informações técnicas entre as instituições especializadas sobre estudos de investigações clínicas e terapêuticas, propiciando o diagnóstico correto e o tratamento uniforme das crianças e adolescentes portadores de neoplasias, por intermédio de protocolos cooperativos. Apesar de a maioria dos protocolos de tratamento atuais para leucemia aguda infantil indicar a necessidade da estratificação do risco de recaída de acordo com a presença de alterações genéticas, no Brasil existem poucos centros com laboratórios especializados para análise molecular. Os grandes centros que disponibilizam de tais métodos diagnósticos, por sua vez, não têm uma metodologia uniformizada e em muitos casos quando contam com a biologia molecular não contam com a imunofenotipagem ou com a citogenética. De fato, estas tecnologias, cada qual com sua sensibilidade particular, são complementares uma vez que revelam diferentes propriedades do clone leucêmico e são indispensáveis para a correta avaliação da doença.

Alguns grupos brasileiros têm utilizado diferentes metodologias para realizar estudos com o objetivo de identificar a distribuição das alterações genéticas nos nossos pacientes.

Na LLA, os resultados já relatados indicam freqüência de alterações similar à descrita nos países desenvolvidos como Estados Unidos e União Européia. Apesar da tentativa de padronização de tratamento através do uso do protocolo brasileiro de terapia contra LLA (GBTLI), muitos centros se baseiam em diferentes protocolos

internacionais, como o BFM e o St Jude, o que prejudica a avaliação da resposta clínica e da detecção de eventuais diferenças geográficas no perfil dos pacientes.

Na LMA por sua vez os estudos com adultos e crianças brasileiras apontam para uma incidência aumentada de leucemia prómielocítica em algumas regiões do país, assim como foi descrito na literatura em outros países latino-americanos, em hispânicos nos Estados unidos e em alguns locais na Europa.

Neste estudo foram analisadas 284 crianças com diagnóstico confirmado de leucemia aguda, sendo que 54% eram LLA de origem B, a neoplasia mais comum da infância. Mesmo as LLAs de origem T (13%), para as quais não buscamos marcador molecular de prognóstico apesar de a literatura sugerir a importância de alterações pouco frequentes tais como a $t(7;9)(q34;q34.3)$ e a $inv(7)(p15q34)$, foram avaliadas para a presença de um marcador de clone leucêmico que pudesse ser seguido durante o acompanhamento para detectar doença residual mínima. As LMAs (33%) por sua vez permitiram a análise de alterações gênicas concomitantes e de seu provável impacto no prognóstico das crianças brasileiras.

A seguir os resultados serão discutidos separados por subtipo de leucemia para facilitar a interpretação.

V. 1. LLA de origem B

Na LLA de origem B o gene de fusão *TEL-AML1* foi detectado em 27 (26%) dos 104 pacientes avaliáveis, semelhante ao descrito na literatura em estudos com crianças no país e no exterior (20-25%).¹³⁰ A translocação tem sido associada a deleções no cromossomo 12 detectadas por citogenética e indicativas de evolução do clone leucêmico, possivelmente ocasionando recaídas tardias. No entanto, nos pacientes analisados esta anomalia foi detectada em apenas um caso e cerca de 40% tiveram falha na obtenção de metáfases, não permitindo a avaliação citogenética.

As demais crianças tiveram cariótipo normal, o que demonstra a importância da biologia molecular como uma ferramenta essencial para o diagnóstico não só pela sua sensibilidade, mas também pela detecção de alterações crípticas. A presença de *TEL-AML1* esteve associada à menor leucometria, confirmando o suposto valor de melhor prognóstico descrito em muitos estudos.

Da mesma forma, a análise molecular demonstrou importância para a detecção de *MLL-AF4* em 4% dos pacientes, apenas 2 também presentes na detecção por

citogenética convencional. Dos 4 pacientes positivos, 3 eram lactentes (0-24 meses), conforme apontado pela literatura como uma das principais alterações nesta faixa etária, somando-se às demais translocações que têm o gene *MLL* como parceiro. Diversos estudos com lactentes indicam a importância do uso da tecnologia de *FISH* para a detecção de demais alterações incluindo *MLL*, as quais conferem leucometria aumentada e prognóstico desfavorável aos bebês, e exigem terapia intensificada. É importante que a biologia molecular e a citogenética trabalhem em conjunto e realizem todas as análises possíveis para identificação destas alterações.

O gene de fusão *BCR-ABL* foi detectado em 9% das crianças analisadas, percentagem elevada comparada à descrita na literatura (2-4%) o que sugere uma incidência diferente nas crianças brasileiras. Mesmo separando os centros em estudo a incidência unicêntrica é aumentada. Apenas 3 das 9 crianças também foram detectadas por citogenética convencional e 4 não obtiveram metáfase para análise. Trabalhos de grupos brasileiros utilizando a citogenética como ferramenta de detecção não relataram esta diferença, o que pode ser explicado não pela diferença de sensibilidade em relação à biologia molecular, mas sim devido à possibilidade de análise citogenética de células não pertencentes ao clone leucêmico, pelo baixo poder de discriminação da microscopia convencional em regiões complexas ou polimórficas e pela existência de alterações crípticas. A leucometria foi significativamente maior nas crianças com este gene de fusão. Estudos seqüenciais com maior número de pacientes e comparando diferentes regiões do país poderiam estabelecer diferenças geográficas da presença desta alteração, já que este estudo se limitou à análise de crianças da região Sudeste do Brasil.

O gene de fusão *PBX1-E2A* foi detectado em 7% das crianças estudadas e, apesar de não ser mais utilizado como fator prognóstico devido aos impactos discrepantes descritos na literatura, foi analisado por ser levado em consideração no protocolo BFM-95 utilizado em alguns casos no Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, além de servir como marcador de doença residual mínima.

Ao todo foram detectadas translocações de risco em 45% das LLAs estudadas. As demais, no entanto, foram analisadas por citogenética convencional e 21% apresentaram alguma anomalia no cariótipo. Nestes pacientes negativos para genes de fusão a positividade para rearranjo clonal de imunoglobulina ou receptor de célula T serviu como marcador de doença residual mínima.

Ainda dentro do grupo sem translocações foram detectadas duas alterações no gene *FLT3*, uma duplicação e uma mutação, cada qual representando cerca de 1% do total de pacientes analisados. Apesar de a literatura apontar para a baixa incidência destas em LLA de origem B (1-6%), alguns estudos com lactentes têm demonstrado associação da mutação no domínio tirosina quinase do gene *FLT3* a alterações no gene *MLL* (15-18%).¹⁰² O pequeno número de lactentes incluídos neste estudo não possibilita levar em consideração a não-associação entre *FLT3* e os casos positivos para *MLL-AF4*. Armstrong *et al.*, por sua vez, sugeriu a associação de mutações pontuais em *FLT3* e crianças com cariótipo hiperdiploide (25-28%), mas neste estudo nenhuma das 10 crianças com hiperdiploidia apresentou alteração no gene *FLT3*, provavelmente devido ao reduzido número de pacientes com análise citogenética disponível.⁹⁸

A taxa de remissão completa no grupo de crianças estudado foi de 95%, equivalente ao que está descrito em relação à eficácia dos protocolos de indução utilizados.

O sexo e a leucometria não estiveram relacionados à remissão. A idade, apesar de não significativa, mostrou impacto uma vez que a mediana no grupo de crianças que não alcançou a remissão foi maior do que as demais (10 vs 5 anos), como relatado na literatura científica já que crianças mais velhas têm sabidamente maior risco de não alcançar a remissão devido à agressividade da doença nesta faixa etária.¹³¹

A taxa sobrevida global em 5 anos utilizando-se o protocolo GBTLI foi de 84%, e a do BFM de 64%. Vale ressaltar, no entanto, que as crianças que foram submetidas a este último já vinham com características agressivas ou não responderam bem ao GBTLI, tendo sido tratadas por decisão clínica, o que influenciou os resultados. Desta forma não se pode afirmar que o uso de GBTLI esteja associado à sobrevida de 84% uma vez que nem todos os pacientes de um mesmo centro receberam a terapia de forma seqüencial e aleatória.

As translocações encontradas não tiveram impacto na remissão, tanto a de bom prognóstico (*TEL-AML1*) quanto as de mau prognóstico (*MLL-AF4*, *PBX1-E2A*, *BCR-ABL*), porém o acompanhamento dos pacientes ratifica o valor prognóstico das mesmas.

