



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Pós-graduação em Ciências Biológicas - Biofísica**



Amanda Faria de Figueiredo

**Estudo do Perfil Cromossômico da Leucemia
Mielóide Aguda da Infância no Brasil**

Rio de Janeiro, RJ

Outubro, 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

AMANDA FARIA DE FIGUEIREDO

**ESTUDO DO PERFIL CROMOSSÔMICO DA
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA DA INFÂNCIA
NO BRASIL**



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Pós-graduação em Ciências Biológicas - Biofísica**



**UFRJ
V. I**

Amanda Faria de Figueiredo

Título: Estudo do perfil cromossômico da leucemia mielóide aguda da infância no Brasil

V.I

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências biológicas (Biofísica)

Orientadora: Eliana Abdelhay
Co-orientadora: Maria Luiza M. Silva

Rio de Janeiro
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

de Figueiredo, Amanda Faria
ESTUDO DO PERFIL CROMOSSÔMICO DA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA DA
INFÂNCIA NO BRASIL/ Amanda Faria de Figueiredo. Rio de Janeiro, 2010.

.....

Orientadora: Eliana Abdelhay

Co-orientadora: Maria Luiza Macedo Silva

Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas – Biofísica

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas
Filho, 2010

1. Perfil cromossômico 2. Leucemia mielóide aguda 3. Infância 4.
Citogenética Molecular I. Abdelhay, Eliana Saul Furquim Werneck (Orient.) II.
Silva, Maria Luiza Macedo (Co-orient.) III. Universidade Federal do Rio de Janeiro
(UFRJ), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) IV. ESTUDO DO
PERFIL CROMOSSÔMICO DA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA DA INFÂNCIA NO
BRASIL

Amanda Faria de Figueiredo

**TÍTULO: ESTUDO DO PERFIL CROMOSSÔMICO DA LEUCEMIA MIELÓIDE
AGUDA DA INFÂNCIA NO BRASIL**

Dissertação de mestrado aprovada em ____ de _____ de 2009.

Dra. Eliana Abdelhay, INCA

Dra. Maria Luiza Macedo Silva, INCA

Dra. Ana Beatriz Furnaleto Pacheco, UFRJ

Dr. Marcelo Gerardin Poirot Land, UFRJ

Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges, UFRJ

Dra. Márcia Alves Marques Capella, UFRJ

Dr. Edson Rondinelli, UFRJ

Às duas mulheres mais importantes da minha vida: minha mãe e minha avó.

E ao meu avô: sua memória nunca será esquecida.

Dedico.

Agradecimentos

- Primeiramente, a Deus pelo dom da vida que me concedeu e pela oportunidade de concretizar mais uma etapa de minha vida, sabendo que Ele estava e está sempre junto de mim, onde eu estiver.

- À minha querida e admirada mãe pelo enorme incentivo, confiança, carinho e amor que sempre me deu desde o momento em que eu ainda estava em seu ventre. Pelas sempre presentes demonstrações de amor durante os dias mais difíceis destes dois anos que se passaram. Te amo, mãe!

- À minha querida avó pelo incentivo e pelo carinho, não deixando que eu desanimasse nunca.

- Ao meu avó, *in memoriam*, por ser na verdade um pai para mim. E onde você estiver estará vendo que estou completando mais uma tapa em minha vida e, tendo orgulho de mim.

- À minha família: tios, tias, primos, primas e agregados por sempre depositarem em mim confiança e pelos momentos de conversa que me fortaleceram bastante.

- A minha orientadora Dra. Maria Luiza, primeiramente, por me receber tão bem em seu laboratório e por aceitar me orientar. E pelos momentos de debate científico e ensinamentos de vida.

- À minha orientadora Dra. Eliana Abdelhay por também aceitar me orientar e pela oportunidade de crescimento acadêmico.

- Ao meu namorado Antonio por sempre acreditar em mim, por me incentivar na carreira acadêmica e por nunca desistir e desanimar quando obstáculos apareciam. Amo-te, meu presentinho de Deus!

- As minhas amigas de faculdade Amanda Santos, Carla, Fernanda e Karen pelas conversas sempre engraçadas e descontraídas. À Karen, em especial, pela amiga sempre presente.
- À minha amiga e companheira de bancada, durante os sábados, e companheira de computador, Mariana, pela enorme paciência, pelo carinho e por sempre se mostrar solícita quando precisei.
- A minha amiga do Inca, Amanda Maia, pelos puxões de orelha nos momentos mais oportunos e pela sua amizade.
- À Daniela pela enorme paciência comigo e também por se mostrar muito solícita quando precisei.
- Ao Gabriel e Roberto pela ajuda, apoio e momentos de descontração.
- A Terezinha e Eliane, pelo debate dos casos e ajuda com os alguns experimentos.
- A Bethânia, pelas palavras carinhosas e pela disposição em me ajudar sempre que a solicitava.
- À Luize, Daiane, Moises e Luciano, pelos momentos de descontração em meio as análise dos casos.
- Ao Dr.Thomas Liehr, por me receber em seu laboratório para a realização de alguns experimentos e por se mostrar tão acessível em alguns momentos.
- À Dra. Hasmik, pelos ensinamentos de bancada durante os experimentos de MCB.
- Às agências financiadoras, CAPES-DAAD e FAPERJ pelo financiamento do projeto.

-Aos médicos colaboradores, mas principalmente, aos pacientes que são o objetivo maior deste estudo.

**“A ciência é a tentativa de compreender a realidade. É uma atividade quase religiosa, na mais ampla acepção da palavra”
George Wald**

RESUMO

DE FIGUEIREDO, Amanda Faria. Estudo do Perfil Cromossômico da Leucemia Mielóide Aguda da Infância no Brasil. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Biofísica)) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2009.

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma neoplasia caracterizada por um acúmulo excessivo de precursores de origem mielóide na medula óssea que perderam a capacidade de se diferenciar normalmente e de responder a reguladores normais de proliferação. A LMA corresponde a cerca de 20% dos casos totais de leucemias na população em geral, sendo o tipo leucêmico mais comum em adultos e, o tipo mais raro na infância, correspondendo a cerca de 15-20% dos casos pediátricos. Aproximadamente 85% das LMAs infantis apresentam anormalidades cromossômicas, tais como, a $t(8;21)(q22;q22)$, a $t(15;17)(q22;q12)$ e a $inv(16)(p13;q22)$. A detecção dessas anormalidades pelas técnicas de citogenética, no momento do diagnóstico, é um importante fator para o direcionamento do tratamento e para o prognóstico. Neste estudo, foram analisados 56 pacientes, de ambos os sexos, com idade variando de 4 meses a 17 anos, diagnosticados com LMA em diferentes instituições brasileiras no período de abril de 2006 a abril de 2009. As amostras de medula óssea e/ou sangue periférico foram tratadas de acordo com os protocolos padrões e as técnicas de bandeamento G, FISH, utilizando sondas locus específicas para os diversos rearranjos e mFISH, utilizando sondas para cromossomos inteiros. A análise por bandeamento G revelou alterações cromossômicas em 75% dos casos, com exceção de 8 pacientes sem mitose e 12 pacientes com cariótipos normais. Porém, com a utilização de técnicas de citogenética molecular, como o MCB, M-FISH e FISH, em 22 casos, esta frequência foi de 83%. A anormalidade mais freqüente foi a $t(15;17)(q22;q12)$ em 31% dos casos. Duas novas anormalidades foram detectadas com utilização do MCB e M-FISH: 46, XY, $inv(3)(p22p26)$ e 49, X,+ $inv\ dup(1)(qter\rightarrow q23\sim 24::q23\sim 24\rightarrow qter)$,+8,+8,+21,+21. Trinta e cinco pacientes estão vivos e, vinte e um foram a óbito. Estes dados mostram a importância da combinação de técnica de citogenética convencional, bandeamento G e, de técnicas moleculares, FISH e mFISH, na determinação do complexo perfil cariotípico da LMA da infância brasileira.

ABSTRACT

DE FIGUEIREDO, Amanda Faria. Estudo do Perfil Cromossômico da Leucemia Mielóide Aguda da Infância no Brasil. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Biofísica)) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2009.

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a disease characterized by an excessive accumulation of myeloid precursors at the bone marrow, with lost the ability of differing normally and answering to normal proliferation regulators. AML counts about 20% of the total leukemia cases at the general population, being considered the most common adults' leukemia type and, the most rare in childhood, accounting for 15-20% of childhood cases. Approximately 85% of childhood AMLs show chromosomal abnormalities, such as, $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q12)$ and $inv(16)(p13;q22)$. The detection of these abnormalities by cytogenetics' techniques, at the diagnosis, is an important factor to a directed treatment and to the prognosis. At this study, 56 patients, from both genders, between 4 months and 17 years old, with AML in different Brazilian institutions were analyzed from April, 2006 to April, 2009. Bone marrow and/or peripheral blood samples were treated according to standard protocols and G-Banding, FISH (using locus specific probes to different rearrangements) and m-FISH (using whole chromosome painting) techniques. G Banding analysis revealed 75% of chromosome abnormalities, except 8 patients with no mitosis and 12 patients presenting normal karyotype. However, this frequency grew to 83% using molecular cytogenetics techniques, such as MCB, M-FISH and FISH. The abnormality more frequently found was $t(15;17)(q22;q12)$, accounting for 31% of the cases. Two new abnormalities were detected using MCB and M-FISH: $46,XY,inv(3)(p22p26)$ and $49,XX,+invdup(1)(qter->q23-24::q23-24->qter),+8,+8,+21,+21$. Thirty-five patients are alive and, twenty-one died. These data show the importance of combining standard cytogenetics technique, G-banding and, molecular techniques, FISH and mFISH, in determining the complexity of the AML karyotype in Brazilian children.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sangue periférico com a presença de blastos, indicados pelas setas	2
Figura 2 - (a) Pele com a presença de petéquias	2
(b) Pele com a presença de equimoses	2
Figura 3 - Esquema simplificado da diferenciação das células hematopoiéticas e as possíveis linhagens correspondentes aos subtipos FAB das leucemias mielóides .	6
Figura 4 – Frequência de cada um dos subtipos morfológicos FAB	40
Figura 5 – Comparação do número de casos que apresentaram e não apresentaram as células estudadas com mitoses	41
Figura 6 - Frequência do número cromossômico modal	42
Figura 7- Anormalidades citogenéticas envolvendo os cromossomos 5 e 7	45
Figura 8 -Anormalidades citogenéticas recorrentes	45
Figura 9 – Anormalidades citogenéticas não-recorrentes	47
Figura 10 -Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência ilustrando o rearranjo gênico <i>PML/RARA</i> em uma metáfase.	48
Figura 11 – Técnica de MCB para os cromossomos 9 e 11, mostrando as anomalias del(9)(q21q31) e del(11)(q13 or q14)	50
Figura 12 – Técnica de M-FISH, mostrando as anormalidades citogenéticas tetrassomia dos cromossomos 8 e 21 e a presença de um der(1).	51
Figura 13 – (A)MCB para o derivativo do cromossomo 1, mostrando a invdup (1)(q)	52
Figura 14 – Técnica de M-FISH, mostrando a anomalia citogenética del(13)(q13q21)	52
Figura 15 – Padrão de cores gerado pelo software Isis para um cariótipo normal (46, XX)	53
Figura 16- Outro padrão de cores gerado pelo software Isis para um cariótipo normal (46, XX)	53
Figura 17- Técnica de MCB para o cromossomo 3, mostrando a anomalia citogenética inv(3)(p22;p26)	55
Figura 18 – Técnica de MCB e FISH para o cromossomo 16, mostrando anomalia citogenética inv(16)(p13;q22)del(16)(q22)	56
Figura 19 - Perfil cariotípico dos Subtipos FAB encontrados neste estudo	57
Figura 20 – Anormalidades citogenéticas recorrentes em ambos os sexos	58
Figura 21 - Status dos pacientes com as anomalias recorrentes, cariótipo normal e com cariótipo apresentando mais de uma anormalidade	59

Figura 22 - Associação das anormalidades citogenéticas por faixa etária	60
Figura 23- Perfil cariotípico dos subtipos morfológicos FAB	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação morfológica, imunológica e citoquímica da LMA	10
Tabela 2 – Características mais freqüentes dos subtipos FAB	15
Tabela 3 - Comparação da classificação FAB e WHO da LMA	21
Tabela 4 - Anormalidades citogenéticas encontradas no estudo	36
Tabela 5- Anormalidades cromossômicas envolvendo a região 11q23	44
Tabela 6- Anormalidades citogenéticas raras e ainda não-descritas	47
Tabela 7- Anormalidades citogenéticas reveladas por Bandeamento G e por MCB	49
Tabela 8- Casos que apresentaram cariótipo normal por bandeamento G e o posterior cariótipo analisado por MCB ou M-FISH	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF9	<i>Mixed lineage leukemia gene translocated to 3</i> – gene da leukemia de linhagem mista
AML1	<i>Acute myeloid leukemia 1 gene</i> –/gene leucemia mieloide aguda 1
ABL	<i>V-abl abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 gene</i> / gene homólogo ao oncogene viral da leukemia em murinos V-abl
BCR	<i>Breakpoint cluster region gene</i> / gene de uma concentração de pontos de quebra
CBFB	<i>Core Binding factor B gene</i> / gene da subunidade B do factor de ligação ao DNA
CEBPA	<i>CCAAT/ Enhancer binding protein alpha/</i> Alpha proteína que se liga a um enhancer
DAPI	4,6-Diamino-2-Fenilindol
del	Deleção
der	Cromossomo derivativo
DOP-PCR	<i>Degenerate Oligonucleotide Primed Polymerase Chain Reaction/</i> Reação da polimerase em cadeia com oligonucleotídeos degenerados
dic	Cromossomo dicêntrico
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucléico
ETO	Gene da família dos ETs genes
FAB	<i>French-American-British Classification</i> – Classificação Franco-americana-britânica
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> – Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente
HCl	Ácido clorídrico
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen/ Antígeno Leucocitário humano (MHC classe II)</i>
HOX	Genes da família homeobox
INCA	Instituto Nacional de Câncer
inv	Inversão
invdup	Inversão e duplicação
ISCN	<i>International System of Cytogenetic Nomenclature</i> / Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética
ITD	<i>Internal Tandem Duplication/</i> Duplicação interna <i>in tandem</i>
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
MCB	<i>Multicolor Banding Chromosome</i> / Bandeamento multicolorido
mFISH	<i>Multicolor FISH/</i> FISH multicolorido
M-FISH	<i>Multiplex FISH /</i> FISH Multiplex
MLL	<i>Mixed Lineage Leukemia gene/</i> Gene da leucemia de linhagem mista
MPO	Mieloperoxidase
MS	Ministério da Saúde
MYH11	<i>Miosin Have Chain 11/</i> miosina de cadeia pesada 11
M3v	M3 variante
M4Eo	M4 com eosinófilos
M5a	M5 com monoblastos sem diferenciação
M5b	M5 com monoblastos com diferenciação
NPM1	Nucleofosmina
NRAS	<i>Neuroblastoma Ras viral Oncogene Homolog/</i> Oncogene viral homólogo ao neuroblastoma Ras
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction/</i> Reação da polimerase em cadeia
Ph	Cromossomo Ph
PLZF/PLZF	<i>Promyelocytic Leukemia Zinc Finger /</i> Proteína PLZF
PML/PML	<i>Promyelocytic Leukemia Gene /</i> Proteína PML

PTD	<i>Partial tandem dupliation/</i> duplicação parcial <i>in tandem</i>
RARA/RARA	<i>Retinoic Acid Receptor Alpha Gene /</i> Proteína RAR α
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute/</i> Instituto Memorial Paque Roswell
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction/</i> Reação da polimerase em cadeia com a transcriptase reversa
SB	<i>Sudan Black</i>
SKY	<i>Spectral Karyotyping/</i> cariótipo espectral
SMD	Síndrome mielodisplásica
SNC	Sistema Nervoso Central
SSC	<i>Saline Sodium Citrate/</i> Solução salina de citrato de sódio
TdT	<i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase/</i> deoxinucleotidil transferase terminal
WHO	<i>World Health Organization/</i> Organização Mundial da Saúde

Símbolos utilizados para a nomenclatura citogenética

(::)	Quebra e união, em um sistema detalhado
(+)	Ganho de material genético
(-)	Perda de material genético
/	Separa os clones de um cariótipo
(?)	Identificação questionável de cromossomo ou estrutura cromossômica
->	De – para, em um sistema detalhado
(~)	Denota intervalos e limites de segmentos de cromossomos ou números de cromossomos, fragmentos, ou marcadores.
[]	Representa o número de células com determinada alteração
t	Translocação cromossômica
ter	Final do cromossomo ou telômero
p	Braço curto de um cromossomo
q	Braço longo de um cromossomo

SUMÁRIO

ITEM	
Resumo	IX
Abstract	X
Lista de figuras	XI
Lista de tabelas	XIII
Lista de abreviaturas e siglas	XIV
1. Introdução	1
1.1. Leucemias	1
1.2. Leucemia Mielóide Aguda	4
1.3. Classificação Morfológica e imunológica da LMA	8
2. Importância da Caracterização Citogenética das neoplasias	11
3. Padrão Citogenético da LMA	13
4. Classificação da Organização Mundial da Saúde (WHO Classificação)	17
5. Prognóstico de pacientes com LMA	21
6. LMA do Lactente	25
7. Objetivos	29
8. Materiais e Métodos	30
8.1. Desenho Experimental	30
8.2. Amostra	30
8.3. Estudo Cromossômico por Bandeamento G	31
8.4. Estudo Cromossômico por Banda C	33
8.5. Citogenética Molecular	33
8.5.1. FISH e M-FISH	33
8.5.2. MCB	34
9. Resultados	36
9.1. Subtipos Morfológicos (FAB) encontrados no estudo	39
9.1.1 Associação entre a taxa de remissão e os subtipos FAB	40
9.2. Padrão cariotípico por Bandeamento G	41
9.2.1. Número Cromossômico	42
9.2.2. Anormalidades Recorrentes	42
9.2.3. Anormalidades Secundárias e Não-específicas	46
9.3. Citogenética Molecular	48
9.3.1. FISH	48
9.3.2. MCB	49
9.4. Prognóstico	57
9.4.1. Correlação com o sexo dos pacientes	57
9.4.2. Associação das anormalidades e a taxa de remissão	58
9.4.2. Correlação das Anormalidades Citogenéticas e a Idade	59
9.4.3. Associação das Anormalidades Citogenéticas e os Subtipos FAB	60
10. Discussão	62
11. Conclusões	76
12. Referências Bibliográficas	78
13. Anexos	90
13.1. Publicação	90
13.2. Cariótipos	93

1. Introdução

1.1. Leucemias

As leucemias são um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas caracterizadas pela proliferação clonal de células da linhagem hematopoiética que sofreram alterações genéticas que se manifestam em uma determinada fase durante a sua diferenciação. Estas alterações afetam genes importantes que controlam mecanismos naturais de proliferação, diferenciação/maturação e apoptose.

Gilliland e colaboradores (2004) reportaram que a leucemia, assim como outros cânceres, pode resultar da ocorrência de múltiplas etapas, nas quais, mutações de múltiplos genes acontecem nas células precursoras do espaço medular. O primeiro evento (mutação) leva a uma hematopoiese clonal. Nesta etapa, são muito comuns alterações clonais e tais anormalidades, são usualmente associadas à perda de genes supressores de tumor. Porém, esta única mutação não é suficiente para o desenvolvimento da leucemia, sendo necessária a aquisição de anormalidades cariotípicas nas células da medula óssea. Neste último estágio, é evidenciado o bloqueio da diferenciação (parada maturativa), um aumento da população blástica na medula e a leucemia propriamente dita.

Os principais sintomas clínicos resultam do acúmulo de precursores imaturos (Figura 1) na medula óssea que podem prejudicar, ou até mesmo impedir, a produção de células sanguíneas, tais como: os eritrócitos, causando anemia; os leucócitos, resultando em uma susceptibilidade a infecções e as plaquetas, causando hemorragias. Havendo a proliferação excessiva de células blásticas da medula óssea, poderá ocorrer a infiltração destas em tecidos, tais como amígdalas, linfonodos, pele, baço, rins, sistema nervoso central (SNC) e outros. A fadiga, a palpitação e a anemia são sintomas iniciais e aparecem devido à redução da

produção de eritrócitos na medula óssea. A susceptibilidade a infecções e as hemorragias são os principais fatores que podem levar a óbito. Depois que a doença se instala, o tratamento deve ser iniciado tão logo seja feito o diagnóstico e a classificação morfológica da leucemia.

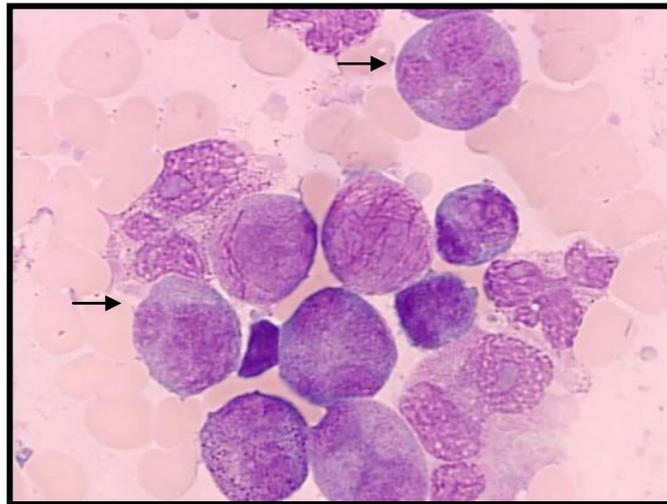


Figura 1. Sangue periférico com a presença de blastos indicados pela seta. Fonte : <http://www.leukemia-images.com/bilder.leukemia-images.com/Acute.myeloid.leukemia.with.ve15380uniquefile2007-01-5-00-17-06.jpg>

A suspeita do diagnóstico da hemopatia maligna é reforçada pelo exame físico, no qual o paciente pode apresentar palidez, febre, esplenomegalia, epistaxe (sangramento nasal), hemorragias conjuntivais, sangramentos gengivais, petéquias (Figura 2A) e equimoses (Figura 2B).

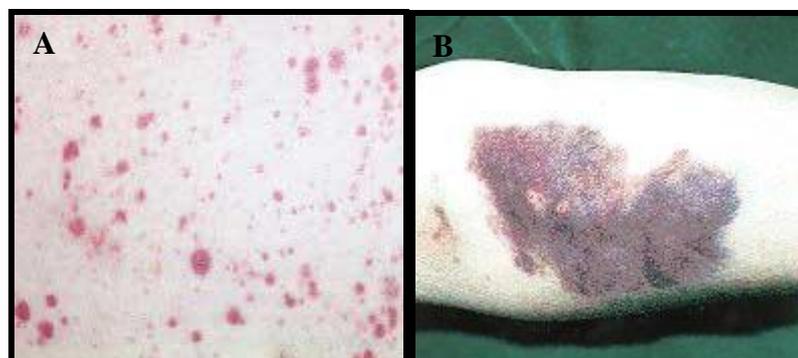


Figura 2: (A) Pele com a presença de petéquias; (B) Pele com a presença de equimoses. Fonte: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=344

Na análise laboratorial, o hemograma estará alterado, no entanto, o diagnóstico é confirmado no exame da medula óssea (mielograma).

Como as hemopatias malignas são neoplasias bastante heterogêneas quanto à morfologia e ao prognóstico, o reconhecimento de características morfológicas de células neoplásicas tem capacitado os hemopatologistas a distinguir as leucemias agudas, em duas grandes categorias: a leucemia mielóide aguda (LMA) e a leucemia linfoblástica aguda (LLA), que apresentam diferenças na epidemiologia clínica e na resposta a terapias específicas (Bloomfield *et al.*, 1993). (Figura 1)

Deste modo, a classificação das leucemias é baseada em critérios, como o tipo celular envolvido, o grau de diferenciação e a evolução clínica seguida na doença. Nas leucemias crônicas há um aumento de células neoplásicas maduras não-funcionais, que substituem gradativamente os elementos normais da medula óssea, enquanto que nas leucemias agudas acontece a proliferação de elementos celulares imaturos e de rápida evolução clínica.

O tratamento das leucemias consiste na destruição das células neoplásicas presentes, para que assim, a medula óssea volte a produzir células normais. Atualmente, o progresso para obter a cura total da leucemia vem sendo conseguido com a associação de diversos medicamentos (poliquimioterapia), com o controle das complicações infecciosas e hemorrágicas e com a prevenção ou combate da doença no SNC. Porém, outros tipos de tratamento podem incluir o transplante de células-tronco hematopoéticas.

A estimativa para o biênio 2008/09 feita pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA/Brasil) informa que ocorrerão cerca de 9.890 novos casos de câncer por ano em crianças e adolescentes com até 18 anos de idade. Em países em desenvolvimento o câncer pediátrico, atualmente, se destaca como principal causa

de óbito. No Brasil, em 2005, a taxa de mortalidade por câncer em pacientes de 1 a 19 anos foi de 8% em relação a todos os óbitos, configurando a segunda colocação dentre as causas de morte em crianças e adolescentes (MS/INCA, 2008).

A causa da leucemia ainda é desconhecida, mas alguns fatores podem estar relacionados com o desenvolvimento de leucemias no ser humano, como a exposições a radiações, agentes químicos, viroses e hereditariedade, de acordo com vários estudos epidemiológicos exploratórios. Com os avanços no entendimento das transformações malignas em níveis moleculares, os mecanismos de ativação de oncogenes e, conseqüentemente, mudanças no DNA, surgiram como fatores de risco em potencial para explicar os mecanismos etiopatológicos das leucemias (Estey & Dohner, 2006). Assim como, aberrações de determinadas expressões de proto-oncogenes também já estão bem estabelecidas como fatores indutores de LMA (Sandler D.P. & Ross J.A., 1997).

1.2. Leucemia Mielóide Aguda

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma neoplasia caracterizada por um acúmulo excessivo de precursores mielóides na medula óssea que perderam a capacidade de se diferenciar normalmente e de responder a reguladores normais de proliferação. O evento leucemogênico pode ocorrer em uma célula-tronco comprometida com a linhagem mielóide, impedindo a maturação e a diferenciação das células (Figura 3).

As células alteradas possuem uma vantagem de sobrevivência, fazendo com que a medula e o sangue periférico sejam caracterizados por uma leucocitose com predominância de células imaturas. À medida que estas células imaturas se acumulam na medula óssea, elas substituem as células mielocíticas,

megacariocíticas e eritrocíticas normais, levando a uma perda da função da medula óssea e a complicações como sangramentos, anemia e infecções.

Infelizmente, o curso clínico natural da LMA pode ser fatal em termos de dias, ou semanas a partir do diagnóstico. Isto se deve, principalmente, às complicações advindas da insuficiência medular, podendo ser citadas como as mais comuns: infecções ligadas a neutropenia e hemorragias relacionadas a trombocitopenia (Clarke & Glaser, 2000)

A LMA é mundialmente reportada em cerca de 4 casos a cada 100 mil habitantes, correspondendo a aproximadamente 20 % dos casos totais de leucemias na população em geral (Head, 2004a). Na população adulta, é a mais comum neoplasia mielóide com uma média de idade de 70 anos, isso corresponde à cerca de 80% dos casos de leucemias agudas em adultos. Porém, na infância, a LMA é um tipo raro, correspondendo a cerca de 15% - 20% das leucemias agudas que atingem crianças até os 18 anos de idade. Por outro lado, em recém-nascidos, a LMA corresponde a aproximadamente 49% dos casos (Lichtman & Liesveld, 2001).

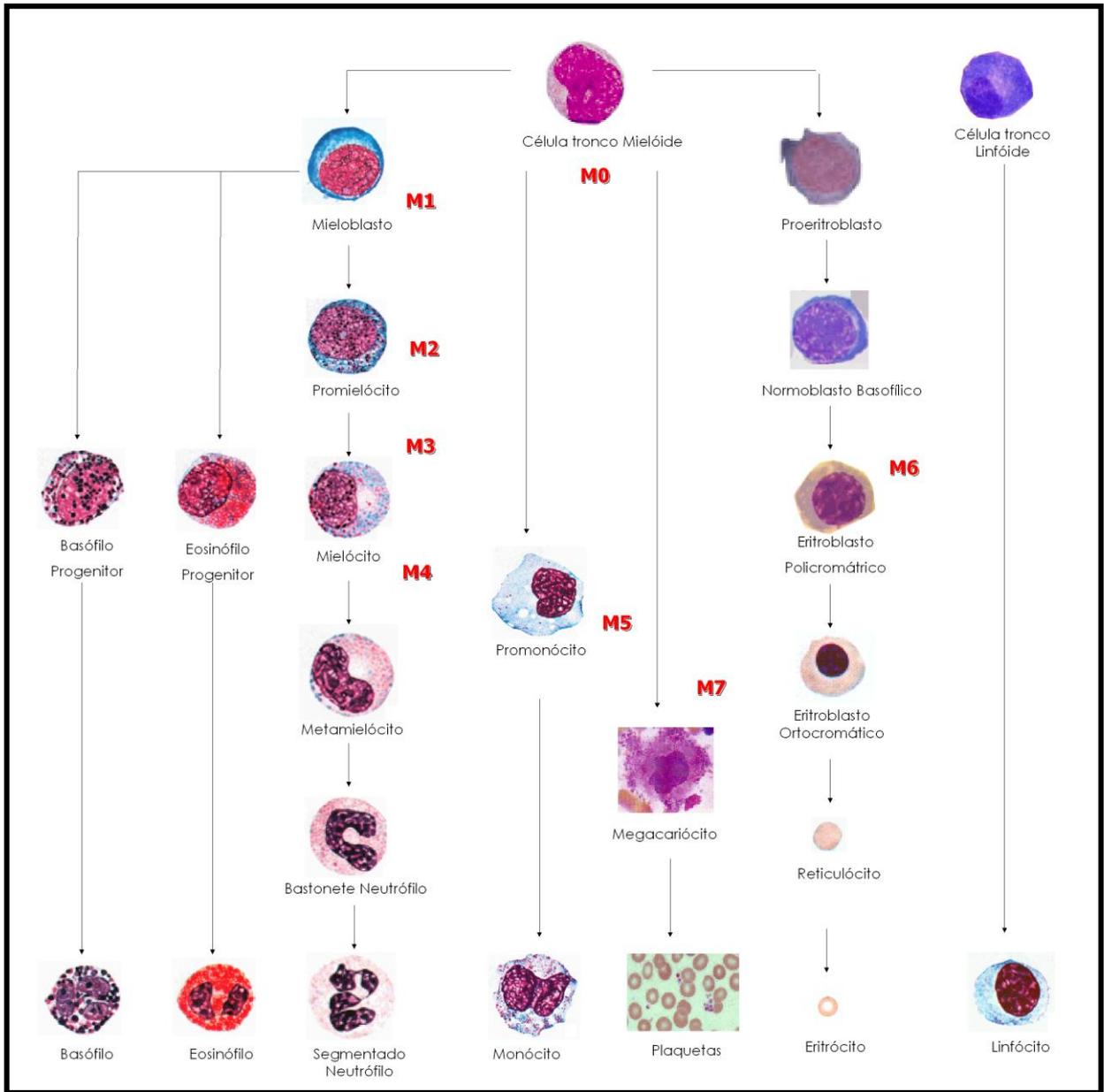


Figura 3- Esquema simplificado da diferenciação das células hematopoiéticas e as possíveis linhagens correspondentes aos subtipos FAB¹ das leucemias mielóides. Fonte: modificado de http://www.userlogic.com/anll/studyaids/maturationchart/maturation_chart.html
 M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7 – Subtipos morfológicos FAB da LMA

¹ FAB : Grupo de Hematologistas Franco-Americano-Britânico que classificou morfológicamente as leucemias

A incidência da LMA em pessoas com menos de 15 anos de idade cresce rapidamente após o nascimento, atingindo o seu pico um pouco antes dos 5 anos de idade (Head, 2004b). A LMA pode apresentar-se como uma doença *de novo* ou pode ser secundária à: crise blástica de LMC, evolução de mielodisplasia e a tratamentos que utilizam agentes alquilantes, inibidores de topoisomerase e/ou radiação ionizante (Rund & Bem-Yehuda, 2004).

De acordo com Ross e colaboradores (2000), há uma considerável diferença geográfica no aparecimento de leucemias na infância e estas diferenças, podem ajudar no esclarecimento dos mecanismos etiológicos. Por exemplo, nos Estados Unidos e alguns países desenvolvidos da Europa, os gráficos de incidências mostram um pico significativo de leucemia linfoblástica aguda (LLA) na infância, entre 2-5 anos. Com relação aos países em desenvolvimento, Howard e colaboradores (2004) observaram o pico de incidência de Leucemia Linfoblástica Aguda entre 3 a 5 anos de idade em 375 crianças diagnosticadas entre 1980 e 2002. Em relação a LMA, também foram observadas diferenças geográficas, como por exemplo, em crianças de origem latina, hispânica e asiática, já foi descrita uma alta incidência de LMA, sendo a leucemia promielocítica aguda (LMA-M3), um subtipo da LMA caracterizado pelo acúmulo de promielócitos anormais na medula óssea, o subtipo mais encontrado entre as crianças de origem hispânica e latina (Parkin et al., 1988).

No entanto, no Brasil, devido aos poucos estudos epidemiológicos e a raridade desta doença na infância, não existe na literatura uma descrição do tipo leucêmico predominante na infância brasileira.

1.3. Classificação morfológica e imunológica da LMA

Com o objetivo de uniformizar os vários tipos celulares presentes na LMA, foram desenvolvidas as classificações: morfológica, que leva em consideração o tipo celular predominante e o grau de maturação da célula envolvida e, imunofenotípica, que se baseia na presença ou na ausência de determinados antígenos de superfície nas células blásticas. A classificação morfológica desenvolvida pelo grupo de hematologistas franceses, americanos e britânicos (Bennett *et al.*, 1976) descreve a LMA como tendo 8 subtipos principais (classificação FAB), cada um dos quais podendo apresentar características singulares. O subtipo FAB M0 (2%) apresenta blastos grandes e agranulares com pouquíssima diferenciação mielóide; “*sudan black*” (SB) e mieloperoxidase (MPO) negativos; os blastos expressam pelo menos um antígeno mielóide (CD13, CD33, CD11b), podendo expressar muitas vezes CD34 e TdT. O subtipo FAB M1 (10-18%) apresenta mieloblastos pouco diferenciados com bastonetes de Auer² ocasionalmente vistos. O subtipo FAB M2 (27-29%) apresenta mieloblastos com diferenciação (< 20% monoblastos), blastos Auer proeminentes e cloromas³. O subtipo FAB M3 (5-19%) apresenta promielócitos anormais hipergranulares, com diversos bastonetes de Auer, núcleo freqüentemente reniforme ou bilobulado e coagulação intravascular disseminada (CID)⁴. Já a M3v é caracterizada por núcleo com fendas profundas, granulação fina, poucos bastonetes de Auer. O subtipo FAB M4 (16-25%) (20-80% das células não-eritróides são

² Bastonetes de Auer: compostos lisossomais que podem ser vistos em células blásticas com formato de agulhas alongadas que contêm peroxidase, enzimas lisossomais e grandes inclusões cristalinas.

