



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

Estudos Citogenéticos nas Leucemias do Lactente

Terezinha de Jesus Marques Salles

Recife, 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Estudos Citogenéticos nas Leucemias do Lactente

Terezinha de Jesus Marques Salles

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Genética.

Orientadora: Profa Dra Neide Santos

Co-orientadora: Dra Maria Luiza Macedo Silva

Salles, Terezinha de Jesus Marques
Estudos citogenéticos nas leucemias do lactente/ Terezinha de Jesus
Marques Salles. – Recife: O Autor, 2010.

126 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Neide Santos.

Co-orientadora: Maria Luiza Macedo Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Ciências Biológicas. Genética, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Citogenética 2. Leucemia em crianças 3. Hospitais
universitários I. Título.

572.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-035

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

Parecer da comissão examinadora da tese de

TEREZINHA DE JESUS MARQUES SALLES

“Estudos Citogenéticos nas Leucemias do Lactente”

A comissão examinadora considera o presente trabalho

[**APROVADO**]

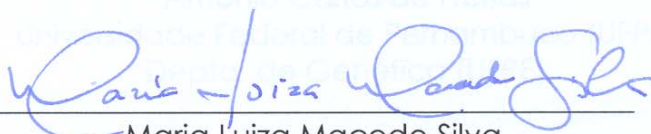
Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Terezinha de Jesus Marques Salles, faz jus ao grau de Doutor em Genética pela UFPE
Recife, 17/12/2010

1º Examinador:



Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay
Instituto Nacional do Câncer (INCA)/RJ

2º Examinador:



Maria Luiza Macedo Silva
Instituto Nacional do Câncer (INCA)/RJ

3º Examinador:

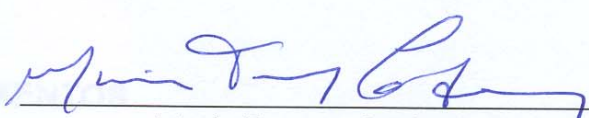


Marcos André Cavalcante Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Depto. de Biofísica

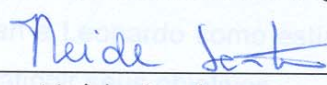
4º Examinador:



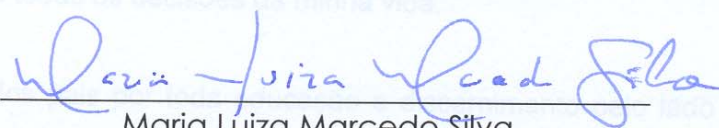
Paula Sandrin Garcia
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Depto. de Genética

5º Examinador:

Maria Tereza Cartaxo Muniz
Universidade de Pernambuco (UPE)
Instituto de Ciências Biológicas

Orientador:

Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Depto. de Genética (UFPE)

Co-orientador:

Maria Luiza Marcedo Silva
Instituto Nacional do Câncer (INCA)/RJ
Laboratório de Citogenética do (CEMO-INCA)/RJ

Coordenador:

Antonio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Depto. de Genética (UFPE)

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados filhos, Vivian e Leonardo como estímulo para que eles sempre tenham força de vontade para atingir seus objetivos.

A meu querido marido, companheiro que sempre teve muita tolerância e compreensão em todas as decisões da minha vida.

Aos meus queridos pais por toda educação e discernimento pelo lado correto da vida.

Este trabalho não poderia ter sido realizado sem a colaboração de diversas pessoas amigas a quem expresso os meus profundos agradecimentos:

À Dra Neide Santos, minha orientadora, pela amizade e maneira gentil com que aceitou tal incumbência.

À minha co-orientadora Dra. Maria Luiza Macedo Silva que desde o mestrado vem ajudando na minha formação como citogeneticista, sem sua participação este trabalho não teria tanto valor.

