

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Mariela Granero Farias

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMUNOFENOTÍPICA DE 35 CASOS DE
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA PEDIÁTRICA**

Porto Alegre
Março de 2010

Mariela Granero Farias

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMUNOFENOTÍPICA DE 35 CASOS DE
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA PEDIÁTRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de **mestre** em Ciências Médicas.

Orientadora: Dra. Lúcia Silla

Porto Alegre
Março de 2010

1 F224C FARIAS, MARIELA GRANERO

Caracterização molecular e imunofenotípica de 35 casos de leucemia linfóide aguda pediátrica / Mariela Granero Farias ; orient. Lúcia Silla. – 2010.

87 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Leucemia-linfoma linfoblástico de células precursoras 2. Imunofenotipagem 3. Reação em cadeia da polimerase 4. Prognóstico 5. Terapia I. Silla, Lúcia Mariano da Rocha II. Título.

NLM: WH 250

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos...

... à Dra. Lúcia Silla pela sua orientação em todos os momentos da execução deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, pela ajuda e grande incentivo nas horas difíceis;

... ao Dr. José Andres Yunes, do Centro Infantil Boldrini, por ceder gentilmente as linhagens celulares utilizadas como controles positivos para as translocações estudadas; pela orientação na realização dos PCR's; pela generosidade nos ensinamentos transmitidos e principalmente pelo incentivo e apoio;

... às colegas Alice Pinheiro Machado e Fernanda de Paris, da Unidade de Biologia Molecular pela amizade, estímulo e auxílio técnico.

... à Dra Liane Esteves Daudt, do Serviço de Hematologia Clínica e ao Dr Algermir Lunardi Brunetto, do Serviço de Oncologia Pediátrica, por gentilmente ceder as amostras dos pacientes para o estudo;

... à Dra Marina Michalowski, do Hospital da Criança Santo Antônio, pelas informações, apoio e participação no estudo;

... ao Dr Tiago Rodrigues Nava, pela colaboração desde o início do projeto e auxílio nas coletas das amostras;

... a todos os colegas da Unidade de Hematologia pela compreensão e apoio nos momentos que necessitei me afastar da rotina;

... à minha família e amigos, pelo apoio incondicional, carinho, incentivo e compreensão em todas as horas.

*“Existem duas coisas que nunca devem ser esquecidas:
Paciência – isto é deixar que as coisas sigam seu rumo –
e Fidelidade ao que se quer.”
(Kalil Gibran)*

RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é caracterizada pelo acúmulo de células imaturas da linhagem linfóide, na medula óssea, sangue periférico e órgãos linfóides, sendo seu pico de incidência por volta dos cinco anos de idade. O prognóstico da LLA é determinado pela idade, imunofenótipo e alterações moleculares sendo que estas últimas são de fundamental importância para a estratificação em grupos de risco. Nesse estudo, realizamos uma análise retrospectiva das características imunofenotípicas e moleculares, de 35 casos de LLA pediátrica, tratados em duas grandes Instituições da cidade de Porto Alegre. Os pacientes foram classificados de acordo com critérios morfológicos, citocímicos e imunofenotípicos. Em relação ao imunofenótipo, 8,8% dos pacientes foram classificados como LLA pró-B, 67,6% LLA-B (B-comum e pré-B) e 23,5% LLA-T. O imunofenótipo Pré-B CD10+ foi o mais comum. A frequência dos principais genes de fusão de significância prognóstica, realizada por RT-PCR foi de 15% para a t(12;21)/TEL-AML1 (19% entre as LLA de linhagem B); 4% t(4;11)/MLL-AF4, 4% t(1;19)/E2A-PBX1 e 4% t(9;22)/BCR-ABL. Nossos resultados mostram a importância do estudo molecular e sugerem que crianças com LLA tratadas nas Instituições referidas, apresentam as mesmas características biológicas de outras regiões do Brasil e de países desenvolvidos, suportando o uso de protocolos de regimes terapêuticos similares. Assim, o aumento do número de pacientes de alto risco com LLA na infância, parece não estar relacionado a um excesso de anormalidades genéticas desfavoráveis, e sim uma consequência do diagnóstico tardio, como sugerido pelo excesso de casos de hiperleucocitose. Embora a LLA pediátrica apresente um elevado índice de cura, o desafio atual é a busca de melhores testes diagnósticos e novas estratégias terapêuticas, através do conhecimento de genes alvos, permitindo o tratamento individualizado e uma maior sobrevida para o paciente.

Palavras chave: leucemia linfóide aguda; imunofenótipo; genes de fusão; PCR; prognóstico; tratamento.

ABSTRACT

The acute lymphoblastic leukemia (ALL) is characterized by the accumulation of immature cells of lymphoid lineage in the bone marrow, in the peripheral blood and lymphoid organs, with peak incidence around the age of five. The prognosis of ALL is determined by age, immunophenotype and molecular changes of which the latter have fundamental importance for determining the stratification in risk groups. In this study, we have conducted a retrospective analysis of immunophenotypic and molecular characteristics of 35 cases of pediatric ALL, treated at two major institutions of Porto Alegre city. Patients were classified according to morphological, cytochemical and immunophenotypical. Regarding the immunophenotype, 8.8% of patients were classified as pro-B ALL, 67.6% B-ALL (common B-and pre-B) and 23.5% T-ALL. The Pre-B immunophenotype CD10 + was the most common. The frequency of major fusion genes of prognostic significance performed by RT-PCR was 15% for a t(12;21)/TEL-AML1 (19% between the B-lineage ALL), 4% t(4;11)/MLL-AF4, 4% t(1;19)/E2A-PBX1 and 4% t(9;22)/ BCR-ABL. Our results show the importance of the molecular study and suggest that children with ALL that have been treated in those institutions have the same biological characteristics of the ones from other regions of Brazil and developed countries, what supports the use of similar therapeutic protocols. Thus, the increased number of high-risk patients with childhood ALL appears to be related to an excess of adverse genetic abnormalities, but as consequence of late diagnosis, as suggested by the excess of cases of hyperleucocytosis. Although pediatric ALL has a high cure rate, the current challenge is the search for better diagnostic tests and new therapeutic strategies through the knowledge of target genes enabling the individualized treatment and increased chances for patients to survive.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia; immunophenotype; fusion genes; PCR; prognosis; treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Identificação e o momento dos rearranjos moleculares na leucemogênese pediátrica.....	29
Figura 2: a) Representação esquemática dos genes TEL e AML1 e pontos de quebra. b) Gene de fusão TEL/AML1 gerado como produto da translocação t(12;21)(p13;q22).....	31
Figura 3: a) Representação dos genes E2A e PBX1 e pontos de quebra. b) Gene de fusão E2A/PBX1 gerado como produto da translocação t(1;19)(q23;p13).	33
Figura 4: a) Representação dos genes BCR e ABL e pontos de quebra. b) Gene de fusão BCR/ABL gerado como produto da translocação t(9;22)(q34;q11) p190.....	35
Figura 5: Apresentando os 54 pontos de quebra e 31 genes padrões do rearranjo no gene MLL.	37
Figura 6: a) Representação dos genes MLL e AF4 e pontos de quebra. b) Gene de fusão MLL/AF4 gerado como produto da translocação t(4;11)(q21;q23).	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição geográfica da t(12;21) em crianças com LLA.	13
Tabela 2: Classificação da OMS da Leucemia Linfóide Aguda.	23
Tabela 3: Anormalidades cromossômicas estruturais na LLA.	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	PREVALÊNCIA	12
2.2	ETIOLOGIA	14
2.3	CLASSIFICAÇÕES	16
2.3.1	Classificação Morfológica	16
2.3.2	Classificação Imunofenotípica	17
2.3.2.1	LLA de Células B.....	17
2.3.2.1.1	BI / LLA pró-B.....	18
2.3.2.1.2	BII / LLA B comum.....	18
2.3.2.1.3	BIII / LLA pré-B.....	18
2.3.2.1.4	BIV / LLA-B madura.....	19
2.3.2.2	LLA de Células T.....	19
2.3.2.2.1	TI / LLA pró-T.....	20
2.3.2.2.2	TII / LLA pré-T.....	20
2.3.2.2.3	TIII / LLA-T cortical.....	20
2.3.2.2.4	TIV / LLA-T madura.....	20
2.3.2.3	Imunofenotipagem e Co-expressão Aberrante.....	21
2.3.3	Classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS)	22
2.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	23
2.5	ALTERAÇÕES MOLECULARES	25
2.5.1	Translocações Cromossômicas	25
2.5.2	Origem Celular da Translocação	27
2.5.3	Origem Pré-natal da Translocação	27
2.6	ESTUDO DAS PRINCIPAIS TRANSLOCAÇÕES CROMOSSÔMICAS .	29
2.6.1	Estrutura e Função dos Genes TEL e AML1	29
2.6.2	Translocação t(12;21)/TEL-AML1	30
2.6.3	Estrutura e função dos genes E2A e PBX1	32
2.6.4	Translocação t(1;19)/E2A-PBX1	32
2.6.5	Estrutura e Função dos Genes BCR e ABL	34
2.6.6	Translocação t(9;22)/BCR-ABL	34
2.6.7	Estrutura e Função dos Genes MLL e AF4	36

2.6.8	Translocação t(4;11)/MLL-AF4	37
2.7	PROGNÓSTICO.....	39
2.8	ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO	41
2.8.1	Protocolo Berlin-Frankfurt-Münster (BFM-2002)	41
2.8.1.1	Grupo de Baixo Risco.....	41
2.8.1.2	Grupo de Risco Intermediário.....	42
2.8.1.3	Grupo de Alto Risco	42
2.8.2	Protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia da Infância (GBTLI-LLA-99)	42
2.8.2.1	Grupo de Baixo Risco de Recidiva (RB).....	43
2.8.2.2	Grupo de Alto Risco de Recidiva (AR)	43
2.8.3	Classificação do <i>National Cancer Institute</i>	43
2.8.3.1	Grupo de Baixo Risco.....	44
2.8.3.2	Grupo de Alto Risco	44
2.9	TRATAMENTO.....	44
2.9.1	Terapia de Indução.....	45
2.9.2	Intensificação ou Reindução.....	46
2.9.3	Profilaxia de Leucemia Meníngea	46
2.9.4	Continuação da Terapia.....	47
2.9.5	Transplante de <i>Stem Cell</i> Hematopoética Alogênico.....	47
2.9.6	Terapias Alvo.....	48
3	OBJETIVOS.....	49
3.1	OBJETIVO GERAL.....	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
5	ARTIGO EM INGLÊS.....	67
6	CONSIDERAÇÕES GERAIS	84

2 INTRODUÇÃO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma neoplasia maligna de linfócitos, caracterizada pelo acúmulo clonal de linfoblastos na medula óssea e supressão da hematopoese normal. O evento patogênico que leva ao desenvolvimento da LLA ainda é desconhecido, mas sabe-se que ocorrem alterações nos genes que controlam a homeostase da célula linfóide, o que resulta em expansão clonal desregulada de células progenitoras imaturas. (1)

Os sintomas variam de acordo com os graus de anemia, neutropenia e trombocitopenia ou pela presença de infiltração leucêmica extra-medular. Os sítios mais comuns detectados clinicamente são linfonodos, baço, fígado, sistema nervoso central (SNC) e pele. (2)

A LLA é o tipo mais comum de leucemia na infância, apresentando um pico de incidência entre 2 a 5 anos de idade, sendo mais comum entre pacientes do sexo masculino e raça branca. (2)

A grande maioria dos casos é de linhagem B (85%), agrupados dentro de quatro subtipos, que correspondem a diferentes níveis de maturação do desenvolvimento da célula linfóide B. (3) No entanto, a classificação imunofenotípica reflete o estágio de maturação das células, trazendo poucas informações em relação ao prognóstico ou sobre o entendimento da biologia da doença. (4) A classificação atual segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) incorpora e inter-relaciona a clínica, as características morfológicas, citogenéticas, imunofenotípicas e moleculares, classificando os casos como leucemia/linfoma linfoblástico B e T, onde a B é dividida em sete entidades distintas, definidas por anormalidades cromossômicas recorrentes. Quanto aos casos de LLA-B que não apresentam essas anormalidades são considerados como “não especificadas”. (5)

Noventa por cento das crianças com LLA tem anormalidades cromossômicas, das quais 50% são translocações. (6) As translocações e os oncogenes correspondentes mais comumente identificadas nas LLAs B são a t(12;21)/TEL-AML1 (20-25% dos casos), a t(1;19)/E2A-PBX1 (5 a 6%), a t(9;22)/BCR-ABL (3 a 5%), o rearranjo do gene MLL (6%) e a t(4;11)/MLL-AF4 (3%). (6,7)

Muitos genes têm sido implicados na leucemogênese, dentre os quais se destacam os ligados à proliferação celular, tais como genes supressores de tumor e

os genes reguladores de transcrição. Eles causam modificações no processo regulatório por manutenção ou aumento da capacidade ilimitada de auto-renovação, subvertendo o controle da proliferação normal, bloqueando a diferenciação e promovendo resistência a apoptose. (8,9) O estudo desses genes determina não só o prognóstico, como aumenta o entendimento na trajetória crucial da transformação da célula tronco leucêmica. (10)

Afirma-se então, que a LLA é uma doença heterogênea com diferenças biológicas e prognósticas. (11) Anormalidades estruturais específicas como a t(9;22), t(1;19) e t(4;11) conferem um alto risco de recidiva. Por outro lado a t(12;21) está associada a um prognóstico altamente favorável. Essas anormalidades genéticas, além de auxiliarem na caracterização das LLA's, definirão o prognóstico e estratégias de tratamento, também podem delinear trajetórias causais específicas para a malignidade. (12)

Embora a LLA seja sempre considerada uma doença grave, a identificação de vários fatores prognósticos permite a estratificação dos pacientes em grupos de risco, possibilitando uma abordagem terapêutica diferenciada. (13,14) Assim, os grupos de maior risco são tratados com esquemas quimioterápicos mais intensos, seguidos ou não, de transplante de medula óssea, enquanto que os grupos de baixo risco, com bom prognóstico, podem ser poupados dos efeitos deletérios da terapia intensiva. (10)

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PREVALÊNCIA

A LLA é o tipo mais comum de leucemia da infância, sendo estimado aproximadamente, 30 a 50 novos casos por milhões de crianças, e representa de 25% a 30% de todas as malignidades infantis, com um pico de incidência entre 2 a 5 anos de idade, afetando mais frequentemente pacientes do sexo masculino. (2)

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para o ano de 2010, de novos casos de leucemias (qualquer tipo) no Brasil, é da ordem de 5240 casos em homens e 4340 em mulheres. Já no Estado do Rio Grande do Sul, a taxa estimada é de 7,75 casos para cada 100 mil homens e de 6,01 para cada 100 mil mulheres. (15)

Não só inexitem dados sobre a incidência de acordo com o tipo e subtipo de leucemias no Brasil, como também, existem poucos estudos em nosso país sobre a descrição das alterações moleculares a elas relacionadas. A estimativa da prevalência de alterações moleculares é, portanto, baseada em estudos realizados em países como Estados Unidos da América, Alemanha, Itália e França.

Trabalhos realizados em crianças com LLA-B no Brasil, na cidade do Rio de Janeiro, (16) e no estado do Rio Grande do Sul, (17) estimaram em 20% e 19% respectivamente, a frequência relativa da anormalidade genética TEL/AML1. Esses resultados foram semelhantes aos estudos relatados, previamente, numa série de crianças dos Estados Unidos, Alemanha, Itália, (18) França e Bélgica, (19,20) República Czechoslovakia, (21) Japão e Taiwan. (22) (Tabela 1) Apesar de a taxa atual de incidência da LLA pediátrica variar pouco dentro desses países, esses resultados mostram uma prevalência elevada de leucemia com o gene de fusão TEL/AML1. (16)

Tabela 1: Distribuição geográfica da t(12;21) em crianças com LLA.

Localização	n	Frequência (%)	Referência
Índia	42	4,8	Hill <i>et al.</i>
Inglaterra	56	39	Codrington <i>et al.</i>
Austrália	66	33	Amor <i>et al.</i>
Alemanha/Itália	334	18,9	Borkhardt <i>et al.</i>
Taiwan	165	18	Liang <i>et al.</i>
Brasil	62	20	Magalhães <i>et al.</i>
Estados Unidos	86	17	Jamil <i>et al.</i>
Taiwan	41	17	Liang <i>et al.</i>
Hong Kong	75	16	Tsang <i>et al.</i>
Suécia	72	15	Andreasson <i>et al.</i>
Japão	108	13	Nakao <i>et al.</i>
Escócia	36	11,1	Spathas <i>et al.</i>
Japão	74	9,5	Egushi-Ishimae <i>et al.</i>
Índia	46	9	Inamdar <i>et al.</i>
Índia	259	7	Siraj <i>et al.</i>
Espanha	41	2	Garcia-Sanz <i>et al.</i>

Fonte: Hill A *et al.* Haematologica, 2005;90:414-416. (26)

Embora a população brasileira seja o produto de grupos étnicos diferentes, os poucos estudos existentes sugerem que a frequência de cada anormalidade parece ser semelhante àquela encontrada em populações sem nosso grau de miscigenação. Isto sugere que a distribuição generalizada de fatores de risco ou mecanismo etiológico para estes subgrupos de crianças com leucemia, independe dos antecedentes étnicos. (16)

No entanto, alguma variação geográfica tem sido relatada para a t(12;21), já que a prevalência observada para crianças com LLA precursor B nos Estados Unidos, Alemanha, Itália e França é diferente da relatada no Reino Unido (23) e Índia, (24,25) variando de 13% a 7% respectivamente. Já em um estudo com 42 crianças portadoras de LLA, realizado em Kerala, localizada no sul da Índia, encontraram positividade em 4,8% dos casos. (26) Na Espanha foi relatada uma frequência muito baixa, apenas 2% do gene de fusão TEL/AML1, (27) logo é importante que esses achados discordantes sejam confirmados ou refutados. A variação internacional de outras frequências relativas a subtipos de leucemias ou, melhor ainda, a taxa anual de incidência pode fornecer uma pista de fatores genéticos ou ambientais que contribuem para a patogênese da doença. (16) A

constatação de que crianças brasileiras com LLA têm as mesmas características biológicas que aquelas de países desenvolvidos, sustentam o uso de protocolos de tratamento semelhantes. (28)

Aparentemente, países em desenvolvimento têm a mesma prevalência de LLA TEL/AML1 observada em países desenvolvidos, (29,30,31) superior aos subdesenvolvidos. Tal observação substancia a hipótese de que o desenvolvimento deste tipo de câncer estaria associado a melhores condições de vida e ao padrão das infecções observadas nestas crianças. (32) No entanto, segundo alguns autores, essas diferenças poderiam ser atribuídas mais ao número reduzido de estudos e a indisponibilidade de técnicas diagnósticas, do que a diferenças geográficas, ou ainda, diferenças sutis nos pontos de quebra poderiam levar a resultados moleculares (PCR) falsos negativos. (33)

3.2 ETIOLOGIA

Uma extraordinária diversidade de alterações cromossômicas e moleculares ocorrem nas células leucêmicas e sua presença restrita ao clone leucêmico sugere que as leucemias são adquiridas e não herdadas. Todavia, uma pequena, mas significativa proporção (acima de 5%) de leucemias mielóides e linfóides agudas estão associadas com a hereditariedade ou síndromes reconhecidamente genéticas, como síndrome de Down, síndrome de Bloom's, anemia de fanconi, telangiectasia ataxia, e neurofibromatose, (34) cujos genes envolvidos codificam funções relacionadas à estabilidade genética e reparo ao DNA. (32)

Diferentes subtipos biológicos de leucemias podem ser originados por vários mecanismos e há muitos *links* funcionais entre anormalidades moleculares particulares e agentes causais. (32)

Embora não seja causa única e exclusiva, uma resposta imune anormal a infecções tem surgido como um possível mecanismo etiológico. Greaves criou a hipótese, que crianças não expostas a infecções comuns, durante os primeiros anos de vida, têm um inadequado preparo do sistema imunológico e infecções futuras, nos pacientes que apresentam suscetibilidade ou predisposição pelo genótipo,

podem predispor a uma resposta imunológica inapropriada, aumentando o risco de leucemia. (32; 35)

Um outro mecanismo envolve a Topoisomerase II (Topo II), que é uma enzima importante para a replicação, transcrição e recombinação do DNA, modulando a indução transitória de *double-strand breaks* (DSB's). (36) Ela catalisa estas quebras nas moléculas de DNA, mas usa ligações covalentes para segurar as moléculas de DNA que foram quebradas. Sua inibição interfere no seu papel regulatório, aumentando o risco de translocações cromossômicas. Estudos recentes demonstram que inibidores Topo II, como o etoposídeo ou doxorrubicina, impedem que o complexo de clivagem do DNA seja restabelecido pela enzima. (37)