³ Cloromas: manchas de aspecto esverdeado que podem aparecer na pele

⁴ A coagulação intravascular disseminada (CID ou CIVD) é uma síndrome adquirida caracterizada pela ativação difusa da coagulação intravascular, levando à formação e deposição de fibrina na microvasculatura. A deposição de fibrina pode levar à oclusão dos vasos e conseqüente comprometimento da irrigação sangüínea de diversos órgãos, que em conjunto com alterações metabólicas e hemodinâmicas, contribui para a falência de múltiplos órgãos. O consumo e conseqüente depleção dos fatores da coagulação e plaquetas, resultantes da contínua atividade procoagulante, pode levar a quadros de sangramento grave, o que freqüentemente é a primeira manifestação notada.

monoblastos) apresenta diferenciação mieloblástica e monoblástica; a variante M4Eo (5-10% de todos os casos) é associada com >5% de precursores eosinofílicos displásicos na medula óssea. O subtipo FAB M5 (13-22%) apresenta diferenciação monoblástica. O subtipo M5a tem predomínio de monoblastos (>80% das células leucêmicas) e o subtipo M5b demonstra diferenciação (<80% das células leucêmicas são monoblastos). O subtipo FAB M6 (1-3%) é caracterizado por uma eritroleucemia com diseritropoese bizarra e características megacarioblásticas. E o subtipo FAB M7 (4-8%) é caracterizado por megacarioblastos com fibrose medular.

A classificação imunofenotípica é um importante fator no diagnóstico das leucemias agudas, especialmente para a LLA e alguns tipos de LMA como o subtipo M0 e M7 (Falcão & Martins, 2000) (Tabela 1).

Desde a descoberta do cromossomo Philadelphia (Nowel & Hungerford, 1960), anomalia citogenética específica encontrada na medula óssea de pacientes com LMC, vários estudos citogenéticos realizados em LMA, tem detectado anomalias específicas associadas a subtipos morfológicos. Essas anomalias mostraram o papel importante da citogenética tumoral no entendimento da leucemogênese da infância.

Tabela 1 – Classificação morfológica, imunológica e citoquímica da LMA

Subtipo FAB	Nome comum e % dos casos	Citoquímica e Imunofenotipagem
M0	LMA com diferenciação mínima (2%)	SB e EN (-), TdT(+/-), aMPO (+), CD33 ou CD13 (+), CD7+/-, CD14, CD15+/-, CD34, (marcadores de células T)
M1	LMA sem maturação (10- 18%)	MPO(+) e SB (+),aMPO (+),TdT, CD13 ou CD33, HLA-DR +, CD14, CD15, CD34, CD4+/-
M2	LMA c/ maturação (27-29%)	MPO (+) SB (+), EN (-); CD14(+/-);CD11(+), CD33 e ou CD13 (+), aMPO(+), HLA-DR +,CD14, CD4
M3	Leucemia promielocítica aguda (5-19%)	MPO (+), SB (+), CD14(-);CD11(+);CD15(+);HLA(-), CD33/CD13 (+), aMPO (+)
M4	Leucemia mielomonocítica (16-25%)	MPO (+) SB (+) e EN (+)CD14(+);CD11(+/-);HLA(+), CD33/CD13 (+), CD13, CD33, CD15, CD36, HLA-DR +/-, CD4, CD34+/-, TdT+/-
M4Eo	Leucemia mielomonocítica c/ eosinófilos anormais (5-10%)	MPO (+) SB (+) EN (+)CD14(+/-);CD11(+); HLA (+), CD33/CD13 (+/-), CD15, CD36,CD34+/-, TdT+/-
M5	Leucemia monocítica aguda (13-22%)	CD11c, CD13, CD33, CD36, HLA-DR +, CD15, CD14, CD4, CD34, CD7+/- ,MPO (-) SB (-),EN (+)
M6	Eritroleucemia (1-3%)	Eritrócito: Glicoproteína A+, CD71, CD45+/-, Mieloblasto: os mesmos da M1, SB (+), MPO (+), EN (-)
M7	Leucemia megacariocítica Aguda (4-8%)	CD36, CD41, CD42, ou CD61+, CD34, CD13, CD33+/-, HLA-DR+, SB (-), MPO(-), EN (+)

MPO- mieloperoxidase, HLA- antígeno leucocitário humano, CD – “cluster differentiation”, TdT – deoxinucleotidil transferase terminal, EN – Naftil esterase, SB - Sudan Black, HLA –antígeno leucocitário humano. Fonte: Modificado de Bennett et al., 1976.

2. Importância da Caracterização Citogenética nas Neoplasias

A análise citogenética das células malignas representou o início de um dos maiores avanços na compreensão da natureza biológica das neoplasias, em especial no campo da leucemogênese e nas implicações prognósticas. Isso porque, com o advento da citogenética, foi possível a descoberta de várias aberrações cromossômicas recorrentes e específicas em diferentes tipos de leucemias. Este tipo de descoberta, mostrando que a leucemia era uma doença genética, possibilitou a determinação dos genes envolvidos no intrigante processo de aparecimento da leucemia através do mapeamento e da clonagem desses genes. A presença de determinadas aberrações cromossômicas caracterizou marcadores tumorais no diagnóstico e na determinação do prognóstico.

A citogenética tumoral foi dependente do melhoramento das técnicas de obtenção cromossômica como também das técnicas de análise cariotípica. Assim, de modo esquemático, podemos dividir o desenvolvimento da análise dos cromossomos em 5 fases. A primeira começa com a descoberta de métodos para obter células metafásicas em culturas *in vitro* e se estende até 1969, levando a descoberta do cromossomo Philadelphia (Ph) na Leucemia Mielóide Crônica (Nowell & Hungerford, 1960). Nesta época, os cromossomos eram corados por corante de *Giemsa* sem tratamento prévio, o que tornava difícil a distinção confiável entre os cromossomos não-homólogos. A segunda fase se inicia com o desenvolvimento da técnica de bandeamento (1969–1971), que possibilitou a individualização precisa dos pares de cromossomos, assim como, a natureza das aberrações cromossômicas de diversas neoplasias. Nesta época, foi descrita a primeira translocação no câncer humano $t(8;21)(q22;q22)$ em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (LMA) (Zech L., 1969) e a natureza do cromossomo Philadelphia

(Ph) como resultante de uma translocação recíproca, envolvendo os cromossomos 9 e 22 - t(9;22)(q34; q11) (Rowley J. D., 1998). A terceira fase começa com o uso de sondas de DNA específicas para identificar genes ou regiões cromossômicas. Estas sondas marcadas com material fluorescente deram origem ao desenvolvimento da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH)(Van Prooijen-Knegt *et al.*, 1982). Com essa técnica, é possível identificar anormalidades cromossômicas que envolvem pequenos segmentos de DNA, como por exemplo, os exatos pontos de quebra envolvidos na inversão pericêntrica do cromossomo 16, encontrada em pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) (Kundu & Liu, 2001). A quarta fase começa com o uso, não de sondas de regiões cromossômicas, mas sondas de cromossomos inteiros e com a utilização de mais de três fluorocromos, gerando um padrão diferente de cor para cada um dos 24 cromossomos humanos (Schrock *et al.*, 1996; Speicher *et al.* 1996). Essa poderosa técnica chamada de cariótipo espectral (SKY) ou FISH *multiplex* (M-FISH) tem se mostrado de extrema importância para detectar não só translocações, mas, principalmente, para detectar aberrações cromossômicas complexas. Como por exemplo, na detecção da amplificação de regiões 11q, 21q e 22q que não haviam sido detectadas antes em pacientes com LMA que apresentavam cariótipos complexos, mas que podem ter um papel importante na leucemogênese (Mrozek *et al.*, 2002). Juntamente com o M-FISH, surgiu uma quinta fase que se caracteriza pelo uso de sondas que foram confeccionadas a partir de pedaços de todos os cromossomos. Essas sondas eram marcadas com cinco diferentes fluorocromos, gerando padrões de cores para cada um dos 24 cromossomos pela sobreposição desses inúmeros fragmentos de DNA (Liehr & Claussen, 2002; Liehr *et al.*, 2002). Essa técnica denominada de *Multicolor Banding Chromosome* tem se mostrado muito importante para a caracterização de

cariótipos complexos, pequenas anormalidades citogenéticas e cariótipos com anormalidades *masked* nas LMAs (Macedo Silva *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008; Marques-Salles *et al.* 2009).

A técnica de M-FISH apresenta limitações, pois esta necessita da presença de metáfases de relativa qualidade na amostra para a análise. Com isso, houve a necessidade de se estabelecer uma técnica de FISH que não necessitasse de metáfases de qualidade. Então, a hibridização genômica comparativa (CGH) conseguiu ultrapassar esse obstáculo através da comparação do DNA genômico normal e do DNA genômico neoplásico. Esses DNAs eram diferencialmente marcados com fluorocromos verde e vermelho, respectivamente, misturados em quantidades iguais e co-hibridizados. Com a utilização dessa técnica, um grande avanço foi alcançado, principalmente, na citogenética de tumores sólidos que apresentam limitações na qualidade das metáfases (Kearney, 2001).

3. Padrão Citogenético da LMA

A literatura tem mostrado que, aproximadamente, 85% das crianças com LMA apresentam alterações cromossômicas (Hall, 2001; Raimondi *et al.*, 1999), enquanto que cariótipos anormais são detectados em aproximadamente 60% dos pacientes adultos (Mrozek *et al.*, 2004). A razão para essa discrepância ainda não é conhecida. Algumas anormalidades cromossômicas, que podem tanto ser encontrada em crianças como em adultos, estão associadas com os mesmos subtipos FAB, por exemplo, a t(8;21) com a M2, a t(15;17) com a M3 e a inv(16) com a M4Eo (Raimondi *et al.*, 1999; Leblanc & Berger, 1997).

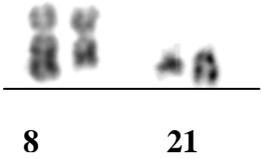
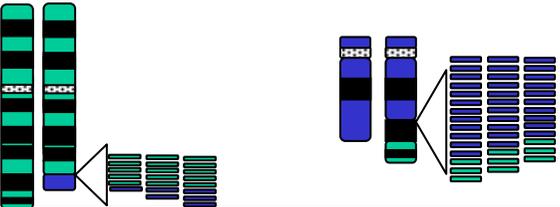
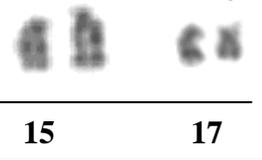
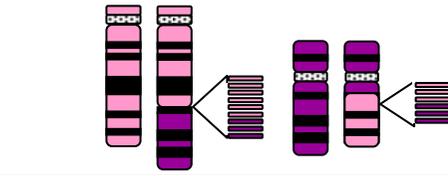
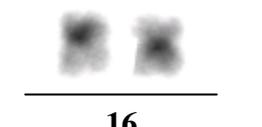
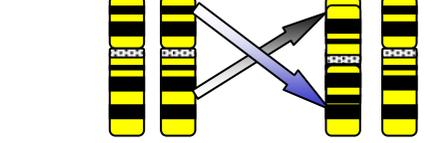
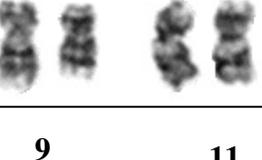
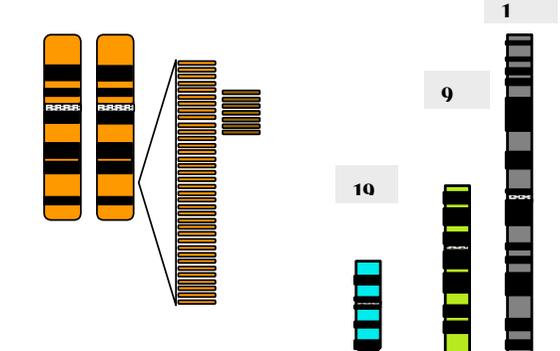
Os tipos de alterações citogenéticas encontradas na LMA podem ser numéricas e/ou estruturais. As alterações estruturais encontradas na LMA são, principalmente, as denominadas translocações e inversões, que conferem um

cariótipo pseudodiplóide, ou seja, com 46 cromossomos. As alterações estruturais mais freqüentemente encontradas na LMA da infância são aquelas que afetam a região q23 do cromossomo 11, especialmente nos subtipos M4 e M5, podendo ser encontrada em 14-22% dos casos de LMA da infância. Os rearranjos, que envolvem essa região, mais comumente observados são $t(9;11)(p21;q23)$, $t(10;11)(p13;q23)$ e a $t(11;19)(q23;p13)$ (Manola, 2009) (tabela 2).

A segunda alteração estrutural mais encontrada na LMA da infância é a $t(8;21)(q22;q22)$, sendo reportada em 7-16% dos casos e é preferencialmente correlacionada com o subtipo morfológico M2. No nível molecular, essas alterações envolvem genes que codificam fatores transcricionais ou componentes reguladores de complexos transcricionais. Quando são detectadas aberrações do tipo translocações, usualmente é produzida uma proteína híbrida que está envolvida na desregulação da proliferação, diferenciação e apoptose de células sangüíneas precursoras (Schnittger S. *et al.*, 2002; Meshinchi S. *et al.*, 2001) (tabela 2).

As alterações numéricas podem ser do tipo monossomias e nulissomias, conferindo um cariótipo hipodiplóide, ou seja, com menos de 46 cromossomos e, podem ser do tipo trissomias, tetrassomias e etc, conferindo um cariótipo hiperdiploide, com mais de 46 cromossomos. A alteração numérica mais freqüente na LMA, tanto do adulto como na infância é a trissomia do cromossomo 8, exceto na M0. Esse cromossomo extra é geralmente visto com outras anormalidades citogenéticas recorrentes como $t(8;21)$, a $t(15;17)$ e outras. Porém, também pode ser visto como uma única aberração cromossômica do cariótipo em 2,1% dos casos de LMA na infância (Raimondi *et al.*, 1999) e em 3-4% em pacientes adultos. Mesmo não estando associada com um subtipo específico de LMA, ela é mais comum nos subtipos M1, M4 e M5.

Tabela 2 – Características mais freqüentes dos subtipos FAB

Anormalidades citogenéticas	Genes envolvidos	Cariótipo parcial	Representação esquemática das anormalidades citogenéticas	Associação FAB / Incidência
t(8;21)(q22;q22)	<i>AML1-ETO</i>	 8 21		M2 / 11,7%
t(15;17)(q22;q12)	<i>PML/RARA</i>	 15 17		M3 / 11,5%
inv(16)(p13q22)	<i>CBFβ-MYH11</i>	 16		M4 Eo/ 5,9%
Anormalidades 11q23 t(9;11)(p21;q23) t(11;19)(q23;q13) t(1;11)(q21;q23)	<i>MLL</i>	 9 11		M5/M4 / 18,4%

t – translocação, q – braço longo do cromossomo, p – braço curto do cromossomo, M2, M3, M4, M5 – subtipos morfológicos FAB, *AML1* - *Acute myeloid leukemia 1 gene*, *ETO*- *Gene da família dos ETs genes*, *PML*- *Promyelocytic Leukemia Gene*, *RARA* - *Retinoic Acid Receptor Alpha Gene*, *CBFβ*- *Core Binding factor B gene*, *MYH11* - *Miosin Have Chain 11*, *MLL* – *Mixed Lineage leukemia*. Fonte: Modificado de Manola, 2009 e Langmuir et al, 2001.

Outras alterações numéricas comumente observadas neste tipo de leucemia são as monossomias do cromossomo 5 ou 7, encontradas em pacientes mais velhos e na LMA secundária. A trissomia do cromossomo 21 em crianças é a segunda alteração numérica mais freqüente, estando associada às anomalias citogenéticas recorrentes. Mas também pode ser encontrada de forma única no clone em 1,5% dos casos (Raimondi *et al.*,1999). Além dessas alterações, podem também ser encontradas trissomias do cromossomo 4, 11, 13 e 21 com menor freqüência do que a trissomia do cromossomo 8 em adulto (Bacher *et al.*, 2005).

A segunda alteração numérica mais comum neste tipo de leucemia é monossomia do cromossomo 7 encontrada em aproximadamente 5% das crianças, enquanto que a monossomia do cromossomo 5 é muito rara, representando aproximadamente 1% dos casos (Raimondi *et al.*, 1999). Em adultos, esses números aumentam para, respectivamente, 7% e 5% dos casos (Grimwade, 2001).

Como foi possível observar, alguns subtipos morfológicos raros não apresentam anomalias citogenéticas específicas, como a M0, M1 e M6. Atualmente, o padrão cariótipo da LMA pode ser assim descrito, para esses subtipos raros: a M0 e a M1 são descritos com uma alta freqüência de aberrações cromossômicas clonais (Bacher *et al.*, 2005), além disso, demonstram uma certa associação com a trissomia dos cromossomos 4, 11, 13 e 21, tanto como anomalias isoladas ou como adicionais a outras anomalias citogenéticas também não-específicas (Klaus *et al.*, 2004). O outro subtipo raro, M6, foi somente descrito apresentando uma alta incidência de cariótipos complexos⁵ (61%)(Bacher *et al.*,2005).

⁵ Cariótipos complexos: São cariótipos que apresentam mais de duas anormalidades cromossômicas ou quando há o envolvimento de três ou mais cromossomos numa mesma aberração cromossômica.

4. Classificação da Organização Mundial de Saúde (Classificação WHO)

Atualmente, a Organização Mundial de Saúde em conjunto com a Sociedade dos Hematopatologistas e a Associação de Hematopatologistas Europeus estabeleceu uma nova classificação para as neoplasias linfóides e mielóides (Jaffe *et al.*, 2001; Vardiman *et al.*, 2002). Esse sistema de classificação tem como princípio básico utilizar não somente os achados morfológicos, mas sim todas as informações disponíveis, incluindo os aspectos genéticos, imunofenotípicos, biológicos e clínicos dos pacientes para determinar as entidades específicas da doença.

A classificação WHO das neoplasias mielóides inclui muitos dos critérios de classificação usados pelo grupo FAB na classificação da LMA (Bennett J.M. *et al.*, 1976) como aspectos morfológicos, citoquímicos e imunofenotípicos das células neoplásicas a fim de estabelecer a linhagem e o grau de maturação dessas células (Vardiman *et al.*, 2002) (tabela 3). A LMA foi, então, dividida, de acordo com esse sistema de classificação, em quatro grupos distintos:

(1) LMA com anormalidades genéticas recorrentes⁶

Este grupo é caracterizado pela presença de translocações balanceadas⁷ recorrentes e inversões, tendo, este grupo, a mesma incidência durante toda a vida adulta, com uma média de idade de 30 anos. As anormalidades genéticas encontradas neste grupo compreendem aproximadamente 85% das anomalias encontradas em pacientes mais jovens, mas uma pequena porcentagem dessas anormalidades é encontrada em pacientes mais velhos. Este grupo tende a

⁶ Recorrentes: Para uma anomalia ser considerada recorrente, ela já deve ter sido observada mais de duas vezes em um mesmo laboratório ou mais de três vezes em laboratórios diferentes, ou seja, descrita por três pesquisadores diferentes.

⁷ Balanceadas: Translocações em que não há perda nem acréscimo de material genético

responder favoravelmente a quimioterapia citotóxica. Foram então incluídas quatro categorias de anormalidades características, geralmente associada a LMA primária:

(1.1) a LMA com $t(8;21)(q22;q22)$, (*AML1/ETO*);

É a mais típica, LMA com diferenciação, morfologia do subtipo FAB M2. Representa 10 a 15% dos casos de LMA

(1.2) a LMA com eosinófilos anormais na medula óssea e com $inv(16)(p13;q22)$ ou $t(16;16)(p13;q22)$, (*CBF β /MYH11*);

Tipicamente, LMA com diferenciação mielomonocítica e eosinófilos displásicos, contendo grandes grânulos bem corados, morfologia de subtipo FAB M4Eo. Porém, outras morfologias são freqüentes, como o subtipo FAB M2 e M5, porém sem a presença de eosinófilos displásicos. Representa 6 a 8% dos casos de LMA.

(1.3) a leucemia promielocítica com $t(15;17)(q22;q12)$, (*PML/RAR α*) e variantes;

Esta anomalia citogenética tem uma alta correlação com o subtipo morfológico M3 e M3v. No entanto 2 a 3% dos casos podem ser correlacionadas com o subtipo morfológico FAB M1 e M2. As variantes podem ser a $t(11;17)(q23;q12)$ (*PLZF/RAR α*), a $t(5;17)(q32;q12)$ e a $t(11;17)(q13;q12)$. Este grupo representa 8 a 10% dos casos de LMA.

(1.4) a LMA com anormalidades na região 11q23 (*MLL*).

Numerosos cromossomos já foram identificados em translocações com a região 11q23, no entanto, a mais freqüente tem sido a $t(9;11)(p21;q23)$ (*MLL/AF9*). O subtipo morfológico mais encontrado é o M5, mas outros subtipos já foram identificados como M2, M4 e M7. Representa 5 a 8% dos casos de LMA.

Aproximadamente 30% dos pacientes com LMA terão uma dessas anormalidades genéticas que são importantes para o diagnóstico clínico e seleção de terapia relacionada ao risco de recaída da doença (Grimwade *et al.*, 1998; Mrozek. *et al.*, 2000; Slovak *et al.*, 2000).

(2) LMA com displasia de múltiplas linhagens;

Neste grupo, os pacientes apresentam uma historia prévia de uma SMD⁸ ou uma doença mieloproliferativa nos últimos 6 meses. Este grupo é caracterizado por anomalias também encontradas na SMD, tendo a sua incidência aumentada com o aumento da idade e uma média de idade é de 70 anos. As anormalidades citogenéticas incluem -7/del(7q), -5/del(5q), +8, +9, +11, del(11q), del(12p), -18, +19, del(20q) e +21, porém menos freqüente, pode-se encontrar t(2;11), t(1;7), t(3;3)(q21;q26) e a inv(3)(q21q26). Este grupo responde de forma pobre a quimioterapia citotóxica e compreende 15% dos casos de pacientes jovens.

(3) LMA e SMD decorrentes de terapias

Este grupo pode ser dividido ainda em dois subgrupos dependendo da terapia que levou a hemopatia maligna:

(3.1) LMA relacionada à terapia com agentes alquilantes

Este tipo de terapia pode levar a danos no DNA, causando uma leucemia de morfologia de leucemia secundária e, geneticamente similar a LMA de múltiplas linhagens. O pico de incidência é entre 4 e 7 anos pós-exposição. Este grupo demonstra uma alta incidência de anormalidades que envolvem os cromossomos 5 e 7 e, tem um resultado clínico ruim dentro do grupo.

⁸ SMD: Síndrome Mielodisplásica é um grupo de doenças hematopoiéticas caracterizada pela proliferação clonal das células da medula óssea caracterizada por citopenias, displasias e hematopoiese deficiente.

(3.2) LMA relacionada à terapia com inibidores de topoisomerase II

Este tipo de terapia está associado com anomalias, envolvendo as regiões 11q23 ou 21q22 e outras anomalias encontradas em pacientes que não receberam quimioterapia previamente como, a $inv(16)(p13q22)$ e a $t(15;17)(q22;q12)$. O período de latência entre o início do tratamento e o começo da leucemia é pequeno, variando de 6 meses a 5 anos.

(4) LMA não categorizada

Neste grupo, estão aqueles casos que não satisfizeram a nenhum dos três grupos anteriores, como por exemplo, a eritroleucemia⁹, a LMA com diferenciação mínima (subtipo morfológico FAB M0), a leucemia megacarioblástica aguda (LMA-M7), assim como a pan-mielose¹⁰ aguda com mielofibrose.

⁹ Eritroleucemia: É um tipo raro de leucemia mielóide aguda caracterizada pela proliferação de elementos eritropoiéticos na medula óssea.

¹⁰ Pan-mielose: Proliferação de três componentes da medula óssea, sobretudo das células da série megacariocítica

Tabela 3 - Comparação da classificação FAB e WHO da LMA

Classificação Francesa-Americana-Britânica (FAB) da LMA	Classificação da Organização mundial de Saúde (WHO) para a LMA
M0 - LMA sem diferenciação	LMA com anormalidades genéticas recorrentes - LMA com t(8;21) - LMA com eosinófilos anormais na medula óssea e inv(16) ou t(16;16) - Leucemia promielocítica aguda (LPA) com t(15;17) e variantes - LMA com anormalidades da 11q23
M1 - LMA minimamente diferenciada	LMA com displasia de múltiplas linhagens - Seguida de Síndrome Mielodisplásica (SMD) - Sem antecedente de SMD
M2 - LMA com diferenciação granulocítica	LMA e SMD associadas a tratamento - Associada a agentes alquilantes/radiação - Associada a inibidores de topoisomerase-II
M3 - Leucemia promielocítica aguda	LMA não categorizada nos itens anteriores
M4 - Leucemia mielomonocítica aguda	
M5 - Leucemia monocítica aguda	
M6 - Eritroleucemia aguda	
M7 - Leucemia megacarioblástica aguda	

M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7 – Subtipos morfológicos FAB, t-translocação, LMA-leucemia mielóide aguda, q =braço longo do cromossomo. Fonte: **Cucuianu, 2005**

5. Prognóstico de pacientes com LMA

O prognóstico das crianças com LMA melhorou discretamente nos últimos 20 anos. Atualmente, a sobrevida livre de recidiva em 5 anos pode chegar a quase 40% para o conjunto dos pacientes (Head, 2004b). Nos dias de hoje, o resultado da análise citogenética, realizada no diagnóstico, é o mais importante fator prognóstico. Ou seja, as estratificações de risco nos diversos protocolos de tratamento de LMA dependem praticamente desses resultados (Mrozek *et al.*, 2000).

Um prognóstico mais favorável parece estar relacionado com algumas das anomalias cromossômicas da LMA, tais como a t(8;21) sem a deleção do braço q do

cromossomo 9 ou sem anomalias citogenéticas adicionais, a t(15;17) associada ou não a outras anormalidades cromossômicas e a inv(16)/t(16;16)/del(16q). Os pacientes apresentando anomalias numéricas, tais como, trissomias dos cromossomos 8 e 6 e, nulissomia do cromossomo Y e anomalias estruturais, como, del(12p) e cariótipos normais são selecionados para protocolo de tratamento intermediário. Os pacientes que apresentam a monossomia do cromossomo 5 ou a del(5q), a monossomia do cromossomo 7 ou a del(7q), a inv(3q)/t(3;3), a t(6;9), del(9q), t(9;22), anormalidades da região 11q23 e cariótipos complexos são selecionados para protocolo de alto risco. Muitas das alterações encontradas na LMA apresentam um prognóstico desconhecido. Alguns pacientes que apresentam mau prognóstico são, em vários protocolos, candidatos à terapia com transplante alôgenico das células progenitoras hematopoiéticas, após a obtenção da primeira remissão completa, como é o caso dos pacientes que apresentam t(9;22)(q34;q11) e dos pacientes com as anomalias envolvendo a região 11q23 (Dewald *et al.*, 2002).

Em um estudo recente, cerca de 45% das LMA demonstraram cariótipo normal pela análise da citogenética convencional (Klaus *et al.*, 2004), sendo necessário então, estudos moleculares para detectar rearranjos ocultos (invisíveis ao nível de cromossomo por causa do tamanho dos rearranjos que pode variar de 1 a 2 megabases) ou aberrações moleculares, como por exemplo, mutações em ponto que não podem ser detectadas por análise de citogenética convencional (Klaus *et al.*, 2004; Cuneo *et al.*, 2002; Caligiuri *et al.*, 1998; Gamedinger *et al.*, 2003; Klaus *et al.*, 2003; Osato *et al.*, 1999; Yamamoto. *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 1996).

Análises recentes por hibridização fluorescente (FISH) e por reação em cadeia da polimerase (PCR) em LMA com cariótipo normal detectaram aberrações genéticas. A ocorrência dessas translocações ocultas em LMA pôde ser mostrada

nos casos de LMA M1 e M2 com os cromossomos 8 e 21 normais e com a fusão do gene AML1/ETO a nível molecular em aproximadamente 3% das LMA (Klaus *et al.*, 2004; Krauter *et al.*, 1998; Gamberdinger *et al.*, 2003; Rowe *et al.*, 2000). Este fenômeno de rearranjos submicroscópicos pode ser comparado com o mecanismo que foi primeiro observado em 3-9 % dos casos de LMC sem o cromossomo Philadelphia, mas com a fusão entre os genes BCR e ABL (Heim & Mitelman, 1995).

Um outro grupo de paciente com de LMA apresentando cariótipo normal pode ser caracterizado pela detecção de marcadores moleculares como, mutações em extensão no gene Flt3 (35-40%), mutações no domínio tirosina kinase do gene Flt3 (5-10%), duplicações parciais em seqüência do gene MLL (6-10%), mutações NRAS (6-10%) ou mutações de CEBPA-PU.1- e o gene AML1 (5-8%) (Mueller *et al.*, 2002; Pabst *et al.*, 2001; Preudhomme. *et al.*, 2002; Schnittger *et al.*, 2000; Schnittger *et al.*, 2002).

Devido à raridade da LMA na infância, os estudos multicêntricos são importantes para conhecer o perfil citogenético da LMA na infância. Um estudo multicêntrico sobre citogenética em LMA na infância mostrou que o diagnóstico citogenético da LMA na infância é fundamental para o prognóstico e diagnóstico da doença. Este trabalho, que foi descrito por Raimondi e colaboradores (1999) e o grupo de oncologistas pediátricos nos Estados Unidos (POG), reuniram 478 crianças para determinar o tipo e a freqüência das anormalidades cromossômicas presentes nestes pacientes. Neste trabalho, foi sugerido que mais estudos clínicos e citogenéticos devam ser realizados para os pacientes com t(10;11)(p13;q21), t(6;9)(p23;q34), t(3;5)(q25;q34), t(1;22)(p13;q13) e t(8;16)(p11;p13), assim como, para os pacientes, em outro estudo, que apresentaram t(7;11)(p15;p15), t(1;11)(q23;p15), inv(8)(p11,q13), t(12;22)(p13;q23), t(16;21)(p11;q22) e

t(3;21)(q26;q22), no intuito de determinar terapias mais específicas, pois os pacientes portadores destas anomalias apresentam um prognóstico desfavorável.

No Brasil, um estudo retrospectivo de Bittencourt e colaboradores (2003), observou uma melhora nas taxas de remissão e de sobrevida na última década nos pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - RS, graças à utilização de novo protocolo orientado pelo grupo cooperativo brasileiro de estudos de leucemia (CBEL) a partir de 1994, quando também foi iniciado um estudo citogenético desses pacientes que terminou no ano de 1999. Esse estudo citogenético mostrou uma melhora do prognóstico destes pacientes, mas, no entanto não foi determinante para adoção deste protocolo como padrão.

No trabalho retrospectivo de Viana e colaboradores (2003), realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, foi investigado a sobrevida da criança com LMA antes e depois da introdução do protocolo BFM-83, e também, foi analisado o impacto no prognóstico da idade, do sexo, do nível de nutrição, da contagem inicial de blastos e do uso do fármaco etoposide na fase de indução da remissão, tendo como resultado, um aumento significativo na sobrevida e na duração da primeira remissão com a introdução do protocolo germânico.

Em um outro trabalho brasileiro da região de Teresina no Piauí (Rego *et al.*, 2003), foi observado que entre os 345 pacientes revisados (230 com LLA e 115 com LMA), a LMA foi predominante em adultos (77%), com uma média de idade de 34 anos, ou seja, semelhante ao observado no sudeste do Brasil (Fagundes *et al.*, 1995; Pagnano *et al.*, 2000; Fagundes E.M. *et al.*, 2002), mas menor do que a média de idade mundial (52 anos)(Langmuir *et al.* 2001).

6. LMA do lactente

Entre as formas de leucemias *de novo* geralmente restritas a idade do grupo pediátrico, as leucemias com translocações, envolvendo a região 11q23 ocorrem, preferencialmente, em lactentes e crianças mais novas, compreendendo a maioria das leucemias da infância. As leucemias do lactente compreendem um grupo de leucemias caracterizado pelo diagnóstico de LLA ou LMA durante os primeiros 12 meses de vida, porém algumas instituições estendem esse período até os 18 meses. As leucemias do lactente são raras, acometendo menos de 5% de todas as leucemias da criança e a idade de incidência no grupo da LLA e da LMA é quase o mesmo (Ross, 2000; Hall, 2001).

Clinicamente, a leucemia do lactente é caracterizada por uma alta leucometria, a presença de hepatoesplenomegalia e envolvimento do sistema nervoso central (Emerenciano *et al*, 2007). Imunologicamente, esse tipo leucêmico apresenta um fenótipo de célula pró-B, sem a presença do marcador CD10 e, algumas vezes apresenta expressão aberrante para marcadores de diferenciação monocitóide. Esses dados podem indicar que a leucemia ocorre ainda em uma célula-tronco ainda não comprometida totalmente com a linhagem mielóide e linfóide. Nos casos de origem mielóide, a distribuição entre os subtipos é desigual, sendo os subtipos M4 e M5 os mais freqüentemente reportados, seguidos pelo subtipo M7 (Biondi *et al.*, 2000).

O rearranjo da região 11q23 pode estar presente em mais 85% dos casos de leucemia do lactente, dependendo das técnicas aplicadas na sua detecção (Meyer *et al*, 2006). Os lactentes com diagnóstico de leucemia aguda (LA) que apresentam o rearranjo da região 11q23 têm um pior prognóstico quando comparado com uma outra criança com LA sem esse rearranjo (Pui *et al*, 1999). Além disso, já foi

reportada que quanto menor a idade da criança, maior é a frequência do rearranjo envolvendo a região 11q23 que em mais de 95% dos casos, pode apresentar o gene *MLL* envolvido neste rearranjo (Balgobind *et al.*, 2009).

O gene *MLL* codifica uma proteína nuclear que age como um regulador positivo da expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário e o início da hematopoiese. Essa proteína *MLL*, que é um homólogo do regulador transcricional *Trithorax* em *Drosophila melanogaster*, é um efetivo regulador da transcrição dos genes *HOX*, os quais têm um papel chave na regulação do desenvolvimento hematopoiético (Yu *et al.*, 1998).

Até o momento, mais de 50 diferentes parceiros gênicos já foram descritos para o gene *MLL*, com diversas funções e variáveis domínios funcionais, dos quais 64 já foram clonados e analisados a nível molecular (Meyer *et al.*, 2009). Essa diversidade de possíveis rearranjos gênicos questiona se todos esses possíveis genes contribuem para uma função comum ou se cada um deles tem efeitos diferentes na leucemogênese. Embora esses diferentes parceiros gênicos apresentem diferentes aspectos, todos eles clivam a grande porção 3' do gene *MLL* e, se dimerizam com a parte restante. E independente, se o parceiro gênico é de localização nuclear ou citoplasmática, a proteína quimérica formada se localizará no núcleo, indicando que o seu potencial é, sobretudo determinado pela capacidade da porção *MLL* se ligar ao DNA (Yano *et al.*, 1997).

Aproximadamente a metade dos lactentes com LMA têm rearranjos no gene *MLL*, ou seja, rearranjos que afetam a banda cromossômica 11q23 (Gale *et al.*, 1997; Ford *et al.*, 1993). E outros estudos mais recentes, demonstram que a origem de muitas das leucemias agudas da infância ocorrem ainda no útero materno durante a hematopoiese fetal (Wiemels *et al.*, 1999; Greaves *et al.*, 1996; Gale *et al.*,

1997). O mecanismo da leucemogênese durante os primeiros meses de vida pode estar relacionado ao fato de que o crescimento do feto é mais sensível aos efeitos de substâncias potencialmente capazes de promover danos aos DNA durante o início da gravidez e/ou os primeiros semestres de vida.