A presença de *TEL-AML1* não demonstrou impacto significativo na sobrevida global ou livre de eventos, porém as medianas maiores no grupo de crianças com a translocação sugerem melhor evolução clínica. O paciente que apresentou a deleção do cromossomo 12 associada não teve pior resposta, diferente do que

sugere a literatura. Houve 3 recaídas tardias que, no entanto responderam bem à terapia de re-indução. As 3 demais recaídas ocorreram em torno de 10 meses de tratamento e foram seguidas de óbito.

Um caso interessante para abordagem é o dos gêmeos univitelinos que apresentaram LLA de origem B com 3 anos de diferença, quando ainda não era realizada de rotina a análise molecular para detecção de translocações de risco. O primeiro menino foi diagnosticado em 1998 e foi tratado com o protocolo brasileiro de baixo risco (GBTLI-93). Quatro anos depois recaiu e a análise de seu sangue periférico revelou a presença do gene de fusão *TEL-AML1* no clone leucêmico. Antes que ele recaísse, em 2000, seu irmão também foi diagnosticado com LLA e a alta leucometria levou à administração do protocolo GB para alto risco. Ele respondeu muito bem e mantém-se em remissão desde então. Apesar de a presença da translocação não ter influenciado na escolha da terapia, já que só fora identificada na recaída, este caso com *TEL-AML1* que supostamente deveria responder bem ao tratamento foi associado à recaída tardia, mostrando a importância da intensificação da terapia para o sucesso do tratamento do irmão.

Resultados recentes comprovam que cerca de 20% das crianças com a t(12;21) recaem, representando o maior índice de recaída em um grupo considerado de bom prognóstico. Ao que tudo indica não há influência de ganhos de mutações e sim da remanescência de um clone pré-leucêmico com a *TEL-AML1*. Com isso foi alterado o valor da t(12;21) como fator independente para baixo risco de recaída no protocolo recém atualizado na Itália pela Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediátrica (AIEOP ALL). Atualmente a detecção de doença residual mínima ao final da indução indica a intensificação da terapia, inclusive nos casos com esta translocação os quais eram tratados sempre com protocolo de tratamento convencional.⁴⁸

A presença de translocações consideradas de relativo pior prognóstico (*BCR-ABL*, *PBX1-E2A* e *MLL-AF4*) foi correlacionada com a menor taxa de sobrevida global em 5 anos, assim como de sobrevida livre de evento, através de análise univariada comparando a presença ou ausência destas. A análise multivariada avaliando o impacto de cada uma destas translocações, no entanto, demonstrou impacto apenas da presença de *BCR-ABL* e *MLL-AF4* na sobrevida livre de eventos dos pacientes em estudo (5 e 3 vezes menor probabilidade de SLE, respectivamente). Em relação à sobrevida global, somente o impacto de *MLL-AF4* foi significativo. Este resultado é

coerente com a literatura e confirma que a presença de *PBX1-E2A* não pode ser utilizada para a adequação de terapia baseada em risco de recaída.

A presença de alterações no gene *FLT3*, por sua vez, demonstrou associação com leucometria aumentada, não-resposta à indução da remissão além de uma pior sobrevida livre de eventos e global, revelando uma doença mais agressiva. Sendo assim, tanto a presença de *DIT-FLT3* quanto de *FLT3-D835* mostraram valor prognóstico independente para alto risco de recaída, apesar da baixa incidência na amostra estudada. Outros estudos apresentaram resultados semelhantes quanto ao impacto de alterações em *FLT3* na leucometria, remissão e SLE, mas não foi mostrado impacto na SG, o que sugere que o reduzido número de pacientes em estudo possa ter influenciado o resultado.

V. 2. LLA de origem T

Dentre as 190 LLAs estudadas, 38 (20%) foram de origem T, incidência comparada aos demais relatos na literatura. Pouco se sabe sobre as características genéticas e o comportamento clínico dos pacientes brasileiros, mas os protocolos prevêm intensificação de terapia quando diagnosticada a origem T, pois a doença foi constantemente relatada como de péssimo prognóstico comparado com a LLA de origem B. Este grupo de pacientes apresentou leucometria mediana aumentada e menor taxa de remissão completa (71 vs 94%) em comparação com as LLA de origem B, conforme esperado.

Os 4 pacientes que receberam terapia convencional alcançaram remissão mas 2 deles recaíram, demonstrando a importância da intensificação do protocolo de tratamento.

As taxas de sobrevida global e livre de eventos em 5 anos (40% e 8%) retratam o prognóstico sombrio desta doença. Nos casos de recaída em que as amostras foram enviadas ao laboratório a presença da leucemia foi confirmada pela análise do rearranjo clonal de TCR detectado ao diagnóstico.

Alguns estudos têm tentado desvendar a diversidade genética do clone leucêmico agressivo presente na LLA T e os mecanismos de aquisição de resistência à terapia. Alguns resultados apontam para o envolvimento de genes como o NOTCH1 na via de sinalização celular desregulada na leucemia.¹³² Alterações citogenéticas recorrentes como a deleção nos cromossomos 2, 7 e 9 foram identificadas mas não

foi encontrada associação com resposta clínica em relação aos pacientes com cariótipo normal.

Neste grupo de pacientes não foram detectadas alterações no gene *FLT3*, porém 2 estudos relataram a incidência em adultos e crianças (2-5%). Um destes trabalhos analisou adultos e sugere a associação da presença de *FLT3-D835* com a expressão de CKIT/CD117 pelo clone leucêmico, conferindo pior prognóstico. Outro trabalho em seguida relatou resultados discrepantes com a detecção da mutação em apenas 2,7% dos pacientes (2/3 crianças), não relação com a presença do antígeno de superfície e nenhum impacto clínico.^{132,99} Desta forma ainda há um vasto campo de pesquisa para elucidar os mecanismos envolvidos na formação e progressão desta patologia.

V. 3. LMA

O sucesso de terapias baseadas no risco de recaída para a qualidade de vida ou mesmo cura de crianças com LLA com prognóstico ruim influenciou o uso de estratégia semelhante para a estratificação do risco de recaída hematológica baseado em alterações genéticas detectadas no diagnóstico das LMAs.⁹²

Este estudo analisou 94 pacientes (33% das LAs) com diagnóstico de LMA *de novo* ou secundária, 5 delas com síndrome de Down as quais foram analisadas separadamente e revelaram associação com menor idade e melhor prognóstico, como indica a literatura e portanto recomenda-se excluir estes pacientes de características tão distintas da análise de seguimento das demais LMAs .

Foi detectado o gene de fusão *PML-RAR α* em 26 (35%) pacientes analisados, muito acima do valor descrito na literatura (5-15%), no entanto sabe-se que provavelmente ocorreu envio tendencioso de casos com leucemia prómielocítica (LPA) devido ao fato de se tratar de uma emergência clínica em virtude do quadro de coagulopatia apresentado ao diagnóstico. A análise de incidência unicêntrica, no entanto, comprovou a alta frequência de crianças com morfologia M3/M3v e consequentemente alto número de casos com a t(15;17), aparecendo em 29% dos pacientes do setor de Hematologia do INCa e em 22% dos provenientes do Hospital Infantil de Vitória. Calculando um valor médio entre a percentagem de pacientes originados dos 2 centros de envio seqüencial pode-se estimar que a incidência da

translocação ocorreu em torno de 25% dos pacientes diagnosticados, compatível com outros relatos em pacientes brasileiros (19-24%).

Desta forma sugere-se que a freqüência de LPA esteja aumentada em nosso meio, assim como foi relatado em algumas populações específicas tais como crianças italianas (17-20%), adultos no Brasil, México, Peru e regiões da Espanha (20%) e pacientes de origem latina em Los Angeles (37%).^{68,69,70,133,134} Dentre os casos de leucemia prómielocítica analisados 2 não apresentaram a t(15;17) e tiveram pior resposta pois não puderam se beneficiar com o tratamento com ATRA. Os demais pacientes positivos para a translocação foram associados à menor contagem de leucócitos ao diagnóstico, conforme já descrito em relação à leucopenia encontrada nesse subgrupo da doença.

O gene de fusão *AML1-ETO* foi identificado em 16% dos casos, não muito diferente dos 12-15% das crianças relatadas pelos demais trabalhos na literatura.

A incidência de *CBFβ-MYH11* e *BCR-ABL* foi de 1,5% cada, confirmando a baixa incidência em crianças conforme os demais relatos científicos.

Ao todo foram detectadas translocações de risco em 54% das LMAs estudadas. As demais, no entanto, foram analisadas por citogenética convencional e 37% apresentaram alguma anomalia no cariótipo.