O gene MLL afeta 80% das LLA's e 65% das LMA's em lactentes, esses achados são semelhantes às anormalidades moleculares secundárias observadas em crianças e adultos tratados com inibidores da Topo II. (38) Isto levou a hipótese que a exposição materna a esses inibidores, durante a gravidez, poderia induzir a leucemia do lactente. (39,40) Rearranjos no gene MLL são raros em crianças maiores com leucemias recorrentes, mas são frequentes em leucemias secundárias, decorrentes de quimioterapia com inibidores Topo II, sugerindo que a exposição no útero pode ser relevante para a leucemia do lactente. (38,41,42)

A exposição do feto a substâncias que afetam a Topo II pode, portanto, ser um evento leucemogênico nas leucemias com rearranjo MLL. Uma variedade de outros compostos naturais e sintéticos pode inibir a Topoisomerase: (43) agentes quimioterápicos; (44) estrógenos, (45) metabólitos do benzeno (tais como benzoquinona do fumo), (46) isoflavonóides – flavonóides presentes em alimentos e bebidas; (47) algumas ervas medicinais (camomila) e culinárias; laxativos antraquinoras como a sena, (42) resinas de podofilina; antibióticos do grupo das quinolonas; alguns pesticidas, incluindo certos fungicidas, inseticidas, e muitas substâncias fenólicas ou seus metabólitos. (48) Como os flavonóides são potentes inibidores Topo II, foi examinado o papel de três deles altamente consumido na dieta (quercetina, genisteína e campferol) no desenvolvimento do rearranjo MLL. (40) Strick *et al.*, demonstraram que vários bioflavonóides podem induzir clivagem do gene MLL em linhagens celulares, bem como nos progenitores mielóides e linfóides. (49) Sítios de clivagem associados com bioflavonóides são co-localizados com os sítios de clivagem do gene MLL, associado ao uso de etoposídeo. Essas

informações geram uma forte evidência laboratorial que flavonóides podem estar diretamente envolvidos no dano ao locus do MLL. (49,50)

Estudos epidemiológicos indicam ainda associações significativas entre a ingestão de álcool, utilização de maconha, exposição ao benzeno e ao petróleo, (41,51) durante a gravidez (42) e a ocorrência de leucemia no lactente (41,51). Concluiu-se que a história materna de duas ou mais perdas fetais pode aumentar o risco relativo para LLA e LMA no lactente em cerca de 25 vezes comparado com controles saudáveis. (32,50) Estudos em grande escala estão em curso no EUA e Inglaterra para confirmar o possível papel da exposição a químicos, vírus, bactérias, ou radiação ionizante na gênese da LLA. (52) Exposições a campos eletromagnéticos estão sendo excluídos como fator suspeito. (53)

Apesar de a exposição a agentes químicos e fatores ambientais seja muito comum, a leucemia do lactente é rara. É possível que o momento crítico para a exposição mutagênica seja durante as primeiras semanas de gestação, quando o sítio hematopoético troca do saco vitelino para o fígado. (49) A reduzida habilidade do feto ou da mãe para desintoxicar tais agentes poderia aumentar a susceptibilidade do feto para LLA. (43,54)

3.3 CLASSIFICAÇÕES

3.3.1 Classificação Morfológica

O estudo morfológico é o principal critério para o diagnóstico das leucemias agudas. O diagnóstico é estabelecido quando o exame da medula óssea revela células blásticas acima de 25% da celularidade total. Em 1976, o grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) classificou as LLA's em três subtipos morfológicos, L1, L2 e L3, com base no diâmetro celular, forma do núcleo e protuberância dos nucléolos, e quantidade e aspectos relativos do citoplasma: (55)

- LLA-L1: células linfóides pequenas e homogêneas, cromatina nuclear fina, ausência de nucléolos, citoplasma escasso e núcleo regular.

- LLA-L2: células grandes e heterogêneas, cromatina nuclear frouxa, presença de nucléolos, citoplasma abundante e forma do núcleo irregular.
- LLA-L3: células linfóides grandes e homogêneas, com cromatina nuclear fina, nucléolos proeminentes, citoplasma fortemente basofílico e com presença de vacúolos.

Os subtipos L1 e L2 não têm relevância, pois não têm implicação no prognóstico. Também não há correlação entre estes subtipos com características imunofenotípicas ou moleculares. Por outro lado, o subtipo L3 que corresponde ao imunofenótipo de LLA-B madura, tem implicações prognósticas e está frequentemente associado com a translocação t(8;21). (56)

3.3.2 Classificação Imunofenotípica

3.3.2.1 LLA de Células B

A grande maioria dos casos de LLA é de linhagem B (aproximadamente 85%). Estes são agrupados em diferentes subtipos, os quais correspondem a diferentes níveis de maturação do desenvolvimento da célula B normal. (2)

Os primeiros antígenos associados à célula linfóide B a serem expressos após o comprometimento do CD34, um precursor hematopoético inicial, são o CD22 primeiramente no citoplasma e depois na membrana; o CD10 e CD19 na membrana, o deoxilnucleotidil transferase (cTdT) e CD79a no citoplasma. (58,59) Imediatamente após, os precursores de célula B sequencialmente começam a perder CD34 e cTdT, a diminuir a expressão de CD10 e mostrar reatividade para CD20; (59) a seguir se inicia a produção da Imunoglobulina M de cadeia pesada (IgM) que se acumula no citoplasma até a produção da imunoglobulina de cadeia leve. (58) Quando isto ocorre, moléculas de IgM são expressas na superfície da célula do linfócito B funcionalmente imaturo. (60) Com base na sequência de maturação normal de células B da medula óssea, a LLA-B é atualmente classificada em quatro subtipos: BI ou LLA pró-B, BII ou LLA comum, BIII ou LLA pré-B, e BIV ou LLA-B madura. (3)

3.3.2.1.1 BI / LLA pró-B

As células blásticas leucêmicas da LLA pró-B se assemelham aos precursores de células B normais da medula óssea. (61) Estas células sempre expressam CD19, HLA-DR e quase todos os casos tem cCD22 e cCD79a (citoplasmáticos), e CD22 de membrana. O antígeno cTdT é detectado em 90% dos casos, e as células de mais de 75% dos casos expressam CD34. (62) O antígeno CD10 geralmente é negativo e o CD20 está presente numa pequena proporção de células blásticas na metade dos casos. (61) Em 10 a 15% dos casos de LLA pró-B, o CD45 pode estar fracamente expresso; as células que tem este imunofenótipo são geralmente hiperdiplóides (com mais de 50 cromossomos). (61,63)

3.3.2.1.2 BII / LLA B comum

Corresponde a LLA de linhagem B mais frequente. Semelhante ao estágio anterior, este subtipo expressa CD19, CD22, HLA-DR e CD79a. Os linfoblastos deste subtipo de LLA, não apresentam imunoglobulinas de cadeia pesada μ citoplasmática (cIgM), imunoglobulinas de membrana (mIgM), nem as proteínas Kappa (κ) Lambda (λ). (60) Mais de 95% destas leucemias expressam CD10 e cTdT, todavia somente $\frac{2}{3}$ são positivas para CD34 (64). Muitos casos de LLA B comum não expressam ou expressam fracamente o antígeno CD20. (61)

3.3.2.1.3 BIII / LLA pré-B

Estas células leucêmicas expressam cIgM, sem mIgM e imunoglobulinas de cadeia leve κ ou λ (65) Como no estágio anterior, os blastos expressam CD19, HLA-DR, CD10, geralmente cTdT, (61,66) e às vezes CD34. (65)

3.3.2.1.4 BIV / LLA-B madura

Em 2 a 4% dos casos de LLA, as células expressam mIgM e imunoglobulinas de cadeias leves κ ou λ . Há dois distintos tipos fenotípicos e genotipicamente de LLA de células B madura: o tipo mais comum é caracterizado pela morfologia L3 de acordo com a classificação FAB e, as células expressam CD19, CD22, CD20 e frequentemente CD10 e CD23; o CD34 é negativo. (61) Em raros casos, o cTdT é expresso (67) ou as imunoglobulinas estão ausentes. (68) O padrão imunofenotípico da expressão de antígenos e das imunoglobulinas sugere que o compartimento celular normal das células L3 são as células do centro germinal folicular. Frequentemente estes casos representam a fase leucêmica do linfoma de Burkitt. A marca deste subtipo de LLA de célula B é a presença de uma translocação recíproca do cromossomo 8 com um dos cromossomos contendo o gene de imunoglobulina. Estas translocações, as quais incluem a $t(8;14)(q24;q32)$, $t(2;8)(p12;q24)$ e $t(8;22)(q24;q11)$ envolvem rearranjos do gene *c-myc*. (61) O segundo subtipo, é mais raro, apresenta blastos com a morfologia L1 ou L2 e nestes casos podem expressar cTdT, CD34 e CD20 fraco. (69,70) Infiltração leucêmica extramedular não é encontrada nesta apresentação e as $t(8;14)$, $t(2;8)$ e $t(8;22)$ estão ausentes. (61)

3.3.2.2 LLA de Células T

O imunofenótipo de células T ocorre em 13 a 15% dos casos de LLA na infância e também pode ser separado dentro de grupos fenotípicos que podem corresponder a diferentes estágios do desenvolvimento de célula T no timo (71). Semelhante à LLA precursor B, a LLA-T é dividida, atualmente, dentro de quatro subtipos: pró-T, pré-T; cortical e maduro. (3,60)

3.3.2.2.1 TI / LLA pró-T

Apresenta tipicamente co-expressão de dois marcadores de célula T iniciais CD7 e cCD3, na ausência de outros antígenos associados à célula T. (2,60)

3.3.2.2.2 TII / LLA pré-T

Adicionalmente ao CD7 e cCD3, expressam CD2, CD5, CD4 e/ou CD8.

3.3.2.2.3 TIII / LLA-T cortical

Positivos para cCD3, CD4, CD8, e negativos para mCD3 e como timócitos corticais, estas células leucêmicas, mostram reatividade para CD1a.

3.3.2.2.4 TIV / LLA-T madura

Apresenta fenótipo maduro, positivos para CD3, CD4 ou CD8 e negativos para CD1a. É mais frequentemente observado entre os pacientes que apresentam linfoma linfoblástico T que LLA-T pura. (2,60)

Na LLA-T cortical e madura, a expressão de CD3 de membrana pode estar associada com a expressão de Receptor de Célula T (TCR) do tipo TCR α/β ou TCR γ/δ . (72)

3.3.2.3 Imunofenotipagem e Co-expressão Aberrante

Por muito tempo acreditou-se que células neoplásicas das leucemias agudas refletiam o fenótipo dos estágios iniciais das células hematopoéticas normais da medula óssea, que apresentavam o bloqueio de diferenciação. (4) Embora a célula neoplásica da LLA-B mostre uma forte semelhança a precusores hematopoéticos normais da medula óssea, estudos recentes mostram que a maioria senão todas estas células apresentam características imunofenóticas que geralmente não são detectadas em seus precusores normais. (4) Portanto, a presença destas aberrações fenóticas permite a identificação específica da célula patológica e a discriminação da célula normal (59) Durante as últimas décadas foi mostrado que tanto na LLA-B, quanto na LLA-T os fenótipos são aberrantes em mais que 95% dos casos. (73) A avaliação simultânea de padrões fenotípicos de maturação de células B anormais e a expressão de antígenos de linhagem cruzada, refletido pela alta reatividade do CD13 e CD33, marcadores pan-mielóides em células B leucêmicas, pode ser observada em cerca da metade dos casos. Apesar da incidência destes antígenos mielóides associados ao precursor B, variar amplamente na literatura, há uma concordância de que estes marcadores são os exemplos mais representativos de expressão de antígenos de outra linhagem neste grupo particular de pacientes com LLA. Em um estudo envolvendo 264 pacientes com LLA precursor B, a expressão dos antígenos CD13 ou CD33 foi detectada em 31,9% e 17,9% dos casos, respectivamente; enquanto a co-expressão dos dois marcadores mielóides foi encontrada em 10,2% dos casos. (73)

Ainda há discordância entre os estudos em relação ao impacto prognóstico da co-expressão de antígenos mielóides na LLA, (74,75,76) mas a possibilidade de correlacionar o padrão fenotípico com as alterações genéticas sugerida há várias décadas (77,78) parece ser procedente. Aparentemente, em casos com lesão genética idêntica, um fenótipo semelhante pode ser esperado. Recentemente vários trabalhos têm mostrado que algumas características fenotípicas das células neoplásicas da LLA-B estão associados com anormalidades genéticas específicas, (4) como é o caso da expressão de CD13 e CD33 na t(9;22) (81,82) e na t(12;21) (18,82,83) e antígeno 7,1, CD15 e CD65 na t(4;11). (83,84)

Foi demonstrado que blastos com certas translocações tendem a expressar combinações particulares de antígenos de superfície, como na LLA de linhagem B, imunofenótipo pró-B, com a t(4;11)(q21;q23) perdendo a proteína CD10 e expressando atipicamente antígenos associados à linhagem mielóide CD65 e CD15. (85) O reconhecimento deste subtipo é muito importante, pois ele também é característico da LLA pró-B, mas também pode estar presente em 17% de todas LLA's pré-B e é caracterizado pela alta prevalência da fusão do transcrito MLL-AF4. (86) Estes blastos reagem com o anticorpo monoclonal 7,1 que é um antígeno específico para a molécula NG2, (sulfato de condroitina), uma proteína de superfície celular de 220 a 240kD, envolvida na adesão e nos mecanismos de migração celular, principalmente para o SNC. (87) Esta não é expressa em células hematopoéticas normais, mas está presente em células leucêmicas de crianças com LMA ou LLA com anormalidades 11q23. (83,88) São necessários mais estudos e, possivelmente, a descrição de outras aberrações moleculares, para que se possa esclarecer se a análise imunofenotípica poderia ser utilizada para o *screening* de anormalidades genéticas específicas, como sugerido por alguns autores. (77,78,89)

3.3.3 Classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS)

Em 1997, a Organização Mundial da Saúde (OMS), com o objetivo de identificar categorias com prognósticos distintos, propôs uma classificação que incorpora e inter-relaciona a clínica e as características morfológicas, citogenéticas, moleculares e imunofenotípicas. (90) Como os esquemas de diferenciação imunofenotípica não são universalmente padronizados, a terminologia dos diferentes subtipos não é uniforme e há uma questionável significância da sub-classificação imunológica, o esquema de classificação da OMS, simplesmente dividiu os casos como LLA em “precursor B” e “precursor T” sem categorização adicional. (90)

Recentemente a OMS em colaboração com *European Association for Haematopathology and European Society for Hemopathology*, publicou uma revisão da classificação de Tumores de Tecidos Linfóides e Hematopoéticos, (5) (Tabela 2) onde faz uma distinção entre leucemia linfoblástica e linfoma linfoblástico. A leucemia linfoblástica B é dividida em sete entidades distintas, definidas por

anormalidades cromossômicas recorrentes e, como já mencionadas, os casos de LLA-B que não apresentam estas anormalidades são considerados como “não especificadas”. (5)

Tabela 2: Classificação da OMS da Leucemia Linfóide Aguda.

Leucemia/linfoma linfoblástico B

Leucemia/linfoma linfoblástico B, NOS.

Leucemia/linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes

Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL*

Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(v;11q23): rearranjo *MLL*

Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(12;21)(p13;q22) *TEL-AML1(ETV6-RUNX1)*

Leucemia/linfoma linfoblástico B com hiperdiploidia

Leucemia/linfoma linfoblástico B com hipodiploidia

Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(5;14)(q31;q32) *IL3-IGH*

Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(1;19)(q23;p13.3); *TCF3-PBX1*

Leucemia/linfoma linfoblástico T

Fonte: Vardiman *et al.* Blood,2009;114:937-951. (5)

3.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A classificação FAB (LLA-L1, L2 e L3) baseada inicialmente em características morfológicas dos linfoblastos, somente tem valor histórico, pois é falha no reconhecimento biológico e seu valor prognóstico é limitado. (91) A significância prognóstica entre L1 e L2 não é completamente comprovada e as características imunofenotípicas, não se correlacionam com a morfologia. A designação de L1 ou L2 é subjetiva e a reprodutibilidade entre observadores depende de experiência e de outros fatores (qualidade dos esfregaços sanguíneos e colorações). Recentemente, foi proposto pela classificação da OMS que os grupos L1 e L2 devem ser combinados e designados de LLA-L1/L2. A intenção é simplificar a classificação morfológica e enfatizar a importância de outros parâmetros biológicos. (92)

As técnicas de imunofenotipagem refletem além do estágio maturacional das células, a presença de fenótipos aberrantes, mas não o entendimento da aberração leucêmica. (91) Os esquemas de diferenciação imunofenotípicos não são

universalmente padronizados e a terminologia para diferentes subtipos também não é uniforme. (90)

A análise citogenética convencional através do estudo de todos os cromossomos permite a identificação de algumas translocações e outras aberrações cromossômicas. Todavia, esta técnica consome tempo, requer experiência, necessita de um grande número de células em divisão e às vezes não fornece resultados confiáveis devido à qualidade dos cromossomos e a falta de metáfases adequadas, já que somente em 60 a 80% das amostras de medula óssea há metáfases suficientes para análise. (93) Além disso, existem pequenas deleções ou rearranjos estruturais com baixos níveis de detecção microscópica. (34)

Alternativa de métodos diagnósticos como fluorescência *in situ* hibridação (FISH), no qual sondas hibridizadas marcam cromossomos em metáfases ou núcleo em interfase e então são detectados por fluorocromos. Este método de análise é mais rápido, e em alguns casos mais sensível que a análise citogenética convencional, pois permite a identificação de rearranjos com menos de 1Kb. (2) A sua utilização tem melhorado a detecção de alterações submicroscópicas não detectadas por citogenética, mas em casos de remissão requer um grande número de núcleos para análise, por este motivo sua sensibilidade é baixa, quando comparada com outros métodos moleculares. (94)

Estudos moleculares dos rearranjos cromossômicos têm fornecido a percepção do mecanismo da tumorigenese, muitos desses genes envolvidos nas translocações são fatores de transcrição que parecem ter um papel direto na hematopoese. O PCR é um ensaio enzimático que fornece o método mais sensível e rápido para detectar rearranjos genéticos clonais. Translocações que resultam na fusão de genes são adequados, especialmente, para análise com transcriptase reversa PCR (RT-PCR), uma técnica na qual a fusão do RNAm é transcrita reversamente dentro do cDNA, e então amplificada por PCR usando *primers* para genes específicos. Embora esta técnica tenha alta sensibilidade para a detecção das mais frequentes translocações em crianças com LLA, a utilização de PCR's *nested* aumenta o risco de contaminação e a ocorrência de amostras falso positivas. Conseqüentemente é necessário muito cuidado na manipulação para prevenir tais problemas. (93)

A análise molecular se tornou parte essencial da avaliação moderna da LLA. Ela detecta anormalidades genéticas comuns e pode distinguir lesões que parecem

idênticas por citogenética, mas que envolvem diferentes genes com diferentes implicações terapêuticas. Além disso, pode detectar alterações submicroscópicas que são importantes na avaliação de risco, como ocorre com a translocação t(12;21). (6,93) Esta translocação é dificilmente detectada por citogenética convencional, pois as partes translocadas do 12p13 e 21q23 têm padrões de bandas-G idênticos (34). É útil também na identificação de diferentes pontos de quebra do BCR/ABL como a p190 e p210 (95) e em alguns casos de presença de genes de fusão, na ausência das translocações como "cromossomo Ph mascarado" ou Philadelphia negativo, onde há a presença do gene de fusão BCR/ABL, mas as células não entram em divisão e, por conseguinte, o clone não pode ser detectado pelo método citogenético. (96)

O RT-PCR quantitativo, tem uma alta sensibilidade, sendo capaz de detectar uma célula positiva em 10.000 células, o que o torna particularmente útil para o acompanhamento da doença residual mínima (DRM). (97)

Apesar das vantagens, os métodos baseados em PCR não substituem a análise citogenética devido à presença de aberrações numéricas, translocações balanceadas desconhecidas, hiperdiploidia e outras anormalidades que podem não ser detectadas por este método. Por esta razão, a análise citogenética é necessária para fazer um diagnóstico completo da LLA. (93)

3.5 ALTERAÇÕES MOLECULARES

3.5.1 Translocações Cromossômicas

As translocações cromossômicas são geradas pelas *double-strand breaks* (DSB's) do DNA. (98) Para uma determinada translocação, a região genômica dentro da qual a recombinação ocorre é específica e localizada ou ainda agrupada em determinada região. Estas regiões, localizadas nos íntrons, são conhecidas como *breakpoint cluster regions* (BCRs) que variam em tamanho de apenas alguns pares de bases (99) a centenas de kilobases. (100). Os BCRs são vulneráveis às

quebras que surgem randomicamente ao longo do gene, mas somente aqueles que levam vantagem clonal causam a doença. (98)