Na LMA da infância, os rearranjos, envolvendo a região 11q23, mais, freqüentemente observados são, as $t(9;11)(p21;q23)$, em aproximadamente 50% dos casos, a $t(11;19)(q23;p13.1)$, $t(11;19)(q23;p13.3)$, $t(6;11)(q27;q23)$ e a $t(10;11)(p13;q23)$. Outras aberrações que envolvem a região 11q23, que já foram vistas em lactentes, são, $t(1;11)(q21;q23)$ e $t(11;17)(q23;q21)$. Outras anormalidades citogenéticas também já foram descritas em lactentes, como a $t(9;19)(p11;p13)$, envolvendo a região 11q23 de forma *masked* (Marques-Salles et al., 2009) e um novo tipo de $inv(16)$ *masked* em um caso com a $t(1;16)(p22;q22)$ (Silva et al., 2008) e também a $t(7;12)(q36;p13)$ que já reportada em 30% dos lactentes com menos de 20 meses (Tosi et al, 2001). Porém, duas translocações mais comuns em crianças mais velhas, a $t(8;21)(q22;q22)$ e a $t(15;17)(q21;q22)$ não foram ainda encontradas em lactentes. Isso sugere um mecanismo diferente de leucemogênese para os lactentes, diferentemente, em crianças acima de 2 anos de idade com LMA (Hall GW, 2001).

Não há relatos na literatura de um perfil citogenético da Leucemia Mielóide Aguda tanto do lactente quanto da criança brasileira, pois a LMA é uma doença pouco estudada em nosso país. Os estudos citogenéticos realizados no Brasil são quase que exclusivamente em adultos. Com isso, a comunidade científica tem incentivado os estudos do perfil cromossômicos da criança, visto que, muitas das alterações recorrentes necessitam ser estudada tanto pelo aspecto biológico como

pelo clínico, para que assim, possam-se elucidar mais genes envolvidos no aparecimento dessa categoria.

Com o intuito de fornecer mais subsídios citogenéticos e moleculares com indicação de possíveis genes envolvidos na gênese da leucemia, na busca de melhores condições de diagnóstico e tratamento, nos propomos a realizar um estudo do perfil cromossômico da Leucemia Mielóide Aguda da criança brasileira.

7. Objetivos

7.1. Objetivo geral

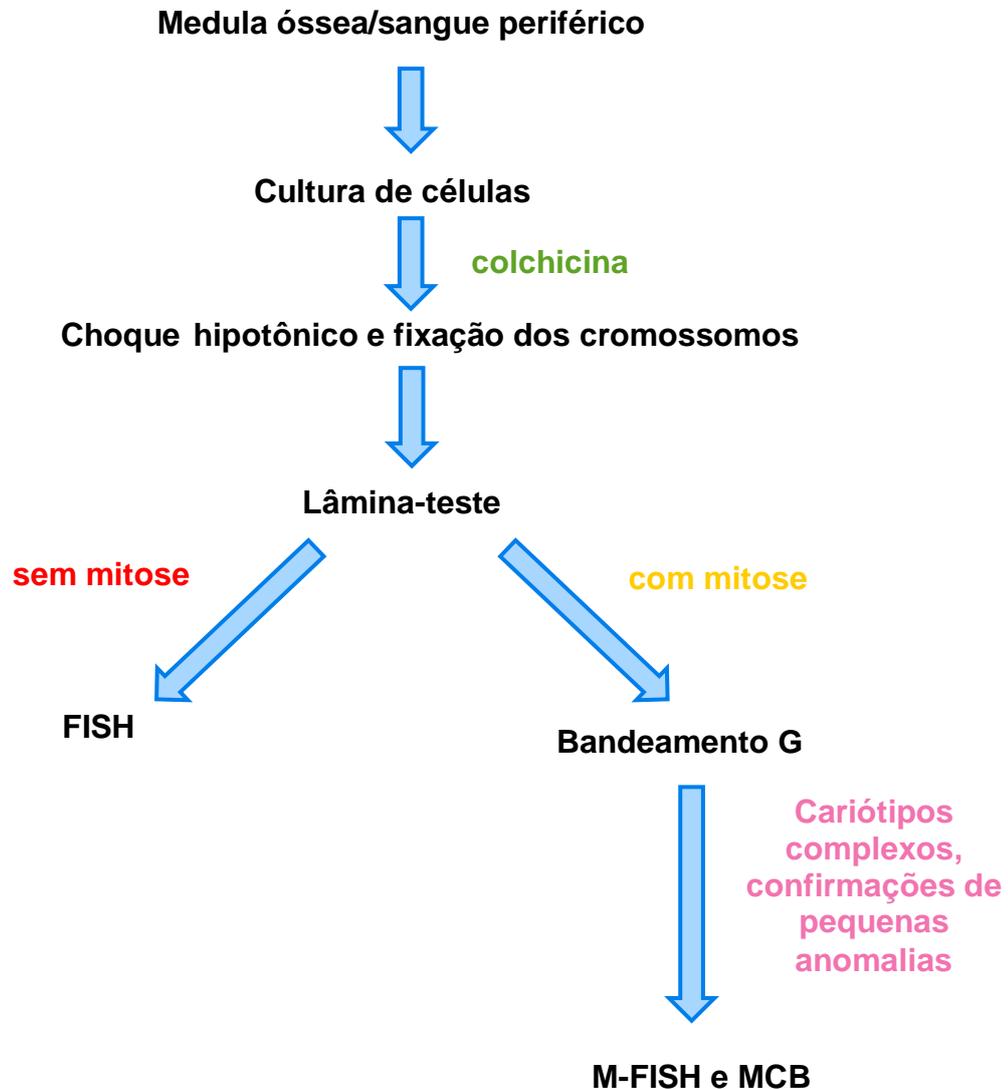
- Descrever o perfil cromossômico de pelo menos 50 pacientes pediátricos com LMA no Brasil, correlacionando-o com os aspectos clínicos e prognósticos.

7.2. Objetivos específicos

- a) Detectar a porcentagem de anomalias cromossômicas da LMA na infância;
- b) Caracterizar anomalias complexas ou anomalias variantes através de processos moleculares;

8. Material e Métodos

8.1. Desenho experimental:



8.2. Amostra

Entre abril de 2006 e abril de 2009, 56 crianças com idade de 0-18 anos de idade foram prospectivamente admitidas e diagnosticadas com Leucemia Mielóide Aguda nas seguintes instituições: Instituto Nacional do Câncer – INCA (RJ) (10), Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira – IPPMG (RJ) (7), Hospital Municipal da Lagoa (RJ) (4), Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE (RJ) (3),

Hospital dos Servidores do Estado (HSE-RJ) (5), Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira – IMIP (PE) (10), Serviço de Oncologia Pediátrica e Hemocentro de Pernambuco – HEMOPE (17).

Os diagnósticos clínicos, de citoquímica, de imunofenotipagem e de morfologia foram fornecidos pelos hematologistas das instituições de internação dos pacientes.

8.3. Estudo Cromossômico por Bandeamento G:

Os estudos cromossômicos foram realizados em aspirado de medula óssea e/ou sangue periférico dos 50 pacientes, utilizando técnicas de obtenção e identificação cromossômica.

Para obtenção de mitoses foi utilizada a técnica descrita por Testa J.R. *et al.* (1985) modificada. Foram cultivadas 5×10^6 células em 5ml de meio de cultura composto de RPMI 1640 (80%) e soro bovino fetal (20%) em tubos Falcon. As células foram incubadas durante 24 horas em estufa a 37°C. Após 22 - 23 horas, foi adicionada uma solução colchicina (Difco) numa concentração de 0,05µg/ml. Ao término do período de incubação seguia-se a retirada da cultura e preparo das lâminas. Para este procedimento foi utilizado o método descrito por Hungerford (1965) modificado.

Após o período de 24 horas de incubação as células foram centrifugadas e o precipitado obtido foi submetido a choque hipotônico utilizando uma solução de KCl a 0,07M em banho-maria a 37°C. Após 15 minutos as células foram fixadas três vezes em solução de Carnoy (3 metanol : 1 ácido acético glacial). Na primeira fixação, o material foi deixado à temperatura ambiente por 20 minutos. Na última fixação, o material foi ressuspenso em um pequeno volume de fixador para preparo

das lâminas pingando-se uma gota da suspensão em lâmina limpa e umedecida. Uma lâmina de cada tubo Falcon foi observada em microscopia para verificação dos resultados e então o material foi estocado na geladeira para posterior análise cromossômica.

Para análise cromossômica, a técnica de identificação cromossômica utilizada foi a descrita por Seabright (1971). As lâminas de 2 - 10 dias de preparo foram incubadas numa solução de tripsina 0,1% aquecida a 37°C em tempos que variaram de um segundo a um minuto. Em seguida as lâminas foram lavadas com soro fisiológico e coradas em solução de *Giemsa* (Merck) a 2% em tampão fosfato (pH 6,8), por 10 minutos.

O padrão cariotípico dos pacientes foi determinado pela análise de uma média de 20 células metafásicas em microscopia ótica. Um caso foi considerado anormal quando mais de três células apresentarem a mesma anomalia cromossômica. A presença de células normais concomitantes com as anormais foi usada como parâmetro para eliminar a possibilidade de uma anomalia cromossômica constitucional. Nos pacientes que apresentarem, na análise cromossômica, 100% de células anormais com anomalias cromossômicas não recorrentes e naqueles portadores de anomalias cromossômicas dos cromossomos X e Y, a eliminação de anomalias constitucionais foi determinada pela análise cariotípica do sangue periférico estimulado por fitohemaglutinina segundo Hungerford (1965), quando o paciente estiver em remissão da doença.

A documentação dos cariótipos foi realizada no computador por um programa analisador de imagem (Cytovision – Applied Imaging), utilizando-se para isso, uma câmera CCD acoplada ao microscópio Olympus BX51.

Os cromossomos foram identificados e classificados de acordo com os sistemas internacionais para nomenclatura de citogenética humana de 2005 (ISCN, 2005).

8.4. Estudo Cromossômico por Banda C

A técnica de Banda C evidencia regiões com DNA altamente concentrado, como é o caso dos centrômeros. Esta técnica foi empregada em apenas um caso do estudo para verificar a presença de um possível novo centrômero. Esta técnica consiste na hidrólise de lâminas com material previamente fixado com solução de Carnoy 3:1 em uma solução de HCl a 0,2M em temperatura ambiente por 30 minutos. Após, as lâminas foram lavadas em água e depois colocadas em uma solução de Bário (Ba) a uma temperatura de 38-40°C por 10 minutos. Em seguida, estas lâminas foram novamente lavadas em água corrente. E por fim, estas lâminas foram colocadas em uma solução de SSC por 2 horas à 65°C. Depois, estas lâminas foram novamente lavadas para que, posteriormente, elas fossem coradas em solução de Giemsa 2% por 15 minutos (Salamanca & Armandares, 1974).

8.5. Citogenética molecular

8.5.1. FISH e M-FISH

Para investigação de rearranjos moleculares, pela técnica FISH, foram utilizadas sondas comerciais de seqüência homóloga de DNA para *loci* específicos LSI AML1/ETO, CBF β /MUH11, PML/RAR α , o gene *MLL* (Vysis, Inc) e sondas específicas para translocações complexas não recorrentes. Além disso, nos casos que foi detectado a presença de cromossomos marcadores ou de rearranjos crípticos foram utilizados diferentes conjuntos de sondas para a técnica do M-FISH

(“multicolor FISH”) que consiste na utilização simultânea de pelo menos três diferentes ligantes ou fluorocromos para a marcação específica de DNA.

A técnica de FISH foi aplicada no restante do material das culturas, mantidas em fixador sob refrigeração. Depois de preparadas, as lâminas foram mantidas por dois dias à temperatura ambiente, pré-tratadas por imersão em 2X SSC, pH 7,0 a 37°C por 30 minutos e desidratadas em série de etanol 75%, 85% e 100% por dois minutos em cada álcool. Para a hibridação, 10µl desta mistura (7µl de tampão de hibridação; 2µl de água; 1µl de sonda) foram colocadas sobre as lâminas e cobertas com lamínulas de vidro de 25x25mm, sendo mantidas aquecidas em placa térmica a 43°C por dois minutos.

A seguir, as lamínulas foram imediatamente vedadas com borracha selante e incubadas em câmara úmida (50% formamida/2X SSC) a 37°C por 12-16 horas. Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas em três banhos de 50% de formamida/2X SSC pH 7,0 por 10 minutos cada, seguido da imersão em 2X SSC, pH 7,0 por 10 minutos e por último em 2X SSC 0,1% NP-40 (Vysis) ou IGEPAL (Sigma) por 5 minutos, a 45°C. Para análise, foi usado a contra coloração com DAPI II. A análise pelo FISH foi feita em microscópio de fluorescência Olympus BX51 munido de lâmpada HBO 100W e filtros apropriados. A documentação foi realizada através de uma câmera CCD e analisador de imagem (Cytovision da Applied Imaging).

8.5.2. MCB

Para a investigação de rearranjos crípticos¹¹ e a confirmação de cariótipos normais, a técnica de MCB foi realizada a partir de sondas que foram geradas pelo processo de microdissecção de regiões específicas dos cromossomos, como

¹¹ Crípticos: ocultos

descrito previamente (Lüdecke *et al*, 1989; Senger *et al*, 1990). Cada uma das sondas foi baseada em um número de fragmentos cromossômicos que variou de 15 a 20 fragmentos que foram retirados de cada cromossomo, intencionalmente, de forma imprecisa, para que eles se sobrepusessem. Com isso, foram geradas 169 sondas de regiões específicas que cobrem todo o genoma humano (Liehr & Claussen, 2002; Liehr *et al* 2002; Weise *et al.*, 2008).

O DNA isolado foi, então, amplificado pela técnica DOP-PCR (Telenius *et al*, 1992). A reação de PCR original foi feita em um volume de 50µl da amostra inicial. Desta amostra, um volume de 0.5µl foi re-amplificado e um volume de 50µl foi obtido no final. Depois esse processo foi repetido e, então, foi feita a marcação das sondas com 5 diferentes fluorocromos: *SpectrumOrange*, *Rhodamine 110*, *TexasRed*, *Cyanine 5* e *Cyanine 5.5*. Essa marcação também foi feita pela técnica de DOP-PCR. Com isso, de 2 a 10 bibliotecas de sondas foram criadas para cada cromossomo. Essas sondas quando sobrepostas criaram um padrão de pseudocores para cada um dos 24 cromossomos humanos. A técnica de MCB é baseada na mudança da taxa de intensidade de fluorescência ao longo dos cromossomos.

O processo de hibridização, a pós-lavagem e a detecção do sinal foram feitos de acordo com os experimentos realizados para a técnica de FISH. Os resultados da hibridização foram documentados em um microscópio de fluorescência da Zeiss Axioplan equipado com o sistema de análise de imagem Ikaros e Isis de imagem digital para FISH (MetaSystem), utilizando uma câmera XC77 CCD.

9. Resultados

Neste estudo, foram analisados 56 pacientes pediátricos (0-18 anos de idade) pelas técnicas de citogenética convencional e citogenética molecular. Somente 8 pacientes não apresentaram metáfases para a análise citogenética. (tabela 4)

Tabela 4 - Anormalidades citogenéticas encontradas no estudo.

Paciente	FAB	Idade	Citogenética convencional	FISH, M-FISH, MCB
1	LMA M6	4a	Sem mitose	NF
2	LMA M3	9a	46, XY [20]	NF
3	LMA M3	11a	46, XX, t(15;17)(q22;q12) [3]/ 46, XX [23]	NF
4	LMA M2	9m	Sem mitose	NF
5	LMA M5	2a 10m	46, XY, t(1;11)(q21;q23) [10]/ 46, XY [10]	NF
6	LMA M5	16a	46, XY [30]	NF
7	LMA M0	2a 8m	45, XY, -7, del(12)(p12) [18] / 46, XY [3]	FISH (+) para monossomia do cromossomo 7
8	LMA M2	8a	Sem mitose	NF
9	LMA M5	4a	46, XY [25]	NF
10	LMA M0	4a	46, XY, der(19)t(19;?)(?q13;?) [5]/ 46, XY [20]	NF
11	LMA M5	8m	46, XX, del(11)(q23) [18]/ 46, XX[8]	NF
12	LMA M5	1a 8m	46, XY, der(11)t(1;11) (q21;q23) [7]/ 46,XY [13]	NF
13	LMA M3	12a	46, XY, t(15;17)(q22;q12) [16]/ 46, XY [4]	FISH (+) para o rearranjo <i>PML/RARA</i>
14	LMA M0	13a	46, XX, del(7)(q32) [4]/ 46, XX [18]	NF
15	LMA M3	3a	46, XY t(15;17)(q22;q12) [12]/ 46, XY [8]	NF
16	LMA M3	6a	46,XY [22]	NF
17	LMA M0	17a	46, XY [20]	NF
18	LMA M3	16a	46, XY, t(15;17)(q22;q12), del(11)(q23) [2] / 46, XY, t(15;17)(q22;q12) [16] / 46, XY [4]	NF
19	LMA M2	13a	Sem mitose	NF
20	LMA M3	12a	Sem mitose	FISH (+) para o rearranjo <i>PML/RARA</i>

21	LMA M5	6a	46, XX[23]	NF
22	LMA M1	8a	46, XY, del(9)(q31), t(X;11)(p22;q22) [11] / 46, XY [9]	MCB para os cromossomos 9, 11 e X 46,XY,del(9)(q12q31),del (11)(q13orq14)[4]/46,XY, del(9)(q12q31)[2]/46,XY[7]
23	LMA M4	5a	46, XY, inv(16)(p13q22),+19, -22 [18] / 46, XY [4]	MCB para os cromossomos 16, 19 e 22 46,XY,inv(16)(p13q22),dic(22) (qter->p10::p10->qter) [12]
24	LMA M0	12a	46, XY[30]	M-FISH 46,XY
25	LMA M3	15a	46, XX, t(15;17)(q22;q12) [14] /46, XX [4]	NF
26	LMA M3	9a	46, XY, t(15;17)(q22;q12)[8]/ 46, XY [14]	NF
27	LMA M5	13a	44, XX, ?der(4), -5, -7, -10, ?dic(13), -15, +2 mars [8] /46, XX	M-FISH e MCB 44,XX,der(5)t(5;19)(q13.3;q1 2),t(6;18;17)(q24.3;q21;q23.2 (10)(7qter-> 7q11.23::12q22-> 12q21.2::10p14-> 10q21::12q12-> 12qter),r(12)::p13-> q12::), -15 ,del(19)(q12),der(20)t(20;21)(p11.2;q11.2), +der(21)t(12;21)(q22;q22)
28	LMA M0	11a	45, -Y, t(8;21)(q22;q22) [18]/ 46,XY [2]	45,X,-Y,t(8;21)
29	LMA M3	2a	46, XX, t(15;17)(q22;q12)[3]/ 46,XX [23]	NF
30	LMA M5	7m	46, XX, t(9;11)(p22;q23) [14]/ 46,XX [8]	NF
31	LMA M3	13a	46, XX, t(15;17)(q22;q12) [21] / 46,XX [1]	NF
32	LMA M1	4m	47, XY, der(7)t(7;?), del(12)(p13), +19 [18]/ 46, XY [1]	FISH (+) para o gene <i>MLL</i>
33	LMA M3	8a	46, XX [40]	FISH (+) para o rearranjo

				<i>PML/RARA</i> 46, XX
34	LMA M4	1a2m	45, XY, -7, del(12)(p)[5]/45, XY, -7[7] /46, XY[8]	NF
35	LMA M2	15a	45, X, -Y, t(8;21)(q22;q22) [17]/ 46, XY [7]	NF
36	LMA M2	13a	46, XX, t(8;21)(q22;q22), del(12)(p12)[20] / 46, XX [2]	NF
37	LMA M5	4a	46, XY, der(11), del(12)(q) [20]/ 46, XY [2]	NF
38	LMA M3	16a	46, XX, t(15;17)(q22;q12) [21] / 46, XX [4]	NF
39	LMA M2	8a	46, XX [30]	NF
40	LMA M3	13 a	48,XX,+2mar[4]/46,XX[18]	FISH (+) para o rearranjo <i>PML/RARA</i>
41	LMA M5	1a 9m	46, XX [20]	M-FISH 46, XX, del(7)(q22)/ 46, XX
42	LMA M3	4a	46,XY,t(15;17)[(q22;q12) [15]/46,XY[5]	FISH (+) para o rearranjo <i>PML/RARA</i>
43	LMA M7	2a	54, XX, +5, +6, +11, +12, +19, +20, +21, +21 [8] / 46, XX, del(13)(q) [4]/ 46, XX [20]	M-FISH 46,XX,del(13)(q13q21)
44	LMA M4	16a	46,XY[20]	M-FISH 46,XY,inv(3)(p22p26)
45	LMA M3	7a	Sem mitose	FISH (+) para o rearranjo <i>PML/RARA</i>
46	LMA M3	17a	Sem mitose	FISH (+) para o rearranjo <i>PML/RARA</i>
47	LMA M5	3a	50,XX,+der(1)del(1p),+8,+8,+21, +21	MCB and M-FISH 49~50,XX,+inv dup(1) (qter->q23~24::q23~24- >qter),+8,+8,+21,+21
48	LMA M5	7m	46, XY [20]	FISH (+) para o gene MLL e para o cromossomo 9 46,XYt(9;11)(p22;q23)
49	LMA M4Eo	10a	46,XX[20]	FISH (+) para o rearranjo <i>CBF/MYH11</i> e MCB inv(16)(p13q22)del(16)(q22)
50	LMA M3	16a	46, XY,t(15;17)(q22;q12)	NF

			[14]/46,XY[6]	
51	LMA M5	16a	50,XX,+3,+5,+17,+20	NF
52	LMA M2	8a	45,XY,t(8;21)(q22;q22),-22 [19]/46,XY[1]	NF
53	LMA M3	15a	Sem mitose	FISH (+) para o rearranjo <i>PML/RARA</i> (+)
54	LMA M3	17a	46,XX,t(15;17)(q22;q12) [10]/ 46,XX,t(15;17)(q22;q12), del(11)(q23)[8]/ 46,XX[2]	NF
55	LMA M7	5m	46,XX,der(19),t(11;19)(q23;q13) [23]/46,XX[2]	NF
56	LMA M2	3a	Hiperdiploidia >50 cromossomos	M-FISH 52, XX,+4 [6]/ +4[4]/ +6 [3]/ +8[4]/+10 [2]/+15 [3]/ +19[7]/ -20[3]/ +21[8]/ +21[4]/ +22 [3] [cp9]

t- translocação, q- braço longo do cromossomo, p-braço curto do cromossomo, der- cromossomo derivativo, del-deleção, inv- inversão, LMA – leucemia mieloide aguda, Mo, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 – subtipos morfológicos FAB, a-anos, m-meses, *PML/RARA*- *Promyelocytic Leukemia Gene/ Retinoic Acid Receptor Alpha Gene*, NF- não feito, *MLL* - *Mixed Lineage Leukemia gene*

9.1. Subtipos morfológicos (FAB) encontrados no estudo

Todos os subtipos morfológicos FAB puderam ser observados neste estudo, dentre os 8 subtipos FAB, o subtipo M0 foi encontrado em 6 casos, o subtipo M1 foi encontrado em apenas 2 casos, o subtipo M2 em 8 casos. Já o subtipo M3 foi o mais freqüente neste estudo, sendo encontrado em 21 casos, o subtipo M4 foi encontrado em apenas 4 casos, sendo dois deles com a presença de eosinófilos e o subtipo M5 em 12 casos. Enquanto que o subtipo M6 foi observado em 1 caso apenas e, o subtipo M7 foi encontrado 2 casos (figura 4).

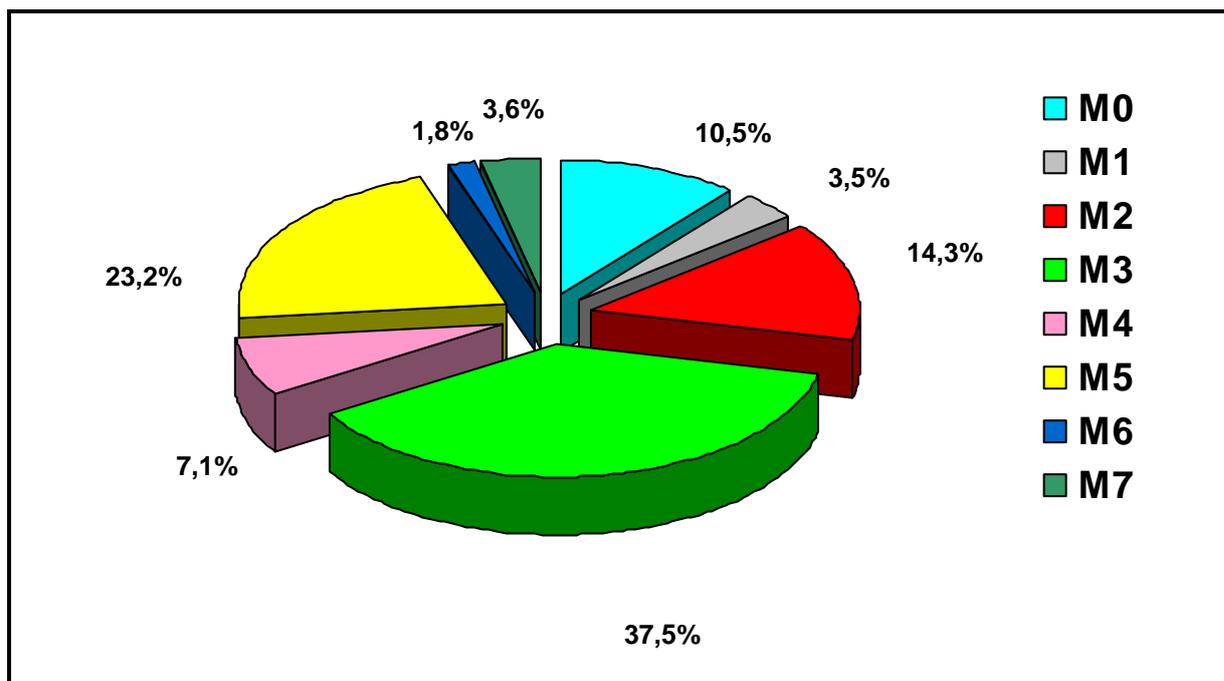


Figura 4 – Frequência de cada um dos subtipos morfológicos FAB. M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7 – Subtipos morfológicos FAB da LMA, de acordo com o grau de diferenciação do precursor mielóide acometido.

Quase todos os subtipos FAB apresentaram uma correlação entre as idades dos pacientes, sendo mais freqüentes ou menos freqüentes em uma determinada faixa etária. Três subtipos FAB foram mais freqüentemente observados em crianças com idade igual ou maior que 8 anos: os subtipos M3 (75%), M2 (75%) e M0 (66,7%). Enquanto que, os subtipos mais freqüentes em crianças menores que 8 anos de idade foram: subtipos M5 (77%), M6 (100%) e M7 (100%). No entanto, os subtipos M4 e M1 não apresentaram nenhuma correlação com as idades dos pacientes, sendo encontrados em igual freqüência em ambas as faixas etárias citadas acima.

9.1.1. Associação entre a taxa de remissão e os subtipos FAB

A taxa de remissão dos subtipos FAB variou bastante. O subtipo M7 (2) não apresentou nenhum dos pacientes em remissão, todos eles foram a óbito (2). Já os subtipos M2 (6), M4 (4) e M6 (1) apresentaram 100% de remissão da doença. Os

subtipos M1(2) e M3 (15) apresentaram uma taxa de remissão que não foi maior que 50% (1) (9). E o subtipo M5 (13) apresentou uma taxa de remissão de 75% (8).

9.2. Padrão cariotípico por bandeamento G

Neste presente estudo de 56 pacientes, 48 apresentaram índice mitótico adequado para a análise citogenética convencional. Em 8 pacientes, não foi possível a realização da análise pela citogenética convencional devido à ausência de metáfases e/ou ao pobre índice mitótico (14,3%) (Figura 5). A análise citogenética dos 48 pacientes, pela citogenética convencional, mostrou: 12 (25%) pacientes com cariótipos normais e 36 pacientes apresentaram aberrações cromossômicas (75%). Dos 36 pacientes com cariótipos anormais, 24 (66,7%) apresentaram anormalidades recorrentes e 12 (33,3%) apresentaram anormalidades não-recorrentes e raras.

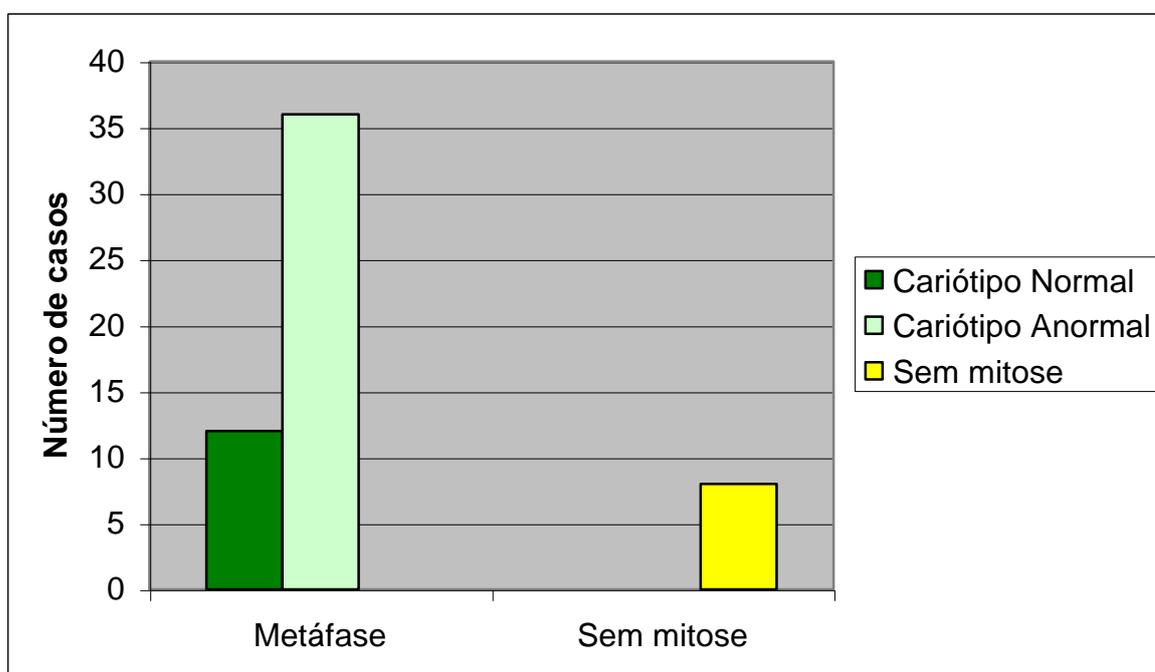


Figura 5 – Comparação do número de casos que apresentaram e não apresentaram as células estudadas com mitoses.

Cariótipo normal - não apresentou anormalidades citogenéticas, cariótipo anormal apresentou anormalidades citogenéticas. Metáfases – casos que apresentaram células com índice mitótico razoável para o estudo. Sem mitose – casos que não apresentaram células em processo de divisão mitótica.

9.2.1. Número cromossômico

A pseudodiploidia foi encontrada em 25 pacientes, representando 69,4% dos casos anormais. Seis casos foram hipodiplóides (16,7%), 5 com 45 cromossomos e 1 com 44 cromossomos. A hipodiploidia foi resultado da perda do cromossomo sexual Y (n=2), da monossomia do cromossomo 7 (n=2), da monossomia do cromossomo 15, associada a outras anomalias (n=1) e da monossomia do cromossomo 22 (n=1). A hiperdiploidia, apesar de rara, foi encontrada em 5 casos, representando 13,9% (Figura 6). Um caso apresentou o número cromossômico igual a 48, dois apresentaram 50 cromossomos e um caso apresentou 52 cromossomos.

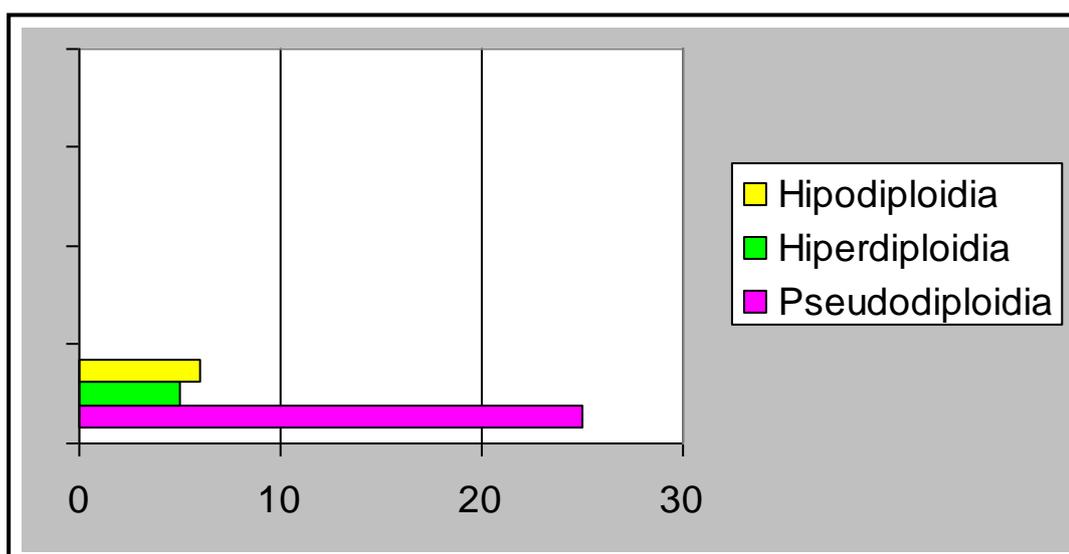


Figura 6 - Frequência do número cromossômico modal.

Hipodiploidia – cariótipo com menos de 46 cromossomos. Hiperdiploidia – cariótipo com mais de 46 cromossomos. Pseudodiploidia – cariótipos com 46 cromossomos, mas citogeneticamente anormais.

9.2.2. Anormalidades recorrentes

As anormalidades recorrentes encontradas neste estudo foram $t(8;21)(q22;q22)$, a $t(15;17)(q22;q12)$, a $inv(16)(p13;q22)$, as anormalidades envolvendo a região 11q23 e as anormalidades envolvendo os cromossomos 5 e 7. A $t(8;21)(q22;q22)$ foi encontrada em 4 pacientes. Três desses pacientes apresentaram 45 cromossomos e 1 paciente apresentou 46 cromossomos. Essa

translocação não foi encontrada como única anormalidade estrutural em nenhum dos 4 pacientes, mas sim associada a outras anormalidades adicionais. Desses 3 pacientes com 45 cromossomos, 2 apresentaram 45 cromossomos devido a perda do cromossomo sexual Y e 1 devido a monossomia do cromossomo 22. O paciente que apresentou cariótipo pseudodiplóide, também apresentou del(12)(p12) (anomalia não-específica descrita posteriormente), associada a t(8;21).

A t(15;17)(q22;q12) foi observada em 11 pacientes, sendo a translocação mais freqüente neste estudo. O número cromossômico encontrado foi 46 em todos os 11 pacientes. A única anormalidade adicional observada foi del(11)(q23) em 2 pacientes. Não foram observadas anormalidades numéricas adicionais neste subgrupo citogenético.

A inv(16)(p13q22) foi observada em 1 caso, apresentando como anormalidades adicionais: a trissomia do cromossomo 19 e da monossomia do cromossomo 22.

As anormalidades que envolvem a região 11q23 foram encontradas em 5 pacientes. Além disso, elas foram divididas em grupos: t(9;11)(p22;q23), t(1;11)(q21;q23), del(11)(q23) e a t(11;19)(q23;q13). A t(9;11)(p22;q23) foi observada em 1 paciente, apresentando-se como única anormalidade citogenética. Já a t(1;11)(q21;q23) foi observada em 2 pacientes também como única anormalidade citogenética. A del(11)(q23) foi observada em 2 pacientes. Sendo que em 1 paciente, esta anormalidade se apresentou como única anormalidade e em um outro caso esta anormalidade foi secundária a t(15;17)(q21;q22), mostrando-se num segundo clone de uma evolução cariotípica. Já a t(11;19)(q23;q13) foi observada em 2 casos, sem nenhuma anormalidade adicional. (tabela 5)

Outra aberração cromossômica envolvendo o cromossomo 11 também foi encontrada em 1 paciente. Este paciente apresentava a $t(X;11)(p22;q22)$, uma anormalidade cromossômica que não envolvia a região 11q23. Além disso, esta anormalidade estava associada a uma anomalia, considerada por alguns estudiosos como recorrente, a $del(9)(q31)$.