Ao intercâmbio científico Brasil-Alemanha. Brasil - Laboratório de Citogenética – Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO), Instituto Nacional de Cancer (INCA) coordenado pela Dra. Maria Luiza Macedo Silva / CAPES 3017089 e Alemanha - Molekulare Zytogenetik – Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Jena coordenado pelo Dr. Thomas Liehr / DAAD XXXX9

Ao Dr Thomas Liehr orientador na Alemanha pelo projeto CAPES/ DAAD, pela revisão dos trabalhos publicados e por todas as análises realizadas em seu laboratório em Jena / Alemanha

À querida Eliane pela ajuda nos diagnósticos citogenéticos, revisão dos FISH, pela amizade e carinho durante todo esse tempo que temos trabalhado juntas.

À Edinalva e Mariluze, médicas hematologistas, que dividiram comigo os diagnósticos, assim como, os sucessos e insucessos no tratamento das crianças com leucemia.

À Dra. Hasmik Mkrtchyan pela orientação na realização das técnicas de citogenética molecular, e pelo início de uma grande amizade.

À Betânia pela ajuda nos exames e na confecção dos gráficos da tese.

À Elizângela pela amizade e pelos diagnósticos imunofenotípicos.

À minha querida irmã Olga pela ajuda na confecção da tese.

À Dra Tereza Cartaxo, chefe dos laboratorios do CEONHPE, pela amizade e pela sua dedicação no desenvolvimento do laboratório de citogenética desta Instituição.

A todas as médicas do CEONHPE, Vera, Karina, Raquel, Silvania, Adriana, Laurice, Leda e Marina que participaram conjuntamente no tratamento das crianças com leucemia.

À Teresa Marquim, Jemima e Amália, pela ajuda na preparação das técnicas citogenéticas.

Dedico esta tese a todas as crianças portadoras de leucemia, na esperança, de que no futuro breve, possamos ver uma mudança na trajetória desta grave doença.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE QUADROS.....	XV
LISTA DE TABELAS.....	XVI
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
1 INTRODUÇÃO.....	XVIII
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 AS LEUCEMIAS AGUDAS NOS LACTENTES.....	3
2.1.1 <i>Mecanismos Hipotéticos da Etiopatogenia das Leucemias Agudas dos Lactentes (LAL)</i>	4
2.1.2 <i>Fisiologia da proteína MLL</i>	8
2.1.3 <i>Patogenia do gene MLL na leucemia do lactente</i>	12
2.1.4 <i>Mecanismo molecular na leucemia aguda do lactente MLL+</i>	17
2.2 SÍNDROME MIELODISPLÁSICA (SMD) NA INFÂNCIA.....	19
2.3 DIAGNÓSTICO DAS LEUCEMIAS NO LACTENTE.....	24
2.3.1 <i>Morfologia</i>	25
2.3.2 <i>Imunofenotipagem</i>	26
2.3.3 <i>Citogenética Convencional</i>	27
2.3.4 <i>Citogenética Molecular: FISH, M-FISH, MCB, mMCB</i>	31
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 PACIENTES.....	39
4.2 MÉTODOS.....	39
4.2.1 <i>Amostras</i>	39
4.2.2 <i>Citogenética Convencional</i>	39
4.2.3 <i>Bandeamento G</i>	40
4.2.4 <i>Citogenética Molecular</i>	41
4.2.4.1 <i>Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH)</i>	41
4.2.4.2 <i>Multicolor FISH (M-FISH) e multicolor banding (mMCB)</i>	42
4.2.4.3 <i>Bandeamento multicolorido (MCB)</i>	43
5 ASPECTOS ÉTICOS.....	44
6 RESULTADOS.....	45
7 DISCUSSÃO.....	89
8 CONCLUSÕES.....	106
9 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	108
10 ANEXOS.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMo = anticorpo monoclonal

ALL1 gene (“acute lymphoblastic leukemia 1 gene”) = Gene da leukemia linfoblástica aguda

AF6 = Gene do cromossomo 6 humano

AF9 = Gene do cromossomo 9 humano

AF1P = Gene do cromossomo 1 humano

AFX= Gene do cromossomo X humano

LMA-K= Leucemia megacarioblástica aguda

AnaE= Alfa-naftil acetato esterase

AnbE = Alfa-naftil butirato esterase

AREB-T= Anemia refratária em transformação

ASH2L gene (“*absent, small, or homeotic, Drosophila, homolog-like*” gene)= gene ausente, pequeno ou homeótico com homologia a *Drosófila*