A análise das alterações no gene *FLT3* revelou 12,5% de positivos para *DIT-FLT3* e 4% para *FLT3-D835*. A freqüência de *DIT* foi dentro da média relatada na literatura (11,5-16,5%)^{135,136}, enquanto a freqüência da mutação foi baixa em relação aos estudos anteriores em países desenvolvidos que descrevem a incidência em 7% das crianças. Outros grupos brasileiros têm encontrado baixa freqüência de *FLT3-D835*, no entanto foi relatada a presença de mutações pontuais em regiões diferentes do gene, tais como no éxon 20 e em outros domínios do éxon 17, também causando alteração no domínio quinase da proteína, podendo portanto haver alterações ocultas na amostra estudada.

No grupo de crianças com *DIT-FLT3* houve associação significativa com maior leucometria ao diagnóstico. Esta característica já está bem definida no relato de diferentes grupos que estudaram a incidência de *DIT-FLT3* na LMA, tanto em adultos quanto crianças. Foi também encontrada associação com o sexo feminino ($p=0,08$), o que já havia sido descrito na LMA de adultos pelo grupo do Dr Rego em Ribeirão Preto, São Paulo.¹³⁷ Não houve associação com idade nem com nenhum subtipo FAB específico. Estudos publicados por diferentes grupos de países

desenvolvidos descreveram em adultos até 40% de associação da duplicação com o subtipo FAB M3/M3v e conseqüentemente com a presença de *PML-RAR α* , o que foi relatado em menor freqüência nas crianças, as quais, por outro lado, tiveram associação de *DIT* com o subtipo FAB M1/M2.¹³⁵ Foi descrito ainda que 40-50% dos adultos com *DIT-FLT3* apresentam cariótipo normal, havendo menor associação nas crianças (15-30%).

Neste estudo, 15% das crianças em que foi detectada a presença de *PML-RAR α* foram positivas para *DIT-FLT3*. No grupo com o gene de fusão *AML1-ETO*, 17% apresentavam a duplicação, valor diferente dos estudos anteriores que relataram a baixa incidência de *DIT* em pacientes com *AML1-ETO* (8%).¹³⁸ A mutação esteve presente em apenas um caso com cariótipo normal (7%), mas certamente o alto índice de falha ou ausência de resultado citogenético desfavoreceu esta análise.

A presença de *FLT3-D835* também não demonstrou associação com nenhum subtipo FAB específico e por sua vez não esteve associada significativamente com sexo, leucometria ou idade. Um dos pacientes foi subtipo M3 e apresentou a t(15;17) e outro tinha morfologia de subtipo M4 e foi positivo também para a *DIT-FLT3*. A incidência de ambas alterações associadas à presença de *D835* foram descritas como eventos raros na LMA infantil e o valor prognóstico destes ainda não foram estabelecidos.

A taxa de remissão completa das 94 crianças com LMA foi de 84% e foi significativamente associada com uma menor idade ao diagnóstico (8 vs 12 anos). Apesar de não ter sido encontrada associação estatisticamente significativa com leucometria inicial, o grupo de pacientes que alcançou a remissão teve menor leucometria que o grupo que não alcançou.

Apenas a presença de *DIT-FLT3* teve impacto na taxa de remissão, mesmo as translocações de risco favorável não demonstraram papel significativo.

A probabilidade estimada de sobrevida livre de doença para as LMAs estudadas foi de 44% em 5 anos e a probabilidade de sobrevida global, de 56%. Não houve correlação entre a presença de alterações moleculares de bom prognóstico (*PML-RAR α* , *AML1-ETO*, *CBF β -MYH11*) e a sobrevida livre de eventos ou global. Sugere-se que este fato esteja ocorrendo em virtude da presença de alterações em *FLT3* dentro do grupo com translocações de bom prognóstico. Estudos com adultos brasileiros, no entanto, vêm revelando pior evolução clínica nos casos tratados com protocolo de tratamento para baixo risco (convencional), o que pode ser explicado

não por fatores sócio-econômicos, mas pelas características biológicas dos nossos pacientes, demonstrando a necessidade de adaptação terapêutica para o uso de um protocolo brasileiro eficaz contra LMA.

A presença de alterações de mau prognóstico (*BCR-ABL* e alterações em *FLT3*), por sua vez, foi correlacionada com a menor taxa de sobrevida global e sobrevida livre de evento quando analisadas em conjunto, mas a análise multivariada só conferiu valor independente à presença de *DIT-FLT3*. Analisando separadamente a duplicação nos subgrupos em que apareceu concomitante às translocações de bom prognóstico, tem-se que os pacientes na presença de ambas apresentam menor sobrevida livre de eventos.

No caso da associação com *AML1-ETO*, ocorre uma tendência à menor SLE pelo risco de recaída aumentado, no entanto os pacientes respondem bem à terapia de re-indução da remissão. Um estudo prolongado e com uma amostragem maior é necessário para elucidar o valor destas mutações em conjunto, principalmente devido ao fato de haver uma incidência aumentada de *DIT-FLT3* nos pacientes analisados em comparação com o que foi descrito na literatura.

Na leucemia prómielocítica, uma doença muito agressiva ao diagnóstico devido à hemorragia provocada pelo consumo e perda dos fatores de coagulação sanguínea, o uso de ATRA beneficia a maioria dos pacientes e geralmente o paciente responde bem, permanecendo em remissão hematológica. No entanto, há relatos de mortes fulminantes na indução e recaídas em casos positivos para *PML-RAR α* mesmo com o uso de ATRA, o que tem levado aos pesquisadores a reavaliarem a condição de bom prognóstico deste grupo de pacientes. A descoberta das alterações no gene *FLT3* concomitantes têm sido levada em consideração para a determinação do procedimento clínico a ser tomado. A literatura aponta para um risco aumentado de recaída hematológica na presença de *DIT-FLT3* e *PML-RAR α* , mas alguns estudos não encontraram diferença de sobrevida na presença ou ausência da duplicação.

Este estudo revelou queda significativa da taxa de sobrevida livre de eventos em 3 anos (60% na presença de *PML-RAR α* para 25% nos casos com *DIT-FLT3* concomitante) e, da mesma forma, a taxa de sobrevida global em 3 anos caiu (de 80% para 25%), o que conferiu um valor prognóstico muito ruim e provavelmente explica a ausência de impacto da t(15;17) quando avaliada separadamente.

Porém é essencial ressaltar que 2 das 4 crianças com ambas as alterações faleceram nas primeiras 42 horas e não puderam se beneficiar do efeito do ATRA, o

que poderia ser explicado pelo alto risco de morte por hemorragia anterior à remissão. Este fato, porém, não alterou o valor prognóstico independente conferido pela presença da duplicação nestes pacientes após análise multivariada. Na literatura também foram descritos óbitos muito precoces na presença de *DIT-FLT3* e *PML-RAR α* , e fazendo uma comparação com os 2 pacientes com LLA que apresentaram alterações em *FLT3* no presente estudo, os quais também faleceram rapidamente apesar de a LLA ter um alto índice de remissão, sugere-se que a maior agressividade da doença seja conferida por este genótipo. No entanto um estudo com maior quantidade de pacientes se mostra necessário para confirmação destes dados.

Já no caso da associação de *DIT-FLT3* e *FLT3-D835* não houve diferença significativa de probabilidade de sobrevida em relação ao grupo apenas com *DIT-FLT3*. O mesmo ocorreu quando a comparação foi realizada com os demais casos apenas com *FLT3-D835*. No entanto a comparação com o grupo de pacientes negativos para ambas as alterações confirma o prognóstico ruim visto que o paciente positivo para as duas recaiu e faleceu.

Estudos *in vitro* revelam a resistência de células leucêmicas com ambas as alterações em *FLT3* aos inibidores de tirosina quinase e agentes citotóxicos.¹³⁹ Sendo assim, ainda que os protocolos de tratamento mais atuais indiquem as alterações no gene *FLT3* para intensificação de terapia, alguns casos provavelmente não responderão.

Foi ainda analisada a ausência do alelo selvagem de *FLT3* e a perda da heterozigidade não demonstrou influência significativa no prognóstico, apesar de as medianas de sobrevida diminuírem em função da perda parcial ou total da intensidade da banda correspondente ao alelo não-mutado, o que pode ser explicado pelo pequeno número de pacientes avaliados. Estudos com grande número de pacientes apontam para a importância da medição da taxa alélica como fator prognóstico.¹⁴⁰

Sendo assim, revela-se de extrema importância a medição da taxa alélica de *FLT3* através de estudo de microsátélites utilizando iniciadores fluoresceinados para quantificação e definição apurada da perda de heterozigidade no caso de *DIT-FLT3*. Este estudo já está sendo realizado no Laboratório de Biologia Molecular e objetiva-se comparar este grupo de crianças com um grupo de adultos também estudado.