Tabela 5 – Anormalidades cromossômicas envolvendo a região 11q23

Anormalidades 11q23	Nº de casos
$t(9;11)(p22;q23)$	1
$t(1;11)(q21;q23)$	2
$t(11;19)(q23;p13)$	2
$del(11)(q23)$	2

t- translocação, Del- deleção, p- braço curto do cromossomo, q- braço longo do cromossomo

A monossomia do cromossomo 7 foi encontrada em 2 pacientes. Esta anormalidade citogenética estava associada a uma anormalidade adicional, $del(12)(p12)$, em 2 casos. Dois outros pacientes apresentaram aberrações cromossômicas envolvendo o cromossomo 7: 1 paciente apresentou uma $del(7)(q32)$ como única anormalidade citogenética e 1 paciente apresentou um derivativo do cromossomo 7 e, como anomalia adicional apresentava a trissomia do cromossomo 19 e também a $del(12)(p12)$ (Figura 7). Anormalidades envolvendo o cromossomo 5 foi observada em apenas 1 caso, porém esta anormalidade estava associada a outras anormalidade em um cariótipo complexo (Figura 7).

Apesar de ser a mais freqüente alteração numérica encontrada na LMA da infância, a trissomia do cromossomo 8 não foi observada neste estudo. E a trissomia do cromossomo 21 foi observada também em apenas 1 caso.

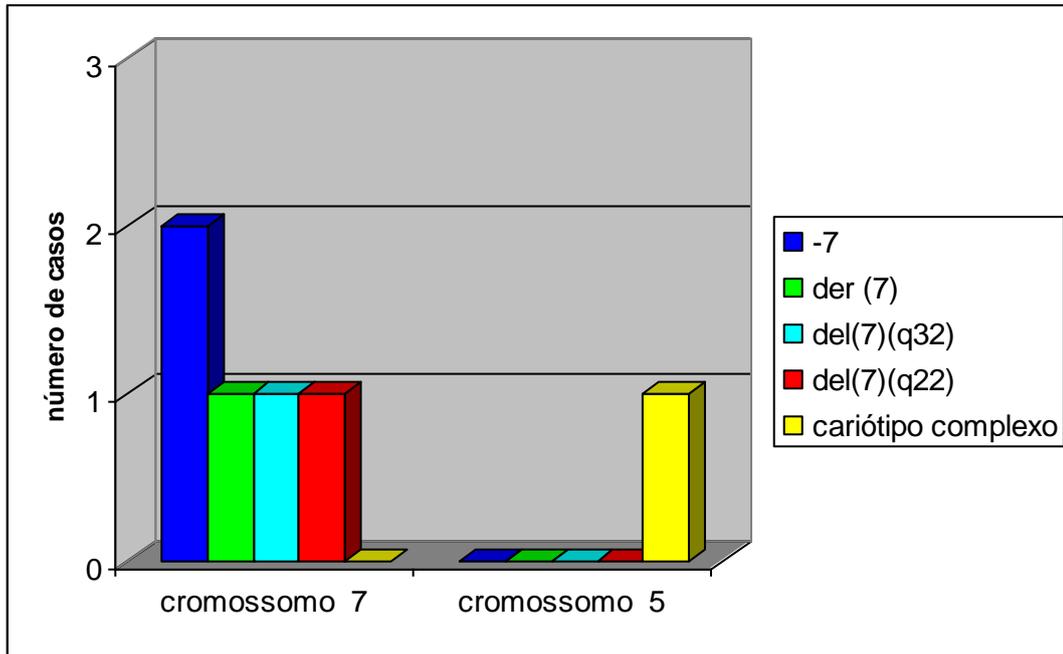


Figura 7- Anormalidades citogenéticas envolvendo os cromossomos 5 e 7.
Der – cromossomo derivativo, Del – deleção, q- braço longo do cromossomo, cariótipo complexo – apresenta mais de três anormalidades citogenéticas

Todas as anormalidades recorrentes encontradas neste estudo e suas respectivas freqüências, em número de casos, estão na figura abaixo:

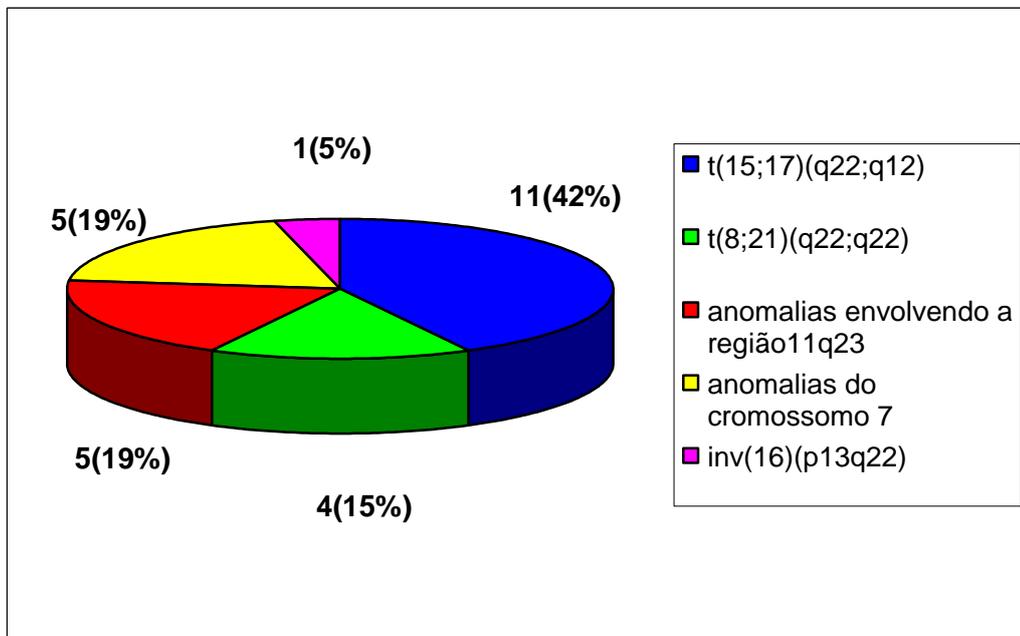


Figura 8- Anormalidades citogenéticas recorrentes.
t- translocação, q – braço longo do cromossomo, p – braço curto do cromossomo, inv - inversão

9.2.3. Anormalidades secundárias e não-específicas

A anomalia não-específica mais observada neste estudo foi uma alteração estrutural do tipo deleção. Diferentes deleções foram observadas em 10 pacientes, sendo que estas, se mostraram, na maioria dos casos, como anomalias adicionais. A del(12)(p12) foi a mais freqüente, sendo observada em 4 casos, porém esta anormalidade não foi encontrada como única alteração cromossômica e sim, como uma alteração cromossômica adicional em todos os casos. Em 2 casos, ela era adicional a monossomia do cromossomo 7 e em 1 caso, ela estava associada a um derivativo do cromossomo 7. E em 1 caso, ela estava associada com a anormalidade recorrente t(8;21)(q22;q22). A del(11)(q23) foi observada como única anormalidade em 1 caso. Em 2 casos, ela foi observada como uma alteração adicional a t(15;17)(q22;q12) num clone secundário. Além disso, 3 outros casos apresentaram deleções como alterações estruturais: 1 caso apresentou a del(7)(q32) como única anormalidade citogenética, 1 caso apresentou uma del(1)(p) e outro caso apresentou a del(13)(p13) como única anomalia citogenética. A del(9)(q31) foi observada em 1 caso, porém acompanhada de uma alteração adicional: t(X;11)(Figura 9).

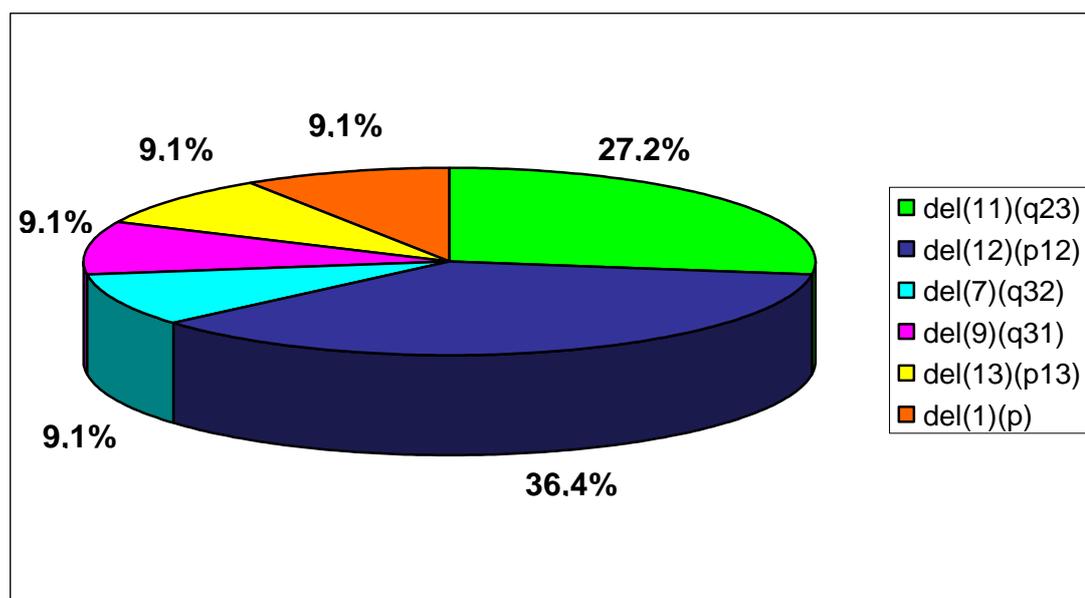


Figura 9 - Anormalidades citogenéticas não-recorrentes.
Del-deleção, q-braço longo do cromossomo, p-braço curto do cromossomo

Quatro anormalidades citogenéticas raras e ainda não-descritas foram observadas neste estudo. Foram elas: deleção do braço q do cromossomo 13, inversão do cromossomo 3, deleção do braço longo do cromossomo 1, além de tetrassomias do cromossomo 8 e 21 (tabela 6). Essas três últimas anormalidades citogenéticas foram encontradas em um único caso que apresentou o seguinte cariótipo pela citogenética convencional: 50,XX,+der(1)del(1p),+8,+8,+21,+21. Essas anormalidades citogenéticas raras corresponderam a cerca de 8% dos cariótipos anormais encontrados no estudo.

Tabela 6 – Anormalidades citogenéticas raras e ainda não-descritas.

Anormalidades raras	Número de casos
del(13)(q13;q21)	1
del(1)(q)	1
Tetrassomia do cromossomo 8 e do cromossomo 21	1
Inv(3)(p22p26)	1

Del- deleção, q- braço longo do cromossomo, tetrassomia – quatro cópias do mesmo cromossomo, inv – inversão, p- braço curto do cromossomo

9.3. Citogenética Molecular

9.3.1.FISH

Para aqueles casos em que não foi obtida metáfase e havia material com preparação cromossômica disponível foi realizada a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência. Entre as 8 amostras que não apresentaram índice mitótico, em apenas 4 foi possível realizar a técnica de FISH, devido a ausência de material de preparação cromossômica. Estes 4 pacientes eram do subtipo morfológico M3 e foi testado a presença do rearranjo gênico entre os genes *PML* e *RARA*. Todos os 4 pacientes mostraram a presença da fusão gênica *PML-RARA*. Resultados típicos estão mostrados na figura 10.

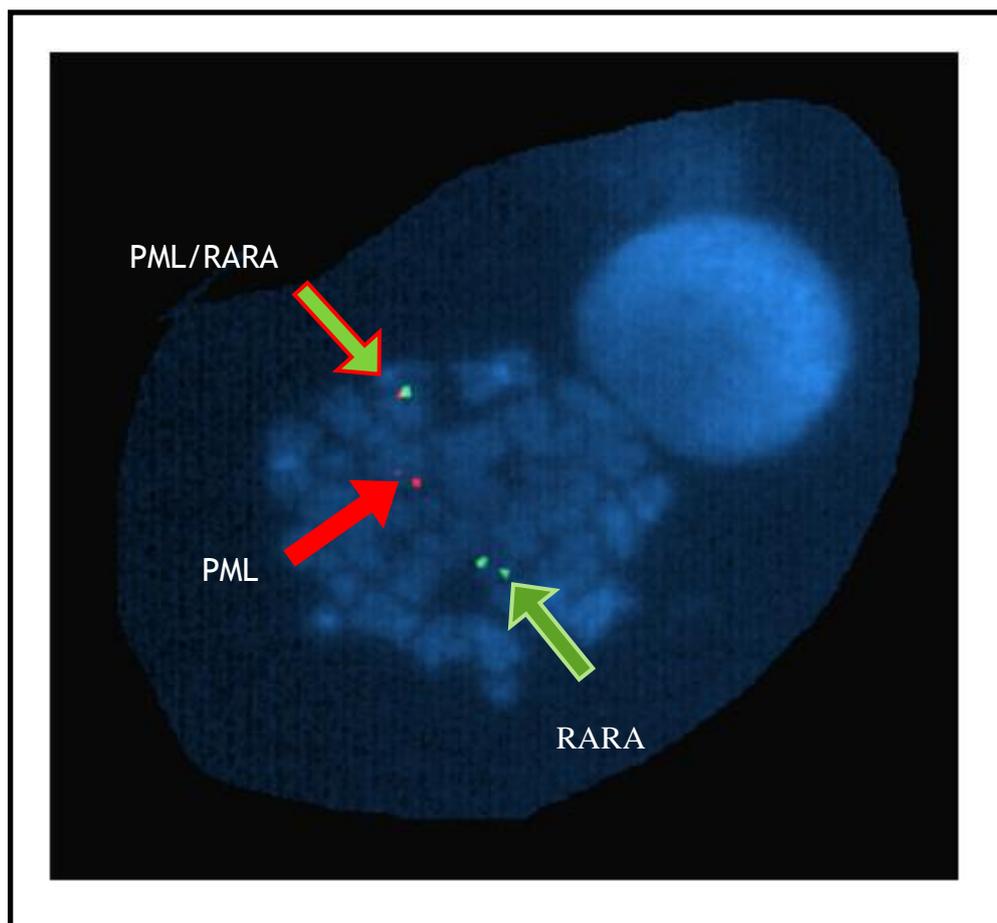


Figura 10 – Hibridização *in situ* por fluorescência ilustrando o rearranjo gênico *PML/RARA* em uma metáfase.

Sonda *Dual Color (Vysis)*: sinal verde – hibridização na região gênica q22 do cromossomo 15 (*PML*). Sinal vermelho- hibridização na região q12 do cromossomo 17 (*RARA*). Os dois sinais juntos demonstram o rearranjo *PML/RARA*.

9.3.2. MCB

Para os pacientes com cariótipos complexos, foi realizada a técnica de MCB (*Multicolor Banding Chromosome*). A tabela com dados está abaixo:

Tabela 7 – Anormalidades citogenéticas reveladas por Bandeamento G e por MCB

Paciente	Citogenética Convencional	MCB
22	46, XY, del(9)(q31), t(X;11)(p22;q22) [11]/ 46, XY [9]	46,XY, del(9)(q12q31),del(11)(q13or q14)[4]/ 46,XY, del(9)(q12q31)[2]/46,XY[7]
23	46,XY, inv(16)(p13q22), +19,-22 [18]/ 46, XY [4]	46, XY, inv(16)(p13q22), dic(22)(qter- >p10::p10->qter)
27	44, XX, ?der(4), -5, -7, - 10,?dic(13), -15, +2mars	44, XX, der(5)t(5;19)(q13.3q12), t(6;18;17)(q24.3;q21;q23.2), der(7)t(7;13)(p11.2;q120, der(10(7qter- >7q11.23::12q22->12q21.2::10p14- >10q21::12q12->12qter), r(12)(:p13- >q12::), -15, del(19)(q12), der(20)t(20;21)(p11.2;q11.2), +der(21)t(12;210(q22;q22)
41	46, XX, der(7)	46, XX, del(7)(q22)
43	54, XX, +5, +6, +11, +12, +19, +20, +21, +21 [8]/ 46, XX, del(3)(q)[4]	46, XX, del(13)(q13q21)
47	51, XX, +8, +8, +21, +21, +mar	49~50, XX, +inv dup(1)(qter- >q23~q24::q23~q24->qter), +8, +8, +21, +21
48	46, XY, der(11)	46, XY, t(9;11)(p22;q23)
56	Hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos	52, XX, +4 [6], +4[4], +6 [3], +8 [4], +10 [2], +15 [3], +19 [7], -20 [3], +21 [8], +21 [4], +22 [3] [cp9]

Del- deleção, t- translocação, q-braço longo do cromossomo, p – braço curto do cromossomo, inv- inversão, dic- cromossomo dicêntrico, mar -cromossomo marcador, der – cromossomo derivativo, invdup- inversão mais duplicação, cp- *composite karyotype* (composição de cariótipos), ter –terminal

A técnica de MCB foi empregada em 9 pacientes e, em 7 desses pacientes (77,7%), essa técnica conseguiu determinar as anormalidades citogenéticas presentes no cariótipo dos pacientes, anteriormente não determinado e os pontos de quebra exatos em cada cromossomo. Resultados típicos na figura 11.

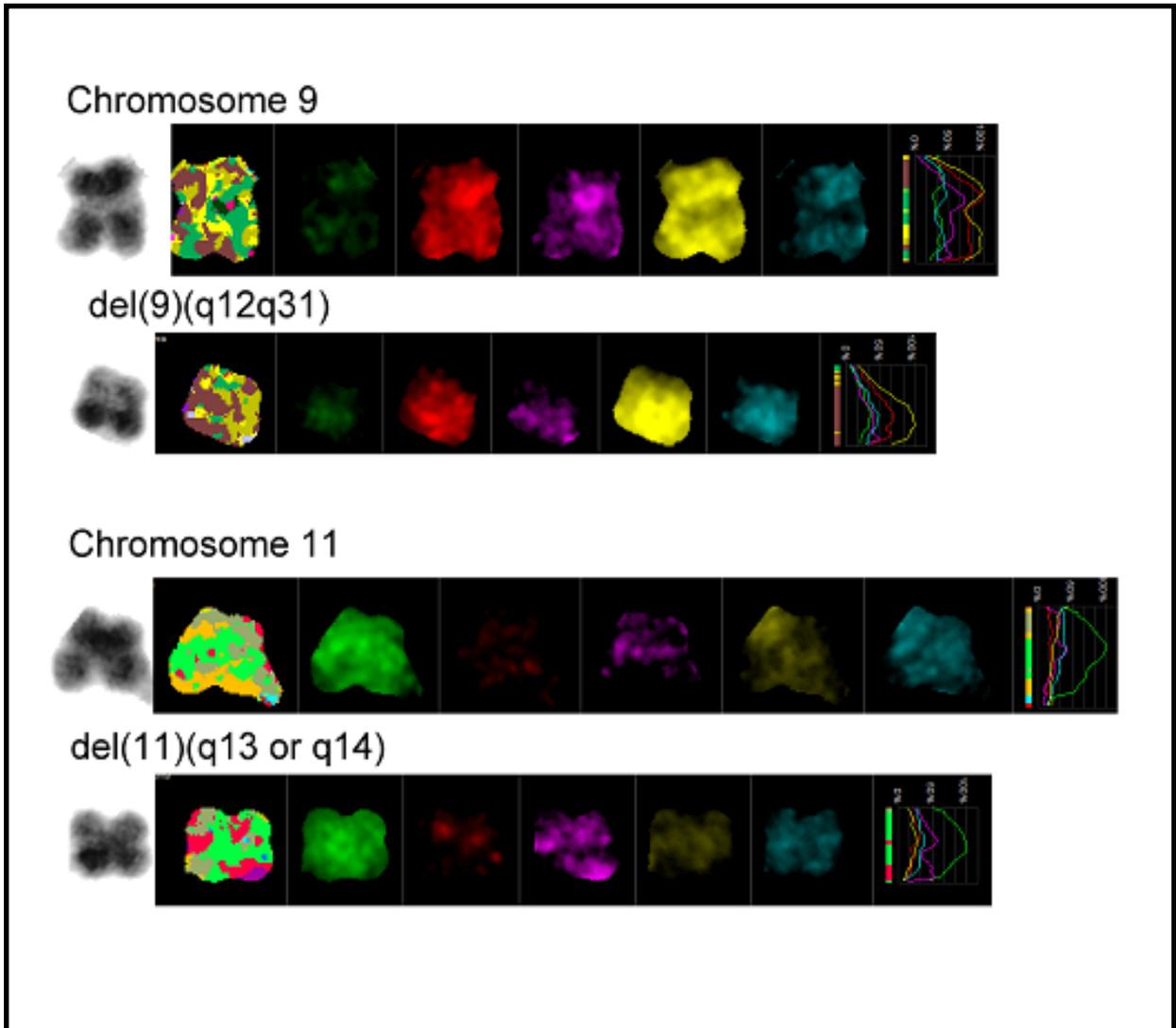


Figura 11 – Técnica de MCB para os cromossomos 9 e 11, mostrando as anomalias $del(9)(q21q31)$ e $del(11)(q13 \text{ or } q14)$

MCB utilizando cinco diferentes fluorocromos: *SpectrumOrange*, *Rhodamine 110*, *TexasRed*, *Cyanine 5* e *Cyanine 5.5*. del- deleção, q-braço longo do cromossomo, p-braço curto do cromossomo

As anormalidades encontradas foram: deleções, cromossomos dicêntricos, inversões associadas com duplicações e translocações. Somente em 2 pacientes, essa técnica não revelou diferenças entre o cariótipo determinado pela citogenética convencional e a citogenética molecular. Um cariótipo mostrou uma hiperdiploidia

tanto pela citogenética convencional quanto pela molecular, sem anormalidades estruturais adicionais. Anormalidades citogenéticas ainda não descritas e raras também foram detectadas: Invdup(1)(q) (figura 12 e 13), del(13) (q) (figura 14). Nas figuras 15 e 16, os padrões de M-FISH normais podem ser observados.

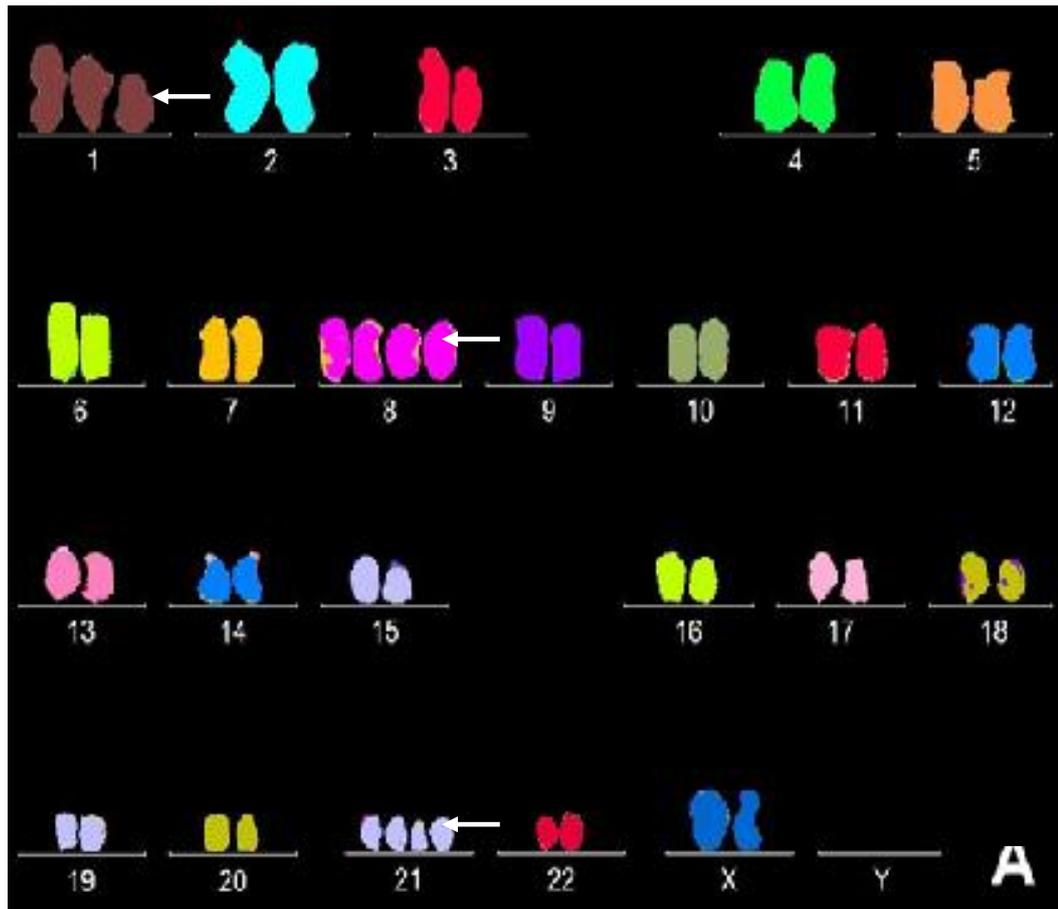


Figura 12 – Técnica de M-FISH, mostrando as anormalidades citogenéticas tetrassomia dos cromossomos 8 e 21 e a presença de um cromossomo 1 derivativo.

Sistema de cores gerado pelo software Isis para cada um dos cromossomos. der – cromossomo derivativo – cromossomo estruturalmente rearranjado, resultante de um rearranjo envolvendo dois ou mais cromossomos ou por múltiplas aberrações em um único cromossomo

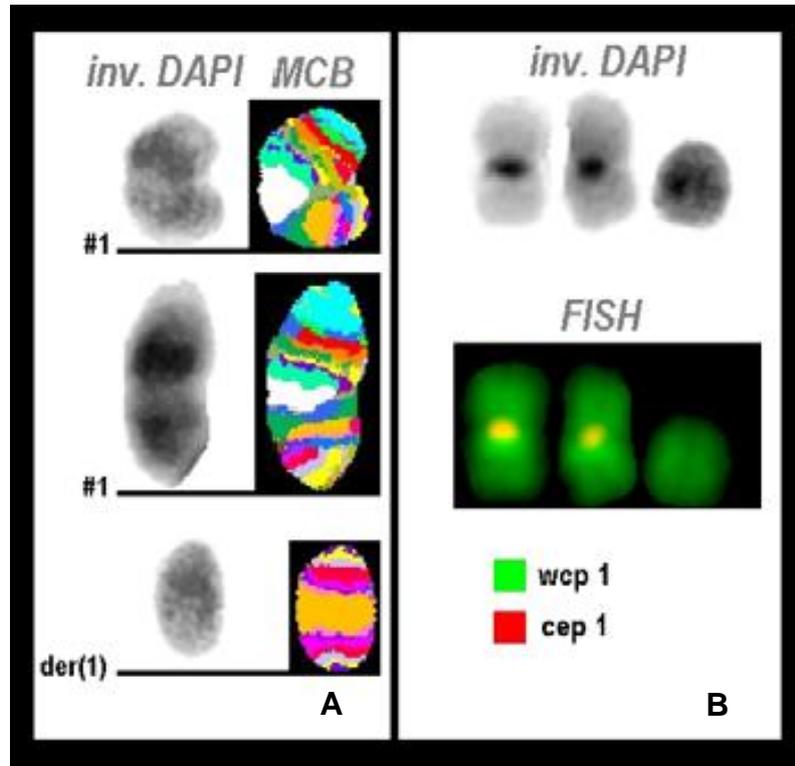


Figura 13 – (A) MCB para o derivativo do cromossomo 1, mostrando a invdup (1)(q). (B) FISH. Wcp- whole chromosome painting, cep- centromeric probe, DAPI - 4,6-Diamino-2-Fenilindol

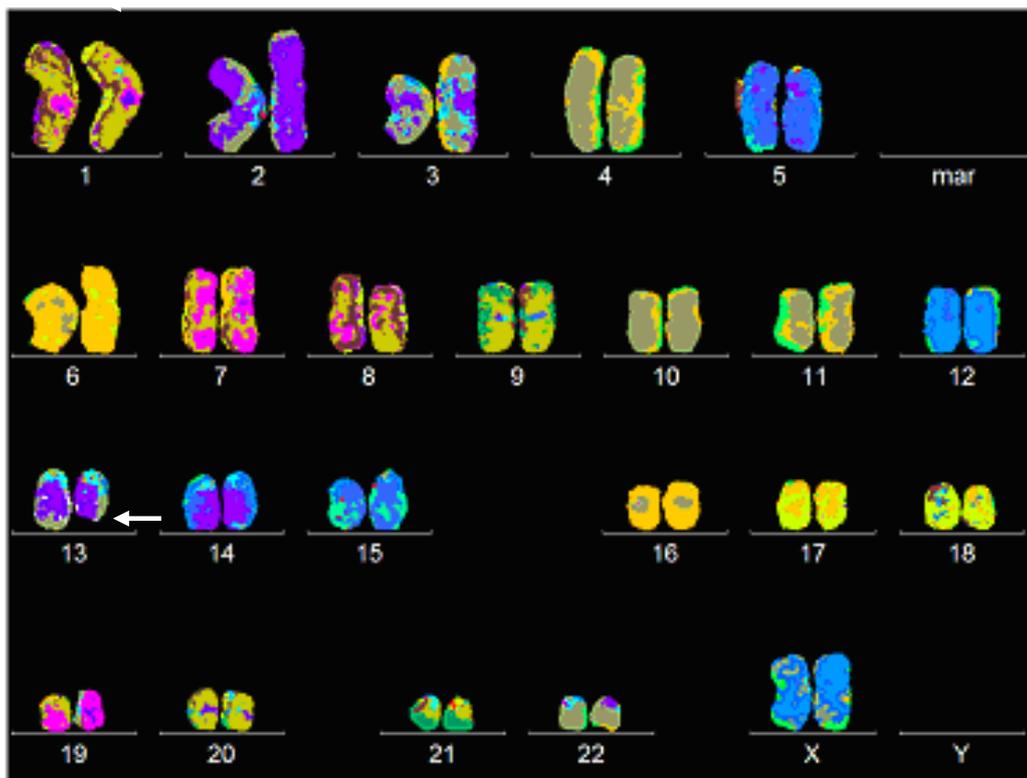


Figura 14 – Técnica de M-FISH, mostrando a anomalia citogenética del(13)(q13q21). Sistema de cores gerado pelo software Isis para cada um dos cromossomos. Del- deleção.

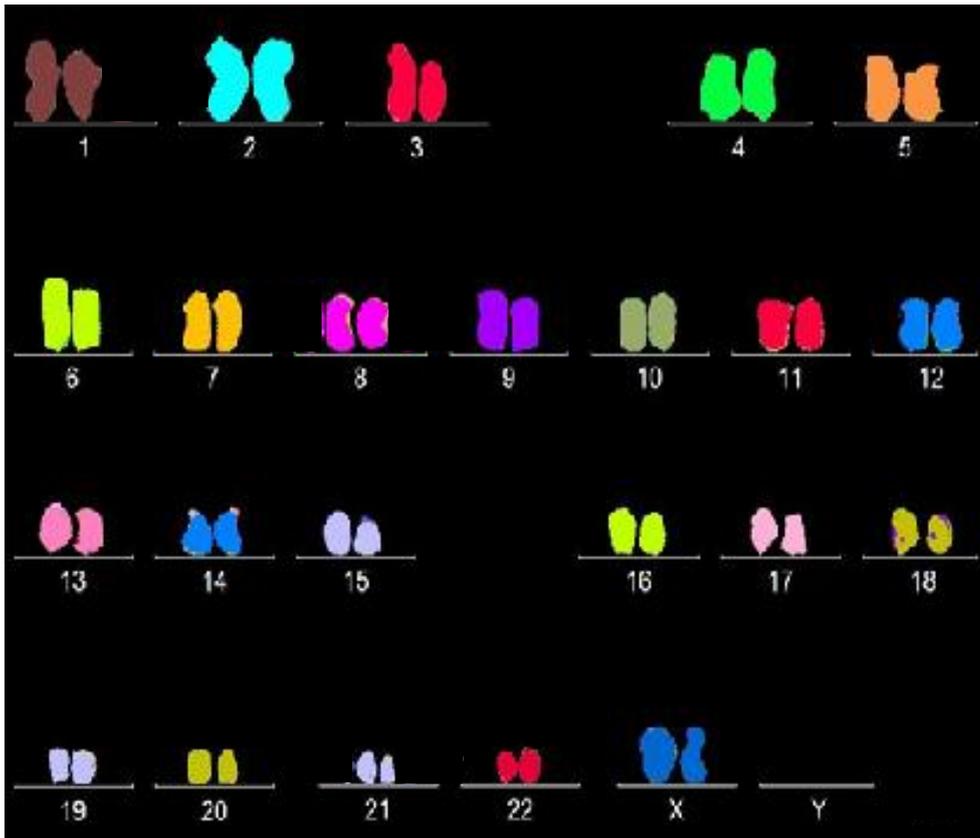


Figura 15- Padrão de cores gerado pelo software Isis para um cariótipo normal (46, XX).

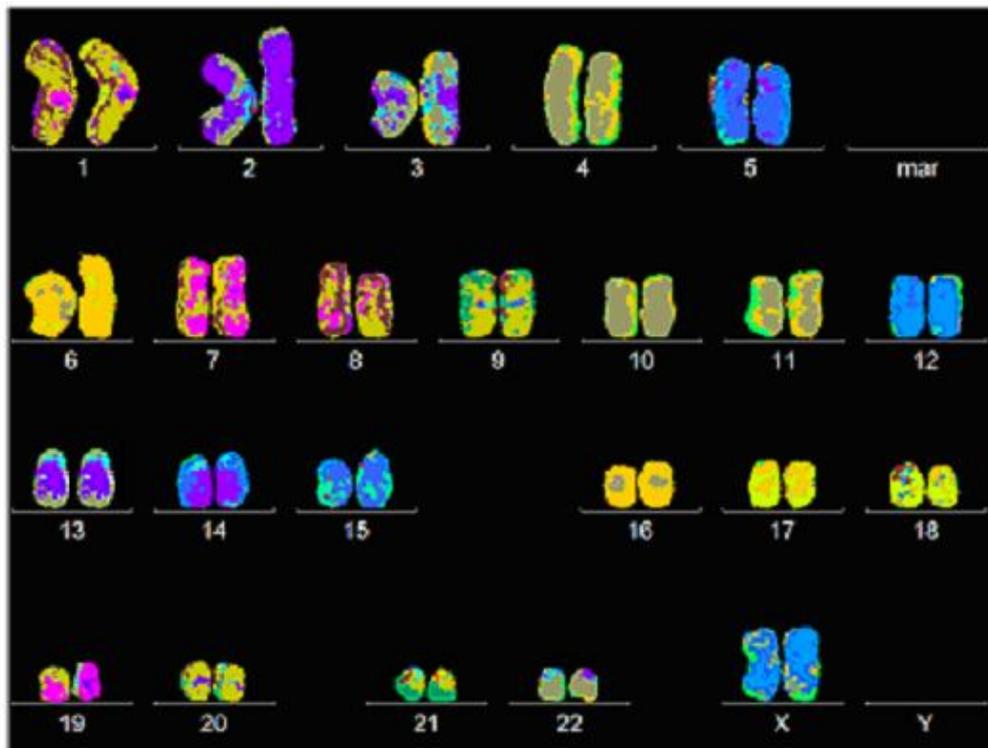


Figura 16- Outro padrão de cores gerado pelo software Isis para um cariótipo normal (46, XX)

Porém, em 4 casos foi realizada a técnica do MCB para confirmação do cariótipo em questão. Os dados estão na tabela abaixo:

Tabela 8- Casos que apresentaram cariótipo normal por bandeamento G e o posterior cariótipo analisado por MCB ou M-FISH.