BCR (“Break Cluster Region”) = Região de pontos de quebra

CALLA = Antígeno comum da leukemia linfoblastica aguda (CD10)

CBP= Proteína de ligação CREB

CCK (“*Color* changing karyotyping”) = Cariótipo de mudança de cor

CTD= (“Cytolethal distending toxin”) = Toxina de citoesqueleto distendinda

CEP = Sonda centromérica

COT1-DNA^R= DNA bloqueador com um valor cot de 1

del = deleção cromossômica

der = cromossomo derivativo

dic = cromossomo dicêntrico

domínio AT = domínio adenina transferase

dominio MT= domínio metil trasferase

EBV= Vírus Epstein Barr

FAB = Grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico

FISH = “Fluorescente in situ Hibrydization” = Hibridização in situ Fluorescente

FYRc e FYRN= Sequências motivo pouco caracterizadas com regiões ricas em fenilalanina/ tirosina, ao redor dos aminoácidos 50 e 100.

Gene *EEN* = Gene de fusão da leucemia extra onze dezenove

Gene *ENL* = Gene da leukemia onze dezenove

GBG = Badeamento G

HLA-DR = Antígeno de histocompatibilidade leucocitário HLA-DR humano

HRX gene = Gene humano Trithorax

HOX gene = Gene *Homeobox*

HTLV-1= Vírus humano tipo lymphotrop T

Hb-F= Hemoglobina Fetal

HDAC = histona deacetilase

IgH = Imunoglobulina de cadeia pesada

Inv = inversão cromossômica

ISCN (“International System Cytogenetic Nomenclature” (Nomenclatura do sistema Internacional)

K-Ras (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)= oncogene homólogo de sarcoma viral de rato Kirsten)

LL= Leucemia do lactente

LAL = Leucemia aguda do lactente

LS = Síndrome Lentigene

LIF (“leukemia inhibitory factor”) = Fator inibitório de leucemia

LLA= Leucemia linfoblástica aguda

LLA- Pró B = Leucemia Linfoblástica Pró-B

LMA = Leucemia mieloblástica aguda

LMA-MO= Leucemia mielóide aguda sem diferenciação

LMA- M1= Leucemia aguda sem maturação

LMA- M2= Leucemia mielóide aguda com maturação

LMA- M3= Leucemia promielocítica aguda

LMA-M3v= Leucemia promielocítica variante

LMA- M4= Leucemia mielomonocítica aguda

LMA-M4 eo= Leucemia mielonocítica aguda eosinofílica.

LMA- M5= Leucemia monoblástica

LMA - M6= Eritroleucemia

LMMJ= Leucemia mielomonocítica juvenil

MAT = Mielopoeese anormal transitória

MCB(Multicolor banding)= bandeamento multicolorido

mMCB(“Multitude multicolor chromosome banding”) = Todos cromossomos com bandeamento multicolorido

M-FISH(Multicolor FISH) = FISH multicolorido

MLL(myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia) = leucemia mista/linfóide ou leucemia mista

MO = Medula óssea

MOF gene (“mammalian ortholog of the Drosophila gene”) - Gene de Drosófila ortólogo mamífero)

MPO = Mieloperoxidase

NF1= Neurofibromatose 1

OMS= Organização Mundial Saúde

P53 = Proteína 53

P300 = Transcrição coactivator

PAS (“Periodic acid Schiff”) – Ácido Periódico de Schiff

PCP= Cromossomo Pintura Parcial

PHD domain= Homedominio de Planta

Proteína Rb= Proteína do Retinoblastoma

Proteína WDR = proteína com motivo triptofano ácido aspártico repetido

PTPN11 (“protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1”) = Proteína tirosina fosfatase, não receptora tipo 1