Perspectivas

Os protocolos clínicos mais recentes utilizados nas instituições de excelência de países desenvolvidos se baseiam na presença de citogenética com valor prognóstico, mas também na detecção de células remanescentes após a indução, sinalizando a doença residual mínima (DRM) e apontando para a intensificação terapêutica mesmo em remissão hematológica. Esta estratégia tem aumentado ainda mais o sucesso do tratamento de LLA e LMA na infância, mas não se pode deixar de lado fatores clínicos para a estratificação de risco, principalmente quando já se sabe que mesmo dentro de um grupo de bom prognóstico 30-50% dos pacientes recaem provavelmente devido a outros eventos genéticos atuando em conjunto e tornando o clone leucêmico mais agressivo.^{11,141}

Os pacientes em estudo, no entanto, não foram avaliados ao final da indução nem no decorrer da remissão, salvo aqueles que se beneficiavam de terapias alvo-específicas como GLIVEC e ATRA para monitorar os níveis de *BCR-ABL* e *PML-RAR α* . Projetos cooperativos futuros visam o envio freqüente de amostras dos pacientes para análise molecular com o intuito de estabelecer a quantificação da carga tumoral através de PCR em tempo real para detecção do marcador molecular encontrado ao diagnóstico, aplicando enfim à rotina clínica o uso da DRM como fator prognóstico e indicativo de intensificação terapêutica.

A freqüente coexistência de translocações e mutações colabora com o modelo dos dois eventos necessários para a leucemogênese, em que duas classes de alterações genéticas afetam dois diferentes pontos de controle do ciclo celular: a diferenciação mediada por fatores de transcrição e as vias de sinalização associadas com proliferação celular, sendo responsáveis pela transformação maligna de progenitores hematopoiéticos.¹⁴²

Essa teoria sugere a utilização de terapias alvo-específicas para as duas vias moleculares desreguladas e prevê a descoberta de novos fármacos que possam ser cada vez mais eficazes no combate às leucemias agudas.

Várias drogas têm sido testadas em modelos animais para inibir a atividade do mutante *FLT3*, e têm se mostrado eficazes na supressão da proliferação de células de LMA, inclusive sendo associadas ao uso de ATRA na presença de *PML-RAR α* . Alguns estudos porém relatam a dificuldade de lidar com mutações adicionais no

gene, assim como ocorre com GLIVEC e *BCR-ABL*, e estudos adicionais precisam ser realizados para a criação de uma droga eficiente.

Este estudo contou com dificuldades por se tratar de uma análise multicêntrica, em que os protocolos terapêuticos são distintos, e por haver casos diagnosticados que não puderam ser enviados ao Laboratório. Será importante realizar estudos com amostras maiores e mais bem definidas quanto ao envio seqüencial para estabelecer o real valor prognóstico destas alterações, uma vez que o pequeno número de pacientes positivos restringe a análise estatística no presente estudo.

Propõe-se que através da CIOPE ocorra colaboração para um estudo em larga escala que possibilite desvendar possíveis diferenças geográficas quanto ao genótipo das leucemias no Brasil e que as condições e parâmetros diagnósticos possam ser uniformizados com o intuito de no futuro utilizar um protocolo brasileiro de terapia único e eficaz.

VI. CONCLUSÕES

1. Nas LLAs de origem B o gene de fusão *BCR-ABL* foi encontrado em 9% das crianças, sugerindo prevalência aumentada em relação aos países desenvolvidos.
2. As translocações t(9;22) e t(4;11) tiveram impacto na sobrevida livre de eventos e na sobrevida global na análise univariada, mas apenas o valor de *MLL-AF4* foi estatisticamente significativo na análise multivariada.
3. A presença de *TEL-AML1* em 26% dos pacientes foi correlacionada a características menos agressivas, mas não mostrou impacto expressivo na SLE ou SG, havendo 22% de recaídas tardias associadas.
4. A incidência das alterações no gene *FLT3* na LLA foi baixa e correlacionada com maior leucometria, menor taxa de remissão e pior sobrevida global, estando os dois casos associados à morte na indução
5. As LLAs de origem T representaram um grupo de pior prognóstico, com SLE e SG significativamente menores que as demais crianças com LLA (8% vs 61% e 40% vs 77%).
6. Nas LMAs o gene de fusão *PML-RAR α* foi encontrado em 35% dos casos (média de 25%), sugerindo incidência aumentada nas crianças brasileiras conforme já relatado por outros estudos no país, confirmando a hipótese de diferença geográfica na frequência de LPA descrita por outros grupos no exterior.
7. A presença das alterações citogenéticas de bom prognóstico não tiveram impacto na sobrevida da LMA provavelmente devido às demais alterações genéticas associadas, como a *DIT-FLT3* e a *FLT3-D835*.
8. As alterações no gene *FLT3* foram associadas à maior leucometria, ao sexo feminino e à menor taxa de remissão
9. A *DIT-FLT3* não demonstrou associação a nenhuma alteração específica, mas revelou impacto clínico na incidência em conjunto com:
 - a. *AML1-ETO*, associada a menor SLE, com incidência alta (17%)
 - b. *PML-RAR α* , associada menor SLE e SG
 - c. *D835-FLT3*, não mostrou impacto significativo, mas o paciente com esta mutação recaiu e morreu
10. A presença da mutação pontual de *FLT3* foi associada à menor taxa de remissão e menor SLE, apesar de não demonstrar impacto significativo provavelmente devido ao reduzido número de pacientes positivos.

11. A associação entre *FLT3-D835* e *PML-RAR α* não demonstrou impacto clínico mas o comportamento da doença foi menos agressivo do que na ausência do gene de fusão.
12. A presença de *DIT-FLT3* mostrou impacto independente no prognóstico tanto na LLA quanto na LMA, sendo associado à menor taxa de remissão e à menor sobrevida global, com alto índice de morte refratária.
13. A análise preliminar da perda de heterozigossidade do gene *FLT3* envolvida na duplicação da região justamembrana do gene não revelou impacto significativo na sobrevida, mas demonstra a clara diferença no comportamento clínico dos pacientes
14. A análise da taxa alélica deverá elucidar a real diferença no grupo de crianças *DIT-FLT3* positivas.
15. Embora preliminar devido a limitações com o envio não- seqüencial de amostras de pacientes de diferentes centros cujo tratamento não foi uniforme, este estudo sugere que a avaliação das alterações no gene *FLT3* devem ser incluídas na rotina diagnóstica das leucemias agudas, para possibilitar a melhor estratificação de risco.
16. Espera-se que estudos com amostras seqüenciais e de diferentes regiões do país possam demonstrar a diferença de expressão gênica nas leucemias agudas brasileiras e revelar o real impacto do genótipo no comportamento clínico.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ¹ Greaves MF. Childhood leukaemia. *British Medical Journal* 2000; 324:383-87
- ² Kersey JH. Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. *Blood* 1997; 90:4243-51.
- ³ Greaves M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *European Journal of Cancer* 1999;35:173-85
- ⁴ McKenna RW. Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leukemias. *Clinical Chemistry* 2000; 46: 1252-59.
- ⁵ Cline M. The molecular basis of leukemia. *New England Journal of Medicine* 1994; 330:328-36.
- ⁶ Greaves MF. The new biology of leukemia. In: Henderson ES, Lister TA and Greaves MF, editors *Leukemia* 6th ed Philadelphia: WB Saunders Co; 1996. p. 34-45.
- ⁷ Envers T and Greaves MF. Loops, lineage and leukemia. *Cell* 1998; 94: 9-12.
- ⁸ Morrison AM, Shah MN, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997; 88: 287-98.
- ⁹ Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine* 2004; 350:1535-48.
- ¹⁰ C. Satoh and K. Ogata. Hypothesis: myeloid-restricted hematopoietic stem cells with self-renewal capacity may be the transformation site in acute myeloid leukemia *Leukemia Research* 2006; 30: 491-495.