Paciente	Citogenética Convencional	MCB
24	46, XY	46, XY
33	46, XX	46, XX
44	46, XY	46, XY, inv(3)(p22p26)
49	46, XX	46, XX, inv(16)(p13q22)del(16)(q22)

Inv- inversão, p – braço curto do cromossomo, q- braço longo do cromossomo, del- deleção

Entre os 4 pacientes, 2 mostraram cariótipo normal tanto pela citogenética convencional quanto por MCB. Mas em 2 pacientes que mostraram cariótipo normal pela citogenética convencional foram detectadas anormalidades citogenéticas pela técnica de MCB: 1 caso com inv(3)(p22q26)(Figura 17) e 1 caso com inv(16)(p13q22)del(16)(q22)(Figura 18).

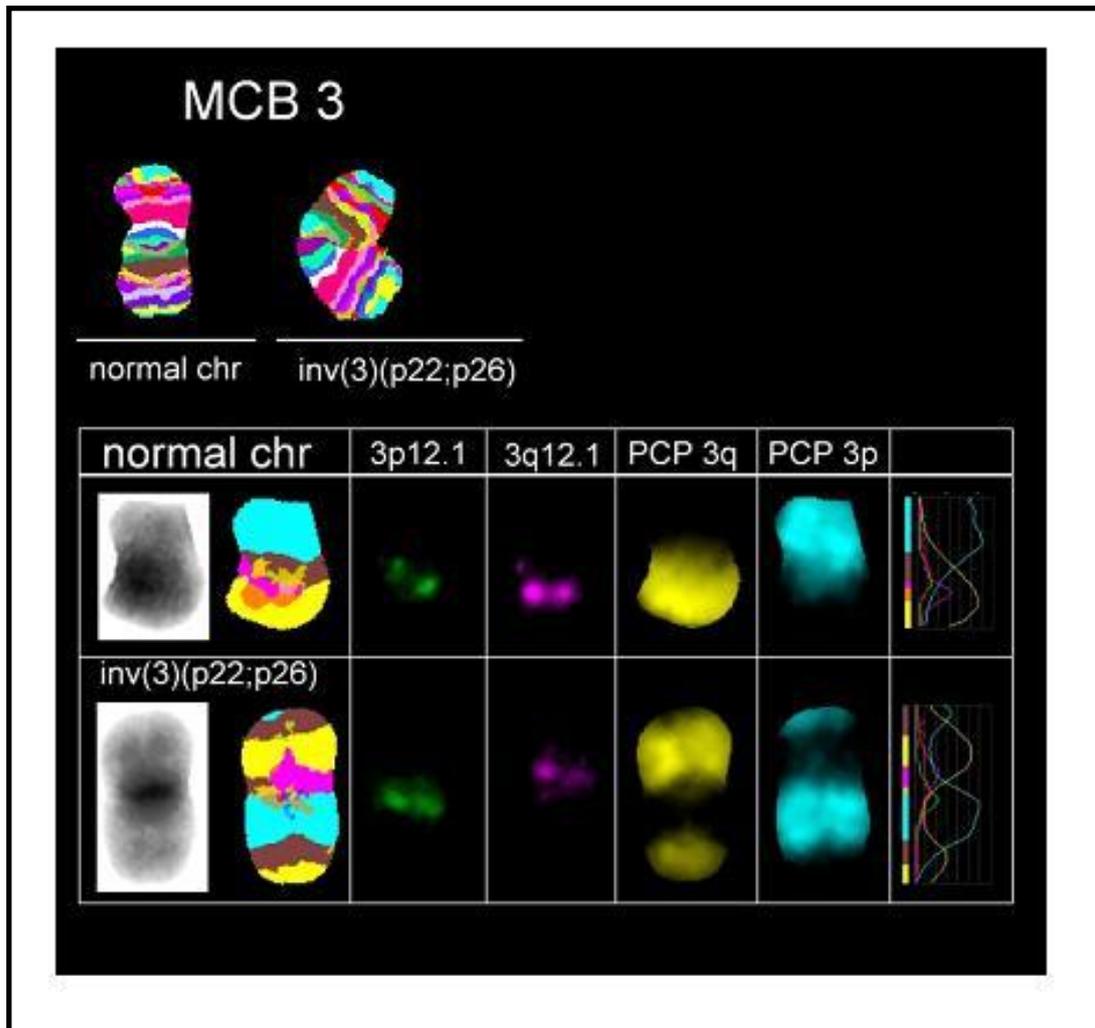


Figura 17- Técnica de MCB para o cromossomo 3, mostrando a anomalia citogenética inv(3)(p22;p26).

Inv – inversão, PCP – *partial chromosome painting*, Chr – cromossomo, p – braço cuto do cromossomo

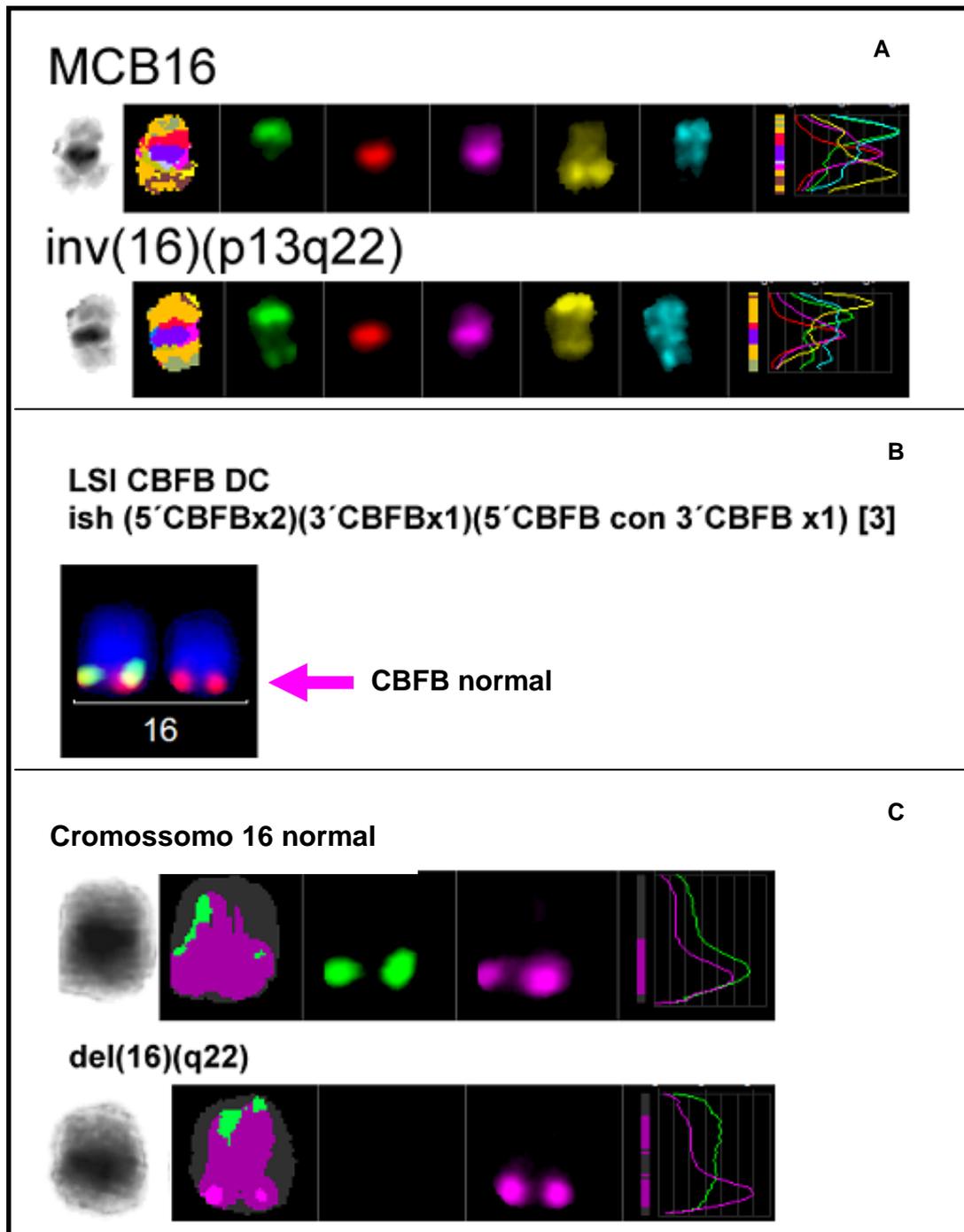


Figura 18 – Técnica de MCB e FISH para o cromossomo 16, mostrando anomalia citogenética $inv(16)(p13;q22)del(16)(q22)$. (A) MCB para o cromossomo 16, mostrando a $inv(16)$. (B) FISH para o gene CBF B. (C) MCB para o cromossomo 16, mostrando a $del(16)$. *Inv-* inversão, *CBFB-* core binding factor gene B, *del-* deleção

Com a utilização das técnicas de citogenética molecular foi possível então detectar um número maior de anormalidades citogenéticas no estudo. (tabelas 4 e 7)

Sendo assim, o perfil cariótipo da LMA da infância brasileira encontrado neste estudo, com as suas respectivas freqüências, está descrito na figura abaixo:

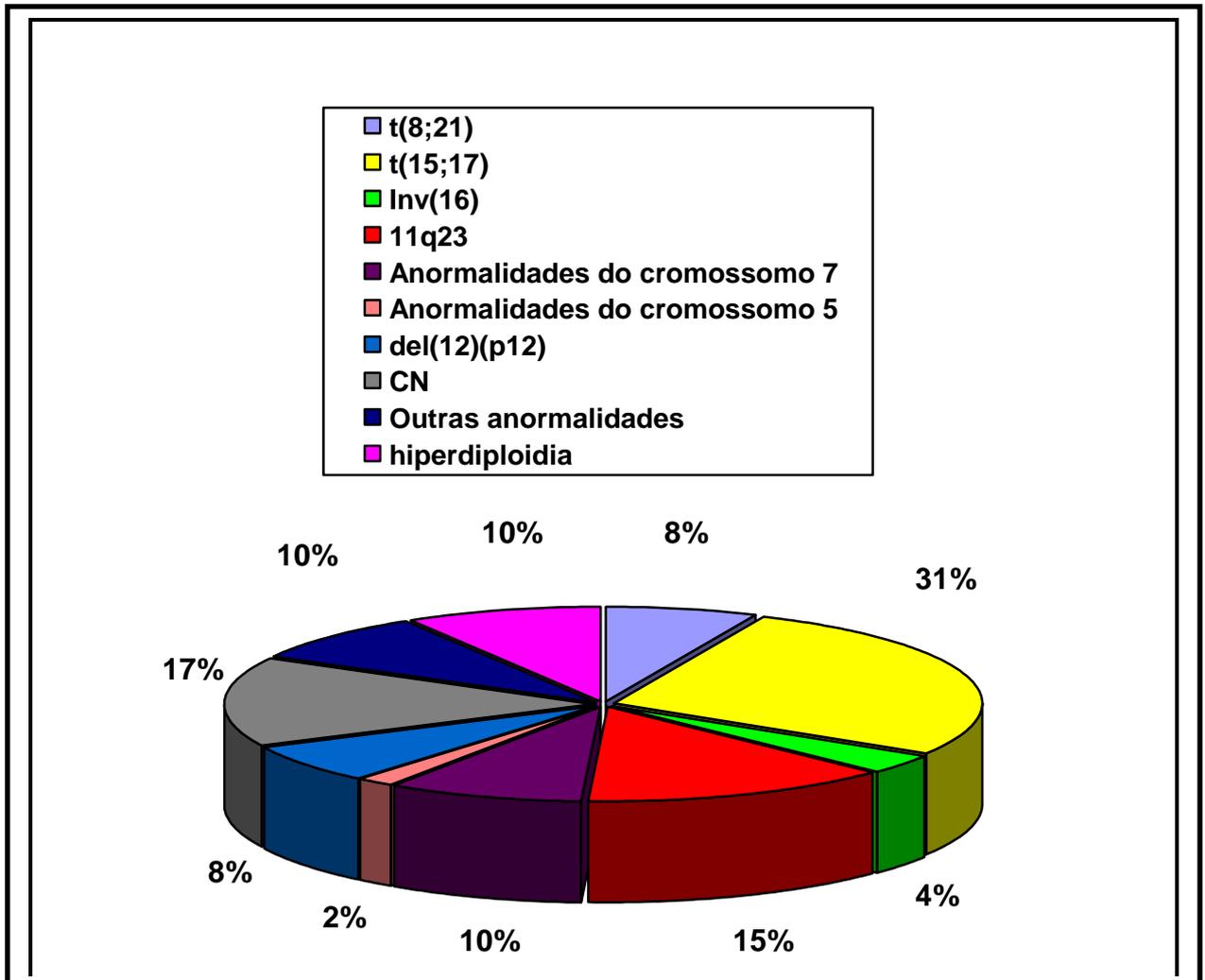


Figura 19- O perfil cariótipo da LMA da infância no Brasil.

Inv- inversão, t- translocação, q- braço longo do cromossomo, p- braço curto do cromossomo, CN- cariótipo normal,

9.4. Prognóstico

9.4.1. Correlação com o sexo dos pacientes

Neste estudo, foi observada uma pequena diferença entre as proporções de casos do sexo masculino e feminino (27M /29F) e, além disso, uma proporção um pouco maior de pacientes do sexo masculino apresentaram as translocações recorrentes, como inv(16), t(8;21) e anormalidades do 7 e do 11. A t(8;21) apresentou um predomínio do sexo masculino (3M/1F) e a t(15;17), apresentou um

predomínio no sexo feminino (9F/7M). A inv(16) apresentou-se com a mesma distribuição entre ambos os sexos (1M/1F) e as anormalidades que envolviam a região 11q23 não apresentou diferenças entre os sexos (3M/3F). As anormalidades envolvendo o cromossomo 7, como a monossomia de 7 e aberrações envolvendo braço q deste cromossomo, apresentaram uma leve predominância no sexo masculino (3M/2F). Anormalidades não recorrentes tiveram uma predominância do sexo feminino (2M/5F) (figura 20).

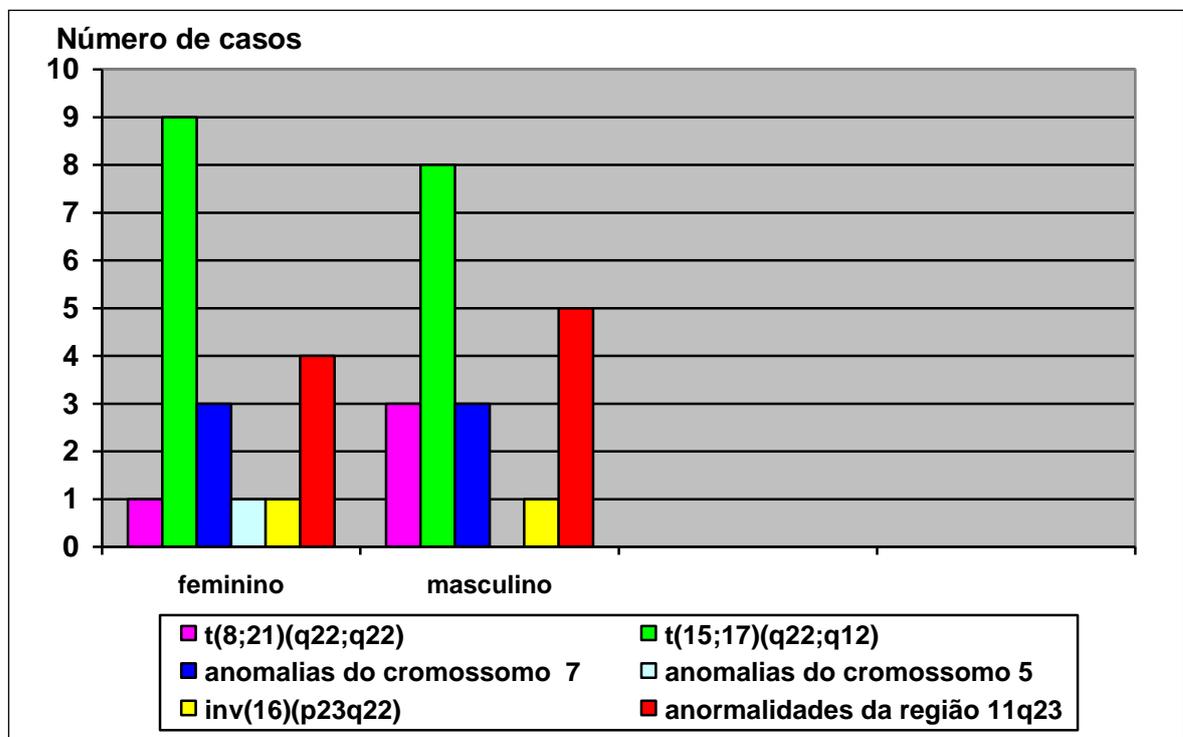


Figura 20 - Anormalidades citogenéticas recorrentes em ambos os sexos.
t- translocação, inv- inversão, q – braço longo do cromossomo

9.4.2. Associação das anormalidades e a taxa de remissão

A taxa de remissão para a população do estudo foi 84,6%. Enquanto que esta taxa de remissão foi maior para os casos que apresentaram cariótipo normal. No entanto, a mesma foi maior para os pacientes que apresentaram a t(8;21) e a inv(16) e, quase duas vezes maior do que os pacientes que apresentaram a t(15;17). A taxa

de remissão entre os pacientes que apresentaram apenas uma anormalidade citogenética foi 85,71% e entre aqueles que apresentaram mais de uma anormalidade cromossômica foi de 44,44%, ou seja, quase duas vezes menor (Figura 21)

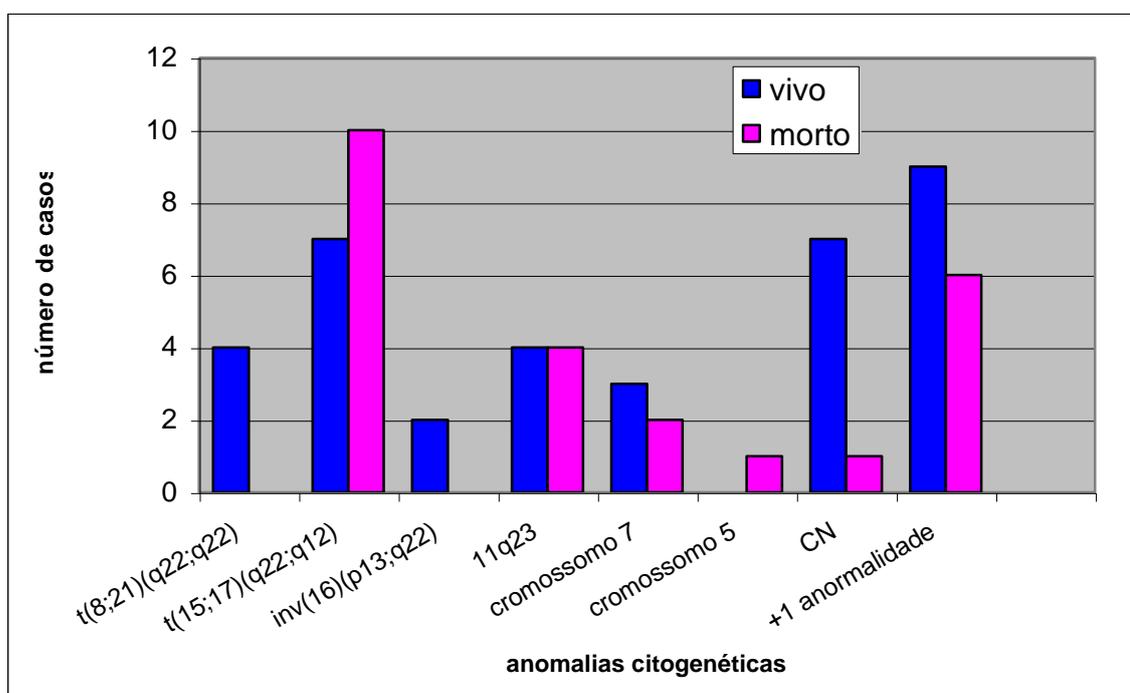


Figura 21 - Status dos pacientes com as anomalias recorrentes, cariótipo normal e com cariótipo apresentando mais de uma anormalidade.

t- translocação, q- braço longo do cromossomo, p-braço curto do cromossomo, CN- cariótipo normal

9.4.3. Correlação das anormalidades citogenéticas e a idade

A idade dentro do estudo variou de 4 meses a 17 anos. A média de idade dos pacientes que apresentaram cariótipo normal foi 9,5 anos e 6,9 anos para os pacientes com cariótipos anormais. Dentro do subgrupo das anormalidades citogenéticas recorrentes, a média de idade dos pacientes que apresentaram a t(8;21)(q22;q22) foi de 13 anos, variando de 11 a 15 anos; a média de idade dos pacientes que apresentaram a t(15;17)(q22;q12) foi de 9,6 anos de idade, variando de 2 a 16 anos; a média de idade dos pacientes com a inv(16) foi de 7,5, variando de 5 a 10 anos; pacientes que apresentaram anormalidades envolvendo a região

11q23 apresentaram uma média de idade de 3,6 anos, variando de 5 meses a 16 anos; pacientes com as anormalidades envolvendo o cromossomo 7, como a monossomia de 7 e aberrações envolvendo braço q deste cromossomo, apresentaram uma média de idade de 3,7 anos, variando de 4 meses a 13 anos. Pacientes que apresentaram as anormalidades não-recorrentes tiveram uma média de idade de 9,1 anos, variando de 2 a 16 anos de idade (Figura 22).

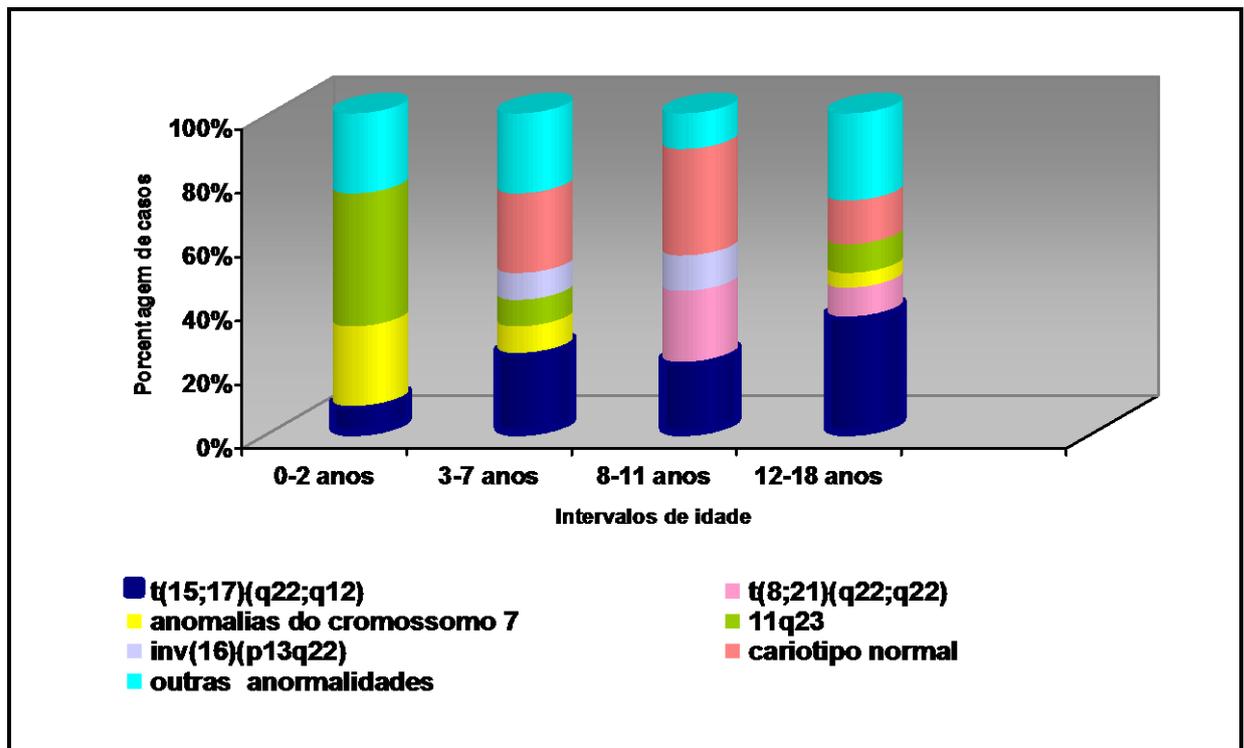


Figura 22 - Associação das anormalidades citogenéticas por faixa etária.
t- translocação, q-braço longo do cromossomo, inv- inversão, p-braço curto do cromossomo

9.4.4. Associação das anormalidades citogenéticas e os subtipos FAB

Dentro do estudo, todos os diferentes subtipos FAB foram observados, porém o subtipo FAB M6, como mencionado anteriormente, foi encontrado em um caso que não apresentou mitoses. O perfil cariótipo dos diferentes subtipos FAB encontrados neste estudo está descrito na figura a seguir:

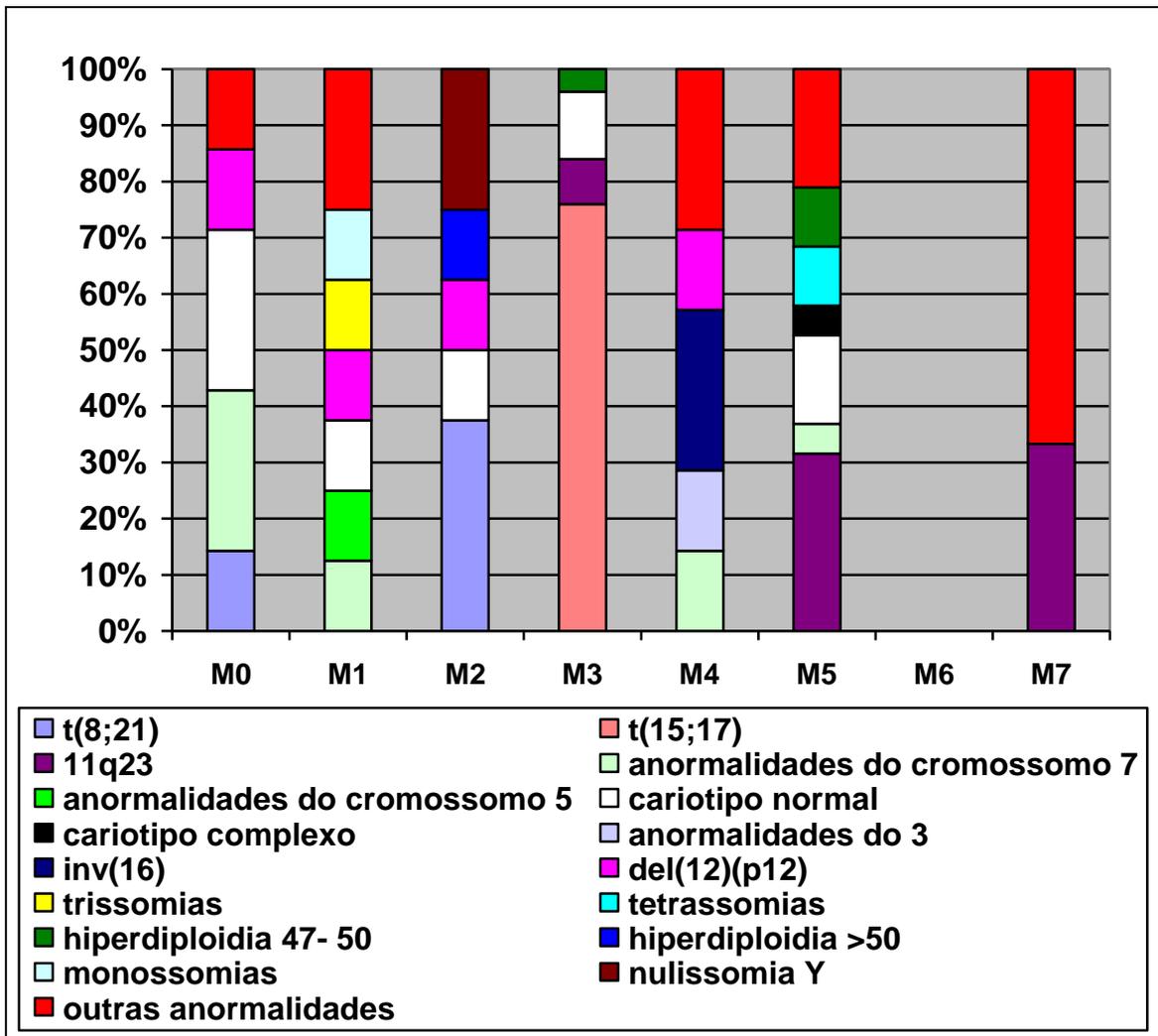


Figura 23- Perfil cariotípico dos subtipos morfológicos FAB.

t- translocação, del- deleção, inv- inversão, M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7 – subtipos morfológicos FAB

10. Discussão

A LMA é uma doença clínica e geneticamente heterogênea que corresponde à cerca de 15-20% de todas as leucemias agudas da infância e é a responsável por mais da metade das mortes por leucemia nos pacientes pediátricos. Apesar da LMA ser uma doença rara, ela pode apresentar uma taxa de cerca de 75-85 % de anormalidades cromossômicas (Raimondi *et al.*, 1999; Betts *et al.*, 2007; Forestier *et al.*, 2003; Stark *et al.*, 2004). Com o advento de novas técnicas moleculares, nas três últimas décadas, como o FISH, o M-FISH e o MCB, novas anormalidades cromossômicas puderam ser identificadas. No entanto, devido aos poucos estudos na LMA da infância e a raridade da doença, algumas dessas anormalidades ainda continuam sem um prognóstico determinado, mostrando a grande importância de estudos que correlacionem a citogenética e curso da doença desses pacientes, já que a citogenética é considerada o mais importante fator prognóstico de risco e, também pode servir como ponto de partida para futuras investigações, indicando os genes envolvidos no processo da leucemogênese.

Em continuação aos poucos estudos existentes em crianças com LMA, nosso estudo que é o primeiro estudo que utiliza diversas técnicas citogenéticas combinadas para a determinação do perfil cariotípico da leucemia mielóide aguda da infância, descrevendo duas novas anomalias na LMA da infância, encontrou uma incidência de cariótipos anormais por técnicas de citogenética convencional de cerca de 75%. Porém, esta taxa aumentou quando foram aplicadas técnicas de citogenética molecular como o multicolor FISH, que engloba toda e qualquer técnica de hibridização que utilize mais de três fluorocromos diferentes. Atingindo, então, uma taxa de anormalidades citogenéticas que chegou a 81%. Além disso, com a utilização dessas técnicas de citogenética molecular, 22% dos pacientes puderam

ser mais bem caracterizados citogeneticamente e alguns puderam ser estratificados em novos grupos citogenéticos de risco. A grande mudança foi o aumento no número de pacientes no grupo das anormalidades recorrentes que apresentavam a $t(15;17)(q12;q22)$ (32-41%) que passou de 29% para 39% com o uso das técnicas de citogenética molecular, principalmente, com o uso de FISH para o rearranjo gênico PML/RARA. Já que com isso, foi possível caracterizar 4 dos 8 casos sem mitoses.

A distribuição dos subtipos FAB também pode variar com a idade, como é o caso dos subtipos FAB M4, M5 e M7 que são mais comuns em crianças mais jovens, enquanto que os subtipos M0, M1, M2 e M3 são mais comuns em crianças mais velhas (Manola, 2009). Neste estudo, porém, de forma interessante, foram encontrados lactentes e crianças menores do que 10 anos nos grupos FAB M0, M1, M2 e M3, demonstrando que não houve grandes diferenças com relação as taxas descritas na literatura desses subtipos morfológicos. O Subtipo mais freqüente no estudo foi o subtipo FAB M3 em 37,5% dos casos.

Com relação ao número modal, a pseudodiploidia foi encontrada em 64,8% dos casos. Comparando com a literatura, esse número modal foi maior, já que em outros estudos semelhantes a este, essa taxa foi de cerca de 51% (Raimondi *et al*, 1999). A hipodiploidia foi detectada em 13,5 % dos casos, tendo como perda principal os cromossomos 7 e Y. A freqüência da hipodiploidia foi um pouco maior do que a incidência descrita em um estudo de Forestier e colaboradores em 2003, que foi de cerca de 11%. Já a hiperdiploidia foi detectada em 16,2 % dos casos analisados, tendo como ganhos mais freqüentes os cromossomos 21 e 8 que, geralmente, estavam associados com outras anormalidades. Esta freqüência difere da que já foi descrita anteriormente, como sendo cerca de 21% dos casos em um

estudo dos Estados Unidos (Raimondi *et al*, 1999) e de 25 % em um estudo de Israel (Betts *et al*, 2007).

Perdas totais ou parciais dos cromossomos 5 e 7 são mais comuns em adultos com LMA e, mais raras na LMA da infância, isso porque estas anormalidades são mais freqüentes nas LMAs secundárias a quimioterapia e a tratamento com agentes alquilantes e, sua baixa incidência na LMA da infância, pode ser explicada pela relativa escassez de crianças com LMA secundária a tratamento. Porém, este estudo que só incluiu crianças com LMA primária, apresentou uma taxa de 11% de anormalidades que envolviam o cromossomo 7, que foi duas vezes maior que a descrita na literatura para esses casos (1-5%)(Manola, 2009). E, quando comparado com a taxa encontrada em adultos que pode variar de 6 a 8%, ela também foi maior (Langmuir *et al*, 2001). Anormalidades que envolviam o cromossomo 5, foram detectadas em uma freqüência de cerca de 4%, taxa esta quase duas vezes maior que a descrita na literatura para a LMA da infância (1-2,5%). Ou seja, outros fatores que não a exposição à radioterapia e ao tratamento com quimioterápicos devem ser levados em consideração para poder explicar esta alta taxa de anormalidades envolvendo os cromossomos 5 e 7 na população brasileira estudada. Com relação ao prognóstico, 60% desses pacientes ainda se encontram em remissão da doença, o que difere dos dados da literatura que afirmam que esta taxa de remissão é em torno de 50%, tanto no adulto quanto na criança. Conferindo, assim, um mau prognóstico em ambos os grupos: adultos e crianças (Mrozek *et al*, 2001). No entanto, não foi isto que foi observado neste estudo da população infantil brasileira, já que menos da metade dos pacientes com estas anormalidades foram a óbito. Então, são necessários mais estudos para que

se possa verificar porque a população brasileira que apresenta anormalidades, envolvendo os cromossomos 5 e 7, apresentaram um bom prognóstico.

A freqüência com que as translocações recorrentes t(8;21), t(15;17) e inv(16) são encontradas em crianças, jovens e adultos jovens não difere substancialmente, ocorrendo em aproximadamente 10-20%, 5-10% e 5% dos casos citogeneticamente anormais, respectivamente, havendo um leve predomínio do sexo masculino. No entanto, estas freqüências são claramente diminuídas em pacientes mais velhos com LMA. Porém, a freqüência das anormalidades citogenéticas recorrentes t(8;21), t(15;17) e inv(16) neste estudo foi de 37,5%, taxa esta, quase duas vezes maior do que a taxa (10-20%) descrita anteriormente em outros estudos com crianças com LMA (Manola, 2009). E com relação ao sexo, não houve diferenças com relação as freqüências descritas na literatura. As freqüências das t(8;21), t(15;17) e inv(16) já foram descritas por Manola (2009) em crianças com uma taxa de aproximadamente, 7-16%, 2-10% e 3-8%, respectivamente.