RBPB5 (“RNA-binding protein splice variant b5”) = Proteína de quebra variante b5 ligante do RNA)

SBB= Sudan Black B

SC (‘Stem cells’)= Célula Pluripotente

SD= Síndrome de Down

SEPT 2 = Proteína septina 2

SEPT 5 = Proteína septina 5

SEPT 6= Proteína septina 6

SET domain = Domínio SET

SH = Sistema hematopoético

SHP-2(“SH2 domain-containing tyrosine phosphatases”) = Tirosina fosfatases contendo o domínio SH2

SMD= Síndrome Mielodisplásica

Smlg (“Surface membrane imunoglobulin”)= Antígeno de membrana de superfície

SMP= Síndrome Mieloproliferativa

SNC= Sistema Nervoso Central

SNL1= Sinal de localização nuclear 1

SNL2= Sinal de localização nuclear 2

SN= Síndrome de Nooam

SP= Sangue periférico

t= translocação

WCP (“Whole chromosomic painting”)= Cromossomo todo pintado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das regiões do gene <i>MLL</i> e regiões de quebras e translocações.....	7
Figura 2 -. Representação esquemática das funções biológicas da proteína <i>MLL</i> com os principais sítios de transcrição.....	10
Figura 3 - Adaptada. Modelo esquemático do complexo <i>MLL</i> na regulação da transcrição.....	11
Figura 4 - Metilação e transcrição do gene <i>MLL</i>	15
Figura 5 - Genes parceiros do gene <i>MLL</i>	16
Figura 6 - Esquema das múltiplas funções das proteínas normais e aberrantes <i>MLL</i> no programa desenvolvimento hematopoético.....	18
Figura 7 - Distribuição da frequência dos parceiros do <i>MLL</i> na infância.....	30
Figura 8 - Marcação da região 11q23 com a sonda <i>MLL</i> LSI espectro	33
Figura 9 - Metáfase e núcleo interfásico com rerranjo do gene <i>MLL</i>	34
Figura 10 . Combinação de fluorocromos para identificação dos cromossomos no M-FISH..	35
Figura 11 - MCB (Bandeamento Multicolorido).....	36
Figura 12 - Portadores de Leucemia <i>de novo</i> (83 casos).....	45
Figura 13 - Faixa etária dos lactentes com leucemia aguda e SMD.....	46
Figura 14 - Anormalidades da região 11q23 na LLA do lactente (N=13).....	54
Figura 15 - Bandejamento G no caso 6 (LLA),46,XX,t(4;11)(q21;q23).....	54
Figura 16 - Anormalidades citogenéticas não relacionadas a região 11q23	55
Figura 17 - Frequência das alterações da região 11q23 na LLA (n=17).	56
Figura 18 - MCB no caso 31 (LLA) mostrando a trissomia 14	58
Figura 19 - Dados citogenéticos do caso 35 com LLA.	59
Figura 20 - Dados citogenéticos do caso 38 com LLA.	60
Figura 21 - Dados citogenéticos do caso 45 com LLA	61
Figura 22 - Dados citogenéticos do caso 41 com LLA.	62