Para que as translocações cromossômicas tenham capacidade leucemogênica os seguintes critérios devem ser encontrados: DSB's simultâneos precisam ocorrer em dois cromossomos em uma única célula; é necessária a proximidade espacial entre estas regiões cromossômicas; (101) quebras devem ocorrer em íntrons "relevantes" de genes "relevantes" para gerar um produto gênico quimérico funcional; recombinação cromossômica deve ser no sentido da transcrição para gerar como produto um gene quimérico funcional; quebras e recombinações devem ocorrer em uma célula com potencial clonogênico e de auto-renovação; o DSB do DNA que inicia a translocação não pode ser letal para a célula no qual ele ocorre e, finalmente, o produto da translocação cromossômica – gene de fusão, deve gerar a super- ou a baixa expressão de genes reguladores e/ou proteínas de fusão quimérica com novas propriedades. (98)

As translocações cromossômicas ativam genes específicos que caracterizam as leucemias humanas, no nosso caso em particular a LLA. O padrão de expressão genética estudado em larga série de leucemias recém diagnosticadas tem reforçado a idéia de que translocações cromossômicas específicas identificam um único subtipo da doença. Geralmente elas ativam genes de fatores de transcrição, os quais em muitos casos podem controlar a diferenciação celular (em vez de divisão celular por si só), regulam o desenvolvimento e frequentemente codificam proteínas no ápice da cascata transcripcional. Os chamados fatores de transcrição oncogênicos, podem exercer controle positivo ou negativo, resposta *downstream* a genes que são expressos aberrantemente nas células leucêmicas. (11)

O entendimento detalhado das translocações cromossômicas é importante não só para a compreensão da leucemogênese, mas também para o diagnóstico diferencial, o desenvolvimento de novas terapias e para estudos epidemiológicos moleculares. (98)

3.5.2 Origem Celular da Translocação

Ainda não se sabe, se as translocações são produtos de erros no processamento do DNA normal ou se são causadas por fatores externos (químicos ou vírus), mas as evidências atuais sugerem que as translocações são talvez, 100 vezes mais comuns na população do que as associadas às leucemias. Isto indica que muitas translocações não são suficientes para a doença, mas podem predizer futuros riscos para as crianças que abrigam a fusão. (102,103,104)

O tipo celular ou o fenótipo de linhagem de um subconjunto de leucemias na infância indicam que cada translocação cromossômica deve surgir em uma célula antecedente na linhagem equivalente, embora não expliquem o porquê da sua associação a subtipos específicos de leucemias. Sabe-se que a *stem cell* ou talvez, uma célula cuja alteração genética a leve a readquirir a capacidade de auto-renovação e de clonogenicidade – *stem cell* maligna é o principal alvo para eventos genéticos chaves nas leucemias agudas e outros cânceres. (105)

Dado um grande número de divisões celulares que ocorrem na medula óssea (10^{11} por dia em um humano adulto), danos no DNA surgem de fatores endógenos e exógenos, e devido à falta de completa fidelidade no mecanismo de reparo-DNA, as translocações cromossômicas podem ocorrer frequentemente. Os períodos de hematopoese ativa, por exemplo, durante o desenvolvimento fetal ou durante repercussão regenerativa, podem ser particularmente, vulneráveis. (98) A busca da origem da leucemia, naturalmente, não termina com o conhecimento do evento inicial, mas contribui para o entendimento do evento subsequente que leva ao desenvolvimento da doença e seu diagnóstico. (104)

3.5.3 Origem Pré-natal da Translocação

Foram desenvolvidos estudos por Mel Greaves e colegas sobre a história natural da leucemia, utilizando gêmeos com leucemias iguais, bem como amostras de teste do pezinho arquivadas, para demonstrar que os eventos genéticos que levam a leucemia podem ocorrer antes do nascimento. Existem evidências claras

para a origem no útero de várias translocações leucêmicas, durante a hematopoese fetal. As translocações são melhores toleradas durante o período pré-natal (imunidade imunológica do hospedeiro) ou formadas mais facilmente durante um período de alta divisão celular na população progenitora com estresse oxidativo ou de folato. (101,103) A *stem cell* hematopoética no fígado fetal e medula óssea são provavelmente os sítios destes eventos, mas os estágios iniciais de hematopoese embrionária não podem ser excluídos. (106)

Greaves criou a hipótese que a maioria dos casos de LLA comum, começa com a alteração na proliferação da célula progenitora B no útero, mas que um ou mais eventos adicionais são necessários para a progressão para a leucemia (Figura 1). O evento ou eventos adicionais provavelmente ocorrem após o nascimento, pois a taxa de concordância temporal para o desenvolvimento da LLA comum em gêmeos é de somente 5% (106). O trabalho de Greaves mostrou que os gêmeos apresentavam células leucêmicas com a fusão TEL-AML1 idênticas, todavia, a doença se tornou aparente em um gêmeo aos 5 anos e no outro somente aos 14 anos de idade. (104,107) Os períodos de latências diferentes sugeriram que algum evento ou eventos adicionais ocorreram em diferentes momentos, provavelmente no período pós-natal. (108)

Uma taxa concordante de 100% e o curto período de latência (de poucas semanas a poucos meses) são fatores típicos de gêmeos lactentes com a t(4;11)/MLL-AF4, sugerindo que esta fusão é leucemogênica por si só, (51,109) ou pode facilitar a aquisição de mutações que cooperam adicionalmente para causar leucemia. (51) A origem pré-natal deste gene de fusão em leucemias de lactentes, (104,106) foi confirmada por um estudo epidemiológico internacional que mostrou que, a exposição transplacenta a substâncias que causam dano no DNA, leva ao desenvolvimento de leucemias da infância envolvendo o gene de fusão MLL. (42)

Na verdade, nem todos os casos de LLA se desenvolvem no útero, e muitos surgem após um tempo prolongado, em crianças maiores. Leucemias de células B frequentemente apresentam subclones adicionais IGH bem como rearranjos TCR, aumentando a evidência que o evento de transformação para a célula leucêmica, precede rearranjos IGH, por causa do processo de seleção natural, que resulta na deleção destes clones ou recombinação adicional V(D)J para produzir um gene IGH funcional. (110). A exceção para isto pode ser a leucemia com a translocação t(1;19), a qual pode ser derivada da transformação de célula pré-B, pós-rearranjo

IGH. Esta característica mostra que a t(1;19) é um evento de transformação que ocorre ao mesmo tempo ou após rearranjos IGH e subsequente seleção, semelhante à transformação com o estágio ontológico da célula leucêmica (111). Wiemes *et al* estudaram pacientes com a t(1;19) e concluíram que nas células pré-B que sofrem a transformação leucêmica resultando na LLA, a translocação, assim como os rearranjos do gene IGH surgem após o nascimento, nas células ontologicamente mais maduras que aquelas envolvidas na maioria das leucemias linfóides pediátricas. (99)

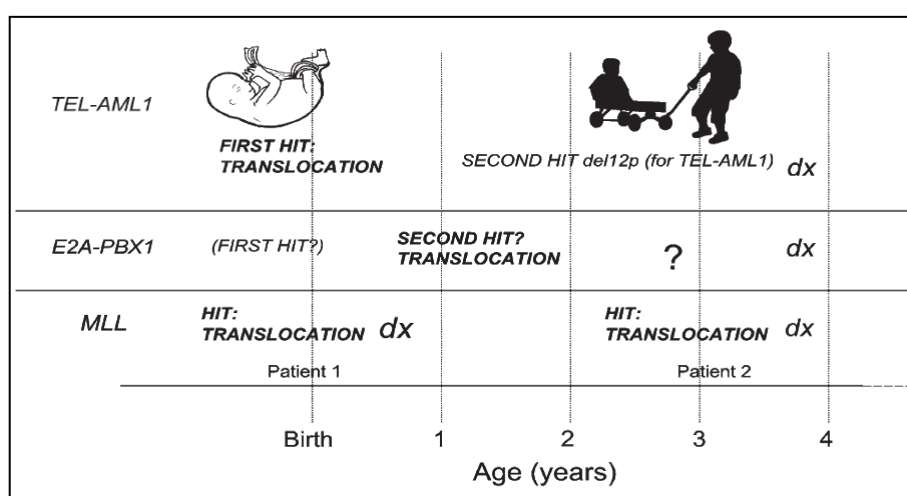


Figura 1: Identificação e o momento dos rearranjos moleculares na leucemogênese pediátrica. Eventos pré-natais e pós-natais são demonstrados. As translocações são de origem pré-natal, com exceção da E2A/PBX1. Rearranjos MLL mostram origem pré-natal em crianças até os dois anos de idade e mais jovens, mas não demonstra esta origem em crianças maiores.
Fonte: Adaptado de Wiemels. J Natl Cancer Inst Monogr,2008;39:87- 90. (105)

3.6 ESTUDO DAS PRINCIPAIS TRANSLOCAÇÕES CROMOSSÔMICAS

3.6.1 Estrutura e Função dos Genes TEL e AML1

O gene TEL (Translocação-Ets-Leucemia), também chamado ETV6, consiste de oito éxons, na região 12p13 e codifica uma proteína de 57 kDa, de localização nuclear. (112) É membro da família de fatores de transcrição Ets, necessários para o processo de desenvolvimento e de resposta da célula para o estímulo extracelular.

Como outros fatores de transcrição, ele coopera na regulação da transcrição de muitos genes, influenciando o nível de suas atividades. A própria função do gene TEL é crucial para o estabelecimento da hematopoese de todas as linhagens celulares na medula óssea. (113)

O gene AML1, também conhecido como RUNX1 ou CBFA2, está localizado no cromossomo 21q22 e codifica uma proteína de 250 aminoácidos, de localização nuclear. (114) Está expresso, normalmente, em todas as linhagens hematopoéticas, atuando na regulação da proliferação e diferenciação destas células. (115)

3.6.2 Translocação t(12;21)/TEL-AML1

A translocação t(12;21)(p13;q22) foi reportada, primeiramente, em 1995 por dois grupos diferentes (19,116). Ela é resultante da fusão entre os genes TEL no cromossomo 12 e o AML1 no cromossomo 21. (94)

Esta translocação, não detectável por citogenética convencional, parece ser o rearranjo mais frequentemente encontrado na LLA pediátrica. Quando analisada por FISH ou PCR, a t(12;21) é encontrada em 16-32% dos casos de LLA pré-B da infância e somente em 3-4% dos adultos. (10,108,113) Esta alteração é mais frequente em crianças entre 1 e 12 anos, com um pico entre 2 e 5 anos, e não foi descrita em pacientes com idade inferior a 1 ano. (11,94,113)

A análise molecular desses genes e do gene de fusão mostrou que o ponto de quebra do gene TEL, localiza-se numa região de 15kb entre os exons 5 e 6. Também foram descritos diferentes pontos de quebra em outras regiões: quebras no íntron 4 (raramente), (94,113) no íntron 1 (entre os exons 1 e 2) ou no íntron 2 (entre os exons 2 e 3). (15) Em muitos casos, o maior transcrito emerge como resultado da junção do exon 5 (nucleotídeo 1033) do TEL para o exon 2 (nucleotídeo 503) do AML1. O mesmo paciente pode ter esses dois transcritos simultaneamente. O ponto de quebra que ocorre no íntron AML1 é menos freqüente, resultando na junção dos exon 5 do TEL e exon 3 do AML1. Apesar deste fato, as duas proteínas quiméricas têm a mesma forma e estrutura (94,113) (Figura).

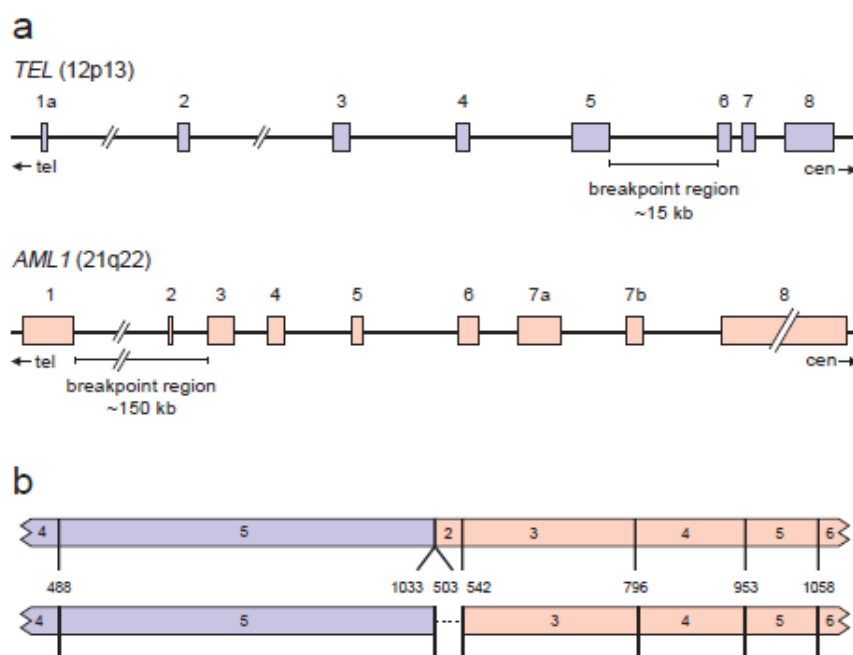


Figura 2: a) Representação esquemática dos genes TEL e AML1 e pontos de quebra. b) Gene de fusão TEL/AML1 gerado como produto da translocação t(12;21)(p13;q22).
 Fonte: van Dogen *et al.* Leukemia, 1999;13:1901-1928. (94)

A fusão TEL/AML1, provavelmente, inibe a atividade de transcrição do gene AML1 normal. (115) A conversão por translocação cromossômica de um fator de transcrição ativador para um repressor de gene é um dos mecanismos patogênicos da LLA com a t(12;21). (108,116) Essa translocação por si só pode ocorrer em progenitores descomprometidos, mas parece ser funcional nos estágios tardios do progenitor do subtipo linfóide. (104)

Muitos pacientes apresentam anormalidades cariotípicas adicionais que contribuem para a pseudodiploidia ou cariótipo near-diplóide. Assim, a alteração secundária mais comum, que ocorre em 50% dos casos é a trissomia do 21. (117) A maioria das crianças com a t(12;21) apresenta o imunofenótipo precursor de células B, (116,118) em particular da LLA-B comum ou pré-B (94) e, muito raramente, da LLA pró-B (110). A expressão de CD10 e HLA-DR é bastante intensa, e fraca para CD20, CD45 e CD34. (4) Muitos pacientes têm co-expressão com os marcadores mielóides CD13, CD33, CD65, (118) porém até agora, a t(12;21) não foi encontrada na LLA-T e LMA. (94)

A presença dessa translocação confere ao paciente um excelente prognóstico que é independente dos fatores de risco padrão, tais como idade e contagem de leucócitos. O tempo livre de doença é de 90%. (118)

3.6.3 Estrutura e função dos genes E2A e PBX1

O gene E2A é constituído por 17 éxons de 4,4kb e está localizado no núcleo, na região cromossômica 19p13.3. (119) Esse gene codifica duas proteínas: E12 e E47, que são geradas por *splicing* alternativos e são membros da família de fatores de transcrição *basic helix-loop-helix* (bHLH), (120,121,122,123) Estes fatores de transcrição, conhecidos como proteínas E, estão envolvidos no processo de diferenciação, crescimento celular, sobrevivência e expressão genética tecida específica. Essas proteínas são expressas em muitos tipos celulares e parecem ser essenciais à hematopoese de células normais da linhagem B. (120,121)

O gene PBX1 constituído por 338 ou 439 aminoácidos de 37 KDa e está localizado no núcleo, na região 1q23, associado às proteínas HOX, cuja função é ligar-se a sequências específicas do DNA (5'ATCAATCAA3'), para a regulação da transcrição. (124)

3.6.4 Translocação t(1;19)/E2A-PBX1

A t(1;19)(q23;p13), é a segunda translocação mais comum na LLA da infância, relatada, primeiramente, em 1984 por Michael, Levin e Garson, (125) em alguns casos de LLA pré-B. Essa translocação gera um gene de fusão que codifica um fator de transcrição quimérico, E2A-PBX1, (126) resultante da fusão do domínio de transativação do bHLH fator de transcrição E2A no cromossomo 19 (p13.3), para o gene PBX1 homeobox (HOX) no cromossomo 1(q23). A proteína de fusão E2A/PBX é oncogênica e afeta a diferenciação celular. (120)

Os pontos de quebra ocorrem no íntron numa região de 3,5kb entre os éxons 13 e 14. A organização genômica do gene PBX1 não é completamente conhecida e os pontos de quebra estão distribuídos numa região intrônica de aproximadamente 50kb entre os éxons 1 e 2. Na maioria dos casos, o transcrito de fusão mostra uma junção no sítio do éxon 13 (nucleotídeo 1518) do E2A para o segundo éxon (nucleotídeo 388) do PBX1. Um transcrito variante é descrito em 5-10% das LLA t(1;19) positiva. Esse transcrito é caracterizado pela inserção de 27 nucleotídeos no

ponto de junção entre os nucleotídeos 1518 e 388 dos genes E2A e PBX1 respectivamente (94) (Figura).

Este subtipo de leucemia difere na origem morfológica e prognósticamente do subtipo de LLA comum, representando aproximadamente 25% das LLA's pré-B da infância, que expressam cIgM, e 5-6% (126) do adulto. (98) É rara na LLA pró-B e LLA-B comum (<1%), bem como nos casos de LLA-T e LMA. (94,127)

A t(1;19), correlacionando-se com a presença de características clínicas de alto risco, tais como leucocitose, níveis elevados de LDH, envolvimento no SNC (128) e raça negra. (2) Assim, essa translocação está associada com pior prognóstico, e os pacientes têm altos risco de recidiva. Ainda não está claro se a t(1;19) por si só é um independente fator prognóstico adverso ou se é, somente quando está associada com outros fatores de alto risco. (120)

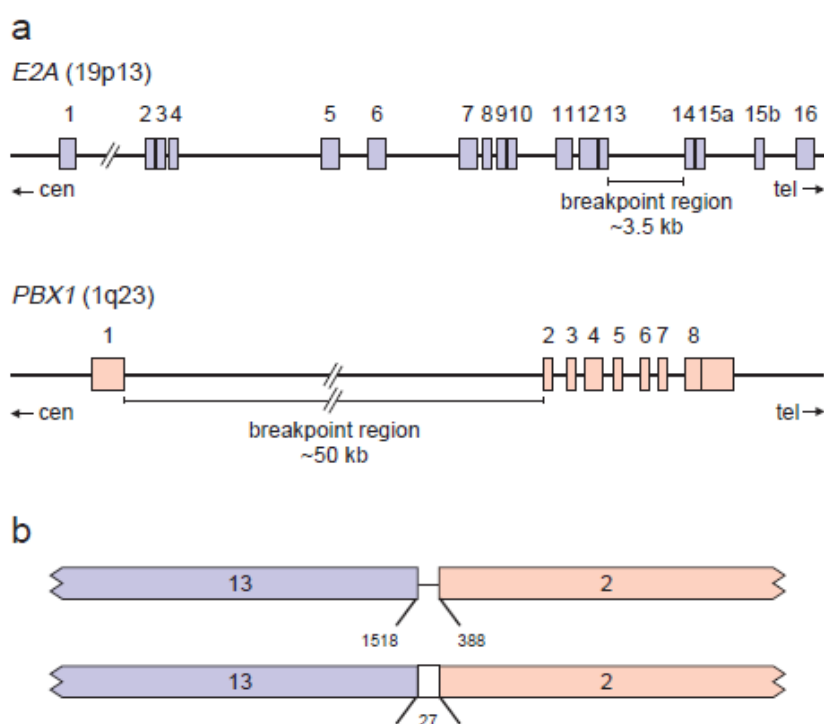


Figura 3: a) Representação dos genes E2A e PBX1 e pontos de quebra. b) Gene de fusão E2A/PBX1 gerado como produto da translocação t(1;19)(q23;p13).