Com relação às freqüências das anomalias t(8;21) (7%) e inv(16) (3,5%), não foi observada nenhuma diferença significativa nas freqüências descritas neste estudo quando comparadas com as freqüências descritas em outros estudos anteriores (Langmuir *et al*, 2001; Manola, 2009). No entanto, a t(15;17) apresentou uma freqüência de 31% neste estudo, com o mesmo número de casos em ambos os sexos. Esta alta freqüência da translocação t(15;17) discorda da literatura, pois outros estudos afirmam que essa translocação tem uma freqüência até 10 vezes menor nesta faixa etária do estudo, embora em países da América do Sul e Central, além da Itália, a t(15;17) já tenha sido descrita com uma alta freqüência (Forestier *et al*, 2003; Mantadakis *et al*, 2008; Ravindranath *et al.*, 2005).

Com relação à idade, houve um predomínio de crianças mais velhas com esta translocação. Porém, esta translocação foi detectada em dois pacientes: um com 2 anos e outro com 3 anos de idade. De fato, alguns estudos anteriores, como os de Nakase e colaboradores (2000) e, Ruiz-Arguelles e colaboradores (1997), já revelaram uma significativa heterogeneidade na frequência da $t(15;17)$ na população mundial. Essas diferenças geográficas podem ser ao acaso, mas também podem indicar que a origem étnica pode ter, sim, uma importância no aparecimento dessas anormalidades, como por exemplo, países nórdicos apresentam com maior frequência a hiperdiploidia e menos frequentemente, as translocações específicas da LLA quando comparados com outras regiões geográficas (Forestier *et al.*, 2003).

Com relação ao prognóstico, este tipo leucêmico pode apresentar uma taxa de cura de 70-90%, tanto em crianças quanto em adultos, já que para o transcrito gerado pela translocação $t(15;17)$, *PML/RARA*, já existe um tratamento com ácido trans-retinóico (ATRA) que induz a diferenciação das células que pararam seu processo de diferenciação no estágio de pró-mielócito com um excelente resultado (Mantadakis *et al.*, 2008). Porém, neste estudo, a taxa de remissão desses pacientes foi de apenas 40%, além de uma alta taxa de óbitos precoces, ou seja, sem se quer iniciar o tratamento. Esses dados sugerem que outros dados biológicos precisam ser mais bem estudados para que se possa determinar porque a população infantil brasileira que apresenta a $t(15;17)$ com uma alta frequência associada a um mau prognóstico, mesmo com tratamento com o ácido trans-retinóico que é o tratamento de primeira linha para os pacientes que apresentam o rearranjo *PML/RARA*.

Os rearranjos que envolvem a região 11q23 resultam em rearranjos do gene MLL com diferentes “parceiros gênicos” em mais de 51 diferentes translocações e, são mais frequentemente observados na LMA da infância (14-22%), especialmente

nos subtipos M4 e M5 (Balgobind *et al*, 2009). Em nosso estudo, anormalidades que envolveram a região 11q23, foram observadas em somente 15% dos casos, sendo que, quase que a sua totalidade observada no subtipo M5. Essa frequência das anormalidades cromossômicas, envolvendo a região 11q23 corresponde à taxa esperada para esta faixa etária descrita em trabalhos anteriores (Forestier *et al*, 2003; Raimondi *et al*, 1999; Betts *et al*, 2007). Nos lactentes, crianças de 0 a 18 meses de idade, essa frequência pode chegar a 65%. Neste estudo, a frequência de lactentes foi de 12,5% dos casos, variando a idade de 4 a 14 meses de vida com um predomínio de rearranjos envolvendo a região 11q23 em 67% dos casos, mesmo apresentando 33% de anormalidades envolvendo o cromossomo 7. A $t(9;11)(p22;q23)$ é o rearranjo que envolve a região 11q23 mais comumente observado na LMA da infância, correspondendo a 50% dos casos que envolvem a região 11q23, sendo reportada em 6-11% dos casos de LMA em geral (Manola, 2009). No entanto, essa anomalia foi encontrada numa frequência de 4,9% do total de casos, mesmo sendo a incidência de lactentes no estudo (12,5%), mais que duas vezes maior que a frequência deste tipo leucêmico na população.

Dentro do grupo dos lactentes, a $t(9;11)$ apresentou uma frequência de cerca de 33% dos casos que apresentaram rearranjo da região 11q23. Isso pode ter ocorrido devido a essa translocação ser muito sutil, necessitando da utilização de técnica de citogenética molecular em todos os casos classificados com M5 e que apresentarem cariótipo normal. Além disso, outras anormalidades envolvendo essa região cromossômica do 11 já foram reportadas na LMA da infância como a $t(11;19)(q23;p13.3)$ que é, principalmente, encontrada na LMA do lactente e, em nosso estudo, foi observada em 2,4% dos casos, o que pode estar relacionado com a média de idade encontrada nos pacientes deste estudo que foi de 7,4 anos de

idade. Outra anormalidade envolvendo essa região também foi encontrada neste estudo, a $t(1;11)(q21;q23)$ que é reportada em 3% dos casos de LMA da infância com rearranjo da região 11q23, sendo mais freqüente no subtipo M5 (Balgobindi *et al*, 2009). Porém, essa anormalidade foi a segunda mais freqüente anormalidade observada neste estudo, envolvendo a região 11q23, juntamente com a $t(9;11)$, correspondendo a 29% dos casos que o gene MLL estava envolvido. Isso pode se dever ao fato do tamanho da amostra de lactentes do estudo que foi duas vezes maior que a freqüência descrita de 5%. Trabalhos anteriores relatam que quando o rearranjo da região 11q23 vem acompanhado de outras anormalidades recorrentes que conferem um bom prognóstico como a $t(15;17)$, a $t(8;21)$ e a $inv(16)$, não há alteração do status de risco bom, conferido por estas anormalidades recorrentes (Raimondi *et al*, 1999; Manola, 2009). No entanto, os dois pacientes que apresentaram $t(15;17)$ e, a deleção da região 11q23 num subclone, foram a óbito. Isso então, não confere com os dados de Manola, que afirmam não haver interferência nos status de risco conferido pela anormalidade $t(15;17)$ de bom prognóstico.

Com relação ao prognóstico, 71% dos casos que apresentaram o rearranjo, apresentam-se em remissão da doença, mostrando-se neste estudo, como uma anomalia de bom prognóstico. Mais estudos brasileiros são necessários para que mais dados biológicos possam elucidar essa diferença em relação à população mundial.

As anormalidades citogenéticas não-específicas corresponderam a 25% dos casos anormais encontrados no estudo. Dentro desse grupo, anormalidade como a $del(12)(p12)$ foi encontrada com uma freqüência de 9,5% do total de casos anormais, mostrando uma alta incidência desta anormalidade neste estudo. Isso

porque esta anormalidade foi reportada por Raimondi e colaboradores (1999), em menos de 1% dos casos considerados anormais como sendo uma anormalidade adicional a outras anormalidades. Neste estudo, em 75% dos casos que apresentaram a del(12)(p), ela estava associada a uma anormalidade que envolvia o cromossomo 7.

Com relação a idade, todos esses três pacientes que apresentavam essas aberrações tinham menos de 3 anos de idade, sendo dois deles, considerados ainda lactentes (menos de 18 meses). Podendo sugerir então, que novos estudos citogenéticos na infância devam ser feitos para que se possa determinar um novo subgrupo citogenético na LMA da infância.

Em relação ao prognóstico, 80% das crianças que apresentaram esta anormalidade estão em remissão da doença. Como esta anormalidade foi descrita em menos de 1% no estudo da Raimondi e colaboradores (1999), não há dados a respeito do prognóstico dessa anormalidade na população infantil. Além da del(12)(p12), outras anormalidades não específicas foram encontradas neste estudo como a del(9)(q12q31), além de um dic(22)(p10;p10) e de uma del(13)(q13q21). A del(9)(q) é considerada por alguns citogeneticistas como uma anormalidade recorrente na LMA, porém pouco se conhece com relação ao prognóstico desta anormalidade. A del(9)(q) foi reportada pela primeira vez em 1984 por Mecucci e colaboradores (1984) como uma anomalia adicional a t(8;21). Além disso, esta anormalidade pode vir acompanhada de outras anormalidades ou aparecer como única anormalidade cariotípica. Por isso, pacientes que apresentam esta anormalidade podem ser divididos em três grupos: (i) del(9)(p); (ii) del(9)(p) e t(8;21) e (iii) del(9)(p) e outras anormalidades. Como descrito por Peniket e colaboradores (2005), a média de idade no diagnóstico desses três grupos é, respectivamente, 21

anos, variando de 3 a 70 anos; 51 anos, variando de 14 a 74 anos; e 38 anos, variando de 2 a 65 anos. Além disso, Peniket e colaboradores, em 2005, verificaram que estas anormalidades na infância eram mais freqüentes no subtipo FAB M2. Neste estudo, esta anormalidade foi observada em apenas um caso com o subtipo FAB M1, correspondendo a 2% do total de casos, o que corrobora com os dados do estudo do Reino Unido (Peniket *et al*, 2005). Porém, em nosso estudo, esta deleção apresentava a del(11)(q13) como uma anomalia adicional em um subclone, em um paciente de 8 anos de idade. Este foi a óbito, conferindo um mau prognóstico para esta anormalidade citogenética neste estudo. Porém, mais estudos são necessários para que se possa estabelecer um prognóstico destas anormalidades na população brasileira. Além disso, anormalidades como o dic(22;22)(p10;p10) foram observadas neste estudo como uma anomalia adicional a inv(16). A Inv(16) é mais comumente associada com o subtipo FAB M4, apresentando eosinófilos anormais, com uma freqüência na infância, que pode variar de 3 a 8%, sendo mais alta na população chinesa (Chan *et al*, 2004). No entanto, a inv(16) também já foi reportada em outros subtipos morfológicos, tais como, M0, M1, M2 e M5 (Manola, 2009). O uso de técnica de citogenética molecular como o FISH e, de biologia molecular como o RT-PCR, são de especial validade, pois esta anormalidade é bastante sutil, sendo de difícil diagnóstico somente com a utilização da citogenética convencional. Anormalidades cromossômicas adicionais já foram reportadas com a inv(16), tais como as trissomias dos cromossomos 22 e 8, assim como, anormalidades que envolvem o braço q do cromossomo 7 (Chan *et al*, 2004) . No entanto, a presença do cromossomo dicêntrico juntamente com a inv(16), mostra mais uma vez a forte associação entre a inv(16) e as anormalidades que envolvem o cromossomo 22, mesmo que esta anormalidade não tenha ainda sido descrita. A del(13)(q13q21) já

foi reportada em um estudo de Raimondi e colaboradores (1999), em apenas um caso. Neste estudo, esta anormalidade foi encontrada em 1 caso em um segundo clone de um caso hiperdiploide, não contribuindo com nenhum dado estatístico, sendo necessários mais estudos para que se possa verificar a frequência desta anormalidade na nossa população e seu prognóstico.

Neste estudo, novas anormalidades também foram descritas. Foram elas: a $inv(3)(p22p26)$ e a $invdup(1)(qter \rightarrow q23 \sim 24 :: q23 \sim 24 \rightarrow qter)$. Ambas as anormalidades só puderam ser determinadas com a utilização de técnicas de mFISH, que consistem, como descrito anteriormente, na utilização de 3 ou mais fluorocromos diferentes em um mesmo experimento para melhor caracterizar o cariótipo. Neste estudo, foram utilizadas as técnicas de M-FISH e de MCB que permitiram revelar novas anormalidades na LMA da infância. Anormalidades envolvendo o braço longo do cromossomo 3, como $inv(3)(q21q26)$, $t(3;3)(q21;q26)$, $t(3;21)$, ganhos e perdas em 3q, são raras na infância. A maioria das anomalias, que envolvem a região 3q21-3q26, está associada, predominantemente, com o subtipo M7 (Haltrich *et al.*, 2006). No entanto, neste estudo, a $inv(3)(p22p26)$ foi encontrada no subtipo M4, com uma frequência de 2%. Esta anomalia estrutural já foi vista em um estudo de Raimondi e colaboradores (1999), mas envolvendo outros pontos de quebra do braço curto do cromossomo 3, diferindo da anormalidade recorrente $inv(3)(q21q26)$, que é tipicamente vista em adultos com LMA. Esta anomalia estrutural não pode ser detectada somente com a técnica de bandeamento G, necessitando da utilização da técnica de M-FISH para ser caracterizada. Com relação ao prognóstico, a $inv(3)(p22p26)$ parece não conferir um bom prognóstico, pois o adolescente de 16 anos de idade que apresentou esta anomalia foi a óbito. É claro, que novos estudos são necessários para estabelecer o prognóstico dessa anomalia na LMA da infância,

já que poucos são os dados de anomalias, envolvendo o cromossomo 3 em crianças. Anormalidades envolvendo o cromossomo 1 foram descritas em 2,5% dos casos de um estudo dos Estados Unidos (Raimondi *et al.*, 1999). A invdup(1) (qter->q23~24::q23~24->qter), também pode ser denominada de cromossomo 1 neocentromérico. Os cromossomos neocentroméricos são caracterizados pela presença de um novo centrômero que é formado em um local diferente da localização original do centrômero, sem DNA α satélite. No entanto, este novo centrômero se comporta da mesma maneira que um centrômero original durante a divisão celular (Amor *et al.*, 2002). Esta anomalia genética é mais freqüentemente encontrada como uma anomalia constitucional em pacientes que apresentam cariótipo do tipo mosaico. No entanto, o cromossomo neocentromérico já foi descrito em células de medula óssea de 2 pacientes com LMA, envolvendo os cromossomos 10 e 8. Um dos casos foi reportado em um adolescente e o outro, em um adulto. Essa anomalia também já foi reportada em outra neoplasia, os tumores lipomatosos. Porém, nas LMAs o cromossomo neocentromérico foi reportado em conjunto com outras anomalias adicionais, diferindo dos tumores lipomatosos em que este cromossomo foi reportado como única anomalia citogenética. Isso pode sugerir que a formação do cromossomo neocentromérico pode ser uma aberração cromossômica primária. Em nosso estudo, esta anomalia também estava acompanhada de outras anomalias adicionais, como a tetrassomia dos cromossomos 8 e 21, mostrando mais uma vez que a formação do cromossomo neocentromérico pode ser uma aberração cromossômica primária. Com relação ao prognóstico, não há dados suficientes para estabelecer um prognóstico, necessitando de mais estudos para que isso possa ser estabelecido. Mas, este caso, por ser o primeiro caso que envolve o cromossomo 1, pôde ser publicado e pode

também sugerir a contribuição dessa anomalia no processo da leucemogênese. Além dele, apresentar tetrassomias dos cromossomos 8 e 21 e de uma tetrassomia parcial do braço longo do cromossomo 1. este caso, foi o primeiro caso a descrever um cromossomo neocentromérico que envolve o cromossomo 1. Isso pode mostrar a contribuição desta anomalia para o processo da leucemogênese (de Figueiredo *et al.*, 2009).(paper em anexo)

Pacientes com cariótipo normal (CN) são classificados no grupo intermediário de risco e mostram um prognóstico variado. Isso porque, rearranjos moleculares como, duplicação *in tandem* do gene FLT3 (FLT3-ITD), duplicações parciais *in tandem* do gene MLL (MLL-PTD) ou mutações no gene da nucleofosmina (NPM1) podem estar presentes em pacientes pediátricos que apresentaram cariótipo normal, tanto pela citogenética convencional quanto pela citogenética molecular. No entanto, cada um desses rearranjos apresenta uma frequência na população pediátrica com diferente prognóstico para cada uma delas. Como é o caso das mutações FLT3-ITD que são reportadas em 20-25% dos casos pediátricos com LMA-CN, servindo como um marcador de mau prognóstico. Enquanto que, MLL-PTD confere um mau prognóstico, sendo reportada em 13% dos pacientes pediátricos. Contrariamente, mutações no gene NPM1, podem ser reportadas em 20-30% dos pacientes pediátricos com LMA-CN, conferindo um bom prognóstico. No entanto, quando esta mutação esta associada a mutações no gene FLT3, o seu prognóstico é influenciado por esta mutação, passando de favorável para desfavorável. Os cariótipos normais foram detectados neste estudo com uma frequência de cerca de 17%. Esta frequência corresponde à frequência descrita para pacientes pediátricos, que é de cerca de 15-30%. Com relação ao prognóstico, 89% dos pacientes ainda se encontram em remissão da doença, conferindo um bom prognóstico. Isso difere do

que foi anteriormente descrito para este grupo citogenético, que, na verdade, demonstrou um prognóstico intermediário. Mas como não foram realizadas técnicas de biologia molecular para verificar a presença dos rearranjos, anteriormente citados, talvez uma grande parte desses pacientes apresente mutações no gene da nucleofosmina que confere um valor prognóstico favorável, mostrando que a frequência desses rearranjos na população brasileira pode ser diferente.

Algumas das técnicas de citogenética molecular apresentam limitações no diagnóstico inicial dos pacientes com LMA, pois, na maioria das vezes, estas técnicas necessitam de uma suspeita inicial para a utilização de determinados conjuntos de sondas, como é o caso de sondas gênicas locus específicas, utilizadas para rearranjos gênicos com *PML/RARA*, *AML1/ETO* e *MLL*. A detecção de anormalidades cromossômicas pela citogenética convencional no momento do diagnóstico é de extrema importância, pois pode direcionar que tipos de técnicas de mFISH devem ser utilizadas na detecção de cariótipos complexos ou de anomalias sutis, não detectáveis pela citogenética convencional. Aproximadamente ¼ dos casos citogeneticamente anormais, apresentam um cariótipo que não pode ser totalmente resolvido pela pobre qualidade do bandeamento ou, pela presença de cromossomos marcadores ou cromossomos em anel, necessitando de técnicas de citogenética molecular para caracterizar o cariótipo. O M-FISH (FISH Multiplex), assim como SKY (cariótipo espectral) são métodos baseados na hibridização *in situ* por fluorescência, que permitem uma simultânea exposição de todos os cromossomos com diferentes cores pelo uso de 5 fluorocromos diferentes, separadamente ou em conjunto em um mesmo experimento. No entanto, se o material translocado tiver de 1-2,6 Mb de tamanho, torna-se necessário a utilização de uma outra técnica de mFISH que consiga determinar áreas específicas de

determinadas regiões cromossômicas em nível de banda e até de subbanda cromossômica. Isso é possível com a utilização do MCB que permite a formação de inúmeras bandas pseudo-coloridas em cada cromossomo graças ao uso do software Isis (MetaSystems), que permite uma resolução de mais 550 bandas por cariótipo haplóide. Muitos trabalhos já foram realizados utilizando as técnicas de M-FISH (SKY e M-FISH), sendo o primeiro deles realizado por Veldman e colaboradores no final da década 90. No entanto, não há muitos trabalhos correlacionando o MCB e a LMA da infância. Dois desses trabalhos, relatam alterações crípticas que só foram descobertas quando se utilizou o MCB (Marques-Salles et al, 2009; Silva et al, 2008)..

11. Conclusões

- A frequência de anormalidades cromossômicas na LMA da infância brasileira foi de 81%, diferindo da alta taxa de cariótipos normais, mais encontrados em pacientes adultos.
- O subtipo morfológico mais encontrado neste trabalho foi o subtipo FAB M3 com uma frequência de 37,5%.
- Foram observadas todas as translocações recorrentes na LMA, tais como: $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q21;q12)$, $inv(16)(p13;q22)$ e anormalidades envolvendo a 11q23. Porém, a $t(15;17)(q21;q12)$, atingiu uma alta frequência (32%). Esta frequência ainda não tinha sido observada na população da LMA da infância.
- Os pacientes com a $t(15;17)$ apresentaram uma alta incidência de óbitos precoces, sugerindo que outros dados biológicos precisam ser melhor estudados.
- Anomalias envolvendo cromossomo 7 atingiram uma frequência (13%), que foi 2 vezes maior do que a descrita na literatura.
- Anomalias complexas envolvendo cromossomo 7 foram observadas mais em crianças com menor idade (0-2 anos) e mostraram uma alta taxa de remissão. Este achado sugere que mais crianças devam ser estudadas para se detectar uma nova classe prognóstica nos lactentes.
- Foram descritas neste trabalho anomalias novas, tais como: $inv(3)(p22;p26)$, $dic(22;22)(q10;q10)$, $del(13)(q13q21)$ e $invdup(1)(q)$. A presença de um cromossomo neocentromérico pode estar envolvida no aparecimento da LMA da infância.

- A combinação das técnicas convencionais, tais como bandeamento G e de técnicas moleculares, tais como M-FISH e MCB, mostrou que houve uma complexidade no perfil cromossômico, sugerindo que técnicas de citogenética molecular devam ser incorporadas a outros estudos da LMA da infância, principalmente, a estudos citogenéticos da criança brasileira.

12. Referências Bibliográficas

1. AMOR, DJ & CHOO, KHA. Neocentromeres: roles in human disease, evolution, and centromere study. **Am. J. Hum. Genet.**, 71, p. 695-714, 2002.
2. BACHER, U.; KERN, W.; SCHNITTGER, S.; HIDDEMANN, W.; SCHOCH, C.; HAFERLACH, T. Further correlations of morphology according to FAB and WHO classification to cytogenetics in de novo acute myeloid leukemia: a study on 2,235 patients. **Ann. Hematol.**, v.84, p. 785-791, 2005.
3. BALGOBINDI, BV; RAIMONDI, SC; HARBOTT, J; ZIMMERMANN, M; ALONZO, TA, AUVIRGNON, A ET AL. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. **Blood**, 2009 (in press).
4. BENNETT, J.M.; Catovsky, D.; Daniel, M.T.; Flandrin, G.; Galton, D.A.G.; Grailnick, H.R.; Sultan, C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. **Br. J. Hematol.**, v. 33, p. 451-458, 1976.
5. BETTS, DV; AMMANN, RA; HIRT, A; HENGARTNER, H; BECK-POPOVIC, M; KUHNE, T; NOBILE, L; CAFLISCH, U; WACKER, P & NIGGLI, FK. The prognostic significance of cytogenetic aberrations in childhood acute myeloid leukaemia. A study of the Swiss Pediatric Oncology Group (SPOG). **Eur J Haematol**, v. 78, p. 468-476, 2007.
6. BIONDI, A; CIMINO, G; PIETERS, R; PUI, CH. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. **Blood**, v.96, p. 24-33, 2000.
7. BITTENCOURT, R.; FOGLIATO, L.; DAUDT, L.; BITTENCOURT, N.S.; FRIEDERICH, J.R.; FERNANDES, F.; ONSTEN, T.; FASSINA, K.; ROCHA, L.K.; MORENO, F.; SILVA, G.; CRUZ, M.S.; DE GARCIA, R.G.; MASNIESKY, J.C.; SILVA, L.M.R. Leucemia Mielóide Aguda: perfil de duas décadas do Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre-RS. **Rev. bras. hematol. hemoter.**, v. 25, p. 17-24, 2003.
8. BLOOMFIELD, C.D., FOON, K.A., LEVINE, E.G., Leukemias *In: Canellos G P, Glick J H, Mac Donald J S, et al, Medical Oncology 2nd*, McGraw-Hill, Inc. p.459-501, 1993.
9. CALIGIURI, M.A.; STROUT, M.P.; LAWRENCE, D.; ARTHUR, D.C.; BAER, M.R.; YU, F.; KNUUTILA, S.; MROZEK, K.; OBERKIRCHER, A.R.; MARCUCCI, G.; DE LA CHAPELLE, A.; ELONEN, E.; BLOCK, A.W.; RAO, P.N.; HERZIG, G.P.; POWELL, B.L.; RUUTU, T.; SCHIFFER, C.A.; BLOOMFIELD, C.D. Rearrangement of ALL1

(MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. **Cancer Res.**, v. 58, p. 55-59, 1998.

10. CHAN, NPH; WONG, WS; NG, MHL; TSANG, KS; LAU, TT; LEUNG, Y; CHIK, KW, SHING, MMK & LI CK. Childhood acute myeloid leukemia with *CBFB-MYH11* rearrangements: Study of incidence, morphology, cytogenetics, and clinical outcomes of Chinese in Hong Kong. **Ame J Hematol.**, v. 76, p. 300-303, 2004.

11. CLARKE CA AND GLASER SL. Acute myeloid leukaemia. **N Eng J Med**, v. 342, p.358-361, 2000.

12. CUCUIANU A. Dominant and opportunistic leukemic clones: Proposal for a pathogenesis-oriented classification in acute myeloid leukemia. **Med Hypotheses**, v.65:p.107-113, 2005

13. CUNEO, A.; BIGONI, R.; CAVAZZINI, F.; BASDI, A.; ROBERTI, M.G.; AGOSTINI, P.; TAMMISOE.; CICCONE, N.; MANCINI, M.; NANNI, M.; DE CUIA, R.; DIVONA, M.; LA STARZA, R.; CRESCENZI, B.; TESTONI, N.; REGE, C.G.; MECUCCIC.; LO, C.F.; SAGLIO, G.; CASTOLDI, G. Incidence and significance of cryptic chromosome aberrations detected by fluorescence in situ hybridization in acute myeloid leukemia with normal karyotype. **Leukemia**, v. 16, p. 1745-1751, 2002.

14. DE FIGUEIREDO, AF; MKRTCHYAN, H; LIEHR, T; SOARES-VENTURA, EM; MARQUES-SALLES, TJ; SANTOS, N; RIBEIRO, RC; ABDELHAY, E. SILVA, MLM. A case of childhood acute myeloid leukemia AML (M5) with a neocentric chromosome neo(1)(qter->q23~24::q23~24->q43->neo->q43->qter) and tetrasomy of chromosomes 8 and 21. **Cancer Genet Cytogenet.** , v.193, p.123-126, 2009.

15. DEWALD, G.; KETTERLING, R.P.; WYATT, W.A.; STUPCA, P. Cytogenetics studies in neoplastic hematologic disorders. In McClatchey K (ed): Clinical Laboratory Medicine, 2nd ed. Baltimore, Williams & Wilkins, p. 658-685, 2002.

16. EMERECIANO, M; KOIFMAN, S; POMBO-DE-OLIVEIRA, MS. Acute leukemia in early childhood. **Braz Jour Medical and Biol Res**, v.40, p. 749-760, 2007.

17. ESTEY, E. & DÖHNER, H. Acute myeloid leukemia. **Lancet**, v 368, p. 1894 – 907, 2006.

18. FAGUNDES, E.M.; ROCHA, V.G.; AZEVEDO, W.M.; CLEMENTINO, N.C.D.; QINTÃO, J.S.; FERRAZ, M.H.C.; VIANA, M.B. Leucemia mielóide aguda do adulto: análise retrospectiva de 99 casos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 17, p. 33-39, 1995.

19. FAGUNDES, E.M. AML in Brazil: can we improve our treatment results? **Série de Monografias da Escola Brasileira de Hematologia**, v. 9, p. 107-116, 2002.
20. FALCÃO, R.P.; MARTINS, S.L.R. A importância da imunofenotipagem na Leucemia Mielóide Aguda. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, 2000.
21. FORD, A.M.; RIDGE, S.A.; CABRERA, M.E. et al. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infants leukemias. **Nature**, v. 363, p. 358-360, 1993.
22. FORESTIER, E; HEIM, S; BLENNOW, E; BORGSTRÖM, G; HOLMGREN, G; HEINONEN, K; JOHANNSSON, J; et al. Cytogenetic abnormalities in childhood acute myeloid leukaemia: a nordic series comprising all children enrolled in the NOPHO-93-AML trial between 1993 and 2001. **Brit Jour of Haematol**, v. 121, p.566-577, 2003.
23. GALE, K.B.; FORD, A.M.; REPP et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. **Proc Nat Acad Sci USA**, v. 94, p. 13950-13954, 1997.
24. GAMERDINGER, U.; TEIGLER-SCHLEGEL, A; PILS, S.; BRUCH, J.; VIEHMANN, S.; KELLER, M.; JAUCH, A.; HARVOTT, J. Cryptic chromosomal aberrations leading to an AML1/ETO rearrangement are frequently caused by small insertions. **Genes Chromosome Cancer**, v. 36, p. 261-272, 2003.
25. GASSMANN, W. Alemanha [2003]. 1 fotografia colorida. Disponível em : <<http://www.leukemia-images.com/bilder.leukemia-images.com/Acute.myeloid.leukemia.with.ve15380uniquefile2007-01-5-00-17-06.jpg>> Acesso em: 10 abril 2009.
26. GILLILAND, DG; JORDAN, CT ; FELIX, CA. The Molecular Basis of Leukemia. **Hematology - Am Soc Hemato Educ Programl** , v. 1,p.80-97, 2004.
27. GREAVES, MF. Infant leukemia biology, aetiology and treatment. **Leukemia**, 10: 372-377, 1996.
28. GRIMWADE, D.; WALKER, H.; OLIVER, F. et al. The importance of diagnostic Cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into the MRC Aml 10 trial. **Blood**, v. 92, p. 2322-2333, 1998.
29. GRIMWADE D. The clinical significance of cytogenetic anomalies in acute myeloid leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol.** ,v.14,p.497-529, 2001.

30. HALL, G.W. Childhood Myeloid Leukeamias. **Best Pract. & Res. Clin. Hematol.**, v.14, p. 573-591, 2001.
31. HALTRICH, I; KOST-ALIMOVA, M; KOVÁCS, G; KLEIN, G; FEKETE, G & IMREH, S. Multipont interphase FISH analysis of chromosome 3 abnormalities in childhood AML patients. **Eur. J Haematol.**, v. 76,p. 124-133, 2006.
32. HEAD, D.R. **Classification and Differentiation of the Acute Leukemias.** In:Wintrobe's Clinical Hematology. Greer, J.P.; Foerster, J.; Lukens, J.N.; Rodgers, G.M.; Paraskevas, F.; Glader, B., 11nd, Bippincott Williams & Wilkins, p. 2063-2076, 2004a.
33. HEAD, DR. **Acute Myelogenous Leukemia in Children.** In:Wintrobe's Clinical Hematology. Greer, J.P.; Foerster, J.; Lukens, J.N.; Rodgers, G.M.; Paraskevas, F.; Glader, B., 11nd, Bippincott Williams & Wilkins, p. 2169-90, 2004b.
34. HEIM, S.; MITELMAN, F. **Cancer Cytogenetics, copyright 1995.** Alan R. Liss, Inc.
35. HOWARD, S.C.; PEDROSA, M.; LINS, M.; PEDROSA, A.; PUI, C.; RIBEIRO, R.C.; PEDROSA, F. Establishment of a Pediatric Oncology Program and Outcomes of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Resource-Poor Area. **Jama**, v.291, p. 2471-2475, 2004.
36. HUNGERFORD, D.A. Leukocytes cultures from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic (KCL). **Stain Technol.**, v. 40, p. 333-338, 1965.
37. ISCN (2005) An International Sistem for Human Cytogenetic Nomenclature(2005): recomendationsof the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature/ ed. Lisa G. Shaffer, Niels Tommerup.
38. JAFFE, E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J.W., eds. World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of Haematopietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001.
39. KEARNEY L. Molecular Cytogenetics. **Best Pract & Res Clin Haematol**, v.14, p.645-668, 2001.
40. KLAUS M.; SCHNITTGER, S.; HAFERLACH, T.; DREYLING, M.; HIDDEMANN, W.; SCHOCH, C. Cytogenetics, fluorescence in situ hybridization, and reverse

transcriptase polymerase chain reaction are necessary to clarify the various mechanism leading to an MLL-AF10 fusion in acute myelocytic leukemia with 10;11 rearrangement. **Cancer Genet. Cytogenet.** , v. 144, p. 36-43, 2003.

41. KLAUS, M.; HAFERLACH, T.; SCHNITTGER, S.; KERN, W.; HIDDEMANN, W.; SCHOCH, C. Cytogenetic profile in de novo acute myeloid leukemia with FAB subtypes M0, M1 and M2: a study based on 652 cases fluorescence in situ hybridization. **Cancer Genet and Cytogenet**, v. 155, p. 47-56, 2004.

42. KRAUTER, J.; PETER, W.; PASCHEBERG, U.; HEINZE, B.; BERGMANN, L.; HOELZER, D.; LUBBERT, M.; SCHLIMOK, G.; ARNOLD, R.; KIRCHNER, H.; PORT, M.; GANSER, A.; HEIL, G. Detection of karyotypic aberrations in acute myeloblastic leukaemia: a prospective comparison between PCR/FISH and standard Cytogenetics in 140 patients with *de novo* AML. **Br. J. Haematol.**, v. 96, p. 72-78, 1998.

43. KUNDU, M & LIU, PP. Function of inv(16) fusion gene CBFB-MYH11. *Cur. Opin. Hematol.* 8: 201-205, 2001.

44. LANGMUIR, PB; APLENC, R; LANGE, BJ. Acute myeloid leukaemia in children. **Best Pract Res Clin Haematol.**, v.14, p.77-93, 2001.

45. LEBLANC T. & BERGER R. Molecular Cytogenetics of childhood acute myelogenous leukeamias. **Eur J Hematol**, v. 59, p. 1-13, 1997.

46. LICHTMAN MA AND LIESVELD JL (2001). Acute Myelogenous Leukemia. In: Williams Hematology, Chap. 93, p.1047, 6st edition.

47. LIEHR T, CLAUSSEN U. Multicolor FISH approaches for the characterization of human chromosomes in clinical genetics and tumor cytogenetics. **Curr Genomics**; 3: 213-35, 2002.

48. LIEHR, T; HELLER, A; STRAKE, H; RUBTSOV, N; TRIFONOV, V; MRASEK, K; WEISE, A; KUECHELER, A; CLAUSSEN, U. Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. **Int. J Mol. Med.**, 9:335-339, 2002.

49. LÜDECKE, HJ; SENGER, G, CLAUSSEN, U; HORSTHEMKE, B. Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. **Nature**, v. 338, p. 348-350, 1989.