Figura 23 - Classificação FAB na LMA dos lactentes (N=23).....	63
Figura 24 - Alterações citogenéticas na LMA dos lactentes (n=21).....	67
Figura 25 - Cariótipo no caso 6(LMA-M4), 46,XY,t(1;11)(p32;q23)	68
Figura 26 - Estudo do rearranjo do gene MLL na LMA do lactente (n=23).....	68
Figura 27 - Dados citogenéticos do caso 17 com LMA-M5.	70
Figura 28 - Dados citogenéticos do caso 18 com LMA-M7.	71
Figura 29 - Dados citogenéticos do caso 20 com LMA-M5.	72
Figura 30 - Dados citogenéticos do caso 23 com LMA-M4eo.	73
Figura 31 - Dados citogenéticos do caso 1 com L bifenotípica.....	76
Figura 32 - Dados citogenéticos do caso 2 com L bifenotípica.....	77
Figura 33 - Frequência do rearranjo do gene MLL nas LAL	78
Figura 34 - Achados citogenéticos na SMD do lactente.	79
Figura 35 - Dados citogenéticos do caso 2 com SMD.....	83
Figura 36 - Dados citogenéticos do caso 4 com SMD.....	84
Figura 37 - Dados citogenéticos do caso 6 com LMA/SMD	85
Figura 38 - Dados citogenéticos do caso 8 com LMA/SMD.	86
Figura 39 - Dados citogenéticos do caso 9 com LMA-M7 e Neurofibromatose....	87
Figura 40 - Dados citogenéticos do caso 10 com SMD/LMA.....	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Critérios mínimos para o diagnóstico da SMD na infância	19
Quadro 2. Classificação da Síndrome Mielodisplásica na infância de acordo com a OMS	20
Quadro 3. Fluxograma para o diagnóstico das leucemias no lactente	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Adaptada. Frequência dos principais parceiros do gene <i>MLL</i> , e do grupo das diversas proteínas geradas.	14
Tabela 2. Diferentes classes de sondas comumente usadas para análise de FISH em laboratórios clínicos.....	32
Tabela 3. Dados Clínicos e Citogenéticos Clássico e Molecular dos lactentes com LLA.....	48
Tabela 4. Dados Clínicos e Citogenéticos Clássico e Molecular dos lactentes com LMA.....	64
Tabela 5. Dados Clínicos e Citogenéticos Clássico e Molecular dos lactentes com leucemia de linhagem ambígua.....	77
Tabela 6. Dados Clínicos e Citogenéticos Clássico e Molecular dos lactentes com SMD	83

RESUMO

A análise citogenética convencional e molecular nas leucemias do lactente (LL) é de fundamental importância para estabelecer alterações cromossômicas e que definem grupos e subgrupos de risco. Este estudo caracterizou alterações cromossômicas em 83 lactentes, oriundos do Centro de Oncohematologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz e Centro de Transplante de Medula Óssea do Instituto Nacional do Câncer (CEMO/INCA) no período de julho/2000 a agosto/2010, sendo 73 casos de leucemias agudas (LA) e 10 de síndrome mielodisplásica (SMD). As Leucemias agudas foram classificadas como leucemia linfoblástica aguda (LLA) (47 casos), leucemia mielóide aguda (LMA) (23 casos) e leucemias ambíguas (3 casos). A idade dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda variou de 5 dias a 22 meses, com proporção entre os sexos de 1:1. A idade dos casos de leucemia mielóide aguda variou de 2 a 21 meses, sendo 15 masculinos e 7 femininos. Os subtipos morfológicos foram leucemia mielóide com diferenciação (M2), leucemia mielomonocítica (M4), leucemia mielomonocítica eosinofílica (M4eo), leucemia monoblástica (M5) e leucemia megacarioblástica (M7). O bandeamento G (GBG) revelou anormalidades da região 11q23 em 38% dos casos de leucemia linfoblástica e em 50% dos casos de leucemia mieloblástica. O rearranjo do gene *MLL* por hibridização *in situ* foi observado em 65% e 39% das leucemias linfoblásticas e leucemia mielóide, respectivamente. Nos casos com síndrome mielodisplásica, a idade variou entre 20 dias a 20 meses, sendo seis do sexo masculino e quatro do feminino. Sete casos foram leucemia mieloblástica em portadores de S.Down, destes seis eram leucemias megacarioblásticas (LMA-K/LMA-M7) e uma leucemia mielóide sem diferenciação (LMA-MO). Todas as leucemias megacarioblásticas tiveram cariótipos complexos com translocações envolvendo o cromossomo 1. Os métodos de Hibridização *in situ* (FISH), multicolor FISH (M-FISH) e bandeamento cromossômico multicolorido (MCB), foram essenciais nos casos duvidosos pelo GBG, nos cariótipos complexos e nos casos de cromossomos marcadores.

Palavras Chaves: Gene *MLL*, citogenética molecular, leucemia do lactente.