Fonte: van Dogen *et al.* Leukemia, 1999;13:1901-1928. (94)

3.6.5 Estrutura e Função dos Genes BCR e ABL

O gene ABL é constituído por 12 éxons, na região cromossômica 9q34.1, localizado no núcleo, codifica uma proteína de peso molecular de 230kb, na membrana plasmática e citoesqueleto de actina. Esse gene exibe uma atividade permanente de ida e volta, entre o núcleo e o citoplasma. O ABL nuclear desempenha um importante papel no processo de regulação de morte celular, após dano do DNA e o ABL citoplasmático, apresentando função na adesão celular. (129, 130)

O gene BCR constituído por 23 éxons, na região 22q11.2, codifica uma proteína citoplasmática de peso molecular de 130kb. (131) Está localizado no citoplasma e é uma proteína quinase (serina/treonina) que contém vários domínios de sinalização. Este gene parece ser um regulador negativo do BCR/ABL. (132)

3.6.6 Translocação t(9;22)/BCR-ABL

O cromossomo Philadelphia (Ph) foi a primeira lesão genética específica identificada num câncer humano, sendo raro da LLA na infância, mas a mais frequente aberração em adultos com essa patologia. O cromossomo Ph resulta de uma translocação recíproca que funde o gene BCR (*breakpoint cluster region*) do cromossomo 22 para o gene ABL (*Abelson tyrosine kinase*) do cromossomo 9. Essa translocação t(9;22)(q34;q11) resulta numa oncoproteína com atividade tirosina quinase, com diferentes pesos moleculares, dependendo do local de quebra no gene BCR. A translocação cria uma fusão do homólogo humano do *Abelson Murine leukemia* vírus ABL no 9q34, com ponto de quebra na região BCR no 22q11. Um transcrito de fusão BCR-ABL resulta numa baixa regulação do ABL tirosina quinase. Primariamente, três principais transcritos quiméricos BCR-ABL surgem de diferentes pontos de quebra no gene BCR. (133)

Na maioria dos pacientes com LLA Ph positivos, a região de quebra no gene BCR, está localizada na chamada m-bcr entre dois éxons alternativos e o éxon 2. O ponto de quebra no gene ABL está localizado numa vasta região intrônica

(aproximadamente 200kb) entre os éxons 1b e éxons 2 (chamado a2) do ABL. Como uma consequência do ponto de quebra m-bcr somente o primeiro éxon do gene BCR (chamado éxon e1) se une ao éxon 2 (e1-a2) do ABL. Isto gera uma proteína BCR-ABL de peso molecular 190kDa (p190^{BCR-ABL}). Este transcrito é formado em 95% dos casos, esporadicamente, ocorrendo, à formação do transcrito e1-a3. (94,134) (Figura) O ponto de quebra do gene BCR surge dentro da região chamada maior-BCR (M-BCR), entre os éxons 13 e 14 (b2a2), ou éxons 14 e 15 (b3a2), gerando as proteínas p210. (89) Como já mencionado em raros pacientes com LLA o cromossomo Ph não é visível por análise citogenética convencional, mas a fusão BCR/ABL é detectada por RT-PCR usando *primers* alvos. Estes são conhecidos como LLA BCR/ABL positivo, Ph negativo. (135)

Desse modo, a proteína p190^{BCR-ABL} é observada exclusivamente na LLA Ph+, já a proteína p210^{BCR-ABL}, está presente em 20 a 40% dos pacientes adultos, sendo rara na LLA pediátrica Ph+. Esta característica está presente em quase todos os pacientes com LMC Ph+. (133)

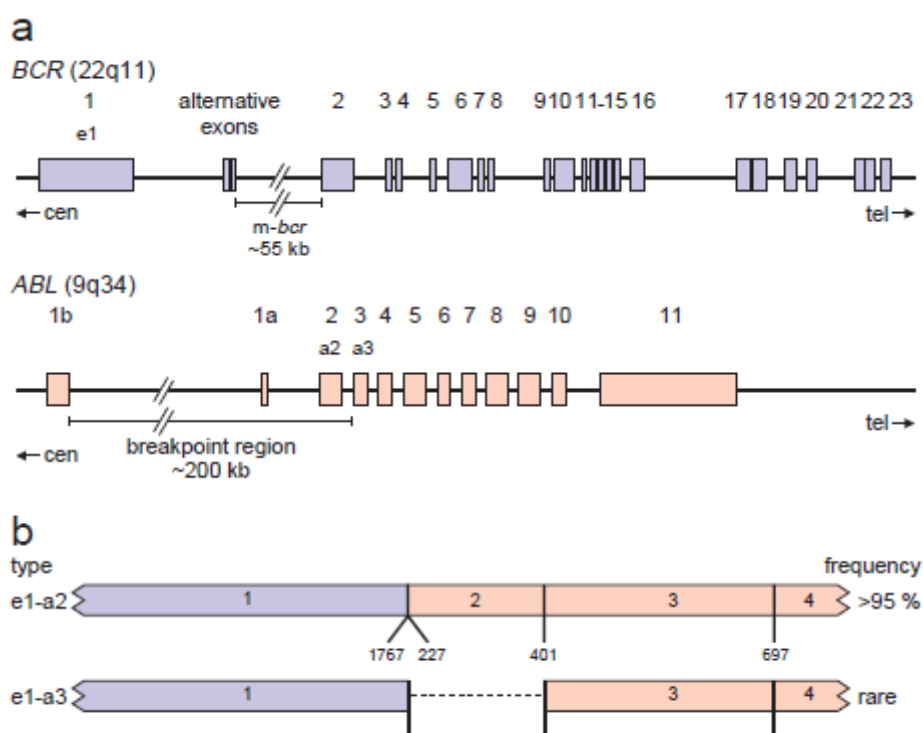


Figura 4: a) Representação dos genes BCR e ABL e pontos de quebra. b) Gene de fusão BCR/ABL gerado como produto da translocação t(9;22)(q34;q11) p190.

Fonte: van Dogen *et al.* Leukemia, 1999;13:1901-1928. (94)

A incidência do aumento do BCR/ABL aumenta com a idade e é encontrada em 25% dos adultos com LLA, em aproximadamente 3-5% das crianças. (113) O fenótipo mais frequente é o de célula B, geralmente expressam CD10, CD19 e CD34, e algumas vezes apresentam marcadores mielóides CD13 e/ou CD33, subtipos LLA B comum e LLA pré-B, (61) raros casos são de células T (60,136).

Clinicamente os pacientes apresentam uma alta contagem de leucócitos e envolvimento no SNC. Esta translocação confere um pior prognóstico e as taxas de remissões raramente excedem 70% com tempo livre de doença de 25 a 30% em 5 anos. (2)

3.6.7 Estrutura e Função dos Genes MLL e AF4

O gene leucemia de linhagem mista (MLL/HRX/ALL1), localizado na banda 11q23 está alterado, frequentemente, na leucemia do lactente (crianças menores de 1 ano). Este gene consiste de pelo menos 86 éxons, codificando uma proteína nuclear com um peso molecular de aproximadamente 430kDa, funcionando como um regulador positivo para a expressão do gene no desenvolvimento embrionário inicial da hematopoese. (137,138)

Verifica-se também o rompimento do gene pela translocação 11q23, gerando mais de 54 pontos de quebra diferentes e envolvendo 31 genes padrões (94,139,140) (Figura). Os cinco mais frequentes rearranjos MLL, contabilizam aproximadamente 80% de todas translocações MLL que geram MLL-AF9; t(11;19)(q23;p13.3) ou MLL-ENL; t(10;11)(p12;q23) ou MLL-AF10; e t(6;11)(q27;q23) ou MLL-AF6. Devido à promiscuidade não é conhecido se os diversos padrões apresentam funções comuns e se existe a mesma influência na leucemogênese. (141)

O gene AF4 localizado na região cromossômica 4q21, codifica uma proteína de 1210 aminoácidos, com peso molecular de 140kDa e está localizado no núcleo cuja função é ativador da transcrição. (142)

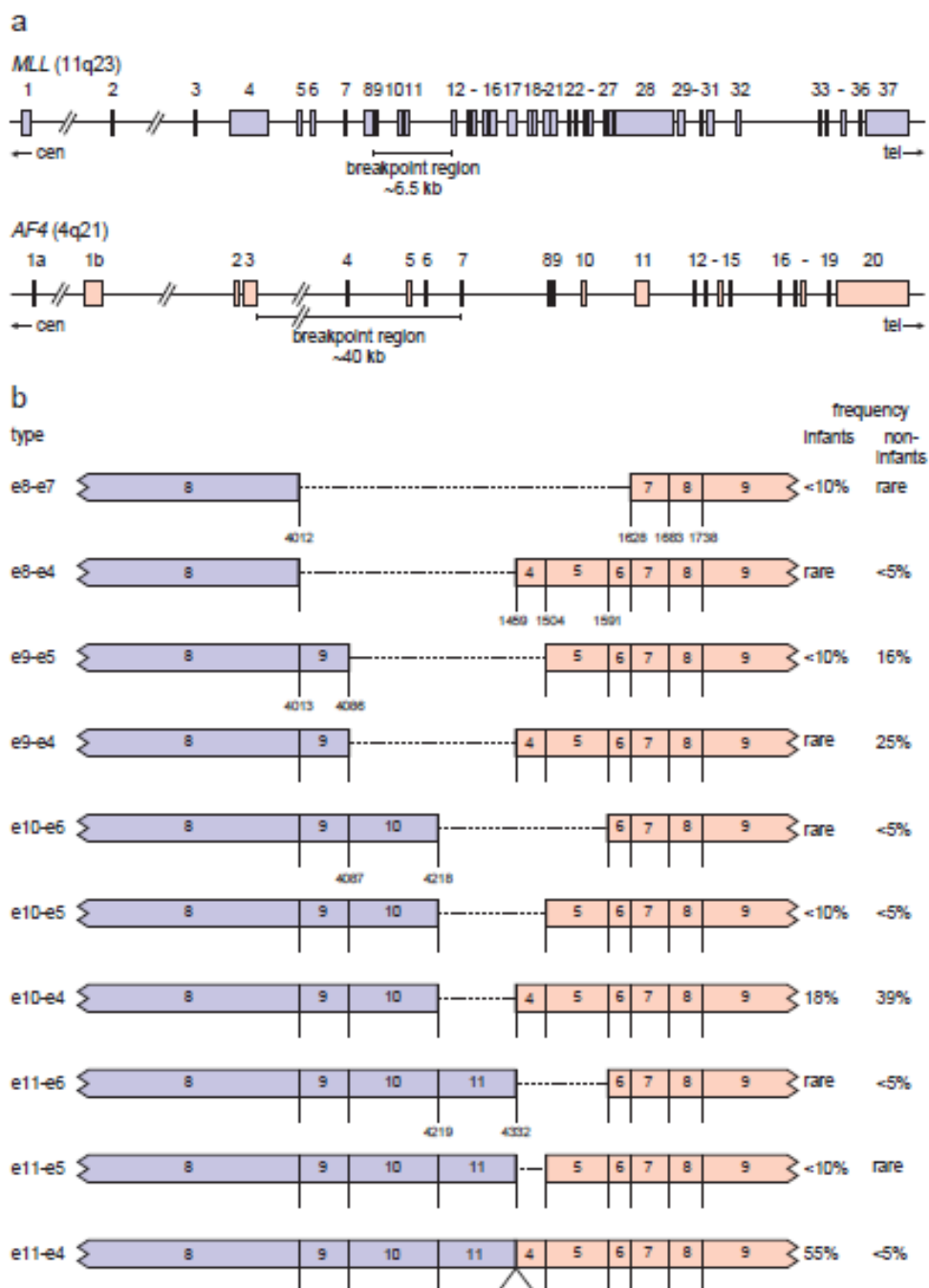


Figura 6: a) Representação dos genes MLL e AF4 e pontos de quebra. b) Gene de fusão MLL/AF4 gerado como produto da translocação t(4;11)(q21;q23).

Fonte: van Dogen *et al.* Leukemia, 1999;13:1901-1928. (94)

Assim as leucemias que apresentam a translocação, envolvendo o gene MLL no cromossomo 11q23 possuem uma única característica clínica e biológica. Rearranjos MLL são encontrados em 70-80% das leucemias em lactentes, e ocorre em aproximadamente 3% das LLAs em crianças com idade acima de 1 ano. (6) Este gene está envolvido em mais de 40 translocações associadas à leucemia, (146) cuja anormalidade nem sempre é detectada pelos procedimentos de citogenética

convencional, sendo os dois métodos de *screening*: a RT-PCR e o FISH. (147,148,149,150)

Esta translocação é a mais frequente aberração MLL-específica em lactentes com LLA pró-B, mas pode estar presente em 17% das LLAs pré-B e 8% das LLA's-T (86). A negatividade para CD10 do rearranjo MLL é um sinal de imaturidade celular, (144) além disso, a co-expressão do CD65 e CD15 é uma evidência de que este tipo de leucemia representa a transformação da célula progenitora linfomielomonocítica. (84)

Pacientes com LLA rearranjo-MLL tem um pior prognóstico, quando comparado com crianças com outras formas de LLA, (141) pois está associado a crianças com idade inferior a 1 ano, alta contagens de leucócitos, organomegalia e envolvimento no SNC. (137) Entre estes fatores, a presença do rearranjo no gene MLL é o mais importante, sendo correlacionado com características clínicas adversas e pior prognóstico, característica deste distinto subtipo de LLA na infância. (140)

A identificação de anormalidades genéticas envolvendo o gene MLL na LLA pediátrica representa um pré-requisito indispensável à classificação acurada da doença, pois se trata de uma leucemia altamente distinta que pode ser claramente separada de outros subtipos de LLA.

3.7 PROGNÓSTICO

Independentemente do grupo de estudo, atualmente todo o estadiamento em LLA parte de uma estratificação estática e outra dinâmica. A primeira inclui características clínicas como, idade e gênero do paciente, contagem inicial de leucócitos em sangue periférico ao diagnóstico, expressão imunológica da doença e de alterações cromossômicas específicas, nas células leucêmicas, como translocações, conhecidamente de bom ou mau prognóstico. A segunda avalia a resposta da doença ao tratamento e é avaliada em dois pontos: (i) no oitavo dia de tratamento com prednisona e (ii) no 33º dia de tratamento que coincide com o final do tratamento de indução. Definindo assim o prognóstico e os diferentes grupos de risco: padrão, intermediário e alto. (151,152)

Como já mencionado, as translocações cromossômicas da LLA levam a formação de genes de fusão e sua expressão como transcritos quiméricos e proteínas são de relevância na leucemogênese porque influenciam a expressão de genes regulatórios, chaves no sistema hematopoético. (Tabela 3) A identificação dessas translocações é um importante instrumento não só para o diagnóstico, como também para a determinação do prognóstico e estratificação dos pacientes. Isto possibilita o desenvolvimento de protocolos terapêuticos, baseados na aberração genética específica presente em leucemias. (153)

Uma das translocações que tem prognóstico significativo é a t(9;22)(q34;11). Crianças com o rearranjo BCR/ABL mostram uma pior resposta a prednisona (154,155) e tem altos níveis de doença residual mínima (DRM) após a terapia de indução. (115) Por esta razão, pacientes que contêm blastos leucêmicos com t(9;22) estão associados ao pior prognóstico, e são candidatos a transplante de medula óssea, após a remissão. (93)

A segunda translocação que identifica pacientes num grupo de alto risco é a t(1;19)(q23;p13). (11) O rearranjo E2A/PBX1 é associado com pior prognóstico em pacientes tratados com terapia padrão, mas tais pacientes apresentam uma melhora com abordagens terapêuticas mais agressivas. (156)

Tabela 3: Anormalidades cromossômicas estruturais na LLA.

Anormalidade cromossômica	Genes envolvidos	Função da Proteína	Imunofenótipo	FAB	Frequência	Prognóstico
t(12;21)(p13;q22)	TEL/AML1	Regulação da transcrição e fosforilação	LLA B Comum Pré-B <i>CD13/CD33</i>	L1/L2	20-25%	Favorável
t(9;22)(q34;q11)	BCR/ABL	Atividade tirosina quinase ciclina dependente	LLA B Comum Pré-B <i>CD13/CD33</i>	L1/L2	3-5%	Desfavorável
t(1;19)(q23;p13)	E2A/PBX1	Fator transcrição	LLA Pré-B	L1/L2	5-6%	Desfavorável
t(4;11)(q21;q23)	MLL/AF4	Regulação transcrição	LLA Pró-B <i>CD15, CD65 e 7,1</i>	L1/L2	3-5%	Desfavorável

Fonte: Adaptação Faderl SA *et al.* Blood, 199; 91:3995-4019. (10)

A terceira translocação conhecida que confere um pior prognóstico em pacientes com LLA pediátrica é a t(4;11)(q21;q23). Esses pacientes apresentam características mais agressivas e tem alta probabilidade de falência no tratamento com protocolo padrão, sendo necessário o uso de intensiva quimioterapia multilinhagem em combinação com transplante de *stem cell* hematopoética. (93)

Por outro lado, a t(12;21)(p13;q22) é associada com um excelente prognóstico com taxas de sobrevida livre de doença de 90%, tendo uma excelente resposta ao tratamento. (157) Dessa forma, a expressão de TEL-AML1 identifica um grande grupo de pacientes candidatos a terapias menos intensas. (158) Entretanto, resultados recentes comprovam que cerca de 20% das crianças com a t(12;21) recaem, representando o maior índice de recaída em um grupo considerado de bom prognóstico. Ao que tudo indica não há influência de ganhos de mutações e sim da remanescência de um clone pré-leucêmico com a TEL-AML1. Com isso a t(12;21) está deixando de ser um fator independente para baixo risco de recaída em alguns protocolos. (159)

3.8 ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO

3.8.1 Protocolo Berlin-Frankfurt-Münster (BFM-2002)

3.8.1.1 Grupo de Baixo Risco

Pertencem a este grupo pacientes com idade ≥ 1 ano e < 6 anos, contagem de leucócitos ao diagnóstico inferior a $20 \times 10^9/L$ e resposta ao tratamento avaliada pela presença de blastos no dia 8 (D8) em sangue periférico menor que $1 \times 10^9/L$ e medula M1 (menos de 5% de blastos) ou M2 (a partir de 5 até menos de 25 blastos) no D15 ou M1 no D33. Todos os seis critérios devem ser preenchidos. (152)

3.8.1.2 Grupo de Risco Intermediário

Pacientes com idade <1 ano e ≥ 6 anos e/ou contagem de leucócitos ao diagnóstico superior a $20 \times 10^9/L$, com resposta ao tratamento avaliada pela presença de blastos no D8 em sangue periférico inferior a $1 \times 10^9/L$ e medula M1 ou M2 no D15 ou M1 no D33, ou baixo risco com M3 (a partir de 25 blastos) no D15 ou M1 no D33.

3.8.1.3 Grupo de Alto Risco

Pacientes classificados como risco intermediário e medula M3 no D15.

Blastos no D8 em sangue periférico a partir de $1 \times 10^9/L$ e medula M2 ou M3 no D33 e pela presença das translocações $t(9;22)$ e $t(4;11)$. Pelo menos um desses critérios deve ser preenchido.

3.8.2 Protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia da Infância (GBTLI-LLA-99)

O protocolo GBTLI LLA-99 prevê a estratificação dos pacientes em dois grupos de risco, utilizando como critério a classificação do *National Cancer Institute* e a resposta terapêutica *in vivo* avaliada no 7º, 14º e 28º dias do tratamento da indução com quatro drogas (dexametasona, vincristina, daunorubicina, asparaginase). (160)

3.8.2.1 Grupo de Baixo Risco de Recidiva (RB)

É o grupo representado por pacientes que ao diagnóstico têm idade ≥ 1 ano e < 9 anos e/ou contagem de leucócitos menor que $50 \times 10^9/L$ e que são respondedores rápidos (leucometria menor que $5 \times 10^9/L$ no D7, ausência de blastos periféricos+ medula M1/M2 no D14) e, que atinjam medula M1 no 28º dia da indução. Doentes com envolvimento inicial no SNC (CNS-3), deverão apresentar ausência de blastos no líquido no D14.

3.8.2.2 Grupo de Alto Risco de Recidiva (AR)

É o grupo constituído por pacientes que ao diagnóstico têm idade < 1 ano e ≥ 9 anos e/ou contagem de leucócitos a partir de $50 \times 10^9/L$ e os respondedores lentos (leucometria a partir de $5 \times 10^9/L$ no D7, presença de blastos leucêmicos no sangue periférico no D14 e/ou medula M3 no D14) e, pelos doentes não responsivos (medula M2 ou M3 no D28, ou evidência de acometimento leucêmico extramedular no final da indução). A presença de blastos no líquido no D14 classifica o paciente neste grupo de risco.

3.8.3 Classificação do *National Cancer Institute*

O *Cancer Therapy Evaluation Program* (CTEP) do *National Cancer Institute* (NCI) definiu um critério mais uniforme para a estratificação dos pacientes em grupos de risco. O benefício deste sistema foi padronizar indicadores prognósticos específicos para todos os pacientes, o que aumenta habilidade de investigadores a utilizar resultados de outros estudos clínicos. Especial ênfase é dada para a idade e contagem de leucócitos para definir grupos de risco para pacientes com LLA precursor B. (161)

3.8.3.1 Grupo de Baixo Risco

É o grupo constituído por crianças com idades entre 1 a 9 anos e com contagem de leucócitos ao diagnóstico $<50 \times 10^9/L$.