50. MACEDO SILVA, M.L.; LAND, M.; HELLER, A.; ABDELHAY, E.; SOCORRO POMBO-DE-OLIVEIRA, M.; RIBEIRO, R.; ALVES, G.; LENER, D.; LIEHR, T. New rearrangement t(3;17)(q26.3;q12) in an AML patient with a poor outcome. **Oncol Rep.** v.3, p.663-66, 2005.
51. MANOLA KN. Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia. **Eur J Heamatol.** v., p., 2009.
52. MANTADAKIS, E; SAMONI, G; KALMANTI, M. A comprehensive review of acute promyelocytic leukemia in children. **Acta Haematol.**, v.119, p. 73-82, 2008.
53. MARQUES-SALLES TJ, LIEHR T, MKRTCHYAN H, RAIMONDI SC, TAVARES DE SOUZA M, DE FIGUEIREDO AF, ROUXINOL S, JORDY MACEDO FC, ABDELHAY E, SANTOS N, MACEDO SILVA ML. A new chromosomal three-way rearrangement involving MLL masked by a t(9;19)(p11;p13) in an infant with acute myeloid leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.** , v.189,p.59-62, 2009.
54. MECUCCI, C; VERMAELEN, K; KULLING, G; MICHAUX, JL; NOENS, L; VAN HOVE, W; TRICOT, G; LOUWAGIE, A & VAN DER BERGHE, H. Interstitial 9q-deletions in hematologic malignancies. **Cancer Genet and Cytogenet**, v. 12,p. 309-319, 1984.
55. MESHINCHI, S.; WOODS, W.G.; STIREWALT, D.L.; SWEETSER, D.A.; BUCKLEY, J.D.; TJOA, T.K.; BERNSTEIN, I.D.; RADICH J.P. Prevalence and prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 97, p. 89-94, 2001.
56. MEYER, C; SCHNEIDER, B; JAKOB, S; STREHL, S; ATTARBASCHI, A; SCHNITTGER, S ET AL. The MLL recombine of acute leukemia. **Leukemia**, v.20,p.777-784, 2006.
57. MEYER C, KOWARZ E, HOFMANN J, RENNEVILLE A, ZUNA J, TRKA J, BEN ABDELALI R, MACINTYRE E, DE BRAEKELEER E, DE BRAEKELEER M, DELABESSE E, DE OLIVEIRA MP, CAVÉ H, CLAPPIER E, VAN DONGEN JJ, BALGOBIND BV, VAN DEN HEUVEL-EIBRINK MM, BEVERLOO HB, PANZER-GRÜMAYER R, TEIGLER-SCHLEGEL A, HARBOTT J, KJELDSSEN E, SCHNITTGER S, KOEHL U, GRUHN B, HEIDENREICH O, CHAN LC, YIP SF, KRZYWINSKI M, ECKERT C, MÖRICKE A, SCHRAPPE M, ALONSO CN, SCHÄFER BW, KRAUTER J, LEE DA, ZUR STADT U, TE KRONNIE G, SUTTON R, IZRAELI S, TRAKHTENBROT L, LO NIGRO L, TSAUR G, FECHINA L, SZCZEPANSKI T, STREHL S, ILENCIKOVA D, MOLKENTIN M, BURMEISTER T, DINGERMANN T, KLINGEBIEL T, MARSCHALEK R. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. **Leukemia**, v.23, p. 1490-1499, 2009.

58. MINISTERIO DA SAUDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. MS/INCA. [1996-2009]. Incidência de câncer no Brasil – Estimativa 2008/2009. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em 10 de abril de 2009.

59. MINISTERIO DA SAUDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. MS/INCA. [1996-2009]. 2 fotografias coloridas. Disponível em: Fonte: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=344. Acesso em : 15 maio 2009.

60. MROZEK, K.; HEINONEN, K.; BLOOMFIELD, C.D. Prognostic value of Cytogenetics findings in adults with acute myeloid leukemia. **Int. J. Hematol.**, v. 72, p. 261-271, 2000.

61. MROZEK, K; HEINONEN, K; BLOOMFIELD, CD. Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. **Best Pract. & Res. Clinical Haematol.**, v. 14, p. 19-47, 2001.

62. MROZEK, K; HEINONEN, K; THEIL, KS; BLOOMFIELD CD. Spectral karyotyping in patients with acute myeloid leukemia and a complex karyotype shows hidden aberrations, including recurrent overrepresentation of 21q, 11q and 22q. **Genes Chromosomes Cancer**, v.34,p. 137-153, 2002.

63. MROZEK, K.; HEEREMA, N.A.; BLOOMFIELD, C.D. Cytogenetics in acute leukemia. **Blood Reviews**, v.18, p. 115-134, 2004.

64. MUELLER, B.U.; PABST, T.; OSATO, M. Et al. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 100, p. 998-1007, 2002.

65. NAKASE, K; BADSTOCK, K; SARTOR, M; GOTTLIEB, D; BYTH, K; KITA, K; SHIKU, H & KAMADA, N. Geographic heterogeneity of cellular characteristic of acute myeloid leukemia: a comparative study of Australian and Japanese adults cases. **Leukemia**, v. 14, p. 63-168, 2000.

66. NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Res.**, v. 20, p. 462-466, 1960.

67. NOWELL, P.C.; HUNGERFORD, D.A. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. **Science**, v. 132, p. 1497, 1960.

68. OSATO, M.; ASOU, N.; ABDALLA, E.; HOSHINO, K.; YAMASAKI, H.; OKUBO, T.; SUZUSHIMA, H.; TAKATSUKI, K.; KANNO, T.; SHIGESADA, K.; ITO, Y. Biallelic

and heterozygous point mutations in the runt domain of AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias. **Blood**, v. 93, p. 1817-1824, 1999.

69. PABST, T.; MUELLER, B.U.; HAKAWA, N.; SCHOCH, C.; HAFERLACH, T.; BEHRE, G.; HEDDEMANN, W.; ZHANG, D.E.; TENEN, D.G. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor CEBP α in t(8;21) myeloid leukemia. **Nat. Med.**, v. 7, p. 444–451, 2001.

70. PAGNANO, K.B.; TRAJINA, F.; TAKAHASHI, T.; OLIVEIRA, G.B.; ROSSINI, M.S.; LORAND-METZE, I.; VIGORITO, A.C.; MIRANDA, E.C.M.; SOUZA, C. A. Conventional chemotherapy for acute myeloid leukemia: a Brazilian experience. **São Paulo Medical Journal**, v. 118, p. 173-178, 2000.

71. PARKIN DM, STILLER CA, DRAPER GJ, BIEBER, CA. International incidence of childhood Cancer. Lyon: IARC Scientific Publication, 1988.

72. PENIKET, A; WAINSCOAT, J; SIDE, L; DALY, S; KUSEC, R; BUCK, G; WHEATLEY, K; WALKER, H; CHATTERS, S; HARRISON, C; BOULTWOOD, J; GOLDSTONE, A & BURNETT, A. Del(9q) AML: clinical and cytological characteristics and prognostic implications. **Brit J Haematol**, v. 129, p. 210-220, 2005.

73. PREUDHOMME, C.; SAGOT, C.; BOISSEL, N. et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). **Blood**, v. 100, p. 2717-2723, 2002.

74. PUI, CH; BEHM, FG. Pathology of acute myeloid leukemia. In Lilleyman J, Hann I & Blanchette V (eds). **Pediatric Hematology**, PP369-385. London:Churchill Livingstone, 1999.

75. RAIMONDI, S.C.; CHANG, M.N.; RAVINDRANATH, Y. et al. Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative Pediatric Oncology Group Study – POG 8821. **Blood**, v.94, p. 3707-3716, 1999.

76. RAVINDRANATH, Y; CHANG, M; STEUBER, CP ET AL. Pediatric Oncology Group (POG) studies of acute myeloid leukemia (AML): a review of four consecutive childhood AML trials conducted between 1981 and 2000. **Leukemia**, v. 19, p.2101-2116, 2005

77. REGO, M.F.N.; PINHEIRO, G.S.; METZE, K.; LORAND- METZE, I. Acute leukemias in Piauí: comparison with features observed in other regions of Brazil. **Braz. J. Med. And Biol. Res**, v. 36, p. 331-337, 2003.

78. ROWLEY, J.D. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. **Ann. Rev. Genet.**, v. 32,p. 495-519, 1999.

79. ROSS, J.A. Dietary flavonoids and *MLL* gene: a pathway to infant leukemia? **Proc Nat Acad Sci USA**, v. 97, p. 4411-4413, 2000.

80. ROWE, D.; COTTERILL, S.J.; ROSS, F.M.; BUNYAN, D.J.; VICKERS, S.J.; BRYON, J.; MCMULLAN, D.J.; GRIFFITHS , M.J.; REILLY, J.T.; VANDERBERGHE, E.A.; WILSON, G.; WATMORE, A.E.; BOWN, N.P. Cytogenetically cryptic AML1-ETO and CBF beta- MYH11 gene rearrangements: incidence in 412 cases of acute myeloid leukaemia. **Br. J. Haematol.** , v. 111, p. 1051-1056, 2000.

81. RUIZ-ARGUELLES GJ. Pomyelocytic leukemia in Mexican Mestizos. **Blood**, v. 89, p. 348-349, 1997.

82. RUND D, BEN-YEHUDA D. Therapy-related leukemia and myelodysplasia: evolving concepts of pathogenesis and treatment. **Hematology** v,9,p,179-187, 2004.

83. SALAMANCA, F.; ARMENDARES, S. C bands in human metaphase chromosomes treated by barium hydroxide. **Annual Review of Genetics**, 17(2):135-6, 1974.

84. SANDLER, D.P.; ROSS, J.A., Epidemiology of acute leukemia in children and adults. **Seminars in Oncology**, v.24 (1), p.3-16, 1997.

85. SCHNITTGER, S.; KINKELIN, U.; SCHOCH, C.; HEINECKE, A.; HAASE, D.; HAFERLACH, T.; BUCHNER, T.; WORMANN, B.; HIDDEMANN, W.; GRIESINGER, F. Screening for *MLL* tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subst os AML. **Leukemia**, v. 14, p. 796-804, 2000.

86. SCHNITTGER, S.; SCHOCH, C.; DUGAS, M.; KERN, W.; STAIB, P.; WUCHTER, C.; LÖFFLER, H.; SAUERLAND, C.M.; 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**, v.100, p.59-66, 2002.

87. SCHRÖCK E, DU MANOIR S, VELDMAN T, SCHOELL B, WIENBERG J, FERGUSON-SMITH MA, NING Y, LEDBETTER DH, BAR-AM I, SOENKSEN D, GARINI Y, RIED, T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. **Science**, v. 273,p. 494-497, 1996.
88. SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet**, v. 2, p. 971-972, 1971.
89. SENGER, G; LÜDECKE, HJ ; HORSTHEMKE, B ;CLAUSSEN, U. Microdissection of banded human chromosomes. **Hum Genet.**, v.84p. 507-511, 1990.
90. SILVA MLM, RAIMONDI SC, ABDELHAY E, GROSS M, MKRTCHYAN H, DE FIGUEIREDO AF, RIBEIRO RC, DE JESUS MARQUES-SALLES T, SOBRAL ES, GERARDIN LAND MP, LIEHR T. Banding and molecular cytogenetic studies detected a CFBF-MYH11 fusion gene that appeared as abnormal chromosomes 1 and 16 in a baby with acute myeloid leucemia FAB M4-Eo. **Cancer Genet. Cytogenet.** , v. , p.182, 56-60, 2008.
91. SLOVAK, M.L.; KOPECKY, K.J.; CASSILETH, P.A., et al. Karyotypic analysis predicts outcome of pre-remission and post-remission therapy in adult acute myeloid leukemia : a Southwest Oncology Group/ Eastern Cooperative Oncology Group Study. **Blood**, v. 96, p. 4075-4083, 2000.
92. SPEICHER, M.R.; BALLARD, St; WARD, D.C. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multicolor FISH. **Nat Genet** , v.2, p. 368-375, 1996.
93. STARK, B; JEISON, M; GABAY, LG; MARDOUKH, J; LURIA, D; BAR-AM, I; AVRAHAMI, G; KAPELIUSHNIK, Y; STHOEGER, D; HERZEL, G; STEINBERG, DM; COHEN, IJ; GOSHEN, Y; STEIN, J; ZAIZOV, R & YANIV, I. Classical and Molecular cytogenetic abnormalities and outcome of childhood acute myeloid leukaemia: report from a referral centre in Israel. **Brit J of Haematol**, v. 126, p. 320-337, 2004.
94. TELENIUS, H; CARTER, NP; BEBB, CE; NORDENSKJOLD, M; PONDER, BA; TUNNACLIFFE, A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. **Genomics**,v. 13,p.718-725, 1992.
95. TESTA, J.R.; MISAWA, S.; OGREMA, N.; VAN SLATEN, K.; WIERNIK, P.H. Chromosomal alterations in acute leukemia patients. Studies with improved culture methods. **Cancer Res.**, v. 45, p. 430-434, 1985.
96. TOSI, S; HARBOTT, J; TEIGLER-SCHLEGEL, A ET AL; t(7;12)(q36;p13), a new recurrent translocation involving ETV6 in infant leukaemia. **Genes Chromosomes and Cancer**, v. 29,p.325-332, 2001.

97. USERLOGIC [2001]. 1 fotografia colorida. Disponível em: <[http:// www. userlogic. com/anll/ studyaids/ maturationchart/ maturation_ chart.html](http://www.userlogic.com/anll/studyaids/maturationchart/maturation_chart.html)>. Acesso em: 20 maio 2009.
98. VAN PROOIJEN-KNEGT AC, VAN HOEK JF, BAUMAN JG, VAN DUIJN P, WOOL IG, VAN DER PLOEG M. In situ hybridization of DNA sequences in human metaphase chromosomes visualized by indirect fluorescent immunocytochemical procedure. **Exp. Cell Res.** , v.141,p. 397-407, 1982.
99. VARDIMAN, J.W.; HARRIS, N.L.; BRUNING, R.D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasm. **Blood**, v.100, p.2292-2302, 2002.
- 100.VIANA, M.B.; CUNHA, K.C.C.M.S.; RAMOS, G.; MURAO, M. Acute myeloid leukemia in childhood: fifteen-year experience in a single institution. **Jornal de Pediatria**, v. 79, p. 489-496, 2003.
101. WIEMELS, JL; CAZZANIGA, G; DANIOTTI, M; EDEN, OB; ADDISION, GM; MASERA, G ET AL. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukemia in children, **Lancet**,v. 354,p. 1499-1503, 1999.
102. WEISE, A; MRASEK, K; FICKELSCHER, I; CLAUSSEN, U; CHEUNG, SW; CAI, WW; LIEHR, T; KOSYAKOVA,N. Molecular Definition of high-resolution Multicolor Banding Probes: First within the human DNA sequence anchored FISH banding probe set. **J Hist & Cytoch.**,v.56, p. 487-493, 2008.
103. 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, R.; NAOE, T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. **Blood**, v. 97, p. 2434-2439, 2001.
104. YANO, T; NAKAMURA, T; BLECHMAN, J; SORIO, C; DANG, CV; GEIGER, B; ET AL. Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct elements at N terminus of the protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**,v 94,p.7286-7291, 1997.
105. YU, M.; HONOKI, K.; ANDERSEN, J.; PAIETTA, E.; NAM, D.K.; YUNIS, J.J. MLL tandem duplication and multiple splicing in adult acute myeloid leukemia with normal karyotype. **Leukemia**, v. 10, p. 774 –780, 1996.

106. YU, BD; HANSON, RD; HESS, JL; HORNING, SE; KORSMEYER, SJ. MLL, a mammalian thritorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.10632-10636, 1998.

107. ZECH, L. Investigation of metaphase chromosomes with DNA-binding. **Exp Cell Res**, v. 58, p. 463, 1969.

13. Anexos

13.1. Publicação



Cancer Genetics and Cytogenetics 193 (2009) 123–126

CANCER GENETICS
AND
CYTOGENETICS

Short communication

A case of childhood acute myeloid leukemia AML (M5) with a neocentric chromosome neo(1)(qter → q23~24::q23~24 → q43 → neo → q43 → qter) and tetrasomy of chromosomes 8 and 21

Amanda Faria de Figueiredo^{a,b}, Hasmik Mkrtychyan^c, Thomas Liehr^c, Eliane Maria Soares Ventura^d, Terezinha de Jesus Marques-Salles^d, Neide Santos^e, Raul Corrêa Ribeiro^f, Eliana Abdelhay^b, Maria Luiza Macedo Silva^{b,*}

^aCarlos Chagas Filho Biophysics Institute, Federal University of Rio de Janeiro (U.F.R.J.), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^bCytogenetic Laboratory, The National Center for Bone Marrow Transplant (CEMO-INCA), National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^cInstitute of Human Genetics and Anthropology, Jena, Germany

^dPediatric Oncohematology Center, Hospital Oswaldo Cruz, Pernambuco University, Recife, PE, Brazil

^eGenetic Department of Federal University of Pernambuco, Recife—PE, Brazil

^fDepartment of Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN

Received 20 February 2009; received in revised form 18 April 2009; accepted 27 April 2009

Abstract

Hyperdiploidy is rarely observed in childhood acute myeloid leukemia (AML). Described here is the case of a 2½-year-old girl with AML-M5 and 51 chromosomes characterized by double tetrasomy of chromosomes 8 and 21 and also a neocentric derivative chromosome neo(1)(qter → q23~24::q23~24 → q43 → neo → q43 → qter). Little is known about the prognostic significance of these chromosomal abnormalities in childhood AML. In the actual case, complete remission was achieved after chemotherapy, which continued for 7 months. No acquired neocentric chromosome 1 has been described previously, even though neocentromere formation has been reported for other chromosomes in neoplasms. © 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is rare and occurs in about 15% of cases of childhood leukemia. Chromosomal abnormalities are found in 68–85% of childhood AML. Specific cytogenetic findings have identified AML subgroups with unique clinical, biological, and outcome characteristics, including t(15;17), inv(16), t(8;21), t(1;22), t(6;9), and 11q23 rearrangements [1]. Several other cytogenetic abnormalities have been described in AML, but are too rare to be correlated with any AML subgroup or specific clinical outcome. Neocentric marker chromosome is one such rare abnormality, previously reported in only two cases of AML [2]. In general, a neocentric marker chromosome is characterized by the presence of a new centromere that formed on chromosomal locations other than the original centromere, without α -satellite DNA. However, the new centromere binds to all known essential centromere proteins and behaves in the same manner as the original centromere during cellular division.

In terms of numeric alterations, there are only a few reports of polyploidy, tetraploidy, or near-tetraploidy in adult and childhood AML. The most frequent chromosomes gained are 8, 19, and 21 [3]. Beyer et al. [4] reported that, in patients with polysomy 8, the majority of the FAB subtypes were represented by M4 and M5 leukemia (55%); tetrasomy 8 was the most frequent polysomy, occurring in 88% of the patients. Otherwise, tetrasomy 21 as a sole cytogenetic abnormality is very rare; it has been reported in only 12 cases, of which 6 cases were AML and the most common FAB subtype was AML-M2 [5].

Here, we describe a pediatric case of AML-M5a with a very rare hyperdiploid karyotype with tetrasomy of chromosomes 8 and 21 and a novel neocentromere rearrangement.

2. Materials and methods

2.1. Case report

A 2½-year-old girl referred to the Pediatric Oncohematology Center, University Hospital Oswaldo Cruz (Recife, Pernambuco) had a 1-month history of anemia, appetite loss, easy bruising, skin bleeding, and epistaxis. Physical

* Corresponding author. Tel.: +55-21-2506-6872; fax: +55-21-2506-6865.

E-mail address: luizamacedo@inca.gov.br (M.L.M. Silva).

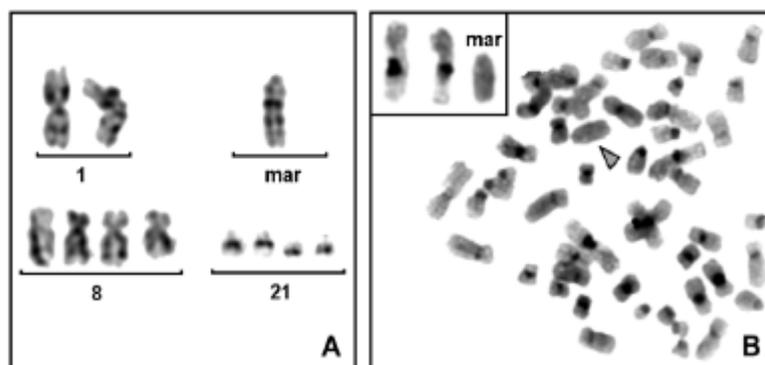


Fig. 1. (A) Partial GTG-banding karyogram revealed the karyotype 51,XX,+8,+8,+21,+21,+mar. (B) C-banding confirmed absence of alphoid satellite on derivative chromosome 1. The arrow indicates the neocentromeric marker chromosome.

examination revealed petechiae, hepatosplenomegaly (the liver was 2.5 cm and the spleen was 12 cm below the costal margins), and generalized adenopathy, with the largest node measuring 3 cm. Hemoglobin was 5.5 g/dL, hematocrit was 17%, white blood cell count was $31 \times 10^3/\mu\text{L}$ with 52% blast cells and lactate dehydrogenase was 440 U/L. The platelet count was $22 \times 10^3/\mu\text{L}$. The morphologic evaluation showed the presence of hypercellular bone marrow, with 80% large monoblast cells with delicate lacy chromatin, up to three large prominent vesicular nucleoli, and abundant basophilic cytoplasm. The finding was compatible with a diagnosis of AML-M5a. Flow cytometry revealed a population of blast cells that expressed CD45, CD7, CD33, CD4, CD13, and CD117.

The child was treated on the AML-BFM98 protocol and complete remission was achieved and persisted for 17 months after diagnosis.

2.2. Cytogenetic analysis

Bone marrow cells obtained at diagnosis were cultivated for 24 hours without mitogenic stimulation and were

processed as previously reported [6]. GTG-banding and C-banding were done according to standard protocol [7]. A peripheral blood cell culture stimulated by phytohemagglutinin yielded normal results, which ruled out constitutional abnormality. Chromosomes were identified and analyzed in accordance with ISCN 2005 [8].

2.3. Molecular cytogenetic analysis

Fluorescence in situ hybridization (FISH) using Vysis centromeric enumeration probe CEP 1 and locus-specific identifier LSI MLL dual-color break-apart probes was done according to the instructions of the manufacturer (Abbott Molecular, Des Plaines, IL; Wiesbaden-Delkenheim, Germany). Multicolor banding, multicolor FISH DNA probe labeling, and FISH were done as previously described [9,10].

3. Results

GTG-banding revealed the karyotype 51,XX,+8,+8,+21,+21,+mar[20] (Fig. 1A). To better characterize the

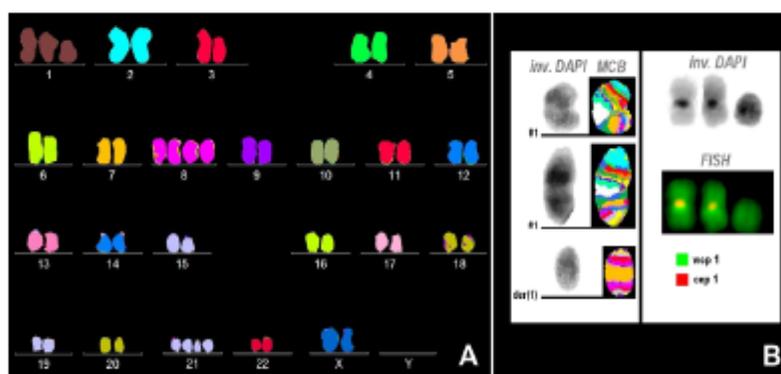


Fig. 2. Fluorescence in situ hybridization (FISH) results characterized the hyperdiploid karyotype and neocentromeric chromosome. (A) Multicolor-FISH confirmed tetrasomy of chromosomes 8 and 21, and the marker chromosome was revealed as a derivative chromosome 1. (B, left) Multicolor banding (MCB) for chromosome 1 revealed an inverted duplication of 1q23–24 → 1qter. (B, right) A centromeric enumeration probe CEP 1 probe (Abbott Molecular Inc.) and whole chromosome paint (WCP) for chromosome 1 identified the neocentromeric marker chromosome. DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole.

karyotype and the chromosomal marker, we conducted a more detailed investigation by using multicolor-FISH, multicolor banding for chromosomes 1 and 8, and additional CEP 1 (Fig. 2). C-banding was performed to confirm absence of alphoid satellite on derivative chromosome 1 (Fig. 1B). The *MLL* gene was not rearranged (data not shown). The karyotype was recharacterized as 51, XX,+neo(1)(qter→q23~24::q23~24→q43→neo→q43→qter),+8,+8,+21,+21.

4. Discussion

Hyperdiploidy (>49 chromosomes) and tetraploidy (4n) are rare cytogenetic abnormalities in AML, especially in childhood AML. Their clinical significance is unknown [11]. In a study of 11 cases, Iyer et al. [3] found that chromosomes 8 and 19 were gained in the majority of cases; other frequently gained chromosomes included 13, 15, and 21. Isolated tetrasomy 8, a relatively rare chromosomal abnormality, has been reported in only 20 cases of hematological disorders [3,12]. Notably, only one report with tetrasomy 8 as a primary chromosomal abnormality in childhood AML has been published [13]. Due to the rare event of this aberration the prognostic impact on the outcome in childhood AML was not described. However recently it has been shown that in adults AML tetrasomy 8 is associated with a poor prognosis [4,12,14]. Tetrasomy 21 as a sole cytogenetic abnormality is very rare being more frequently found in cases of hyperdiploid ALL [15]. Here we report on a 2½-year-old girl with AML-M5a revealing a very rare hyperdiploidy karyotype with tetrasomy of chromosomes 8 and 21, and a novel rearrangement neo(1)(qter→q23~24::q23~24→q43→neo→q43→qter). It is known that the most common derivative chromosomes with neocentromeres are inverted duplications (inv dup), which are usually asymmetrical with respect to the position of the neocentromere; this may respect an asymmetry of the chromosome itself [16]. Although neocentromere formation is in general a rare occurrence, certain cancers are associated with neocentromeric chromosomes. Notably, lipomatous tumors in which the region from 12q14~15 is amplified on marker chromosomes with alphoid centromeres are aggressive, metastatic tumors, and thus have a very different behavior from that of the well-differentiated liposarcomas (ALP-WDLPS) with neocentromeric marker chromosome with the same amplified region [17]. In AML, neocentromeric chromosomes have been described in two cases, one with a derivative of chromosome r(8) [18] and the other with inv dup(10q) [19].

In conclusion, we have described a case of childhood AML-M5a with a rare hyperdiploid karyotype (tetrasomy of chromosomes 8 and 21) and a novel rearrangement, neo(1)(qter→q23~24::q23~24→q43→neo→q43→qter). Although tetrasomy 8 has been associated with a poor prognosis in adults, in the present case complete remission

was achieved and, as of writing, had persisted for 12 months. Nonetheless, in pediatric AML the clinical significance of this unusual karyotype remains elusive.

Acknowledgments

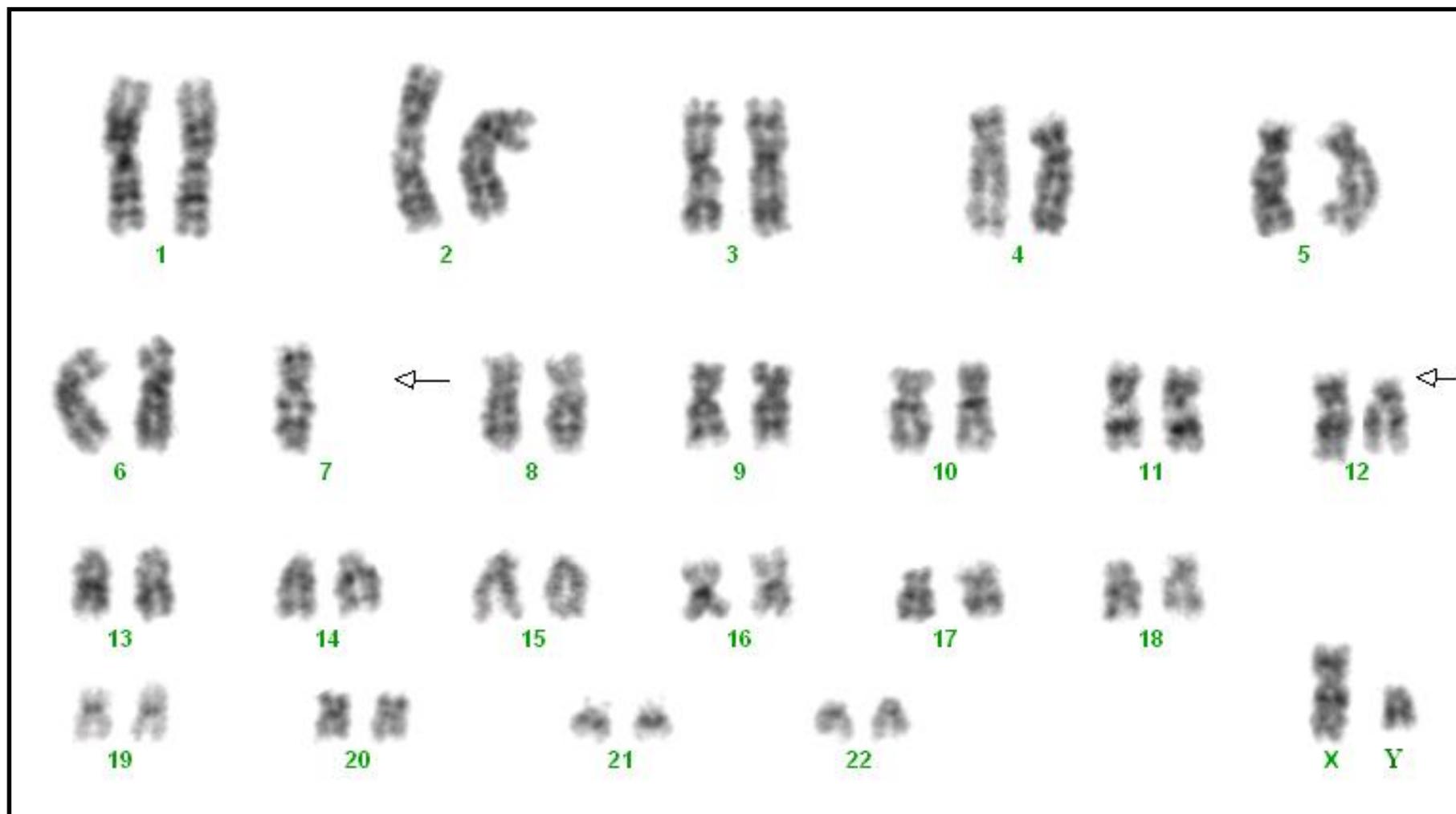
This work was supported by CAPES (project no. 301/08)—German Academic Exchange Service (DAAD) (no. D/07/09624); Research Support Foundation of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ) (no. 170.434/2007); and the Interdisciplinary Center for Clinical Research (IZKF; Germany) together with Thuringian Ministry of Science, Research, and Culture (TMWFK) (TP 3.7 and B307-04004), the Leukemia Foundation and Stefan-Morsch Foundation (Germany); and in part by the Cancer Center Support Grant CA from the U.S. National Institutes of Health, and by the American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC).

References

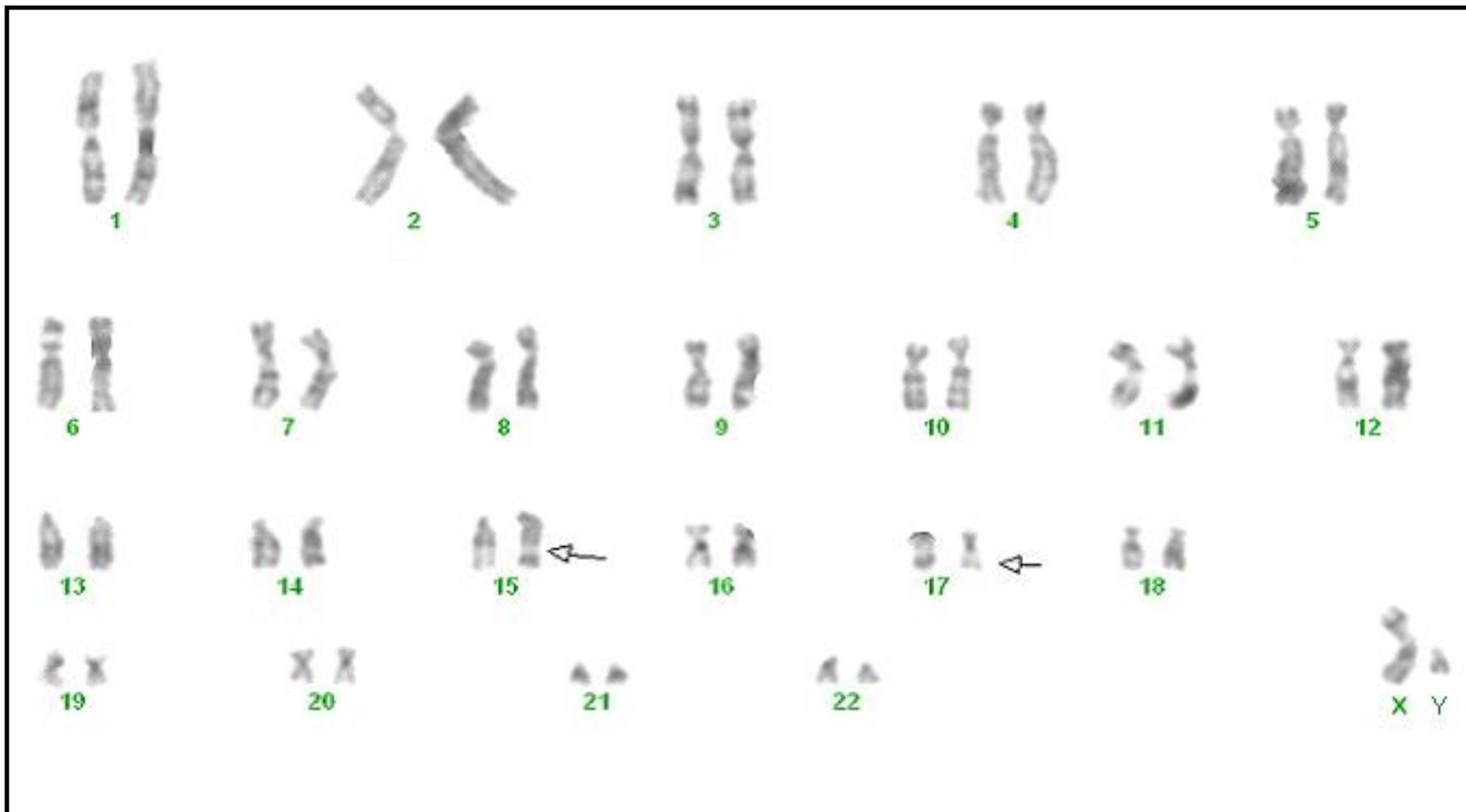
- [1] Raimondi SC, Chang MN, Ravindranath Y, Behm FG, Gresik MV, Steuber CP, Weinstein HJ, Carroll AJ. Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative Pediatric Oncology Group study POG 8821. *Blood* 1999;94:3707–16.
- [2] Marshall O, Chueh AC, Wong LH, Choo KH. Neocentromeres: new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution. *Am J Hum Genet* 2008;82:261–82.
- [3] Iyer RV, Sait SN, Matsui S, Block AW, Barcos M, Slack JL, Wetzel M, Baer MR. Massive hyperdiploidy and tetraploidy in acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;148:29–34.
- [4] Beyer V, Mühlematter D, Parlier V, Cabrol C, Bougeon-Mamin S, Solenthaler M, Tobler A, Pagin P, Gregor M, Hitz F, Hess U, Chapuis B, Laurencet F, Schanz U, Schmidt PM, van Melle G, Jotterand M. Polysomy 8 defines a clinico-cytogenetic entity representing a subset of myeloid hematologic malignancies associated with a poor prognosis: report on a cohort of 12 patients and review of 105 published cases. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;160:97–119.
- [5] Shin MG, Choi HW, Kim HR, Kim MJ, Baek HJ, Han DK, Kook H, Hwang TJ, Kim HJ, Kim SH, Shin JH, Suh SP, Ryang DW. Tetrasomy 21 as a sole acquired abnormality without *GATA1* gene mutation in pediatric acute megakaryoblastic leukemia: a case report and review of the literature. *Leuk Res* 2008;32:1615–9.
- [6] Macedo Silva ML, Raimondi SC, Abdelhay E, Gross M, Mikric-hyan H, de Figueiredo AF, Ribeiro RC, de Jesus Marques-Salles T, Sobral ES, Gerardin Land MP, Liehr T. Banding and molecular cytogenetic studies detected a *CBFβ-MYH11* fusion gene that appeared as abnormal chromosomes 1 and 16 in a baby with acute myeloid leukemia FAB M4-Eo. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;182:56–60.
- [7] Verma RS, Bahu A. Human chromosomes: a manual of basic techniques. New York: McGraw-Hill Education, 1989. pp. 72–81.
- [8] ISCN 2005: an international system for human cytogenetic nomenclature (2005). In: Shaffer LG, Tommerup N, editors. Basel: S. Karger.
- [9] Weise A, Mrasek K, Fickelscher I, Claussen U, Cheung SW, Cai WW, Liehr T, Kosyakova N. Molecular definition of high-resolution multicolor banding probes: first within the human DNA sequence anchored FISH banding probe set. *J Histochem Cytochem* 2008;56:487–93.