-
- ¹¹ Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. *Journal of Cancer Research in Clinical Oncology*. 1996;122(3):135-40.
- ¹² Rabbitts TH, Boehm T, Mengler-Gaw L. Chromosomal abnormalities in lymphoid tumors: mechanisms and role in tumor pathogenesis. *TIG* 1988; 4: 300-04.
- ¹³ Willis TG and Dyer JS. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of b-cell. *Blood* 2000; 96 (3): 808-22.
- ¹⁴ Heisterkamp N, Stemphenson JR, Groffen J. Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation breakpoint in chronic myeloid leukemia. *Nature* 1993; 306: 239-42.
- ¹⁵ Gilliland DG and Griffin JD. The roles of *FLT3* in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002; 100:1532-42.
- ¹⁶ Mittelmann F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in neoplasia. *Nature Genet* 1997; 15: 417-74.
- ¹⁷ Chessells JM. Pitfalls in the diagnosis of childhood leukemia. *British Journal of Haematology* 2001; 114: 506-11.
- ¹⁸ Pui CH. Cure of childhood ALL: exacting a lower toll. *Blood* 2002; 99: 4255- 56.
- ¹⁹ Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology* 1976; 33: 451-58.
- ²⁰ Basso B, Buldini B, de Zen L, Órfão A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica* 2001; 86: 675-92.
- ²¹ Ribeiro and Pui CH. Prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematologic Pathology* 1993; 7(3): 121-42.

-
- ²² Friedman AM *and* Weinstein HJ. The role of prognostic features in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *The Oncologist* 2000; 5: 321-28.
- ²³ Biondi A *and* Masera. Molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 1998; 83: 651-59.
- ²⁴ Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997; 278: 1059-64.
- ²⁵ Ferrando *and* Look AT. Clinical implications of recurring chromosomal and associated molecular abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in Hematology* 2000; 37(4): 381-95.
- ²⁶ Rabbits TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1999; 372: 143-49.
- ²⁷ Radich JP. Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 2001; 15: 21-36.
- ²⁸ Fletcher JA, Lynch EA, Kimball VM, Donnelly M, Tantravahi R, Sallan SE. Translocation (9;22) is associated with extremely poor prognosis in intensively treated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1991; 77: 435-39.
- ²⁹ Arico M, Valsecchi MG, Camitta B, Schrappe M, Chessells J, Baruchel A, Gaynon P, Silverman L, Janka-Schaub G, Kamps W, Pui CH, Masera G. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine* 2000; 342: 998-1006.
- ³⁰ Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *New England Journal of Medicine* 2001; 344: 1038-42.

-
- ³¹ Hunger SP and Cleary LC. What significance should we attribute to the detection of *mll* fusion transcripts? *Blood* 1998; 92(3): 709-11.
- ³² Rowley JD, Diaz MO, Espinosa III R, Patel YD, van Melle E, Ziemin S *et al.* Mapping chromosome band 11q23 in human acute leukemia with biotinylated probes: identification of 11q23 translocation breakpoints with a yeast chromosome. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 1990; 87: 9358-63.
- ³³ Uckun FM, Herman-Hatten K, Crotty M-L, Sensel MG, Sather HN, Tuel-Ahlgren L, Sarquis MB, Bostrom B, Nachman JB, Steinherz PG, Gaynon PS, Heerema N. Clinical Significance of *MLL-AF4* fusion transcript expression in the absence of a cytogenetically detectable t(4;11)(q21;q23) chromosomal translocation. *Blood* 1998; 92(3): 810-21.
- ³⁴ Di Martino J, Cleary ML. MLL rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *British Journal of Haematology* 1999; 106: 614-26.
- ³⁵ Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Diaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. report of the BIOMED-1 concerted action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1901-28.
- ³⁶ McWhirter JR, Goulding M, Weiner JA, Chun J, Murre C. Novel fibroblast growth factor gene expressed in the developing nervous system is a downstream target of the chimeric homeodomain oncoprotein E2A-PBX1. *Development* 1997; 124: 3221-32.

-
- ³⁷ Hunger, S.P. Chromosomal translocation involving the *E2A* gene in acute lymphoblastic leukemia: clinical features and molecular pathogenesis. *Blood* 1996; 87: 1211-24.
- ³⁸ Gabert J, Vey N, Nabera CB, Hayette S, Macintyre E, Bastard C, Cayuela JM, Vaerman JL, Preudhomme C, Dupont M, Dastugue N, Frenoy N, Raynaud S, Davi F, Gaub MP, Lafage M, Sutton L, Charrin C, Vernant JP, Fiere D. Improved outcome of adult patients with *E2A PBX1/ t(1;19)* positive ALL after intensive therapy: results of the LAL-94 multicentric protocol. *Blood* 2001; 98: 840a.
- ³⁹ Foa R, Vitale A, Mancini M, Cuneo A, Mecucci C, Elia L, Lombardo R, Saglio G, Torelli G, Annino L, Specchia G, Damasio E, Recchia A, Di Raimondo F, Morra E, Volpe E, Tafuri A, Fazi P, Hunger SP, Mandelli F. *E2A-PBX1* fusion in adult acute lymphoblastic leukemia: biological and clinical features. *British Journal of Haematology* 2003; 120(3): 484-87.
- ⁴⁰ Schrappe M, Camitta B, Pui CH, Eden T, Gaynon P, Gustafsson G, Janka-Schaub GE, Kamps W, Masera G, Sallan S, Tsuchida M, Vilmer E. Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 2193-94.
- ⁴¹ Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Campana D, Rivera GK, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Razzouk BI, Howard SC, Hudson MM, Kun C, Raimondi SC, Behm FG, Downing GR, Relling MV, Evans WE. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. *Blood* 2004; 104 (9): 2690-96.
- ⁴² Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, Valsecchi MG, Ludwig WD, 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* 1997; 90(2): 571-577.

-
- ⁴³ Rowley J The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annual Review of Genetics* 1998; 32: 495-19.
- ⁴⁴ Romana SP, Le Coniat M, Berger R. t(12;21), a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1994; 9(3): 186-91.
- ⁴⁵ Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR, Rubnitz J, Mathew S, Hancock M, Pui C-H, Rivera GK, Grosveld GC, Behm FG. 12p abnormalities and the *TEL* Gene (*ETV6*) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997; 90 (11): 4559-66.
- ⁴⁶ Seeger K. Treatment response and residual-disease monitoring in initial and relapsed *TEL-AML1* positive childhood ALL. *Leukemia* 2001; 15: 280-82
- ⁴⁷ Rubnitz J, Wichlan D, Devidas M, Shuster J, Kurtzberg J, Bell B, Hunger S, Chauvenet A, Pui CH, Camitta B, Pullen JJ. 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; 108: Abstract 218
- ⁴⁸ Panzer-Grümayer ER, Cazzaniga G, van der Velden VHJ, del Giudice L, Peham M, Mann G, Eckert C, Schrauder A, Germano G, Harbott J, Basso G, Biondi A, van Dongen JJM, Gadner H, Haas OA. 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; 1(11): 7720-27.
- ⁴⁹ Hassan R. Estudos Moleculares dos Rearranjos de Genes de Receptores de Antígeno em Leucemias. Tese, 2000. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- ⁵⁰ Germano G Songia S, Biondi A, Basso G. Rapid detection of clonality in patients with acute lymphoblastic leukemia *Haematologica* 2001; 86: 382-85.

-
- ⁵¹ Szczepan´ ski T, Willemse MJ, Brinkhof B, van Wering ER, van der Burg M, van Dongen JJM. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood* 2002; 99(7): 2315-23.
- ⁵² Bennett JM. World Health Organization classification of the acute leukemias and myelodysplastic syndrome. *International Journal of Hematology* 2000; 72:131-33.
- ⁵³ Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100: 2292-302.
- ⁵⁴ Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 1999; 341: 1051-62.
- ⁵⁵ Giles FJ, Keating A, Goldstone AH, Avivi I, Willman CL, Kantarjian HM. Acute myeloid leukemia. *Hematology* 2002: 73-110.
- ⁵⁶ Hayashi Y. The molecular genetics of recurring chromosome abnormalities in acute myeloid leukemia. *Seminars in Hematology* 2000; 37: 368-80.
- ⁵⁷ Downing JR. AML1/CBF transcription complex: its role in normal hematopoiesis and leukemia. *Leukemia* 2001; 15: 664-65.
- ⁵⁸ Foroni L, Hart SM. Core binding factor genes and human leukemia. *Haematologica* 2002; 87: 1307-23.
- ⁵⁹ Downing JR, Head DR, Curcio-Brint AM, Hulshof MG, Motroni TA, Raimondi SC, Carroll AJ, Drabkin HA, Willman C, Theil CS. An AML1/ETO fusion transcript is consistently detected by RNA-based polymerase chain reaction in acute myelogenous leukaemia containing the (8;21)(q22;q22) translocation. *Blood* 1993; 81: 2860-65.