ABSTRACT

Cytogenetic and molecular analysis in infant leukemia has extremely importance for establishing chromosomes alterations to defining groups and sub-groups of risk. This study has pointed chromosomes alterations in 83 infants originating from Cytogenetic Laboratory of Pediatric Oncohematology Center of University Hospital Oswaldo Cruz of Pernambuco and Cytogenetic Department of Nacional Center for Bone Marrow Transplant of National Cancer Institute from July/2000 until august/2010. Seventy three cases were acute leukemia (AL) and 10 of them, mielodysplasic syndrome (MDS). The acute leukemias were classified as acute lymphoblastic leukemia (47 cases), acute myeloid leukemia (23 cases) and ambiguous leukemias (3 cases). The acute lymphoblastic leukemia age has varied between 5 days to 22 months with gender proportion of 1:1. The acute myeloid leukemia ages have varied from 2 to 21 months, being 15 males and 7 females. The morphologic subtypes were acute myeloid leukemia without maturation (M2), myelomonocytic leukemia (M4), eosinophilic myelomonocytic leukemia (M4eo), acute monoblastic leukemia (M5) and acute megakaryoblastic leukemia (M7). G-banding has revealed abnormalities 11q23 in 38% of the acute lymphoblastic leukemia and 50% of the acute myeloid cases. The *MLL* gene rearrangement by *in situ* hybridization was observed in 65% and 39% of the acute lymphoblastic and acute myeloid leukemia, respectively. The mielodysplastic syndrome age has varied between 20 days to 20 months, being six males and 4 females. Seven cases were acute myeloid leukemia in Down syndrome carriers, being six acute megakaryoblastic leukemia (AMLK) and one undifferentiated acute myeloid (MO). All acute megakaryoblastic leukemia had complex karyotypes with translocation dealing with chromosome 1. The methods *in situ* hybridization (FISH), Multicolor FISH (M-FISH) and multicolor chromosomic banding (MCB) were essential in the doubtful cases by G-banding, in complex karyotypes or mark chromosome cases.

Keys words: *MLL* Gene, molecular cytogenetic, infant leukemia.

1 INTRODUÇÃO

As leucemias no lactente (LL) são doenças graves da criança menor de dois anos de idade. Têm ocorrência em torno de 3% dos casos e características específicas que diferem das leucemias em outras faixas etárias. Evidências sugerem origem intraútero, devido à íntima relação entre embriogênese e carcinogênese. As LL podem ser leucemias agudas (LAL), leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia mielóide aguda (LMA), leucemias de linhagem ambígua (leucemias bifenotípica e bilineal) ou síndrome mielodisplásica (SMD), mielopoeise anormal transitória (MAT), LMA em portadores de síndrome de Down (LMA/SD) e leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ).

No lactente, a LLA ocorre em 60% dos casos tendo como protótipo o subtipo pró-B. É uma doença agressiva, com hiperleucocitose, visceromegalias e infiltração do sistema nervoso central (SNC). Em cerca de 80% dos casos existe o rearranjo do gene *MLL* (*leucemia mista mielóide linfóide*), sendo as principais anormalidades a $t(4;11)$ e $t(11;19)$. Estes rearranjos exercem um papel primordial na leucemogênese, pois a proteína quimérica produzida atua como fator de transcrição, estimulando continuamente a hematopoeise.

A LMA ocorre em 40% dos lactentes e os subtipos mais freqüentes são leucemias mielomonocítica e monoblástica aguda (LMA-M4 e M5). As translocações mais freqüentes são: $t(9;11)$, $t(6;11)$, $t(10;11)$. Apesar da alta freqüência do rearranjo envolvendo o gene *MLL*, diferentemente da LLA, na LMA o prognóstico não difere das outras faixas etárias. Nos recém-nascidos, há uma maior ocorrência da LMA em relação a LLA e a leucemia megacarioblástica aguda, LMA-K(LMA-M7) que está associada à $t(1;22)$ é o principal subtipo, cujo