13.2. Cariótipos

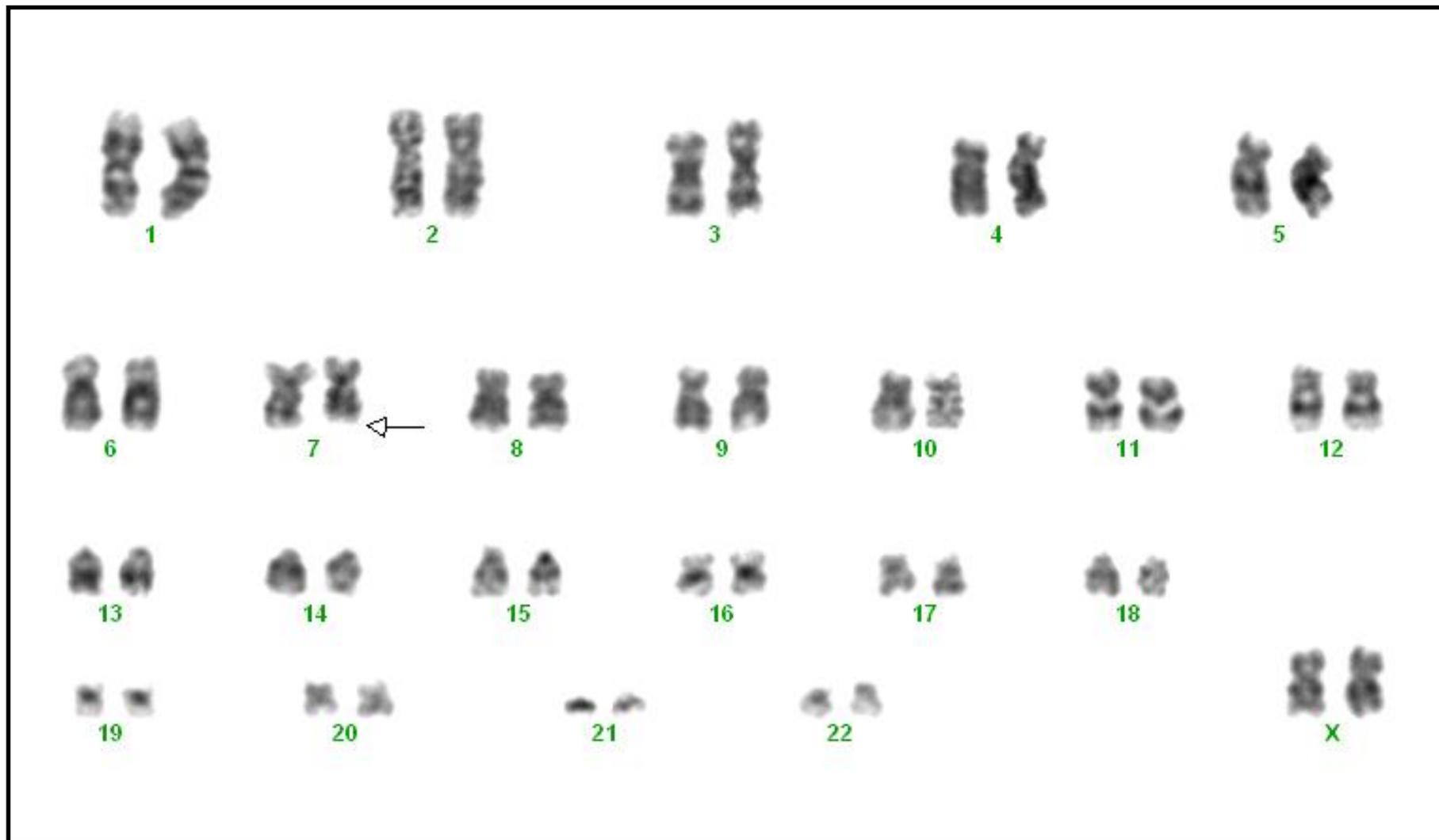
Cariótipos ilustrativos de perfis cromossômicos de alguns pacientes são mostrados a seguir. As setas indicam as anormalidades citogenéticas encontradas em cada paciente.



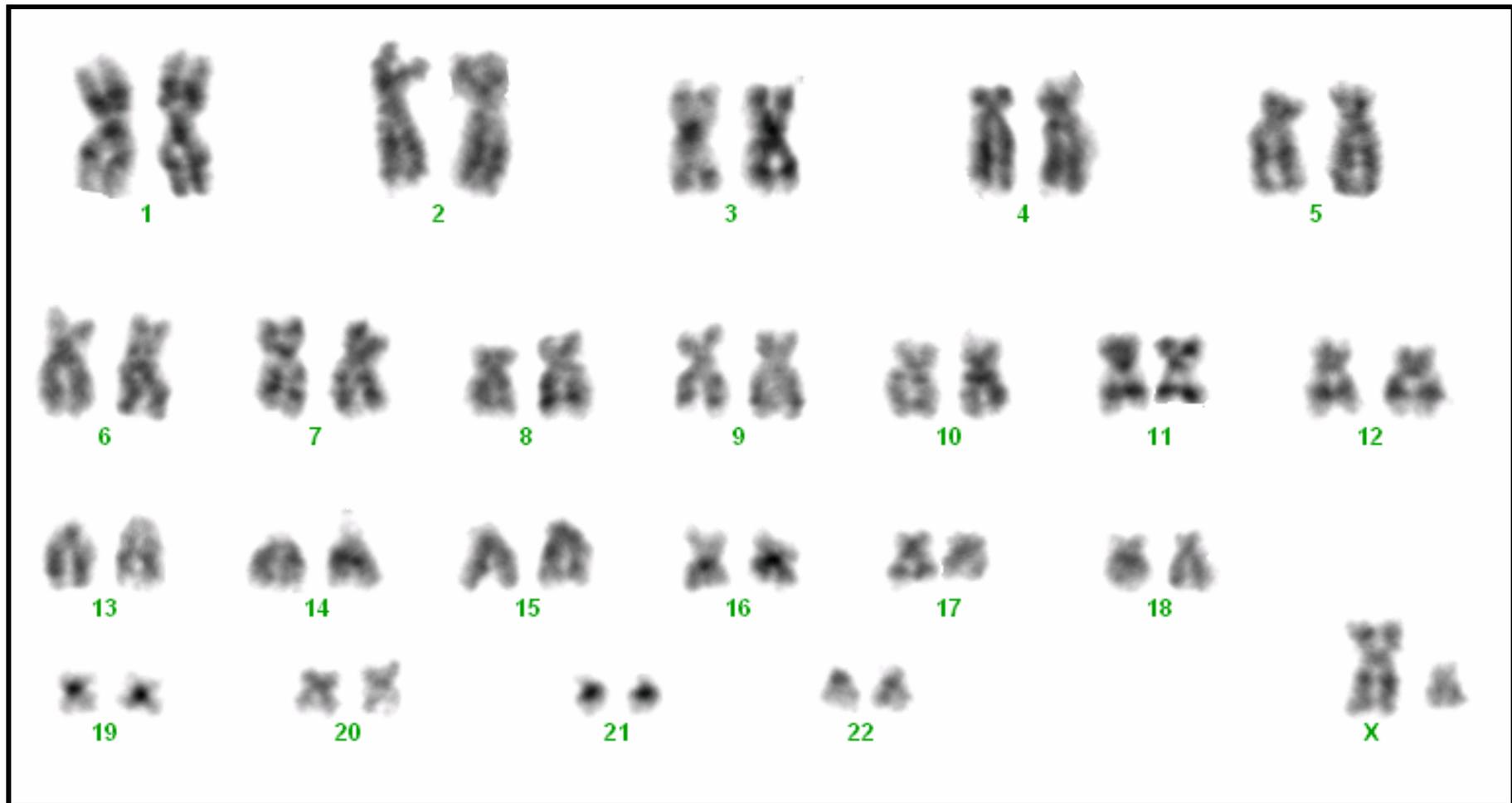
Paciente 7 – Cariótipo : 46, XY, -7, del(12)(p12)



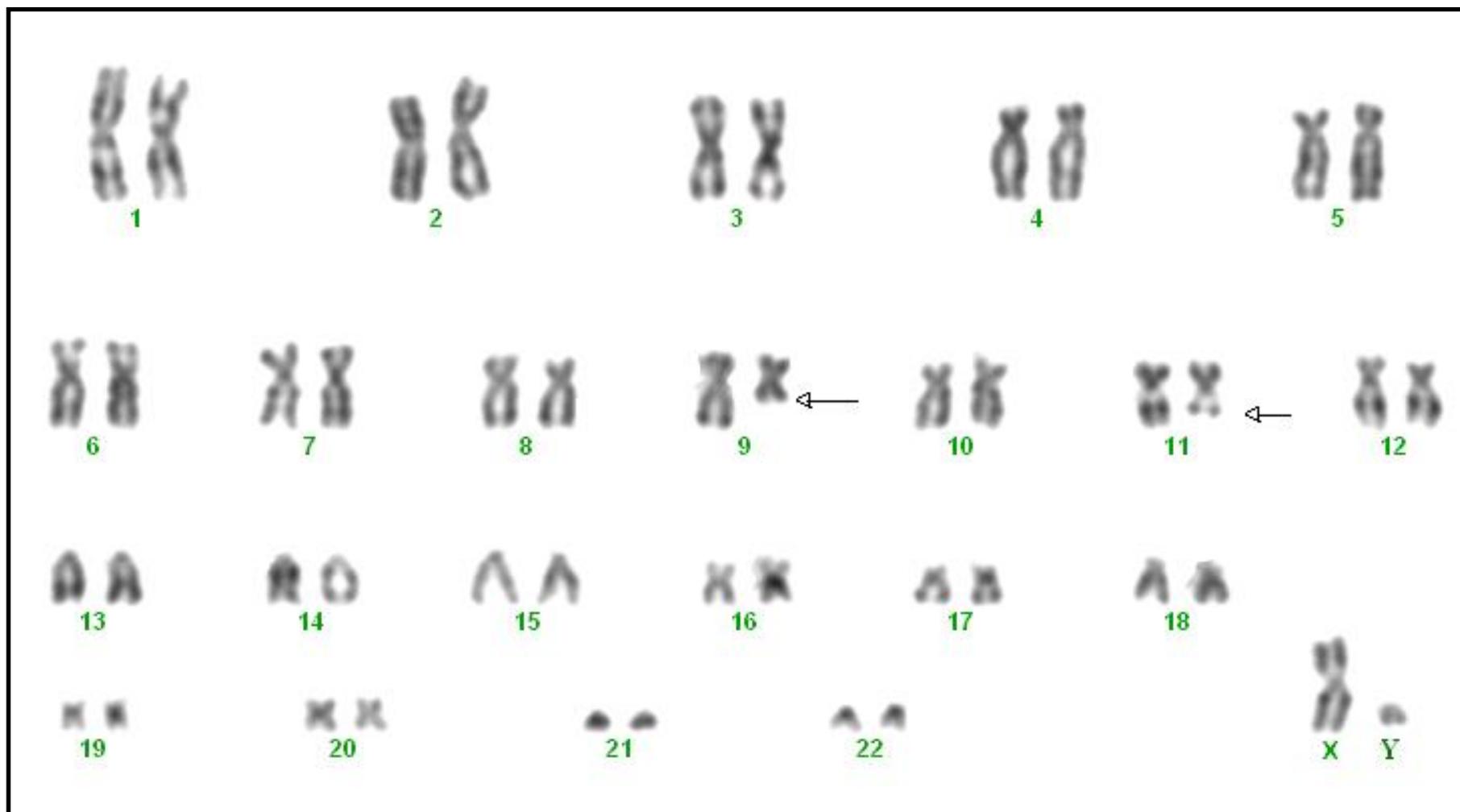
Paciente 13 – Cariótipo: 46, XY, t(15;17)(q22;q12)



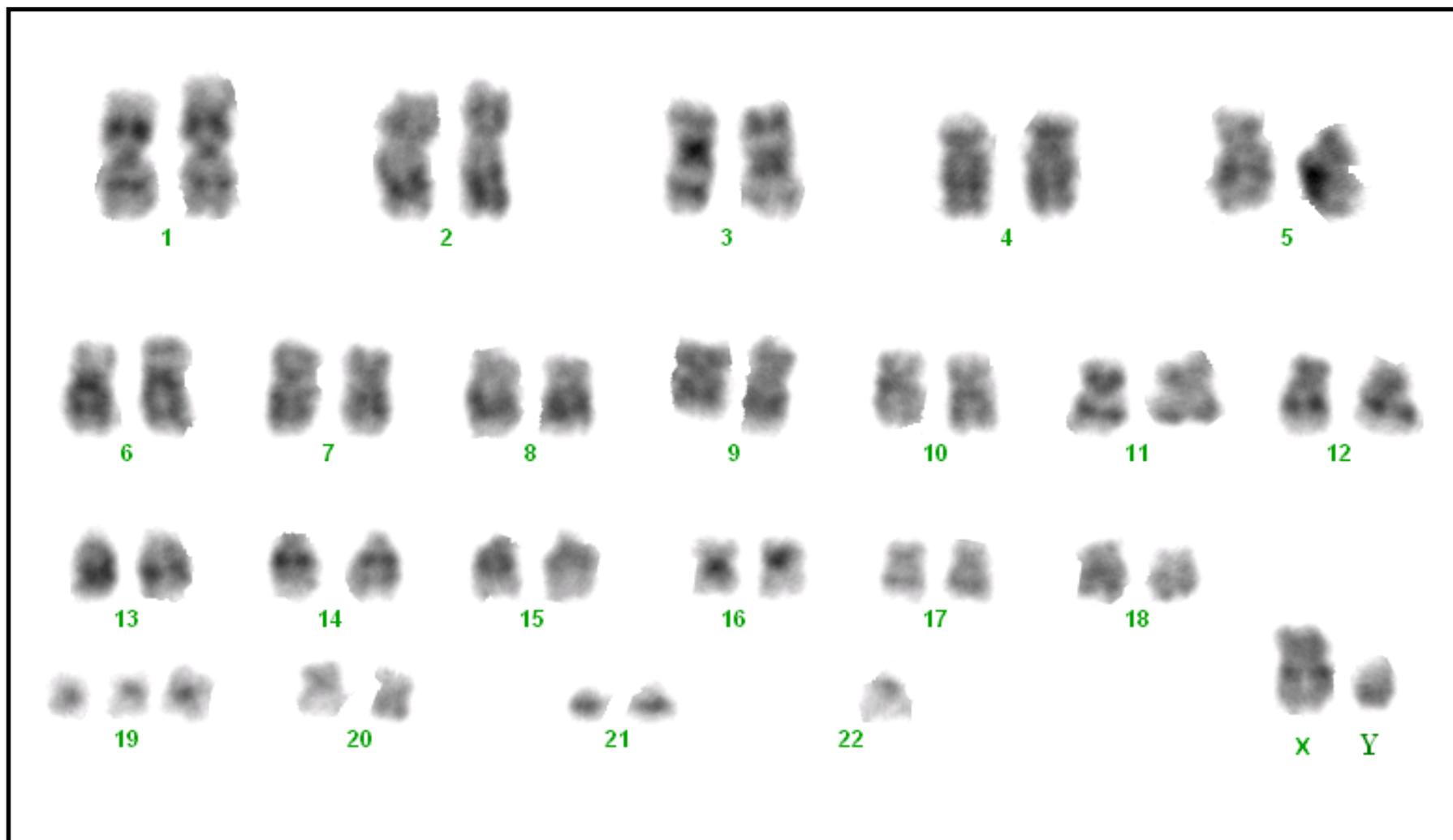
Paciente 14 - Cariótipo: 46, XX, del(7)(q32)



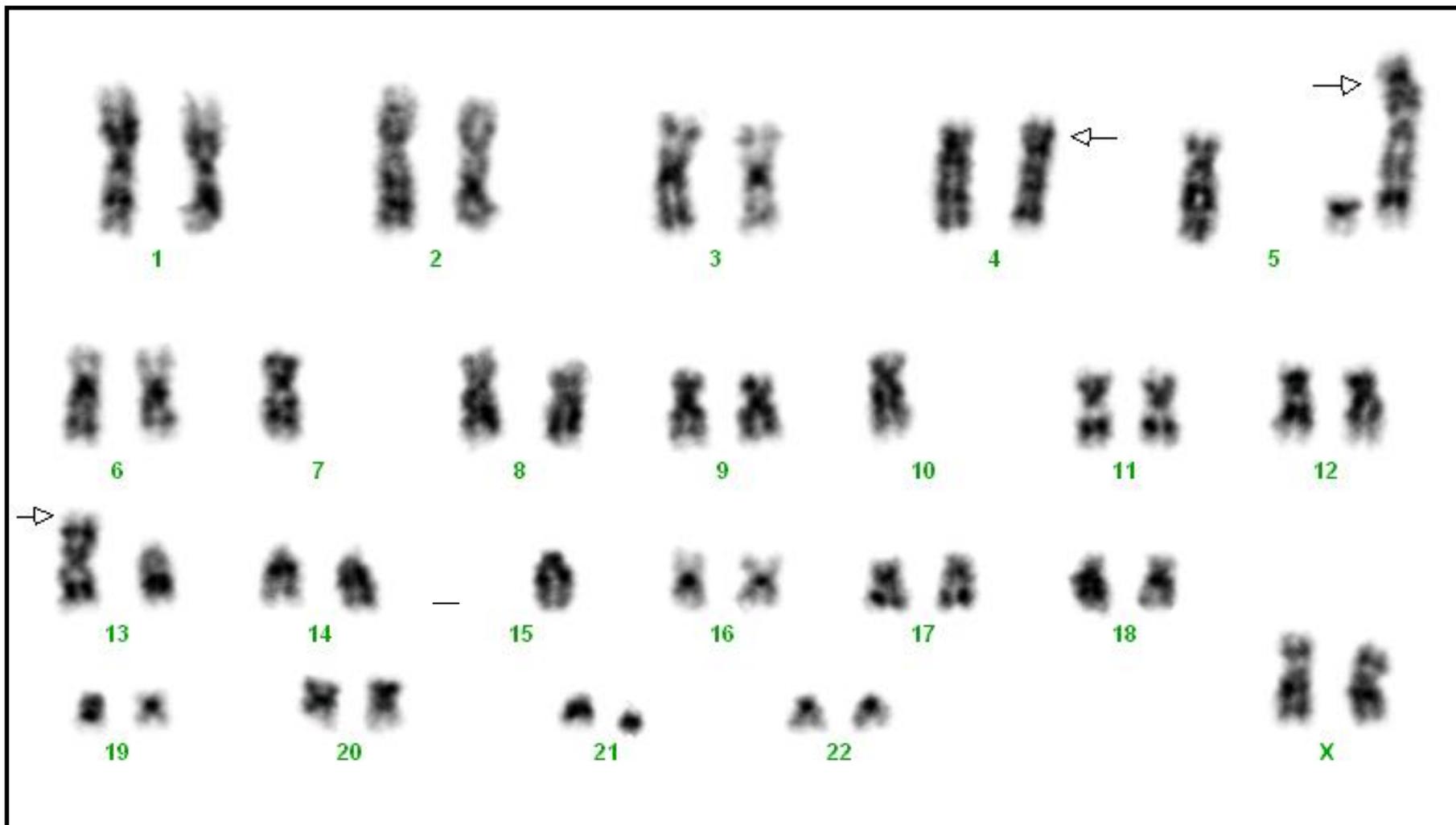
Paciente 18 – Cariótipo :46, XY, t(15;17)(q22;q12), del(11)(q23)



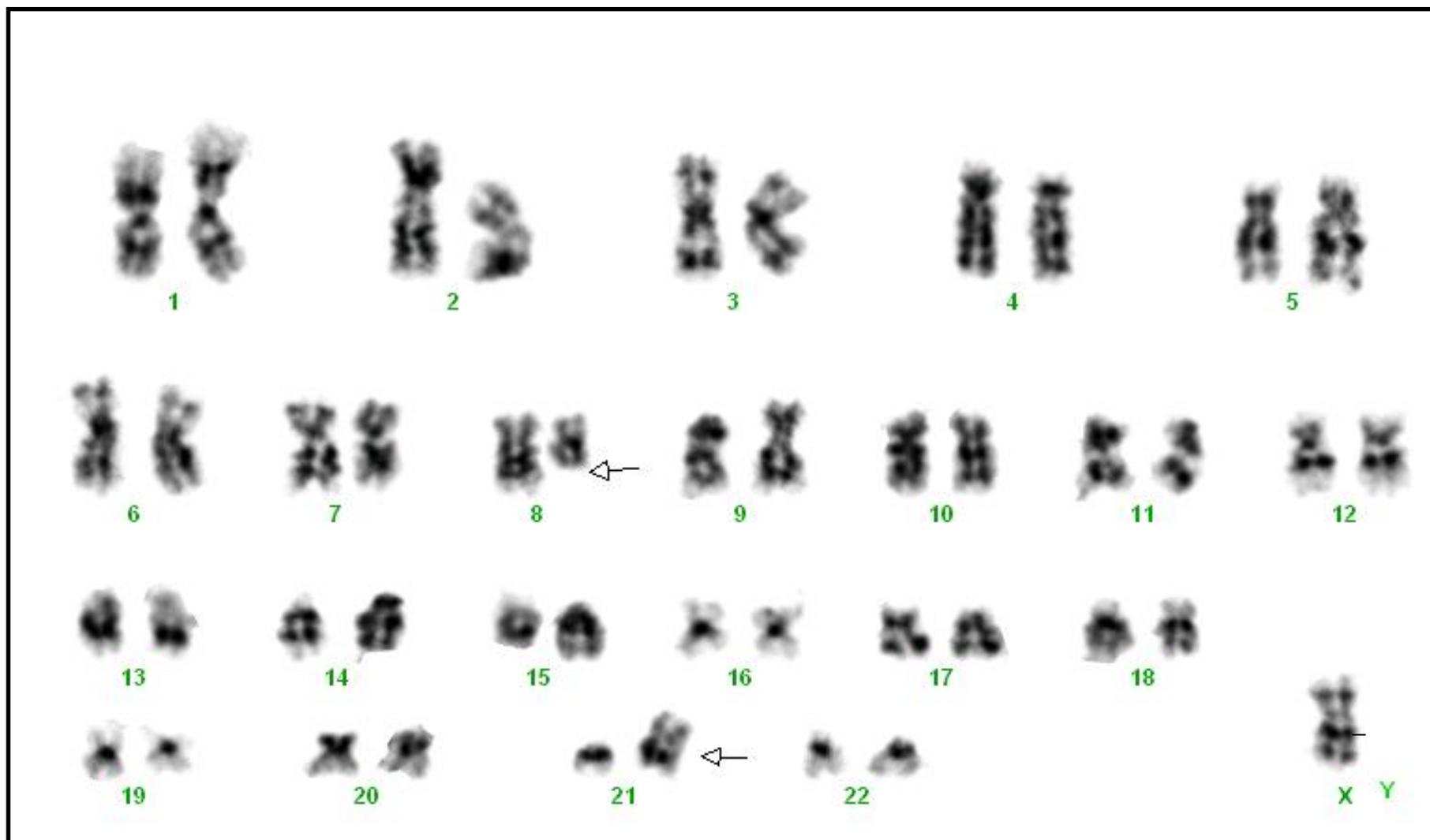
Paciente 22 - Cariótipo: 46, XY, del(9)(q31), t(X;11)(p22;q22)



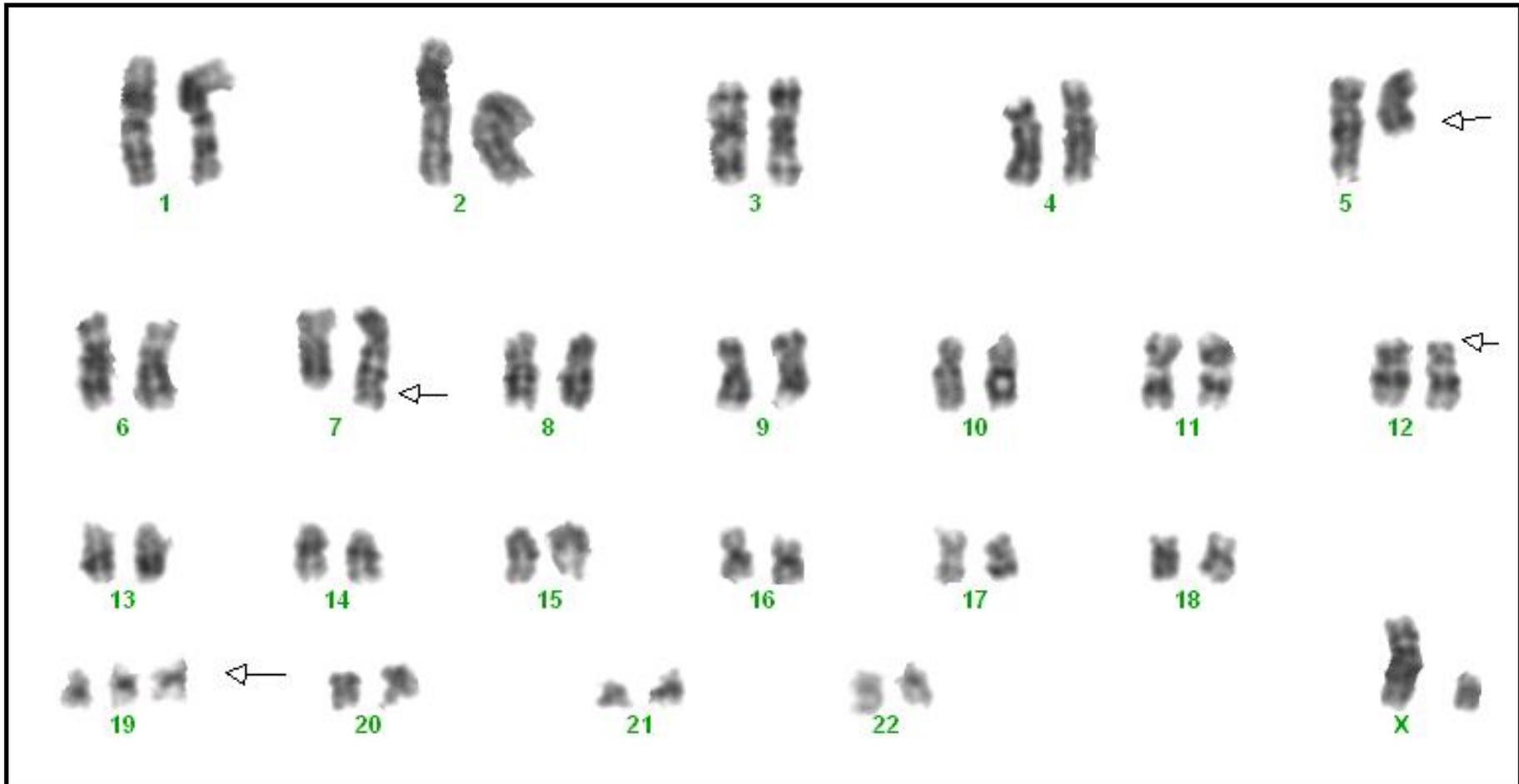
Paciente 23 – Cariótipo: 46, XY, inv(16)(p13q22), +19,-22



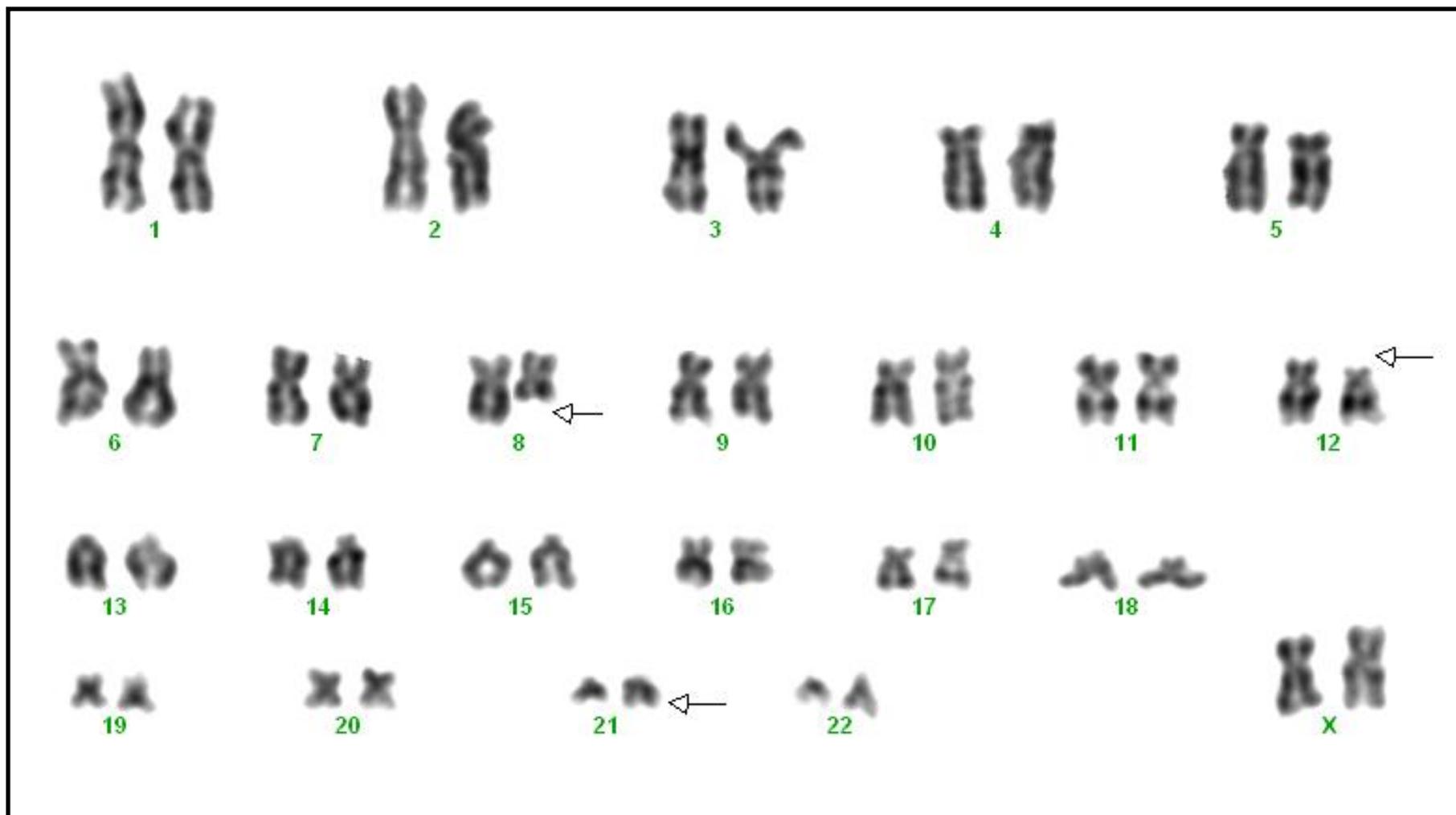
Paciente 27– Cariótipo : 44, XX,?der(4), -5, -7, -10,?dic(13), -15, +2 mars



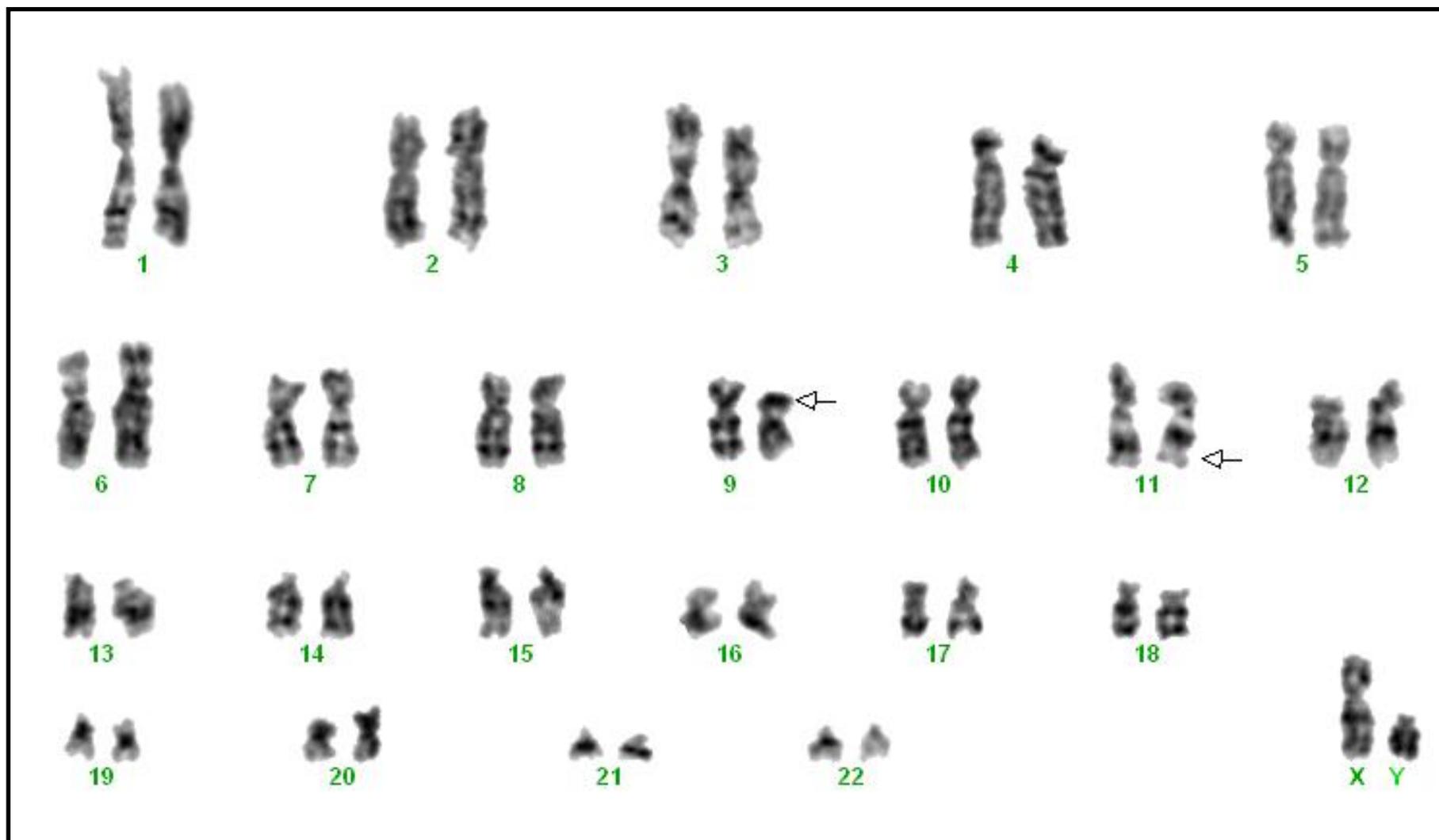
Paciente 28 – Cariótipo : 45, XY,-Y , t(8;21)(q22;q22)



Paciente 32 – Cariótipo: 46, XY, del(5)(q21), der(7)t(7;?)(q34;?),del(12)(p12)



Paciente 36 - Cariótipo : 46, XX, t(8;21)(q22;q22), del(12)(p12)



Paciente 48 – Cariótipo: 46, XY, t(9;11)(p22;q23)

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](#)