3.8.3.2 Grupo de Alto Risco

Pertencem a este grupo crianças com ≥ 10 anos e contagem de leucócitos ao diagnóstico $\geq 50 \times 10^9/L$.

Outros fatores prognósticos além da idade e contagem de leucócitos podem contribuir para a estratificação de risco, como propriedades específicas das células blásticas leucêmicas (índice de DNA, anormalidades cariotípicas e imunofenótipo) e a resposta ao início da terapia.

3.9 TRATAMENTO

Muitos avanços têm sido feito, nas últimas décadas no tratamento da LLA pediátrica, baseado na identificação de marcadores prognósticos e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas, adaptadas ao grupo de risco. A LLA pode ser curada em aproximadamente 75 a 80% dos casos, pelo uso de regimes poliquimioterápicos intensivos (162,163,164), mas, aproximadamente, 25% dos pacientes ainda falham, e outros, frequentemente, apresentam toxicidades terapêuticas significativas. (165)

Com exceção de pacientes com LLA de células B maduras, que têm tratamento específico curto e um programa de quimioterapia muito intenso, todos os pacientes com LLA na infância são tratados com estratégia semelhantes. (165) Regimes atuais consistem em quatro fases de tratamento importantes, que incluem: (i) fase de indução, objetivando uma remissão inicial, dentro de um mês aproximadamente, através do uso de múltiplos agentes quimioterápicos; (ii) uma fase de consolidação, para erradicar blastos residuais em pacientes que estão em

remissão pelo critério morfológico que, geralmente, inclui vários ciclos de quimioterapia; (iii) terapia direcionada ao SNC; e (iv) período de manutenção, para estabilizar a remissão pela supressão de ressurgimento de um clone droga-resistente, objetivando uma redução contínua de células leucêmicas residuais. Para determinado grupo de pacientes, o tratamento também pode incluir radioterapia cranial preventiva ou terapêutica ou o transplante de *stem cell* alogênico. A duração do tratamento varia de 2 e 3 anos, dependendo do protocolo. (166)

3.9.1 Terapia de Indução

Muitos especialistas em leucemias consideram que a citorredução inicial que leva a contagem de blastos residuais inferiores a 5%, ao final da terapia de indução é crucial para a cura final. Entretanto para atingir esse objetivo, restaurar a hematopoese normal e diminuir o risco de infecção, uma combinação de três a cinco drogas é administrada por 4 a 5 semanas. Este regime, atualmente inclui vincristina semanalmente e esteróides diariamente. (165) Tradicionalmente, prednisona oral por 28 dias foi considerado o padrão por muitos grupos, portanto é clara a evidência que terapias com esteróides mais agressivas, ocasionam um controle mais potente da leucemia. A introdução mais recente de dexametasona em vários estudos cooperativos trouxe uma melhora significativa no controle da leucemia, ambos por aumento da cobertura do chamado espaço extramedular (incluindo SNC e testículos) e prevenindo a recidiva. (167,168,169) Entretanto, o uso de altas doses de dexametasona está associado à alta taxa de morbidade, incluindo infecções bacterianas e fúngicas, alterações comportamentais e necrose avascular. No entanto, os benefícios do uso devem ser balanceados contra o risco de morte por toxicidade e altas taxas de severa morbidade. (164) Ainda há a adição de uma terceira ou quarta droga, tais como asparaginase ou antraciclina, que pode não ser necessária em pacientes com risco padrão, mas é eficaz para os pacientes de alto risco. Usando esta estratégia, ensaios clínicos mais recentes reportam até 98% de remissão completa em crianças com LLA. (170)

3.9.2 Intensificação ou Reindução

É comumente aceito o conceito que pacientes em remissão completa aparente, ainda tenham DRM. Então, o uso da terapia de intensificação pode fornecer um adicional e possível controle final da leucemia. Para este propósito, muitos grupos utilizam um programa de tratamento que inclui drogas idênticas ou muito semelhantes às utilizadas na indução. A importância da intensificação tardia ou reindução foi demonstrada pela experiência inicial do grupo BFM (167) e mais tarde confirmada por outros grupos. (162,170,171,172,173,174) Exposição a asparaginase como pós-indução de terapia de intensificação fornece excelentes resultados com baixa morbidade. (165)

3.9.3 Profilaxia de Leucemia Meníngea

Na metade do último século, a atividade pioneira do D. Pinkel do Hospital *St Jude Children's Research* mostrou o potencial da radioterapia para diminuir a falência do tratamento, frequentemente, ocorrido, como uma consequência da disseminação no SNC, em pacientes que apresentavam um aparente controle da doença na medula óssea. (175) O benefício da radioterapia é, todavia, diminuído pela ocorrência de neoplasias secundárias, desordens endócrinas e no crescimento, disfunção neurocognitiva e neurotoxicidade. O Hospital *St Jude Children's Research* documentou que irradiação prévia nos pacientes curados de LLA da infância estava associada com 20,9% de risco acumulativo de uma segunda neoplasia em 30 anos, junto com alta mortalidade e comprometimento da qualidade de vida como maiores taxas de desemprego na população tratada que a população em geral. (176) Atualmente, a melhora contínua na eficácia da quimioterapia tem permitido que a irradiação para profilaxia do SNC seja substituída pelo uso de dexametasona, altas doses de metrotexato e quimioterapia intratecal prolongada. (177) Metrotexato de média para altas doses é frequentemente usado durante esta fase por causa da sua habilidade de difusão no SNC. Está bem documentado que altas doses deste medicamento melhoram o prognóstico em pacientes com LLA-T, devido ao pequeno

acúmulo de metabólitos poliglutamato que é mais ativo na LLA-T que na LLA-B. Da mesma forma, pacientes com TEL/AML1 ou E2A/PBX1 podem se beneficiar de altas doses de metrotexato. Irradiação no SNC ainda está indicada para um seleto grupo de pacientes, tais como aqueles com LLA-T com contagens de leucócitos maior que $100 \times 10^9/L$, doença no SNC, falha na remissão e presença de anormalidades genéticas de alto risco tais como t(9;22) e t(4;11). (178) A terapia intratecal com metrotexato é então, no presente, o preconizado para todos os pacientes, pelo menos durante os primeiros 6-12 meses de tratamento. (179) Em paralelo, a irradiação deve ser usada para o tratamento da leucemia testicular. (180)

3.9.4 Continuação da Terapia

O mecanismo real do efeito protetor da terapia prolongada permanece obscuro, mas sempre que a duração do tratamento for diminuída para 12 a 18 meses, resultados inferiores são obtidos, (181) por isso a combinação mais popular é mercaptopurina diariamente e metrotexato semanalmente, via oral. (182)

3.9.5 Transplante de *Stem Cell* Hematopoética Alogênico

Em geral, o transplante autólogo não é efetivo na LLA pediátrica e não deve ser recomendado. (155) Já o transplante alogênico, que oferece o benefício do efeito enxerto contra leucemia, está recomendado em pacientes sabidamente de alto risco – tanto naqueles com alterações genéticas de mau prognóstico, quanto nos que apresentam uma resposta sub-ótima ao tratamento poliquimioterápico. (163)

Em pacientes com LLA BCR/ABL positivos, ficou demonstrado desde as décadas de 1980 a 1990, que o transplante de medula óssea de doadores HLA idênticos é mais eficaz que outros tipos de transplante ou apenas quimioterapia intensiva, em termos de tempo de sobrevida livre de doença (EFS) e sobrevida global (OS). (183,184) Este benefício para os outros tipos raros de LLA com mau prognóstico, por exemplo, lactentes com t(4;11), permanece controverso. (185) Há

um estudo do grupo BFM que mostrou que casos de LLA de células T, de alto risco, podem se beneficiar com o transplante alogênico. (186)

3.9.6 Terapias Alvo

Terapias alvo em desenvolvimento podem contribuir para progressos nos resultados do tratamento da LLA da infância e adolescência. O alvo destas terapias é o produto de fusão leucemogênico, ou mais especificamente, a oncoproteína. O paradigma desta estratégia ficou demonstrado com o uso do mesilato de imatinibe para o tratamento da leucemia mielóide crônica. (187) O imatinibe é um efetivo inibidor desta quinase, e sua utilização leva à remissão hematológica, citogenética e molecular em 96%, 85% e 69%, respectivamente. A ocorrência de mutações no sítio de ligação do Imatinibe leva, contudo a respostas sub-ótimas ou resistência ao tratamento. (188) Em face desse problema, novos inibidores de tirosina quinase, como por exemplo, o nilotinibe e o desatinibe têm sido desenvolvidos. No tratamento das leucemias linfóides agudas particularmente do adulto, a utilização destas drogas alvo associadas a poliquimioterapia está atualmente em investigação. (189)

Foi descoberto, recentemente, que em metade dos casos de LLA-T apresentam mutações ativas, de genes NOTCH1 que fornecem uma base adicional para terapias alvo da via NOTCH. Diante disso, o alvo, a enzima purina nucleosídeo fosforilase na LLA-T, especialmente pela forodesina é outra estratégia que está sendo testada na LLA pediátrica. (190,191)

A super expressão do tipo selvagem FLT3, especialmente na LLA com rearranjo MLL e LLA hiperdiploide, também fornece uma oportunidade para terapias alvo com inibidores de FLT3. Outra oportunidade pode ser o estado de hipermetilação da LLA rearranjo MLL, onde o gene supressor de tumor FHIT é silenciado pela hipermetilação. Re-expressão conduz a morte das células com rearranjo MLL da LLA do lactente, e agentes de desmetilação têm o mesmo efeito. (192)

Finalmente, diferentes anticorpos monoclonais, dirigidos a diferentes antígenos como CD20, CD22 (193) e CD52, estão no início de estudos clínicos na LLA da infância. (115)

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo identificar as principais alterações cromossômicas de importância prognóstica, nos pacientes pediátricos com leucemia linfóide aguda, através da técnica de RT-PCR, tratados em duas Instituições de referência para o diagnóstico e tratamento de LLA da infância na cidade de Porto Alegre.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Determinar a caracterização imunofenotípica dos blastos leucêmicos nos pacientes estudados.
- ii. Determinar a frequência das principais anormalidades cromossômicas observadas no grupo de estudo.
- iii. Identificar as quatro principais translocações cromossômicas de significância prognóstica pela técnica da RT-PCR.
- iv. Determinar a frequência dos subtipos de LLA, de acordo com a atual classificação da OMS para o diagnóstico e estratificação de risco dos casos estudados.
- v. Padronizar e oferecer o ensaio RT-PCR para futuros pacientes atendidos nas Instituições envolvidas para a caracterização das quatro principais translocações da LLA pediátrica.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pui CH, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukemia-current status and future perspectives. *Lancet Oncol*,2001;2:597-607.
2. Kabriaei P, Anastasi J, Larson RA. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. *Best Pract Res Clin Haematol*,2003;15:597-621.
3. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*,1995;9:1783-1786.
4. de Zen L, Orfao A, Cazzaniga G, Masiero L, Cocito MG, Spinelli M *et al.* Quantitative multiparametric immunophenotyping in acute lymphoblastic leukemia: correlation with specific genotype I. ETV6/AML1 ALLs identification. *Leukemia*,2000;14:1225-1231.
5. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*,2009;114:937-951.
6. Sallan SE, Golub TR, Pui C, Campana D, Evans WE, Behm FG *et al.* Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*, Jan 1999;1999:103-113.
7. Carrol WL, Btiojwani D, Min DJ. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*, Jan 2003;2003:102-131.
8. Hanahan D & Weinberg RA. The Hallmarks of cancer. *Cell*, 2000;100:57-70.
9. Crans HN & Skamoto KM. Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia. *Leukemia*,2001;15:313-331.
10. Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*,1998;91:3995-4019.
11. Puí CH, Robison LL, Look T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*,2008;371:1030-1043.
12. Felix CA, Lange BJ, Chessells JM. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: challenges and controversies in 2000. *Hematology*, Jan 2000;2000:285-302.
13. Harrison JC. The genetics of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*,2000;13:427-439.

14. Harrison JC & Foroni L. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*,2002;6:91-113.
15. INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>). Acesso em: 03 Jan 2010.
16. Magalhães IQ, Pombo-De-Oliveira MS, Bennett CA, Córdoba JC, Dobbin J, Ford AM. *et al.* TEL-AML1 fusion gene frequency in pediatric acute lymphoblastic leukaemia in Brazil. *Br J Haematol*,2000;111:204-207.
17. Zen PRG, Lima MC, Coser VM, Silla L, Daudt L, Fernandes MS. Prevalence of TEL/AML1 fusion gene in Brazilian pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*,2004;151:68-72.
18. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, Valsecchi MG, Ludwig WD, Burci L *et al.* Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. *Blood*,1997;90:571-577.
19. Romana R, Mauchauffé M, Lê Coniat M, Chumakov I, Lê Paslier D, Berger R *et al.* The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a TEL-AML1 gene fusion. *Blood*,1995;85:3662-3670.
20. Cave H, Cacheux V, Raynaud S, Brunie G, Bakkus M, Cochaux P *et al.* ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphocytic leukemia. *Leukemia*,1997;11:1459-1464.
21. Trka J, Zuna J, Hrusak O. Impact of TEL/AML1-positive patients on age distribution of childhood acute lymphoblastic leukemia in Czech Republic. *Leukemia*,1998;12:996-1007.
22. Liang DC, Chou TB, Chen JS, Shurtleff SA, Rubinitz JE, Downing JR *et al.* High incidence of TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia in Taiwan. *Leukemia*,1996;10:991-993.
23. Spathas DH, Stewart J, Singer LO, Theriault A, Bovey M, Connor JM. Detection of t(12;21) in childhood acute lymphoblastic leukemia by fluorescence in situ hybridation. *Cancer Genet Cytogenet*,1999;110:7-13.
24. Inamdar N, Kumar SA, Banavali SD, Advani S, Magrath I, Bhatia K. Comparative incidence of the rearrangements of TEL/AML1 and ALL1 genes in pediatric precursor B acute lymphoblastic leukemias in India. *Int J Oncol*,1998;13:1319-1322.

25. Siraj AK, Kamat S, Gutierrez MI, Banavali S, Timpson G, Sazawal S *et al.* Frequencies of the major subgroups of precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in Indian children differ from the west. *Leukemia*,2003;17:1192-1193.
26. Hill A, Short MA, Varghese C, Kusumakumary P, Kumari P, Morgan GJ. The t(12;21) is underrepresented in childhood B-lineage acute lymphoblastic in Kerala, Southern India. *Haematologica*,2005;90:414-416.
27. Garcias-Sanz R, Alaejos I, Orfao A, Rasillo A, Chillon MC, Tabernero MD *et al.* Low frequency of the TEL/AML1 fusion gene in acute lymphoblastic; leukaemia in Spain. *Br J Haematol*,1999;107:667-669.
28. Silva MLM, Souza MHO, Ribeiro RC, Land MGP, Azevedo AMB, Vasconcelos F. *et al.* Cytogenetic analysis of 100 consecutive newly diagnosed cases of acute lymphoblastic leukemia in Rio de Janeiro. *Cancer Genet Cytogenet*,2002;137:85-90.
29. Ramot B & Magrath I. Hypothesis: The environment is a major determinant of the immunological sub-type of lymphoma and acute lymphoblastic leukaemia in children. *B J Haematol*,1982;52:183-189.
30. Greaves MF, Pegram SM & Chan LC. Collaborative Group Study of the epidemiology of acute lymphoblastic leukaemia subtypes: background and first report. *Leuk Res*,1985;9:715-733.
31. Greaves MF, Colman SM, Beard MEJ, Bradstock K, Cabrera ME, Chen PM *et al.* Geographical distribution of acute lymphoblastic leukaemia subtypes: second report of the Collaborative Group Study. *Leukemia*,1993;7:27-34.
32. Greaves MF. A etiology of acute leukaemia. *Lancet*,1997;349:344-349.
33. Martinez-Ramirez A, Urioste M, Contra T, Cantalejo A, Tavares A, Portero JA *et al.* Fluorescence in situ Hybridization of TEL/AML1 fusion and other abnormalities involving TEL and AML1 genes. Correlation with cytogenetic findings and prognostic value in children acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*,2002;86:1245-1253.
34. Hoffmann R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H. *Hematology: Basic Principles and Practice*, 5th ed.,2005.
35. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*,2006;6:193-203.
36. Berger JM, Gablin SJ, Harrison SC, Wang JC. Structure and mechanism of DNA Topoisomerase II. *Nature*,1996;379:225-232.

37. Money Penny CG, Shao J, Song Y, Gallagher EP. MLL rearrangements are induced by low doses of etoposide in human fetal hematopoietic Stem Cells. *Carcinogenesis*,2006;27:874-881.
38. Kumar L. Epipodophyllotoxins and secondary leukaemia. *Lancet*,1993;342:819-820.
39. Ross JA, Potter JD, Robison LL. Infant leukemia, Topoisomerase-II inhibitors, and MLL gene. *J Natl Cancer Inst. (Bethesda)*,1994;86:1678-1680.
40. Doorn-Khosrovani SBW, Janssen J, Maas LM, Godschalk RWL, Nijhuis JG, Schooten FJ. Dietary flavonoids induce MLL translocations in primary human CD34+ cells. *Carcinogenesis*,2007;28:1703-1709.
41. Ross JA, Davies SM, Potter JD, Robison LL. Epidemiology of childhood leukemia, with a focus on infants. *Epidemiol Rev*,1994;16:243-272.
42. Alexander FE, SPathal SL, Biondi A, Brandalise S, Vabrera ME, Chan LC *et al.* Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with *MLL* gene fusion. *Cancer Res*,2001;61:2542-2546.
43. Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui CH. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood*,2000;96:24-33.
44. Hande KR. Etoposide: four decades of development of a Topoisomerase II Inhibitor. *Eur J Cancer*,1998;34:1514-1521.
45. Pombo-de-Oliveira MS, Koifman S, and Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia. Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*,2006;15:2336-2340.
46. Hut AM & Kalf GF. Inhibition of human DNA Topoisomerase II by hydroquinone and P-benzoquinone, reactive metabolites of benzene. *Environ. Health Perspect*, 1996;104:1265-1269.
47. Kulling SE, Rosenbergg B, Jacobs E, Metzler M. The phytoestrogens Coumestrol and Genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arc Toxicol*,1999;73:50-54.
48. Vickers A & Zollman C. ABC of complementary medicine: herbal medicine. *Br Med J*,1999;319:1050-1053.
49. Strick R, Strissel PL, Borgers S, Smith SL, Rowley JD. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the *MLL* gene and may contribute to infant leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,2000;97:4790-4795.

50. Ross JA. Environmental and genetic susceptibility to MLL-defined infant leukemia. *J Nat Cancer Inst Monogr*,2008;39:83-86.
51. Shu XO, Ross JA, Pedergrass TW, Reaman GH, Lampkin B, Robson LL. Parental alcohol consumption, cigarette smoking and risk of infant leukemia: a Children's Cancer Group Study. *J Natl Cancer Inst*,1996;88:24-31.
52. Greaves M. Science, medicine, and the future childhood leukaemia. *BMJ*,2002;324:283-287.
53. UK Childhood Cancer Study Investigators. Childhood cancer and residential proximity to power lines. *Br J Cancer*,2000;83:1573-1580.
54. Pui CH, Sallan S, Relling MV, Masera G, Evans WE. International childhood acute lymphoblastic leukemia workshop: Sausalito, CA, 30 November-1 December 2000. *Leukemia*,2001;15:707-715.
55. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol*,1976;33:451-458.
56. Jennings DC & Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*,1997;158:2863-2892.
57. Dworzak MN, Fritsch G, Froschl G, Printz D, Gadner H. Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. *Blood*,1998;92:3203-3209.
58. Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, Garcia-Marcos MA, González M, Vazquez L *et al.* Detection of abnormalities in B-cell differentiation pattern is a useful tool to predict relapse in precursor-B-ALL. *Br J Haematol*,1999;104:695-705.
59. van Lochem, van der Velden, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NAC, van Dogen JM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry Part B*,2004;60B:1-13.
60. Orfao A, Ortuño F, Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry Part A*,2004;58:62-71.
61. Campana D. Molecular determinants of treatment response in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*, Jan 2008;2008:366-373.