prognóstico é desfavorável. Entretanto, nos neonatos com SD há uma maior frequência do subtipo LMA-K, sem a $t(1;22)$, e a doença cursa com bom prognóstico. Estes pacientes são classificados como SMD pela OMS que pertence especificamente ao grupo LMA em portadores de SD. Cerca de 20-30% dos neonatos com SD podem apresentar a mielopoese anormal transitórios (MAT) ou achados de mielodisplasia antes do surgimento de LMA definitiva. Assim como os portadores de MAT, os portadores de LMMJ são diagnosticados como SMD e classificados no grupo de doenças mieloproliferativas/mielodisplásicas (SMD/SMP). A LMMJ representa 3% das leucemias da infância, ocorre em torno de 1,2 por milhão entre 0 a 14 anos. Atinge principalmente lactentes e crianças jovens, menores de 5 anos. A doença é indolente com prognóstico ruim. Apesar de 80% dos portadores de LMMJ apresentarem cariótipo normal, a monossomia do cromossomo 7 está frequentemente correlacionada à doença.

No Brasil, os estudos citogenéticos em lactentes são raros e não se conhece as principais alterações cromossômicas. Como a LAL é uma doença com alto risco de recidiva, relacionada ao rearranjo do gene *MLL*, presente em cerca de 70% dos casos estudados, os protocolos atuais sugerem realizar estudos citogenéticos para indicação do tratamento incluindo quimioterapia e transplante de medula óssea. Nas LMA, apesar da presença do rearranjo do gene *MLL*, decorrente principalmente da $t(9;11)$, existe boa resposta a poliquimioterapia, sem a necessidade de transplante de medula óssea. Desta forma, os estudos pelas técnicas de citogenética convencional e molecular na LAL são de fundamental importância para estabelecer as alterações cromossômicas, assim como, para definir grupos e subgrupos de risco que se beneficiem com um tratamento direcionado, o que é de extrema relevância epidemiológica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 As Leucemias Agudas nos Lactentes

As leucemias agudas que acometem os lactentes (LAL) são neoplasias malignas raras do sistema hematopoético e o primeiro caso clínico foi descrito em 1921 por Smith (*apud* Pierce, 1959). Em 1936, Goldhamer e Barnney descreveram o acometimento cutâneo na LMA e, em 1951, Bernhard e cols descreveram que os fatores que causam leucemia poderiam ocorrer intrauterino. Zussman et al. (1967) descreveram um caso de leucemia congênita com anomalias cromossômicas restrita ao clone leucêmico e, revisaram as características clínicas de 50 outros lactentes. Naquela época, a correlação entre leucemias congênitas e síndromes constitucionais (síndrome de Down, síndrome de Bloom e mais raramente, síndrome de Patau e de Turner) levou à especulação que as anomalias cromossômicas adquiridas, que levam a transformação maligna, seriam secundárias a lesões decorrentes de instabilidade cromossômica ou lesões em sítios frágeis dos cromossomos. Estas alterações produziriam um clone anormal oriundo, provavelmente, da lesão na hematopoese embrionária (Quesnel e Malkin, 1997).

Em 1986, Pombo-de-Oliveira et al. publicaram um estudo mostrando as alterações moleculares na leucemia congênita de gêmeos univitelinos. A revisão da literatura, neste estudo mostrou que a maioria destas leucemias ocorria em crianças menores de 1 ano. A partir desse período, os estudos sobre leucemias do lactente ganharam grande impulso, principalmente, com a descoberta do gene *MLL* no cromossomo 11, banda q23, como o marcador mais importante para este tipo de leucemia (Ziermin van der Poel, 1991). Nos lactentes, com rearranjo do gene

MLL, as leucemias apresentam infidelidade celular podendo ser LLA pró-B, LMA M4/M5 e L ambíguas (Cimino et al.,1998). Nos lactentes, a LLA geralmente tem comportamento clínico agressivo, cursa com leucometria elevada, visceromegalias e infiltração SNC, enquanto as infiltrações em pele, tecidos subcutâneos, região retro-orbitária e gengiva ocorrem mais frequentemente na LMA (Pui et al.,1995, Itoyama et al., 2002). A LMA-K ocorre em 10% das LMA da infância, predomina nos neonatos e em geral cursa com prognóstico reservado, à exceção dos portadores de SD (Ribeiro et al, 1993).