-
- ⁶⁰ Rowley, JD. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukaemia. *Annales de Genetique* 1973; 16: 109-12.
- ⁶¹ Erickson P, Gao J, Chang K.-S, Look T, Whisenant E, Raimondi S, Lasher R, Trujillo J, Rowley J, Drabkin H. Identifications of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukaemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to *Drosophila* segmentation gene, *runt*. *Blood* 1992; 80: 1825-31.
- ⁶² Andrieu V, Radford-Weiss I, Troussard X, Chane C, Valensi F, Guesnu M, Haddad E, Viguier F, Dreyfus F, Varet B, Flandrin G, Macintyre E. Molecular detection of t(8;21)/AML1-ETO in AML M1/M2: correlation with cytogenetics, morphology and immunophenotype. *British Journal of Haematology* 1996; 92: 855-65.
- ⁶³ Langabeer SE, Walker H, Rogers JR, Burnett AK, Wheatley K, Swirsky D, Goldstone AH, Linch DC. Incidence of AML-ETO1 fusion transcripts in patients entered into the MRC AML trials. MRC Adult Leukaemia Working Party. *British Journal of Haematology* 1997; 99: 925-28.
- ⁶⁴ Liu PP, Hajra A, Wijmenga C, Collins FS. Molecular pathogenesis of the chromosome 16 inversion in the M4Eo subtype of acute myeloid leukemia. *Blood* 1995; 85: 2289-302.
- ⁶⁵ Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T. Rare CBFβ-MYH11 fusion transcripts in AML with inv(16)/t(16;16) are associated with therapy-related AML M4eo, atypical cytomorphology, atypical immunophenotype, atypical additional chromosomal rearrangements and low white blood cell count: a study on 162 patients. *Leukemia* 2007; 21(4): 725-31

-
- ⁶⁶ Monma F, Nishii K, Shiga J, Sugahara H, Lorenzo F 5th, Watanabe Y, Kawakami K, Hosokai N, Yamamori S, Katayama N, Shiku H. Detection of the CBFB/MYH11 fusion gene in de novo acute myeloid leukemia (AML): a single-institution study of 224 Japanese AML patients. *Leukemia Research* 2007; 31(4): 471-76.
- ⁶⁷ Huang W, Sun G-L, Li X-S, Cao Q, Lu Y, Jang G-S, Zhang FQ, Chai JR, Wang ZY, Waxman S. Clinical relevance of two major PML-RAR α isoforms and detection of minimal residual disease by retrotranscriptase polymerase chain reaction. *Blood* 1993; 82:1264-69.
- ⁶⁸ Golub TR. The molecular genetics of AML: an update. *Hematology* 1999: 102-11.
- ⁶⁹ Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 translocation: a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukemia. *Lancet* 1977; 1: 549-50.
- ⁷⁰ Sierra M, Alonso A, Odero MD, Gonzalez MB, Lahortiga I, Perez JJ, Garcia JL, Gutierrez NC, Calasanz MJ, San Miguel JF, Hernandez JM. Geographic differences in the incidence of cytogenetic abnormalities of acute myelogenous leukemia (AML) in Spain. *Leukemia Research* 2006; 30(8): 943-48.
- ⁷¹ Biondi A, Rovelli A, Cantú-Rajnoldi A, Fenu S, Basso G, Luciano A, Rondelli R, Mandelli F, Masera G, Testi AM. Acute promyelocytic leukemia in children: experience of the Italian Pediatric Hematology and Oncology Group (AIEOP) *Leukemia* 1994; 8:1264-68.
- ⁷² Ruiz-Argüelles GJ. Promyelocytic leukemia in Mexican Mestizo. *Blood* 1997; 89: 33-39.
- ⁷³ Tallman MS. Curative strategies in acute promyelocytic leukemia. *Hematology* 2003, American Society of Hematology Education Program Book; 2003: 90-101

⁷⁴ Gameiro P, Vieira S, Carrara P, Silva AL, Diamond J, de Souza AB, Mehta AB, Prentice HG, Guimarães JE, Hoffbrand AV, Foroni L, Parreira A. The *PML-RAR α* transcript in long-term follow-up of acute promyelocytic leukemia patients. *Haematologica* 2001; 86:577-585.

⁷⁵ Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci M-J, Hagemeijer A, Berger R, Neat M, Howe K, Dastugue N, Jansen J, Radford-Weiss I, Lo Coco F, Lessard M, Hernandez J-M, Delabesse E, Head D, Liso V, Sainty D, Flandrin G, Solomon E, Birg F, Lafage-Pochitaloff M. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. *Blood* 2000; 96: 1297-308.

⁷⁶ Ferrando AA, Armstrong SA, Neuberg DS, Sallan SE, Silverman LB, Korsmeyer SJ, Look AT. Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* 2003; 102: 262-68.

⁷⁷ Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T. AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* 2003; 102 (7): 2395-402.

⁷⁸ Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, Beverloo HB, Moorhouse MJ, van der Spek PJ, Lowenberg B, Delwel R. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 2004; 350:1617-28.

⁷⁹ Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Löffler H, Sauerland CM, Serve H, Büchner T, Haferlach T, Hiddemann W. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002; 100: 59-66.

⁸⁰ Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. FLT3 mutations and leukemia. *British Journal of Haematology* 2003, 122: 523-38.

⁸¹ Parcels BW, Ikeda AK, Simms-Waldrip T, Moore TB, Sakamoto KM. FLT3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. *Stem Cells Express* 2006; 24(5):1174-84.

⁸² Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL, Radich JP. FLT3, RAS and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97: 3589-95.

⁸³ Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, Behm FG, Raimondi SC, Relling MV, Patel A, Cheng C, Campana D, Wilkins D, Zhou X, Li J, Liu H, Pui CH, Evans WE, Naeve C, Wong L, Downing JR. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*. 2002; 1: 133-43.

⁸⁴ Stirewalt D, Meshinchi S, Kussick S, Sheets K, Pogossova-Agadjanyan E, Willman C, Radich J. Novel FLT3 point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* 2004; 124: 481-84.

⁸⁵ Jiang J, Paez JG, Lee JC, Bo R, Stone RM, DeAngelo DJ, Galinsky I, Wolpin BM, Jonasova A, Herman P, Fox EA, Boggon TJ, Eck MJ, Weisberg E, Griffin JD, Gilliland DG, Meyerson M, Sellers WR. Identifying and characterizing a novel activating mutation of the FLT3 tyrosine kinase in AML. *Blood* 2004; 104(6):1855-59

⁸⁶ Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, Schnittger S, Ellwart JW, Wenig K, Kopfner KP, Hiddemann W, Spiekermann K. Point mutations found in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood* 2006; 107: 3700-07.

-
- ⁸⁷ Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002; 99: 4326-35.
- ⁸⁸ Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloideukemia. *Leukemia*. 1996; 10:1911-18.
- ⁸⁹ Gilliland DG and Griffin JD. Internal tandem duplication of the *FLT3* gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 1998; 12:1333-37.
- ⁹⁰ Shih L-Y, Huang C-F, Wu J-H, Lin T-L, Dunn P, Wang P-N, Kuo M-C, Lai C-L, and Hsu H-C. Internal tandem duplication of *FLT3* in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood* 2002; 100: 2387-92.
- ⁹¹ Liang DC, Shih LY, Hung IJ, Yang CP, Chen SH, Jaing TH, Liu HC, Chang WH. Clinical relevance of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2002 ;94: 3292-98.
- ⁹² Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001; 98: 1752-59.
- ⁹³ Olesen LH, Nyvold CG, Aggerholm A, Norgaard JM, Guldborg P, Hokland P. Delineation and molecular characterization of acute myeloid leukemia patients with coduplication of FLT3 and MLL. *European Journal of Haematology* 2005; 75: 185-92.

-
- ⁹⁴ Lacayo NJ, Meshinchi S, Kinnunen P, Yu R, Wang Y, Stuber CM, Douglas L, Wahab R, Becton DL, Weinstein H, Chang MN, Willman CL, Radich JP, Tibshirani R, Ravindranath Y, Sikic BI, Dahl GV. Gene expression profiles at diagnosis in de novo childhood AML patients identify FLT3 mutations with good clinical outcomes. *Blood* 2004; 104(9): 2646-54.
- ⁹⁵ Gale RE, Hills R, Pizzey AR, Kottaridis PD, Swirsky D, Gilkes AF, Nugent E, Mills KI, Wheatley K, Solomon E, Burnett AK, Linch DC, Grimwade D. Relationship between *FLT3* mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2005; 106 (12): 3768-76.
- ⁹⁶ Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carlson BD, Carroll AJ, Mrozek K, Vardiman JW, George SL, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD, Caligiuri MA. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult *de novo* acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of *FLT3*: a cancer and leukemia Group B study. *Cancer Research* 2001; 61: 7233-39.
- ⁹⁷ Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL, Zwaan M, Zimmerman M, Reinhardt D, Kaspers GJL, Heerema NA, Gerbing R, Lange BJ, Radich JP. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood* 2006; 108: 3654-61.
- ⁹⁸ Armstrong SA, Mabon ME, Silverman LB, Li A, Gribben JG, Fox EA, Sallan SE, Korsmeyer SJ. FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004; 103: 3544-46.
- ⁹⁹ Van Vlierberghe P, Meijerink JPP, Stam RW, van der Smissen W, vanWering ER, Beverloo HB, Pieters R. Activating *FLT3* mutations in CD4_/CD8_ pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 2005;106(13):4414-15.
- ¹⁰⁰ Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T,

Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno H, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; 97(8): 2434-39.