62. Borowitz, Shuster JJ, Civin CI, Carroll AJ, Look AT, Behm FG *et al.* Prognostic significance of CD34 expression in childhood B-precursor acute lymphocytic leukemia a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol*,1990;8:1389-1398.
63. Behm FG, Raimondi SC, Schell MJ, Look AT, Rivera GK, Pui CH. Lack of CD45 antigen on blast cells in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with chromosomal hyperdiploidy and other favorable prognostic features. *Blood*, 1992;79:1011-1016.
64. Pui CH, Raimondi SC, Borowitz MJ, Land VJ, Behm FG, Pullen DJ *et al.* Immunophenotypes and karyotypes of leukemic cells in children with Down Syndrome and acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*,1993;11:1361-1367.
65. Koehler M, Behm FG, Shuster J, Crist W, Borowitz M, Look AT, Head *et al.* Transitional Pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia of childhood is associated with favorable prognostic clinical features and an excellent outcome: a Pediatric Oncology Group Study. *Leukemia*,1993;7:2064-2068.
66. Basso G, Buldini B, de Zen L, Orfao A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica*,2001;86:675-692.
67. Drexler HG, Messmore HL, Menon M, Minowada J. A case of cTdT-positive B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol*,1986;85:735-738.
68. Gluck WL, Bigner SH, Borowitz MJ, Brenckman WDJ. Acute lymphoblastic leukemia of Burkitt's type (L3 ALL) with 8;22 and 14;18 translocations and absent surface immunoglobulins. *Am J Clin Pathol*,1986;85:636-640.
69. Walle AJ, Al-Katib A, Wong GY, Jhanwar SC, Chaganti RS, Koziner B. Multiparameter characterization of L3 leukemia cell populations. *Leuk Res*,1987; 11:73-83.
70. Finlay JL, Borchering W, Acute B-lymphocytic relapsing leukemia with L1 morphology: a report of two pediatric cases. *Leukemia*,1988;2:60-62.
71. Cortes JE & Kantarjian HM. Acute Lymphoblastic Leukemia a Comprehensive Review with emphasis on biology and therapy. *Cancer*,1995;76:2393-2417.
72. Asnafi V, Beldjord K, Libura M, Villarese P, Millien C, Ballerini P *et al.* Age-related phenotypic and oncogenic differences in T-cell acute lymphoblastic leukemias may reflect thymic atrophy. *Blood*,2004;104:4173-4180.
73. Lucio P, Gaipa G, van Lochem EG, van Wering ER, Porwit-MacDonald A, Faria T *et al.* BIOMED-I Concerted Action Report: flow cytometric immunophenotyping of

- precursor B-ALL with standardized triple-stainings. *Leukemia*,2001;15:1185-1192.
74. Mejstrikova E, Kalina T, Trka J, Stary J, Hrusak O. Correlation of CD33 with poor prognosis in childhood ALL implicates a potential of anti-CD33 frontline therapy. *Leukemia*,2005;19:1092-1094.
75. Wiersma SR, Ortega J, Sobel E, Weinberg KL. Clinical importance of myeloid-antigen expression in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *N Engl J Med*, 1991;324:800-808.
76. Vitale A, Guarini A, Ariola C, Meloni G, Perbellini O, Pizzuti M *et al*. Absence of prognostic impact of CD13 and/or CD33 antigen expression in adult acute lymphoblastic leukemia. results of the GIMEMA ALL 0496 Trial. *Haematologica*, 2007;92:342-348.
77. Pui CH, Williams DL, Roberson PK, Raimondi SC, Behm FG, Lewis SH *et al*. Correlation of karyotype and immunophenotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*,1988;6:56-61.
78. Tien HF, Wang CH, Lee FY, Liu MC, Chuang SM, Chen YC *et al*. Cytogenetic study of acute lymphoblastic leukemia and its correlation with immunophenotype and genotype. *Cancer Genet Cytogenet*,1992;59:191-198.
79. Tabertero MD, Bortoluci AM, Alaejos I, López-Berges MC, Rasillo A, Garcia-Sanz R *et al*. Adult precursor B-ALL with BCR/ABL gene rearrangements displays a unique immunophenotype based on the pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression. *Leukemia*,2001;15:406-414.
80. Gleissner G, Gokbuget N, Bartram CR, Janssen B, Rieder H, Janssen JWG *et al*. Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Mulicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood*,2002;99:1536-1543.
81. Baruchel A, Cayuela JM, Ballerini P, Landman-Paker J, Cezard V, Haddad E. *et al*. The majority of myeloid-antigen-positive (My+) childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemias express TEL-AML1 fusion transcripts. *Br J Haematol*,1997;99:101-106.
82. Borowitz MJ, Rubnitz J, Nash M. Surface antigen phenotype can predict TEL-AML1 rearrangement in childhood B-precursor ALL: a Pediatric Oncology Group Study. *Leukemia*,1998;12:1764-1770.

83. Wuchter C, Harbott J, Schoch C, Schnittger S, Borkhardt A, Karawajew L. *et al.* Detection of acute leukemia cells with mixed lineage leukemia (MLL) gene rearrangements by flow cytometry using monoclonal antibody 7.1. *Leukemia*, 2000;14:1232-1238.
84. Attarbaschi A, Mann G, König M, Steiner M, Strehl S, Schreiberhuber A *et al.* Mixed lineage leukemia-rearranged childhood Pro-B and CD10-negative Pre-B acute lymphoblastic leukemia constitute a distinct clinical entity. *Clin Cancer Re*, 2006;12:2988-2994.
85. Behm FG, Smith FO, Raimondi SC, Pui CH, Bernstein. Human homologue of the rat chondroitin sulfate proteoglycan, NG2, detected by monoclonal antibody 7.1, identifies childhood acute lymphoblastic leukemias with t(4;11)(q21;q23) or t(11;19)(q23;p13) and *MLL* gene rearrangements. *Blood*, 1996;87:1134-1139.
86. Gleissner B, Goekbuget N, Rieder H, Arnold R, Schwartz S, Diedrich H *et al.* CD10-pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a distinct high-risk subgroup of adult ALL associated with a high frequency of *MLL* aberrations: results of the German Multicenter Trials for adult ALL (GMALL). *Blood*, 2005;106:4054-4056.
87. Levine JM, Nishiyama A. The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: a multifunctional proteoglycan associated with immature cells. *Perspect Dev Neurobiol*, 1996;3:245-259.
88. Borkhardt A, Wuchter C, Viehmann C. Infant acute lymphoblastic leukemia – combined cytogenetic, immunophenotypical and molecular analysis of 77 cases. *Leukemia*, 2002;16:1685-1690.
89. van Denderen J, Van der Plas D, Meeuwssen T, Zegers N, Boersma W, Grosveld G, *et al.* Immunologic characterization of the tumor-specific BCR-ABL junction in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1990; 76:136-141.
90. Harris NL, Jaffe ES, Dieboldi J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J *et al.* World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*, 1999;17:3835-3849.
91. Szczepanski T, van der Velden VHJ, van Dongen JJM. Classification system for acute and chronic leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2003;16:561-582.
92. Foa R & Vitale A. Towards an integrated classification of adult acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*, 2002;2:181-199.

93. Marin C, Martinez-Delgado B, Melendez B, Larrayoz MJ, Martinez-Ramirez A, Robledo M *et al.* Multiplex-Polymerase Chain Reaction assay for the detection of prognostically significant translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*,2001;86:1254-1260.
94. van Dogen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G *et al.* Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*,1999;13:1901-1928.
95. Nashed AM, Rao KW e Gulley ML. Clinical applications of BCR/ABL molecular testing in acute leukemia. *Journal of Molecular Diagnostics*,2003;5:63-72.
96. Costello R, Lafage MYTVB, Sainty D, Arnoulet C, Mozziconacci MJ, Bouabdallah R *et al.* Philadelphia chromosome-negative chronic myeloid leukaemia: a report of 14 new cases. *Br J Haematol*,1995;90:346-352.
97. Schaffel R & Simões B. Leucemia linfoblástica aguda Filadélfia positiva. *Rev Bras Hematol Hemoter*,2008;30:52-58.
98. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*,2003;3:639-649.
99. Wiemels JL, Leonard BC, Wang Y, *et al.* Site-specific translocation and evidence of postnatal origin of the t(1;19) E2A-PBX1 fusion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2002;99:15101-15106.
100. Xiao Z, Greaves MF, Buffler P, Smith MT, Segal MR, Dicks BM, *et al.* Molecular characterization of genomic *AML1-ETO* fusions in childhood leukemia. *Leukemia*, 2001;15:1906-1913.
101. Roix JJ, McQueen PG, Parada LA, Misteli T. Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nature Genet*,2003;34:287-291.
102. Egushi-Ishimae M, Egushi M, Ishii E, Miyazaki S, Ueda K, Kamada N *et al.* Breakage and fusion of the TEL(ETV6) gene in immature B lymphocytes by apoptogenic signals. *Blood*, 2001;97:737-743.
103. Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C *et al.* Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2002;99:8242-8247.
104. Wiemels J. Chromosomal translocations in childhood leukemia: natural history, mechanisms, and epidemiology. *J Natl Cancer Inst Monogr*,2008;39:87-90.

105. Weissman IL The E. Donnall Thomas lecture: normal and neoplastic stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant*,2008;14:849-858.
106. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood*,2003;102:2321-2333.
107. Wiemels JL & Greaves M. Structure and possible mechanisms of *TEL-AML1* gene fusions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*, 1999;59:4075-4082.
108. Felix AC. Evidence of early start for common acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*,1999;354:1486-1487.
109. Bardini M, Spinelli R, Burgano S, Mangano, E, Corral L, Cifola I *et al.* DNA copy-number abnormalities do not occur in infant ALL with t(4;11)/MLL-AF4. *Leukemia*,2010;24:169-176.
110. Smith E & Sigvardsson M. The roles of transcription factors in B lymphocyte commitment, development, and transformation. *J Leukoc Biol*,2004;75:973-981.
111. Brumpt C, Delabesse E, Beldjord K, Davi F, Cayuela JM, Millien C *et al.* The incidence of clonal T-cell receptor rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia varies with age and genotype. *Blood*,2000;96:2254-2261.
112. Knezevich S. ETV6 (ETS variant gene 6 (TEL oncogene)). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. June 2005. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/genes/ETV6ID38.html>
113. Sawinska M & Ladón D. Mechanism, detection and clinical significance of the reciprocal translocation t(12;21)(p12;q22) in the children suffering from acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res*,2004;28:35-42.
114. Huret JL, Senon S. RUNX1 (runt-related transcription factor 1 (acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogene)). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. January 2003. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/AML1.html>.
115. Pieters R & Carrol WL. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin N Am*,2008;55:1-20.
116. Golub TR, Barker FG, Bohlander SK, Heibert SW, Ward DC, Bray-Ward P *et al.* Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*,1995;92:4917-4921.

117. Castor A, Nilsson L, Astrand-Grundstrom I, Buitenhuis M, Ramirez C, Anderson K *et al.* Distinct pattern of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*,2005;11:630-637.
118. Loh ML, Silverman LB, Young ML. Incidence of TEL/AML1 fusion in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Blood*,1998;92:4792-4797.
119. Huret JL. TCF3 (transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. December 1997. URL:<http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/E2A.html>.
120. Hunger SP. Chromosomal translocations involving the E2A gene in acute lymphoblastic leukemia: clinical features and molecular pathogenesis. *Blood*,1996;87:1211-1224.
121. Kee BL & Murre C. Transcription factor regulation of B lineage commitment. *Curr Opin Immunol*,2001;13:180-185.
122. Greenbaum S & Zhuang Y. Regulation of early lymphocyte development by E2A family proteins. *Semin Immunol*,2002;14:405-414.
123. Lazorchak A, Jones ME, Zhuang Y. New insights into e-protein function in lymphocyte development. *Trends Immunol*,2005;26:334-338.
124. Huret JL. PBX1 pré-B-cell leukemia homeobox 1. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*.November1997.URL:<http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/PBX1.html>.
125. Michael PM, Levin MD, Garson OM. Translocation 1;19- a new cytogenetic abnormality in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*,1984; 12:333-341.
126. Hunger SP, Galili N, Carroll AJ, Crist WM, Link MP, Cleary ML. The t(1;19)(q23;p13) results in consistent fusion of E2A and PBX1 coding sequences in acute lymphoblastic leukemias. *Blood*,1991;77:687-693.
127. Raimond SC, Behm FG, Robertson PK, Williams DL, Pui C-H, Crist WM *et al.* Cytogenetics of Pré-B-cell acute lymphoblastic leukemia with emphasis on prognostic implication of the t(1;19). *J Clin Oncol*,1990;8:1380-1388.
128. Jeha S, Pei D, Raimondi SC, Onciu M, Campana D, Cheng C *et al.* Increased risk for SNC relapse in Pré-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1. *Leukemia*,2009;23:1406-1409.

129. Huret JL. t(9;22)(q34;q11) in ALL. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. September 1997. URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Anomalies/t0922ALL.html>.
130. Turhan AG. ABL1 (v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. August 2008. URL: <http://www.Atlas.GeneticOncology.org/genes/ABL.html>.
131. Turhan AG. BCR (Breakpoint cluster region). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. August 2008. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/BCR.html>.
132. Wu Y, Ma G, Lu D, Lin F, Xu HJ, Liu J *et al*. BCR: a negative regulator of the BCR-ABL oncoprotein. *Oncogene*, 1999;18:4416-4424.
133. Jones LK & Saha V. Philadelphia positive acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *B J Haematol*, 2005;130:489-500.
134. Clark S, McLaughlin J, Crist WM, Chaplin R, Witte ON. Unique forms of the ABL tyrosine kinase distinguish Ph1-positive CML from Ph1-positive ALL. *Science*, 1987;235:85-88.
135. Radich JP, Kopecky KJ, Boldt DH, Head D, Slovak ML, Babu R *et al*. Detection of BCR-ABL fusion genes in adult acute lymphoblastic leukemia by the Polymerase Chain Reaction. *Leukemia*, 1994;8:1688-1695.
136. Sazawal S, Bakhshi S, Raina V, Swaroop C, Saxena R. Detection and clinical relevance of BCR-ABL fusion gene in childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia a report on 4 cases. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2009;31:850-852.
137. Huret JL. MLL (myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. December 1997. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/MLL.html>.
138. Huret JL. MLL (myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. October 2005. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/MLL.html>.
139. Huret JL, Dessen P, Bernheim A. An Atlas on Chromosomes in Hematological Malignancies. Example: 11q23 and MLL Partners. *Leukemia*, 2001;15:987-999.
140. Tauchi H, Tomizawa D, Eguchi M. Clinical features and outcome of *MLL* gene rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants with additional chromosomal abnormalities other than 11q23 translocation. *Leuk Res*, 2008;32:1523-1529.

141. Krivtsov AV & Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia Stem-Cell development. *Nature*,2007;7:823-833.
142. Marschalek R. AF1 (AF4/FMR2 family, member 1). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. December 2002. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/AF4.html>.
143. Dimartino JF & Cleary ML. MLL rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *Br J Haematol*,1999; 106:614-626.
144. Mitterbauer-Hohendanner & C. Mannhalter C. The biological and clinical significance of *MLL* abnormalities in haematological malignancies. *Eur J Clin Invest*,2004;34:12-24.
145. Li ZY, Liu DP, Liang CC. New insight into the molecular mechanisms of MLL-associated leukemia. *Leukemia*,2005;19:183-190.
146. Ayton P M, Cleary ML. Molecular mechanism of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene*,2001;20:5695-5707.
147. van der Burg M, Beverloo HB, Langerak AW, Wijsman J, van Drunen E, Slater R *et al*. Rapid and sensitive detection of all types of *MLL* gene translocations with a single FISH probe set. *Leukemia*,1999;13:2107-2113.
148. König M, Reichel M, Marschalek R, Haas OA, Strehl S. A highly specific and sensitive Fluorescence in situ Hybridization assay for the detection of t(4;11)(q21;q23) and concurrent submicroscopic deletions in acute leukaemias. *B J Haematol*,2002;116:758-764.
149. Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G *et al*. Standardization and quality control studies of 'Real-Time' Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. *Leukemia*,2003;17:2318-2357.
150. Barber KE, Ford AM, Harris RL, Harrison CJ, Moorman AV. *MLL* translocations with concurrent 3' deletions: interpretation of FISH results. *Genes Chromosomes Cancer*,2004;41:266-271.
151. Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD, Hiddemann W, Sauter S, Henze G. *et al*. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. results and conclusions of the Multicenter Trial ALL-BFM-86. *Blood*, 1994;84:3122-3133.

152. Campbell M, Castillo L, Dibar EA *et al.* A randomized trial of the I-BFM-SG for the management of childhood non-B acute lymphoblastic Leukemia (ALL IC-BFM 2002).
153. Scott, A. A. & Look. T. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*,2005;23:6306-6315.
154. Schrauder A, Reiter A, Gadner H, Niethammer D, Klingebiel T, Kremens B *et al.* Superiority of allogeneic hematopoietic Stem-Cell transplantation compared with chemotherapy alone in high-risk childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia results from ALL-BFM 90 and 95. *J Clin Oncol*,2006;24:5742-5749.
155. Dördelmann M, Reiter A, Borkhardt A, Ludwig WD, Götz N, Viehmann S *et al.* Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*,1999;94:1209-1217.
156. Rivera GK & Raimondi SC. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia with reinforced early treatment and rotational combination chemotherapy. *Lancet*,1991;337:61-66.
157. Shurtleff AS, Buijs A, Behm FG, Rubnitz JE, Raimondi SC, Hancock ML *et al.* TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*,1995;9:1985-1999.
158. Armstrong SA & Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*,2005;23:6306-6315.
159. Panzer-Grümayer ER, Cazzaniga G, van der Velden VHJ, del Giudice L, Peham M, Mann G, *et al.* Immunogenotype changes prevail in relapses of young children with *TEL-AML1*-positive acute lymphoblastic leukemia and derive mainly from clonal selection. *Clin Cancer Res*,2005;1:7720-7727.
160. GBTLI-LLA-99. Protocolo de tratamento da leucemia linfoblástica aguda na Infância. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica. Campinas; 2000.
161. Smith M, Arthur D, Camitta B *et al.* Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*,1996;14:18-24.
162. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, Harbott J, Zimmermann M, Niemeyer C *et al.* Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90, *Blood*,2000;95:3310-3322.

163. Pui CH, Relling MV, Evans WE. Role of pharmacogenomics and pharmacodynamics in the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*,2003;15:741-756.
164. Silverman LB, Sallan SE. Newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors and treatment, *Curr Opin Hematol*, 2003;10:290-296.
165. Cario G, Stanulla M, Fine BM, Teuffel O, V. Neuhoff N, Schrauder A. distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*,2005;105:821-826.
166. Stanulla M, Cario G, Meissner B, Schrauder A, Möricke A, Riehm H *et al.* Integrating molecular information into treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia - a perspective from the BFM Study Group. *Blood Cells Mol Dis*,2007;39:160-163.
167. Bostrom BC, Sensel MR, Sather HN, Gaynon PS, La MK, Johnston K *et al.* Dexamethasone versus prednisone and daily oral versus weekly intravenous mercaptopurine for patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood*,2003;101:3809-3817.
168. Mitchell CD, Richards SM, Kinsey SE, Lilleyman J, Vora A, Eden TO *et al.* Benefit of dexamethasone compared with prednisone for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the Medical Research Council ALL 97 randomized trial. *Br J Haematol*,2005;129:734-745.
169. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL *et al.* Children's Oncology Group. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood*,2008;111:5477-5485.
170. Lange BJ, Bostrom BC, Cherlow JM, Sensel MG, La MK, Rackoff W *et al.* Double-delayed intensification improve event-free survival for children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood*,2002;99:825-833.
171. van Dogen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L *et al.* Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet*,1998;352:1731-1738.
172. Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, Trigg ME, Cherlow JM, Lukens JN *et al.* Augmented post-induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy. *N Engl J Med*,1998;338:1663-1671.

173. Aricò M, Valsechi MG, Conter V, Rizzari C, Pession A, Messina C *et al.* Improved outcome leukemia defined by prednisone-poor response treated with double Berlin-Frankfurt-Muenster protocol II. *Blood*,2002;100:420-426.
174. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 2004;350:1535-1548.
175. Pinkel D. Five-year follow-up of "total therapy" of childhood lymphocytic leukemia. *JAMA*,1971;216:648-652.
176. Pui CH, Cheng C, Leung W, Rai SN, Rivera GK, Sandlund JT, *et al.* Extended follow-up of long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*,2003;349:640-649.
177. Conter V, Aricó M, Valsecchi MG, Rizzari C, Testi AM, Messina C *et al.* Extended intrathecal methotrexate may replace cranial irradiation for prevention of CNS relapse in children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia treated with Berlin-Frankfurt-Münster-based intensive chemotherapy. The Associazione Italiana di Ematologia de Oncologia Pediatrica. *J Clin Oncol*, 1995;13:2497-2502.
178. Pui CH. Central nervous system disease in acute lymphoblastic leukemia: prophylaxis and treatment. *Hematology*,Jan 2006;2006:142-146.
179. Pui CH, Howard SC. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in pediatric leukemia. *Lancet Oncol*,2008;9:257-268.
180. Hijiya N, Liu W, Sandlund JT, Jeha S, Razzouk BI, Ribeiro RC *et al.* Overt testicular disease at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: lack of therapeutic role of local irradiation. *Leukemia*,2005;19:1399-1403.
181. Toyoda Y, Manabe A, Tsuchida M, Hanada R, Ikuta K, Okimoto Y *et al.* Six months of maintenance chemotherapy after intensified treatment for acute lymphoblastic leukemia of childhood. *J Clin Oncol*,2000;18:1508-1516.
182. Aricó M, Baruchel A, Bertrand Y, Biondi A, Conter V, Eden T *et al.* The seventh International Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Workshop report: Palermo, Italy, January 29-30, 2005. *Leukemia*,2005;19:1145-1152.
183. Aricò M, Valsechi MG, Camitta B, Schrappe M, Chessels J, Baruchel E *et al.* Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N England J Med*,2000;342:998-1006.
184. Eden OB, Harrison G, Rivhards S, Lilleyman JS, Bailey CC, Chessells JM *et al.* Long-term follow-up of the United Kingdom Medical Research Council Protocols

for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, 1980-1997. *Leukemia*,2000;14: 2307-2320.

185. Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, Chessells JM, Baruchel A, Kamps W *et al.* Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet*,2002;359:1909-1915.
186. Schrauder A, Reiter A, Gadner H, Niethammer D, Klingebiel T, Kremens B *et al.* Superiority of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation compared with chemotherapy alone in high-risk childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia results from ALL-BFM 90 and 95. *J Clin Oncol*,2006;24:5742-5749.
187. Deininger MWN, Goldman JM, Lydon N, Melo JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148 selectively inhibits the growth of BCR-ABL positive cells. *Blood*, 90:3691-3698.
188. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N *et al.* Five-year follow-up patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*,2006;2408-2417.
189. Jabbour E, Corets J, O'Brien S, Giles F, Kantarjian H. New targeted therapies for chronic myelogenous leukemia: opportunities to overcome imatinib resistance. *Sem Hematol*,2007;44:25-31.
190. Gandhi V, Kilpatrick JM, Plunkett E, Ayres M, Harman L, Du M *et al.* A proof-of-principle pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical study with purine nucleoside phosphorylase inhibitor immucilin-H (BCX-1777, forodesine). *Blood*, 2005;106:4253-4260.
191. Gandhi V. Forodesine-preclinical studies. *Haematologica*,2006;2:35-37.
192. Stam RW, den Boer ML, Passier MM, Janka-Schaub GE, Sallan SE, Armstrong SA *et al.* Silencing of the tumor suppressor gene FHIT is highly characteristic for MLL gene rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2006;20:264-271.
193. DiJoseph JF, Dougher MM, Armellino DC, Evans DY, Damle NK. Therapeutic potential of CD22-specific antibody-targeted chemotherapy using inotuzumab ozogamicin (CMC-544) for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2007;21:2240-2245.

6 ARTIGO EM INGLÊS

MOLECULAR AND IMMUNEPHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN SOUTH BRAZIL: PRELIMINARY RESULTS AND CONCLUSIONS

Mariela Granero Farias¹, Mariana Michalowski², Algemir Lunardi Brunetto^{3,5} and Lúcia Silla^{1,4,5,6}.

1. Culture, cellular and molecular analysis of hematopoietic cells Laboratory– Experimental Research Center Hospital de Clinicas de Porto Alegre
2. Santo Antônio Children’s Hospital, Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre
3. Pediatric Oncology Hospital de Clinicas de Porto Alegre
4. Hematology and Bone Marrow Transplantation – Hospital de Clinicas de Porto Alegre
5. School of Medicine Federal University of Rio Grande do Sul
6. Post Graduation Medicine Program: Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul.

Mailing address

Mariela Granero Farias

Unidade de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcelos, 2350.

CEP 90035-903- Porto Alegre/RS

Telephone: (51) 3359.8674

E-mail: mg.farias@yahoo.com.br

ABSTRACT

OBJECTIVE: Despite the 50% reported frequency of known translocations in childhood acute lymphocyte leukemia (ALL) little is known about its frequency and clinical relevance in developing countries. We studied the frequency of the aforementioned translocations and related clinical and laboratory characteristics in children with B and T lineage ALL seen at the two main tertiary Pediatric Hospitals in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **METHODS:** Thirty-five patients were included. ALL was diagnosed and classified according to morphological, cytochemical and immunophenotypic criteria. Clinical group risk stratification was done in accordance to BFM-2002 and CTEP/NCI strategies, and the presence of clinical significant translocations was investigated by RT-PCR. **RESULTS:** Concerning the immunophenotype, 8.8% of the patients were classified as pro-B ALL, 67.6% precursor-B ALL (common-B and pre-B), and 23.5% T-ALL. As for Risk stratification at diagnosis based on BFM-2002, for low, intermediate and high risks we found 28.6%, 31.4% and 40.0% respectively; utilizing the CTEP/NCI stratification strategy 14 (40.0%) belonged to the LR and 21 (60.0%) to the HR. The frequency of the main fusion genes, studied retrospectively, was of 15% for the t(12;21)/TEL-AML1 (19% among the B lineage ALLs); 4% t(4;11)/MLL-AF4, 4% t(1;19)/E2A-PBX1 and 4% t(9;22)/BCR-ABL. Although there was concordance between the clinical risk stratification, patient with high risk molecular abnormality was assigned to and treated as a low risk category patient. **CONCLUSION:** In spite of the small sample size, we were able to show that the frequency of the childhood ALL related translocations in southern Brazil was the same as described in other Brazilian regions and in developed countries. There were however, a very high percentage of High Risk cases, mostly because of hyperleukocytosis, possibly due to late diagnosis. The excess of high risk cases probably overshadow the good risk molecular abnormalities although the importance of molecular studies at diagnosis was underlined by the assignment of a high risk patient to a low risk treatment strategy.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, risk groups, fusion genes, PCR.

INTRODUCTION

The acute lymphoblastic leukemia (ALL) is characterized by the clonal proliferation and accumulation of lymphoblastic precursors of B or T cell lineage. [1] ALL is the most common malignancy of childhood accounting for 2400 new patients diagnosed annually in US and the peak incidence is between 2 to 3 years of age. [2] Although reported as an annual incidence of 2.25 cases/100.000 in the region of Ribeirao Preto, southeast Brazil, [3] the Brazilian incidence of childhood ALL is not known.

As the reported cure rate of ALL in developed world for children and adolescents has reached 80%, [4,5,6] stringent risk assessment has become an important prerequisite in the selection of therapy, ensuring that patients are neither over treated nor undertreated. There is general agreement that certain clinical features, genetic abnormalities of leukemic cells, pharmacodynamics, pharmacogenetics, and early treatment response have important prognostic and therapeutic implications. Based on these prognostic factors, patients in most studies are assigned to one of two or three risk groups (e.g., low, intermediate or high). [7,8] Although remission induction treatment may be the same for all risk groups in some clinical trials, the intensity of postremission treatment differs according to the risk groups in all studies. Patients at high risk are typically treated with intensified postremission chemotherapy, and or are candidates for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). [5,6] The diverse clinical outcomes associated with the various subtypes of ALL can be attributed primarily to drug sensitivity or resistance of leukemic blasts that harbor specific genetic abnormalities.[9] Chromosomal abnormalities are present in 90% of the children with ALL of those, 50% are translocations. [10] Favorable genetic abnormalities associated with B cell precursor ALL include hyperdiploidy (>50 chromosomes) and the TEL-AML1 fusion gene which blasts are highly sensitive to methotrexate and asparaginase, respectively. On the other hand, the presence of t(9;22), t(1;19), and t(4;11), confers a high risk of relapse [11,12]. The identified translocations and its relative frequency in childhood precursor B-ALLs are: t(9;22)/BCR-ABL in 3 to 5% of the cases; t(1;19)/E2A-PBX1 in 5 to 6%; re-arrangement of MLL gene in 6%; t(4;11)/MLL-AF4 in about 3% of the cases; and t(12;21)/TEL-AML1 in 20 to 25%. [10,13] Finally, T-ALL might be related to an increased risk of relapse, as considered by some groups. [8]

We have recently showed in a similar patient population, in southern Brazil, that 19% of 58 cases had TEL/AML1 translocation detected by Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) [14] and that its presence did not have prognostic significance. [15] Here we present the preliminary results of a population in the same Brazilian area on the relative frequency of the four described translocations associated with childhood LLA, and call the attention for the very high prevalence of high risk childhood leukemia in these patients, the increased early mortality, and the need for molecular guided risk stratification in order to offer the best chance of survival.

MATERIALS AND METHODS

In this study were included the patients with initial diagnosis of B and T lineage ALL, and excluded mature B-ALL and all the other subtypes of acute leukemias.

Childhood ALL patients from the two main tertiary Hospitals in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, were included. After written consent by the legally responsible for the child, bone marrow (BM) and/or peripheral blood Wright-Giemsa-stained smears and cytochemical (Sudan Black and Periodic Acid Schiff) were examined to characterize blast cell lineage, followed by Flow Cytometry in FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), utilizing the following monoclonal antibodies: CD45, HLADR, CD34, CD19, CD10, CD22, CD20, cTdT, CD38, CD2, CD5, CD7, CD3, CD4, CD8, CD13 and CD33. The acquisition was done through the CellQuest Becton Dickinson program, (San Jose, CA, USA), and immunological classification was in accordance to the European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). [16] BM or PB cDNA was extracted and frozen at diagnosis or obtained from our tissue bank. Cytogenetic studies were irregularly performed, at different laboratories, and were not taken into account for this study.

RT-PCR was performed in precursor-B cell ALL (mature B-ALL cases were excluded) and T ALL. RNA extraction and cDNA synthesis: after Ficoll (Enlab) gradient separation, mononuclear cells total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc. Valenci, CA). The integrity of the RNA was verified in agarose gel 0.8%. The samples were treated with Turbo DNase (Ambion, patent pending), to remove contaminating genomic DNA. The synthesis of the cDNA was done using the kit ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA)

according to the manufacturer's recommendations. A four gene positive control was done to verify the quality of cDNA utilizing BCR, ABL, beta-2 microglobulin and PBGD (porphobilinogen deaminase) [17,18]. For the cDNA synthesis and RT-PCR, we used the Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and followed the Biomed-1 Concerted Action standardization for RT-PCR and Nested PCR. [19] The primers for first and second round are shown in Table 1. [19] REH, RS4, K562, SupB and 697 leukemic cellular lineages (DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany) [20] were utilized as positive control for t(12;21), t(4;11), t(9;22) p190, t(9;22) p210, and t(1;19), respectively. The second round product was observed in agarose gel electrophoresis at 2%, with Sybr Safe DNA gel stain and analysis was used the Kodak- Edas 290 photo System. In two infants with negative RT-PCR, the presence of MLL rearrangement was investigated by FISH utilizing LSI MLL DC BAP (dual color break a part probe) (Vysis Inc.,USA), according to the manufacturer's instructions. The cells were analyzed in a fluorescence microscope (Olympus BMx60), being the hybridization signs evaluated in 100 cells per observer, by two observers. The images were digitalized in a computer with the MacProbe 4.4 program for FISH of the PowerGene System (Applied Imaging Corporation, EUA). The alterations were described according to the ISCN 2009. [21] For internal control of the hybridization reaction were used samples of volunteer donors, after informed consent.

The patients were stratified into low (LR), intermediate (IR) and high risk (HR), based on the following criteria: age, global leukocyte counting upon diagnosis, presence of blasts in the peripheral blood in the 8th day of treatment, number of blasts in the bone marrow on the 33rd day, phenotype and infiltration in the CNS, according to BFM-2002 [22] and or Low (LR) and HR according to Brazilian Group of Treatment of Childhood Acute Leukemia GBTLI 99 protocol [23]. For the purpose of overall and relapse free survival, we also stratified risks according to the Cancer Therapy Evaluation Program of the National Cancer Institute (CTEP/NCI) where Low Risk (LR) is define as precursor B-ALL with leucocytes < 50x10⁹/L, between 1 and 9 years of age, at diagnosis, and High Risk (HR) all other cases including T-ALL and poor initial response to treatment. [8] Over one year of age the patients were assigned to one of the two protocols (BFM 2002 or GBTLI 99). Infants were treated according to Interfant. [24]

Data was analyzed by the Statistical Package for Social Services Science program, version 16 (SPSS® Inc., Chicago, IL, USA); average and standard deviation used for parametric and median, minimum, and maximum for the non-parametric data. For the statistical analysis we utilized Fisher's exact test and Log rank, being $P < 0,05$ considered significant. Event-free survival and overall survival curves were constructed according to Kaplan-Meier. The study was approved by the Research Ethics Committee of the two participating hospitals.

RESULTS

Thirty-five pediatric cases were studied, of these 26 were newly diagnosed consecutive patients included from April 2008 to October 2009; 2 were in their first relapse and 7 were obtained from our tissue bank. The latter data was retrieved from our childhood ALL data base. The median age of the entire group was 6.2 years (range 1 month to 18 years), and 22 (63%) were male (ratio M/F 1.7:1). The median leukocytes count at diagnosis was $16.3 \times 10^9/L$ (range $0,7 \times 10^9/L$ to $521.7 \times 10^9/L$), with 10 (28.5%) of the patients higher than $50 \times 10^9/L$. In the 34 evaluable patients for immunophenotype, 3 (8.8%) were pro-B ALL; 23 (67.6%) precursor-B ALL (common-B and pre-B) and 8 (23.5%) T-ALL. As for the risk groups, according to BFM and including all cases, 10 (28.6%) of the patients belonged to the LR, 11 (31.4%) to the IR and 14 (40%) to the HR group, the latter including three patients with CNS and one with testicle infiltration, at diagnosis. Utilizing the CTEP/NCI stratification strategy 14 (40.0%) belonged to the LR and 21 (60.0%) to the HR (Table 2). Eight and eighteen patients were treated according to GBTLI-99 and to BFM 2002 protocols, respectively.

With a median follow up of 10 months (ranging from 1 to 17), the RFS and OS for the 26 newly diagnosed patients were 67.5% and 84%, respectively (Figure 1). According to risk stratification (Figure 2) the RFS was 100%, 66.7% and 37.5% for LR, IR and HR (BFM) ($P=0.008$ between LR and HR), respectively, and 100% and 46.2% for LR and HR (CTEP/NCI) ($P=0.01$), respectively. The OS was not statistically different between the groups in both stratification strategies, as well as, there was no difference in RFS or OS related to the treatment protocol (data not shown). The two patients in first relapse (ALL t(9;22) and T-ALL), not included in

Kaplan-Meier analysis, were submitted to HLA identical sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) and died of relapse in the first year post transplant.

Of the 35 samples, 8 did not present a good quality RNA/cDNA for the study. Therefore, of the 27 evaluable patients for molecular studies, 9 patients (33%) were positive for the studied genes: 4 (15%) had t(12;21)(p13;q22)/TEL-AML1; 1 (4%) t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4; 2 (7.4%) with rearrangement of MLL gene (detected by FISH); 1 (4%) t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABLp190 and 1 (4%) with t(1;19)(q23;p13)/E2A-PBX1. As expected, the translocation t(9;22)(q34;q11) p210 was not found (Figure 3). Although there was concordance between the clinical risk stratification and the observed translocation, it is important to point out that the one case with t(4;11) translocation was stratified as low risk and treated accordingly.

In spite of the small number of patients and the arguable power of statistical correlations, univariate analysis showed that RFS was significantly worse for Pro-B ALL when compared to Precursor-B ALL (P=0.013) and for children with CNS involvement at diagnosis (P=0.017). OS was significantly reduced for the patients with MLL abnormality (P=0.003) and with CNS infiltration at diagnosis (P<0.001). As for this latter clinical presentation, it was significantly more present in MLL-ALL (P=0.003). Because of obviously reasons a multivariate analysis was precluded. Finally, T-ALL was more frequent before 1 and after 6 years of age (P=0.005).

DISCUSSION

Albeit with a small number of patients, we were able to demonstrate that the common molecular abnormalities occurred roughly as frequently as reported in the literature. The frequency of TEL/AML1 in our group of children (15% in the total and 19% within the B-lineage ALL) was similar to the one found in Brazilian studies, described by us and others, [14,25] and in other countries such as USA, [26] Europe, [27,28,29,30] Japan, [31,32] and Taiwan. [33] As for t(9;22)/BCR-ABL, t(1;19)/E2A-PBX1, t(4;11)/MLL-AF4 each with a frequency of 4%, and MLL rearrangement detected in 7%, in accordance with what was described in another Brazilian study [34] and elsewhere [13].

Zen *et al.* described a lack of prognosis significance for TEL/AML1 as seem to be the case in our group of patients. Probably because of the small number of patients, we were not able to show a prognostic impact for the presence of high risk

molecular markers except for MLL abnormality which presence had a significant negative impact on OS ($P=0.003$) as well as a positive correlation with CNS infiltration. The reduced number of patients and the short follow up in this study, precludes a deeper analysis of RFS and OS. [15]

As we reported earlier Long term survival of Brazilian children with acute lymphoid leukemia (ALL) treated according to German BFM protocols of 157 children with ALL treated in our center from 1983 and 1998, there was a higher than expected number of HR patients as well a lower RFS and OS (39% and 57% in five years, respectively). [35] At the time we attributed those findings to socioeconomic factors leading to late diagnosis, to the long period of enrollment, to differences between successive BFM protocols and in the support therapies along the years, and/or to a different ALL biology in Brazilian patients.

In a recent publication for the BFM group, [7] on 6609 evaluable patients, HR patients represented roughly 10% of the children enrolled on the successive BFM protocols. Smith *et al.*, for the CTEP/NCI workshop reported that 32% of the precursor-B ALL patients only were HR [8]. In our present study, utilizing the ALL-BFM-2002 stratification strategy, HR patients represented 40% of the cases. In our previous study [35] on 157 patients, from the same Brazilian region there was 33.8% of HR. In the 229 children reported by Scrideli *et al.* utilizing the CTEP/NCI like stratification strategy, 52.4% of the patients belonged to the HR [36]. Utilizing CTEP/NCI risk stratification we found 60% of our patients in the HR group. Even though we included T-ALL in this group, it is clear that the reported Brazilian childhood ALL patients are diagnosed at an impressive higher risk category.

Hyperleucocytosis described, as $\geq 50 \times 10^9/L$ at diagnosis could be a surrogate marker for advanced disease. Twenty eight percent of our patients and 31% of the 229 patients described by Scrideli *et al.* [36] presented with hyperleucocytosis at diagnosis. Based on these findings, and utilizing leukocyte numbers as surrogate marker, it is reasonable to assume that the high percentage of HR cases in Brazilian children could be attributed to a late diagnosis. In the cohort of 2209 childhood leukemia patients treated at St Jude's Children Hospital, Pui *et al.* described 23% of the patients as having $\geq 50 \times 10^9/L$ at diagnosis [35] a figure similar to the 19 to 22% described in the 6609 patients enrolled in the successive BFM trials [7]. As for T-ALL while our group had an excess of cases probably by chance (23.5%), Pui *et al.* and Scrideli *et al.* reported respectively, 15 and 16.2% [36,37]. T-ALL represented 16.4%

and 11% of the cases reported in Ribeirao Preto [3] and Rio de Janeiro, [34] respectively.

In summary, in this small cohort of children with ALL, we were able to show that the common described translocations related to childhood ALL appears to be as frequent as described by others in Brazil and in the literature. As a consequence, the increased number of HR patients observed by us and in several cohorts of Brazilian childhood ALL cases appears not to be related to an excess of unfavorable genetic abnormalities, and are most likely a consequence of late diagnosis as suggested by the excess of cases diagnosed with hyperleucocytosis. A national effort toward an earlier diagnosis and referral is warranted. It is also important to point out the relevance of the molecular studies at diagnosis, and its inclusion for risk stratification and treatment assignment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful for the contributions, in special from Dr. José Andres Yunes, from the Boldrini Children's Center, for the donation of the cellular lineages used as positive controls, as well as the guidance in performing the PCRs. They also thank the biochemists from the Molecular Biology Unit, of the Clinical Pathology Service, for the necessary help during the work.

FINANCIAL SUPPORT

Incentive Fund for Research and Events (FIPE) and HEMOAMIGOS-HCPA.

REFERENCES

1. Pui CH. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Clin North Am*,1997;44:831-845.
2. Kabraei P, Anastasi J, Larson RA. Acute Lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. *Best Pract Res Clin Haematol*,2003;15:597-621.
3. Rego EM, Garcia AB, Viana SR *et al*. Characterization of acute lymphoblastic leukemia subtypes in brazilian patients. *Leuk Res*,1995;20:349-355.

4. Conter V, Arico M, Valsecchi MG *et al.* Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) acute lymphoblastic leukemia studies, 1982-1995. *Leukemia*,2000;14:2196-2204.
5. Gaynon PS, Trigg ME, Heerema NA *et al.* Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995. *Leukemia*,2000;14:2223-2233.
6. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M *et al.* Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. *Leukemia*,2000;14:2205-2222.
7. Möricke A, Zimmermann M, Reiter A *et al.* Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia*,2010;24:265-284.
8. Smith M, Arthur D, Camitta B *et al.* Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*,1996;14:18-24.
9. Schrappe M, Arico M, Harbott J, *et al.* Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. *Blood*,1998;92:2730-2741.
10. Sallan SE, Golub TR, Pui C, *et al.* Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*, Jan 1999;1999:103-113.
11. Scott AA & Look T. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*,2005;23:6306-6315.
12. Felix CA, Lange BJ, Chessells JM. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: challenges and controversies in 2000. *Hematology*, Jan 2000;2000:285-302.
13. Carrol WL, Btjowani D, Min DJ. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*,Jan 2003;2003:102-131.
14. Zen PRG, Lima BMC, Coserc VM *et al.* Prevalence of *TEL/AML1* fusion gene in Brazilian pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*,2004;151:68-72.
15. Zen PRG, Capra MEZ, Silla LMR *et al.* *ETV6/RUNX1* fusion lacking prognostic effect in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*,2009;188:112-117.

16. Bene MC, Castoldi G, Knapp W. *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia*,1995;9:1783-1786.
17. Lion T & Kidd V. Appropriated controls for RT-PCR. *Leukemia*,1998;12:1983-1993.
18. Lion T. Current recommendations for positive controls in RT-PCR assays. . *Leukemia*,2001;15:1033-1037.
19. van Dogen JJM, Macintyre EA, Gabert JA *et al.* Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*,1999;13:1901-1928.
20. Drexler HG, MacLeod RA, Borkhardt A *et al.* Recurrent chromosomal translocations and fusion genes in leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia*, 1995;9:480-500.
21. ISCN 2009. An international system for human cytogenetic nomenclature. *In*, LG Shaffer, S Karger Publishers INC, 2009.
22. Campbell M, Castillo L, Dibar EA *et al.* A Randomized trial of the I-BFM-SG for the management of childhood non-B acute lymphoblastic Leukemia (ALL IC-BFM 2002), 2002.
23. GBTLI-LLA-99. Protocolo de tratamento da leucemia linfoblástica aguda na Infância. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica. Campinas; 2000.
24. International Collaborative treatment protocol for infants under one year with acute lymphoblastic leukemia. Interfant-99.
25. Magalhães IQ, Pombo de Oliveira MS, Bennett CA *et al.* TEL-AML1 fusion gene frequency in paediatric acute lymphoblastic leukaemia in Brazil. *Br J Haematol*,2000;111:204-207.
26. Shurtleff SA, Bujis A, Behm EG *et al.* TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*,1995;9:1985-1898.
27. Romana SP, Poirel H, Leconiat M *et al.* High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*,1995;86:4263-4269.
28. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S *et al.* Incidence and Clinical Relevance of TEL/AML1 Fusion Genes in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia Enrolled in the German and Italian Multicenter Therapy Trials. *Blood*, 1997;90:571-577.

29. Cave H, Cacheux V, Raynaud S *et al.* ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*,1997; 11:1459-1464.
30. Trka J, Zuna J, Hrusak O. Impact of TEL/AML1-positive patients on age distribution of childhood acute lymphoblastic leukemia in Czech Republic. *Leukemia*,1998;12:996-1007.
31. Nakao M, Yokota S, Horiike S *et al.* Detection and quantification of TEL/AML1 fusion transcripts by polymerase chain reaction in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*,1996;10:1463-1470.
32. Takahashi Y, Horibe K, Kiyoi H *et al.* Prognostic significance of TEL/AML1 fusion transcript in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*,1998;20:190-195.
33. Liang DC, Chou TB, Chen JS *et al.* High incidence of TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) in childhood B lineage acute lymphoblastic leukemia in Taiwan. *Leukemia*,1996;10:991-993.
34. Silva MLM, Souza MHO, Ribeiro RC *et al.* Cytogenetic analysis of 100 consecutive newly diagnosed cases of acute lymphoblastic leukemia in Rio de Janeiro. *Cancer Genet Cytogenet*,2002;137:85-90.
35. Bittencourt H, Daudt LE, Fassina K *et al.* Long term survival of Brazilian children with acute lymphoid leukemia (ALL) treated according to German BFM protocols. *Blood*, 2000;96:720.
36. Scrideli CA, Assumpção JG, Ganazza MA *et al.* A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. *Haematologica*,2009;94:781-789.
37. Pui CH & Crist WM. Acute lymphoblastic leukemia. In *Childhood Leukemias*. Ed. Cambridge, Cambridge University Press,1999;288-312.

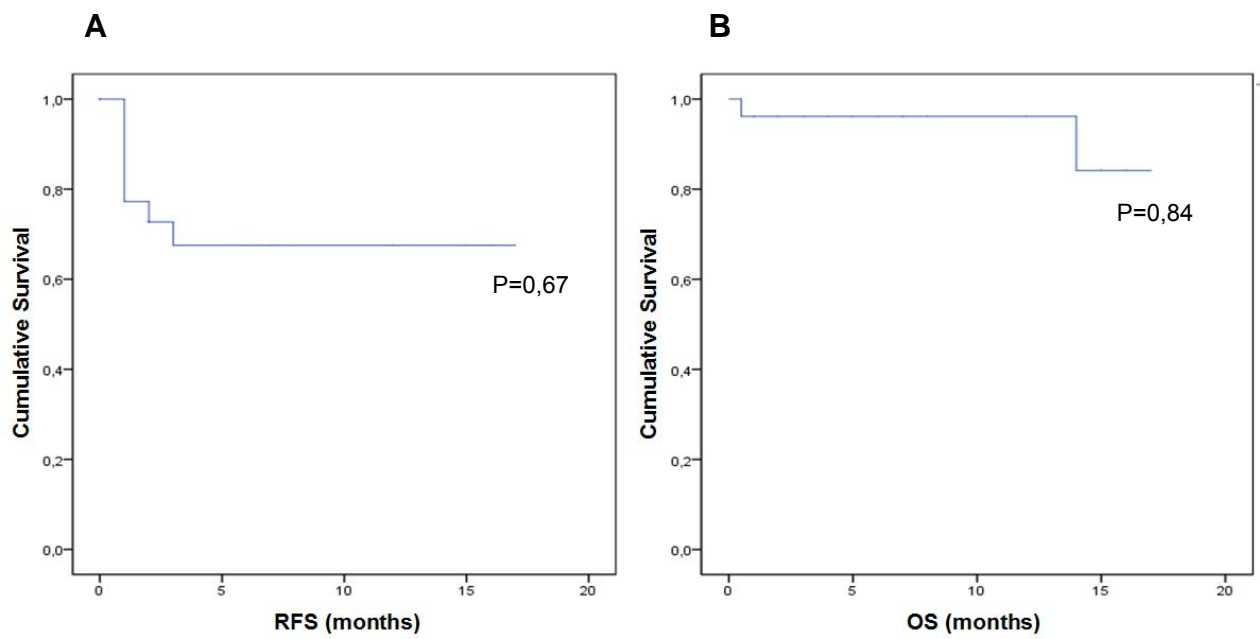


Figure 1. (A) Relapse free survival and (B) overall survival of 26 cases of childhood ALL.

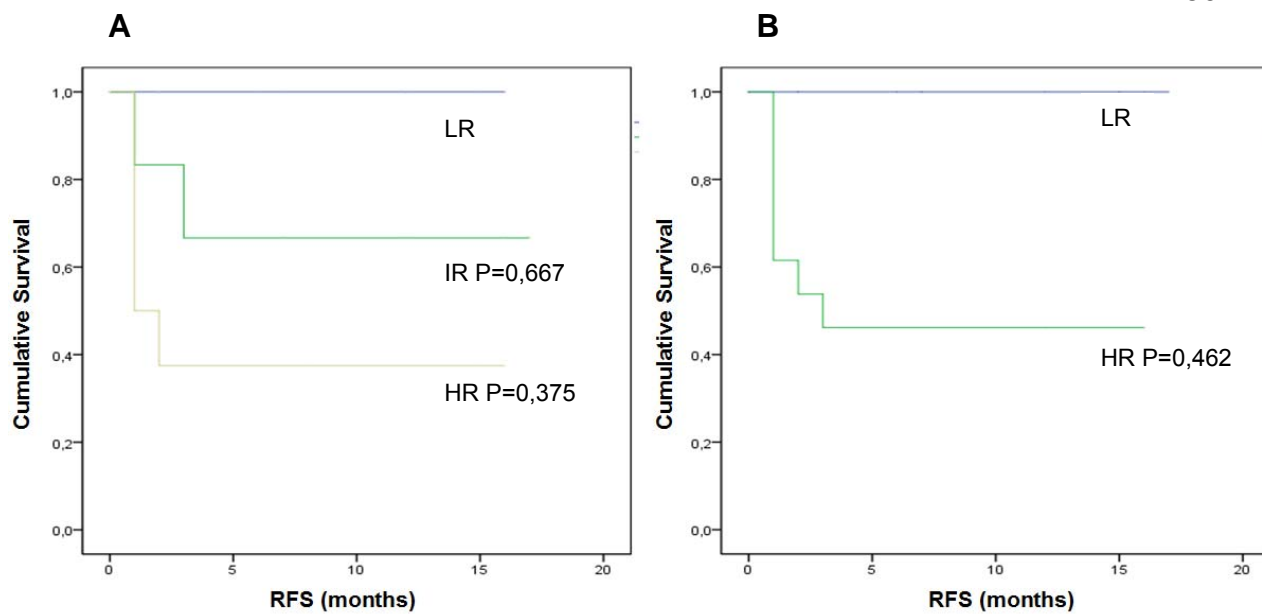


Figure 2. Relapse free survival according to risk group. A) stratified Low (LR), Intermediate (IR) and High Risk (HR) according to BFM 2002 protocol. B) Low (LR) and HR stratified risks according to the Cancer Therapy Evaluation Program of the National Cancer Institute (CTEP/NCI).

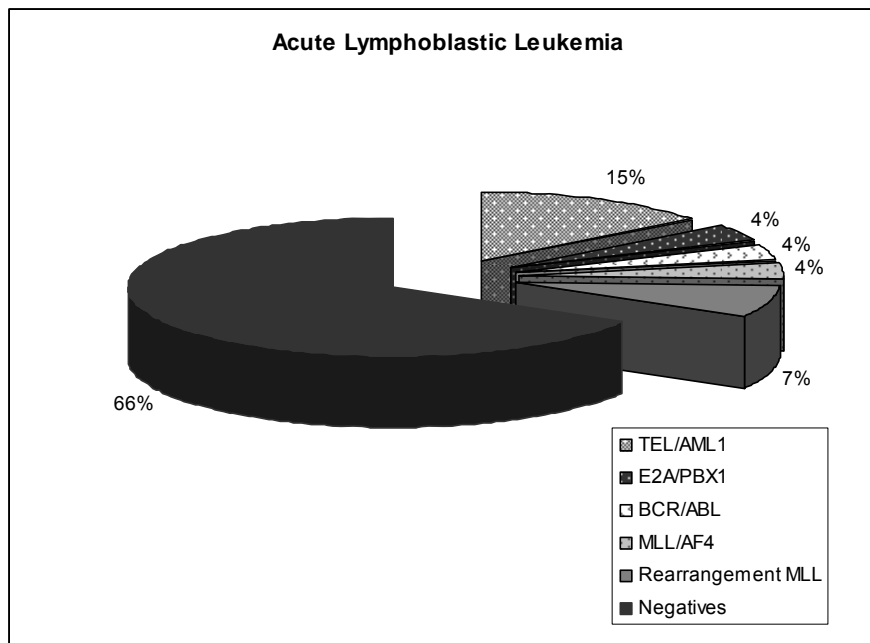


Figure 3. Frequency distribution of the four main molecular abnormalities in 27 childhoods ALL patients treated in Southern Brazil.

Table 1. Primers used in the PCR.

Translocation	Fusion Transcript	1 st round primers (5' to 3')	Fusion Transcript	2 st round primers (5' to 3')
t(9;22)(q34;q11) p210	BCR-b1-A	gaagtgtttcagaagcttctcc	BCR-b2-C	cagatgctgaccaactcgtgt
	ABL-a3-B	gtttgggcttcacaccattcc	ABL-a3-D	ttccccattgtgattatagccta
t(9;22)(q34;q11) p190	BCR-e1-A2	gactgcagctccaatgagaac	BCR-e1-C	cagaactcgcaacagtccttc
	ABL-a3-B	gtttgggcttcacaccattcc	ABL-a3-D	ttccccattgtgattatagccta
t(4;11)(q21;q23)	MLL-A	ccgcctcagccacctac	MLL-C	aggaccgccaagaaaaga
	AF4-B	tgtcactgagctgaaggtcg	AF4-D	cgttccttgctgagaatttg
t(1;19)(q23;p13)	E2A-A	caccagcctcatgcacaac	E2A-C	caccctccctgacctgtct
	PBX-B	tcgcaggagattcatcacg	PBX-D	ggcctgctcgattttctcc
t(12;21)(p13;q22)	TEL-A	tgaccctctgatcctgaac	TEL-C	aagcccataaacctctctcatc
	AML1-B	aacgcctcgctcatcttgc	AML1-D	tggaaggcggcggtgaagc

Abbreviations: A-B external primers, C-D internal primers.

Fonte: adapted van Dogen *et al.* Leukemia, 1999;13:1901-1928.[19]

Table 2 Molecular characteristics and risk stratification of patients

Patient	Gender	Age	WBC ($\times 10^9/L$)	Immunophenotype	Translocation/*FISH	Risk Group	
						BFM	NCI
1	F	3 yrs	24.8	B-common ALL	Negative	I	L
2	F	2yrs 9m	6.2	B-common ALL	t(4;11) MLL/AF4	L	L
3	F	2yrs 6m	67.4	B-common ALL	Negative	I	H
4	F	6yrs 1m	8.1	NA	NA	H	H
5	M	1m	313.8	Pro-B ALL	*nuc ish(MLLX2)(5'MLL sep 3' MLLx1)	H	H
6	M	2yrs 9m	13.3	B-common ALL	NA	L	L
7	M	11yrs	0,7	B-common ALL	Negative	I	H
8	M	5yrs 5m	175.1	B-common ALL	t(9;22) BCR/ABL p190	H	H
9	M	9yrs 7m	521.7	T-ALL	Negative	H	H
10	M	17yrs 9m	10.9	B-common ALL	Negative	I	H
11	F	1yrs	14.4	B-common ALL	NA	L	L
12	M	3m	5.0	Pro-B ALL	*nuc ish97 (MLLX2)(5'MLL sep 3' MLLx1)	H	H
13	M	7m	2.1	T-ALL	Negative	I	H
14	M	12yrs	19.0	T-ALL	Negative	H	H
15	M	9yrs	13.6	T-ALL	NA	H	H
16	M	9yrs 6m	7.1	T-ALL	Negative	H	H
17	F	9yrs	12.2	B-common ALL	NA	I	L
18	F	4yrs 7m	3.1	B-common ALL	t(12;21) TEL/AML1	L	L
19	F	5yrs 4m	70.4	Pre-B ALL	t(12;21) TEL/AML1	H	H
20	M	5yrs 6m	4.3	B-common ALL	Negative	L	L
21	M	6yrs 8m	9.9	B-common ALL	Negative	L	L
22	M	11yrs 5m	67.3	T-ALL	NA	I	H
23	F	2yrs 10m	1.5	B-common ALL	t(12;21) TEL/AML1	L	L
24	M	3yrs	35.1	B-common ALL	Negative	L	L
25	M	4yrs 2m	16.3	Atypical-B ALL	Negative	H	H
26	F	7yrs 9m	26.7	Pro-B ALL	NA	H	H
27	M	3yrs 9m	5.5	B-common ALL	t(12;21) TEL/AML1	L	L
28	M	15yrs 2m	95.4	T-ALL	Negative	H	H
29	F	2yrs	3.1	Pre-B ALL	Negative	L	L
30	M	5yrs	110.4	T-ALL	Negative	H	H
31	M	10yrs	1.3	B-common ALL	t(1;19) E2A/PBX1	I	H
32	M	18yrs	1.2	B-common ALL	Negative	I	L
33	F	15yrs	330.9	B-common ALL	NA	H	H
34	M	4yrs	200.0	B-common ALL	Negative	I	H
35	F	9yrs	1.2	B-common ALL	Negative	I	L

Abbreviations: NA: not evaluable; Risk Group: L - Low; I - Intermediate and H - High. BFM: Berlin-Frankfurt-Münster; NCI: National Cancer Institute.

7 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A LLA é uma doença heterogênea com diferenças biológicas e grupos prognósticos, sendo o tipo mais comum de leucemia na infância, com um pico de incidência entre 2 a 5 anos de idade.

Com a ausência de técnicas moleculares, muitas Instituições utilizam a resposta ao tratamento avaliada citomorfologicamente pela citorredução inicial (redução de blastos no SP após 7 dias do tratamento; ausência de blastos da MO após a indução da terapia no dia 33 do tratamento) como um fator prognóstico independente, em crianças com LLA, determinando assim, o grupo de risco do paciente para utilização de protocolos terapêuticos adaptados ao risco. A análise morfológica, embora útil e aplicável em alguns centros, é subjetiva, de sensibilidade limitada e imprecisa para o estudo de resposta inicial do tratamento e determinação de grupos de risco. Com a utilização de técnicas mais sensíveis como PCR com capacidade de detecção de uma célula leucêmica em 10^3 a 10^6 células normais, para a identificação de alterações moleculares é possível prever já no momento do diagnóstico a estratégia terapêutica a ser utilizada.

As translocações de significância prognóstica mais importantes, identificadas nas LLAs B da infância incluem, a $t(9;22)/BCR-ABL$, a $t(1;19)/E2A-PBX1$, a $t(4;11)/MLL-AF4$ e a $t(12;21)/TEL-AML1$. O estudo destas alterações determina não só o prognóstico, estratificando os pacientes em diferentes grupos de risco, como aumenta o entendimento na trajetória crucial da transformação leucêmica. A identificação dessas anormalidades genéticas permite a escolha de terapias adaptadas ao grupo de risco, assim regimes terapêuticos mais intensos o qual inclui o transplante de medula óssea, são adotados a pacientes de alto risco, que inclui pacientes Ph+ e com anormalidades 11q23. Por outro lado pacientes de baixo risco podem ser poupados da morbidade e mortalidade das altas doses de quimioterapia, quando ela não é necessária, como é o caso da translocação $t(12;21)$.

Há poucos estudos no Brasil em relação a frequência destas alterações moleculares e estes exibem várias diferenças: a faixa etária representativa da população pediátrica, com alguns estudos considerando a faixa pediátrica até os 16 anos, outros até os 18 anos de idade; a escolha da técnica utilizada sabe-se que a citogenética clássica, não detecta a alteração TEL/AML1, pois é uma alteração submicroscópica; o BCR/ABL Ph negativo e nem sempre detecta o rearranjo MLL, o

que pode levar a resultados falso negativos, sendo fundamental o uso de técnicas mais sensíveis como FISH e PCR.

Esse estudo da frequência dos transcritos de fusão de significância prognóstica de crianças de duas grandes Instituições do Sul do Brasil, mostrou que a frequência relativa das anormalidades genéticas, apresenta um resultado semelhante aos estudos, relatados previamente. Embora a população brasileira seja o produto de grupos étnicos diferentes, os resultados mostraram que a frequência de cada anormalidade é semelhante àquela encontrada em populações sem o nosso grau de composição étnica.

O conhecimento dessas translocações é de fundamental importância em todas as regiões do Brasil e exterior, permitindo avanços na padronização de protocolos terapêuticos a nível nacional e internacional.

Em nosso meio, se faz necessário o diagnóstico precoce de forma que os pacientes referidos cheguem às Instituições especializadas com baixo volume tumoral, isso foi demonstrado pelo elevado número de casos de alto risco, que parece não estar relacionado a características biológicas dos pacientes, refletidas pelas alterações moleculares e sim como consequência do diagnóstico tardio, como sugerido pelo excesso de casos com hiperleucocitose ao diagnóstico.

Protocolos terapêuticos desenvolvidos ao longo dos últimos 25 anos, de várias instituições e grupos cooperativos, têm demonstrado o acentuado aumento do percentual de cura com índices atuais de cerca de 80%. Avanços nas estratégias de tratamento é uma prioridade para futuras pesquisas. A identificação de novas anormalidades cromossômicas, associadas às alterações genéticas é de fundamental importância. Alvos específicos de terapia surgirão a partir do grande entendimento das alterações biológicas, que ocorrem nas células leucêmicas, o que resultará em uma melhor sobrevida e qualidade de vida para o paciente.

O desafio, neste século, é tornar acessível esse notável progresso a todas as crianças portadoras de LLA, independentemente do local onde elas residam.