¹⁰¹ Griffin JD. Point mutations in the FLT3 gene in AML. *Blood* 2001; 97: 219

¹⁰² Taketani T, Taki T, Sugita K, Furuichi Y, Ishii E, Hanada R, Tsuchida M, Sugita K, Ida K, Hayashi Y. FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood* 2004; 103: 1085-88.

¹⁰³ Moreno I, Martín G, Bolufer P, Barragán, Rueda E, Román J, Leon P, Mena A, Cervera J, Torres A, Sanz MA. Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2003; 88:19-24.

¹⁰⁴ Fröhling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, Dohner K; AML Study Group Ulm. Acute myeloid leukemia. Prognostic significance of activating *FLT3* mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 2002; 100: 4372-80.

¹⁰⁵ Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT, Linch DC. Studies of *FLT3* mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of *FLT3* mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood* 2002 ; 100 (7): 2393-98.

¹⁰⁶ Heidel F, Solem FK, Breitenbuecher F, Lipka DB, Kasper S, Thiede MH, Brandts C, Serve H, Roesel J, Giles F, Feldman E, Ehninger G, Schiller GJ, Nimer S, Stone RM, Wang Y, Kindler T, Cohen P, Huber C, Fischer T. Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood* 2006; 107(1): 293-300.

¹⁰⁷ Kaspers GJL and Creutzig U. Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions *Leukemia* 2005; 19: 2025-29.

¹⁰⁸ Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene rearrangement in B and T lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 78(1): 192-96.

¹⁰⁹ Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, San Miguel JF, van Dongen JJ. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and *TAL1* deletions as PCR targets. *Leukemia* 1999; 13:110-18.

¹¹⁰ Marin C, Martinez-Delgado B, Melendez B, Larrayoz MJ, Martinez-Ramirez A, Robledo M, Cigudosa JC, Calasanz MJ, Benitez J. Multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of prognostically significant translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Hematologica* 2001; 86: 1254-60.

¹¹¹ Braziel RM, Shipp MA, Feldman AL, Espina V, Winters M, Jaffe ES, Petricoin III EF, Liotta LA. Molecular diagnostics. *Hematology* 2003; 279-93.

¹¹² Chen JS, Elaine CS, Susuki T, Neali GA, Mihara K, Pui CH, Campana D. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001; 97(7): 2115-20.

¹¹³ Van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse M, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps W. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998; 352: 1731-38.

¹¹⁴ Van der Velden VH, Willemse MJ, van der Schoot CE, Hahlen K, van Wering ER, van Dongen JJ. Immunoglobulin deleting element rearrangements in precursor-B

acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia* 2002; 16: 928-36.

¹¹⁵ Scrideli CA, Kashima S, Cipolloti R, R Defavery, Bernardes JE, ToneLG. Minimal residual disease in Brazilian children with acute lymphoid leukemia: comparison of three detection methods by PCR. *Leukemia Research* 2002; 26: 431–38.

¹¹⁶ Scrideli CA, Queiroz RP, Bernardes JE, Defavery R, Valera ET, Tone LG. Use of simplified strategies to evaluate early treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research* 2006; 30(8):1049-52.

¹¹⁷ Silva MLM, Zalberg IR, Ornelas MHF, Tabak DG, Seuanez HN, Deterlind LCS, Espirito Santo MP, Souza IM, Soarez RMP Dobbin JA, Ribeiro RC. Establishment of a new human pre-B leukemia cell line (CEMO-1) with the translocation (1;14)(q21;q32). *Leukemia* 1996; 10: 575-78.

¹¹⁸ Drexler HG, MacLeod RA, Borkhardt A, Janssen JW. Recurrent chromosomal translocations and fusion genes in leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* 1995; 9: 480-500.

¹¹⁹ Viana MB, Cunha KCCMS, Ramos G, Murao M. Leucemia mielóide aguda na criança: experiência de 15 anos em uma única instituição. *Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)* 2003; 79(6): 489-96.

¹²⁰ International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN (1995). Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, Memphis, Tenn, October 1994. Mitelman F, editor.

¹²¹ Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; 162: 156-59.

-
- ¹²² Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18: 5294-99.
- ¹²³ Ehrenberg L, Fedorcsak I, Solymosy F. Diethyl pyrocarbonate in nucleic acid research. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 1974; 16: 189-262.
- ¹²⁴ Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. 1989, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- ¹²⁵ Otazu IB, Zalcborg I, Tabak DG, Dobbin J, Seuanez HN. Detection of BCR-ABL transcripts by multiplex and nested pcr in different haematological disorders. *Leukemia Lymphoma* 2001; 37: 205-11.
- ¹²⁶ Kwok S and Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339: 237-38.
- ¹²⁷ Ramasamy I, Brisco M, Morley A. Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in b cell neoplasm. *Journal of Clinical Pathology* 1992; 45: 770-75.
- ¹²⁸ Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-91.
- ¹²⁹ Otazu IB, Zalcborg IQ, Tabak DG, Seuanez HN. Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia by nested PCR. *Leukemia Research* 1999; 23: 185-90.
- ¹³⁰ Magalhães Q, Pombo-de-Oliveira MS, Bennett CA, Cordoba JC, Dobbin J, Ford AM, Greaves MF. TEL-AML1 fusion gene frequency in pediatric acute lymphoblastic leukaemia in Brazil. *British Journal of Haematology* 2000; 111: 204-07.

¹³¹ Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, Carroll AJ, Heerema NA, Rubnitz JE, Loh ML, Raetz EA, Winick NJ, Hunger SP, Carroll WL, Gaynon PS, Camitta BM. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood* 2007; 109 (3): 926-35.

¹³² Chiaramonte R, Basile A, Tassi E, Calzavara E, Cecchinato V, Rossi R, Biondi A, Comi P. A wide role for NOTCH1 signaling in acute leukemia. *Cancer Letters* 2005; 219: 113-20.

¹³³ Xavier SG. Análise molecular de alterações genéticas e seu papel na avaliação da variabilidade clínico-biológica da leucemia mielóide aguda. Tese (Rio de Janeiro, 2004)

¹³⁴ Pulcheri W, Spector N, Nucci M, de Moraes JCO, Pimenta G, de Oliveira HP. The treatment of acute myeloid leukemia in Brazil: progress and obstacles. *Haematologica* 1995; 80:130-35.

¹³⁵ Zwaan CM, Meshinchi S, Radich JP, Veerman AJP, Huisman DR, Munske L, Podleschny M, Hähnen K, Pieters R, Zimmermann M, Reinhardt D, Harbott J, Creutzig U, Kaspers UJL, Griesinger F. FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood* 2003; 102: 2387-94.

¹³⁶ Iwai T, Yokota S, Nakao M, Okamoto T, Taniwaki M, Onodera N, Watanabe A, Kikuta A, Tanaka A, Asami K, Sekine I, Mugishima H, Nishimura Y, Koizumi S, Horikoshi Y, Mimaya J, Ohta S, Nishikawa K, Iwai A, Shimokawa T, Nakayama M, Kawakami K, Gushiken T, Hyakuna N, Fujimoto T, *et al.* Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan. *Leukemia* 1999; 13: 38-43.

¹³⁷ Souza CF, Lima ASG, Santos GAA, Melato LC, Dore AI, Silva DE, Ismael S, Silva Junior WA, Rego EM. Distinct profile of FLT3 mutations in Brazil. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 2005 106: Abstract 4532.

¹³⁸ Schessl C, Rawat VPS, Cusan M, Deshpande A, Kohl TM, Rosten PM, Spiekermann K, Humphries RK, Schnittger S, Kern W, Hiddemann W, Quintanilla-Martinez L, Bohlander SK, Feuring-Buske M, Buske C. The *AML1-ETO* fusion gene and the *FLT3* length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 2005; 115 (8): 2159-68.

¹³⁹ Bagrintseva K, Geisenhof S, Kern R, Eichenlaub R, Reindl C, Ellwart JW, Hiddemann W and Spiekermann K. FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with acute myeloid leukemia (AML) confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L). *Blood* 2005; 105(9): 3679-85

¹⁴⁰ Schnittger S, Schoch C, Kern W, and Haferlach T. 3' Position of the FLT3-LM and loss of heterozygosity are highly correlated to unfavourable outcome in AML. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 2006 108: Abstract 807.

¹⁴¹ Schiller GJ. Clinical and biological features of favorable-risk acute myelogenous leukemia – is favorable-risk AML really favorable? *Leukemia* 2005; 19: 326-28.

¹⁴² Pedersen-Bjergaard J, Christiansen DH, Desta F, Andersen MK. Alternative genetic pathways and cooperating genetic abnormalities in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006; 20: 1943-49.

VIII. ANEXOS

VIII.1. ANEXO 01

LLAs de origem B

NI	Idade (anos)	Sexo	NI	Idade (anos)	Sexo	NI	Idade (anos)	Sexo	NI	Idade (anos)	Sexo
1	ND	F	39	4,8	M	77	14,6	F	115	15,4	M
2	8,9	F	40	3,2	M	78	4,3	M	116	3	F
3	5,8	F	41	8,4	M	79	14,1	M	117	7,5	F
4	15	F	42	2,4	F	80	5,6	F	118	5	M
5	9,3	F	43	2,6	M	81	3,1	M	119	4,6	M
6	ND	F	44	2,4	F	82	8,1	F	120	3,6	M
7	3,2	F	45	3,3	M	83	6	F	121	2,5	M
8	5,2	F	46	2,6	M	84	6	M	122	2,6	M
9	2,3	F	47	12	F	85	4,6	M	123	2,3	F
10	0,8	F	48	2,7	M	86	4	M	124	12,6	F
11	15,5	F	49	13,9	F	87	14,4	M	125	4,9	F
12	8,7	F	50	8,2	F	88	5,6	M	126	12	F
13	ND	M	51	13,2	M	89	6,3	F	127	13,9	F
14	5,2	F	52	11,9	M	90	1,8	M	128	10,7	F
15	1,8	F	53	9,3	M	91	10,6	M	129	4,7	F
16	1,9	F	54	2,7	M	92	2,9	M	130	8,5	F
17	3,3	F	55	12,1	M	93	8,4	M	131	2,9	F
18	0,8	M	56	3,6	M	94	ND	M	132	5,8	F
19	2,3	M	57	10,8	F	95	3,6	M	133	14,5	M
20	2,7	M	58	9,9	F	96	6,3	M	134	13,2	F
21	17,3	M	59	2,8	F	97	3,7	M	135	5,1	M
22	11,6	M	60	4,6	M	98	3,6	M	136	12,3	M
23	11,7	F	61	2,2	M	99	1,6	M	137	4	M
24	13,1	F	62	8,6	M	100	3,7	F	138	7,4	F
25	6,6	M	63	2,6	F	101	3,9	F	139	2,6	F
26	6,7	M	64	13,5	M	102	0,9	F	140	5,5	M
27	7,1	F	65	3,4	F	103	4	F	141	4,7	M
28	12,6	F	66	13,5	F	104	3,2	F	142	6,7	M
29	10,2	F	67	1,7	M	105	3,9	F	143	14,3	M
30	6,9	M	68	5,6	M	106	3,7	M	144	11,6	M
31	14,9	M	69	5	M	107	7,8	F	145	15,5	M
32	9,9	M	70	4,1	M	108	ND	F	146	7,3	M
33	11,7	M	71	5,1	M	109	8,5	F	147	3,9	M
34	6,3	M	72	5,8	M	110	0,5	M	148	7	F
35	13,4	M	73	5	M	111	13,1	F	149	0,5	M
36	14,2	F	74	4,4	M	112	4,5	M	150	0,8	F
37	2,3	M	75	6,1	F	113	0,3	M	151	2,7	F
38	17	F	76	3,4	F	114	3,2	M	152	2,7	F

VIII.2. ANEXO 02**LLAs de origem T**

NI	Idade (anos)	Sexo	NI	Idade (anos)	Sexo
1	5,1	F	20	12,9	M
2	8	F	21	1,5	F
3	11,7	M	22	8,9	F
4	15,4	M	23	10,5	M
5	11,7	M	24	16,6	M
6	4,9	M	25	10,5	F
7	17,1	M	26	2,8	M
8	12,4	F	27	8,7	M
9	7,6	F	28	15,9	M
10	3,2	M	29	15,2	M
11	3,3	F	30	5,4	M
12	14,1	M	31	12,7	M
13	15	F	32	10,9	F
14	13,5	F	33	8	M
15	13,2	M	34	9,8	M
16	5,8	F	35	14,2	M
17	8,6	M	36	11,1	M
18	2,4	M	37	6,7	F
19	10,3	M	38	4,1	M

VIII.3. ANEXO 03

LMAs

NI	Idade (anos)	Sexo	NI	Idade (anos)	Sexo	NI	Idade (anos)	Sexo
1	16,7	M	32	5,1	F	63	9,8	F
2	17,4	M	33	12,5	F	64	0,7	F
3	6,8	F	34	13	M	65	6,2	F
4	2,1	F	35	16	M	66	13	F
5	8,7	M	36	17,8	M	67	17	F
6	8,2	M	37	1,7	M	68	8,3	M
7	ND	F	38	3,3	M	69	13	M
8	8,4	F	39	4,8	M	70	3,9	F
9	1,2	M	40	2	M	71	9,2	M
10	0,3	M	41	1,5	M	72	8,3	F
11	5	F	42	3,2	F	73	0	M
12	4,2	F	43	ND	F	74	9,4	M
13	16,7	F	44	9,6	M	75	17,2	F
14	16,8	F	45	7,8	M	76	17	M
15	11	F	46	6,7	M	77	9,7	F
16	8,8	M	47	11,7	F	78	0,8	F
17	14,6	F	48	12,9	F	79	5,4	F
18	10,8	F	49	0,3	M	80	1,9	F
19	2,2	M	50	15,2	F	81	8	F
20	2	M	51	0,6	F	82	8,1	F
21	13,9	M	52	5,8	M	83	6,2	F
22	18	M	53	16,3	M	84	18,1	M
23	17,2	M	54	2,4	M	85	4,2	M
24	13,4	M	55	14,7	F	86	8,2	F
25	8,8	M	56	3,3	M	87	11,6	M
26	16,4	M	57	10	F	88	18	M
27	14,6	M	58	1,1	M	89	8,9	M
28	10,2	M	59	7,9	M	90	10,7	M
29	12,7	M	60	2,5	M	91	10,8	M
30	8	M	61	8	M	92	18,1	F
31	18,7	M	62	4	M	93	11,6	M
						94	16,5	M

VII.4. ANEXO 4

Tampões e soluções

Solução isotônica de fosfato tamponada, PBS (10X)

Solução aquosa contendo 0.01M Na₂HPO₄ e KH₂PO₄, 0.0027M KCl e 0.137M NaCl, pH 7.4. Filtrada com filtro de 0.2µm e esterilizada 20 minutos em autoclave a 1 atm.

Tampão para extração de DNA de alto peso molecular

Solução aquosa contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM de EDTA (pH 8.0) e 10 mM NaCl.

Solução stock de acrilamida (30%)

Solução aquosa contendo 29% de acrilamida (Gibco) e 1% de N,N'-metilenbisacrilamida (Gibco BRL). Filtrada com filtro de 0.2 µm mantida a 4°C em recipiente escuro.

Solução fixadora (coloração de géis de poliacrilamida)

Solução aquosa 10% v/v metanol (Merck) e 0.5% v/v ácido acético glacial (Merck).

Solução de prata (coloração de géis de poliacrilamida)

Solução aquosa 3% v/v metanol (Merck), 0.15% v/v ácido acético glacial (Merck) e 0.7% p/v de NO₃Ag (Vetec).

Solução reveladora (coloração de géis de poliacrilamida)

Solução aquosa 30% v/v NaOH (Vetec) e 0.3% v/v formaldeído (Merck).

Solução tampão de carga (utilizado para eletroforese)

Solução aquosa 0.25% p/v de azul de bromofenol (Sigma), 0.25% p/v de xilencianol FF (Sigma) e 30% v/v de glicerol (Merck).

Solução tampão TAE (50X)

Solução aquosa contendo 24.2% Tris base (Gibco), 5.71% ácido acético glacial (Merck) e 50 mM EDTA (Sigma) pH 8.0.

Solução Tris-HCl (1M)

12.11% TRIZMA® base (Gibco), pH requerido ajustado com HCl (Merck) concentrado.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)