2.1.1 Mecanismos Hipotéticos da Etiopatogenia das Leucemias Agudas dos Lactentes (LAL)

As pesquisas realizadas *in vitro* e *in vivo* nas LAL são bastante promissoras no que se refere à etiopatogenia da doença, devido às características biológicas das células leucêmicas e do curto período do surgimento das manifestações clínicas na doença. Apesar da dificuldade na identificação dos possíveis fatores predisponentes, a baixa idade, nestes casos, indica que mutações recorrentes, durante a gravidez ou durante a embriogênese estão associadas ao processo leucêmico (Hartley e Sainsbury, 1981; Greaves, 1993). Os estudos moleculares em gêmeos univitelinos e siameses com leucemias agudas, atualmente, confirmam que a mutação ocorre intraútero. Um fato interessante, nestes casos, é que apenas um dos gêmeos é inicialmente afetado, posteriormente a doença passa para o segundo gêmeo por metástases, via anastomose intraplacentária ou através da circulação materna (Pombo-de-Oliveira et al.,1986; Mahmoud, et al.,1995 Greaves, 2003).

Apesar de não se saber quais fatores levam a leucemia, existem diversos estudos elaborados que avaliam os fatores de risco no desenvolvimento da doença. Uma hipótese muito cogitada é que, durante a gestação as mulheres sofram exposição a substâncias inibidoras da topoisomerase II ou, a enzimas com funções similares destes inibidores. Existem inibidores naturais da topoisomerase II em frutas, vegetais, grão de soja (substâncias flavonóides tipo quercetina e a genisteína), chás preto e verde, cacau, vinhos (catechis) e quinolonas (Ross, 1995; Alexander et al., 2001, Hengstler et al., 2002). A possibilidade de substâncias inibidoras de topoisomerase causarem leucemias advém da semelhança nos achados citogenéticos com a leucemia secundária ao tratamento quimioterápico (Prieto et al., 1990). Dados da literatura mostram que drogas inibidoras de topoisomerase produzem lesão no cromossomo 11, no mesmo ponto de quebra das LAL, na região 11q23 (Hunger, 1998). Outros fatores sugeridos como indutores de leucemias são: exposição materna a raios-X, agentes químicos, como os derivados de petróleo e alguns pesticidas (Lowengart, 1987; Rinski, 1987).

Durante a transformação leucêmica, à nível molecular, ocorre ativação de proto-oncogenes ou a formação do gene de fusão com propriedades de oncogene (Hogge, 1994). Na maioria das vezes, um oncogene é ativado por uma translocação cromossômica, mas pode também resultar de uma mutação pontual, amplificação e inserção viral. Quando há translocação, um proto-oncogene se funde a outro gene celular resultando num produto protéico, que pode ser um fator de transcrição e, assim codificar proteínas envolvidas no crescimento e diferenciação celular. Os genes, como o *MLL*, têm grande importância na leucemogênese, pois atuam como “Master genes”, ou seja, genes regulatórios que

estão envolvidos na regulação da hematopoese e controlam a expressão de diversos genes (Green, 1996).

Nas LAL as anormalidades cromossômicas mais frequentes envolvem o gene *MLL*. Este gene está localizado no cromossomo 11q23, também conhecido como gene *leucemia linfóide 1 (ALL1)* ou gene *Trithorax(HRX)*(Fig.1) (Marschalek, 1997). Este gene codifica uma histona-lisina *N*-metiltransferase HRX, com homologia epigenética à proteína reguladora transcricional Trithorax da *Drosophila melanogaster*, um efector transcricional dos genes *HOX*. A proteína MLL é essencial, tanto no desenvolvimento do embrião, como na regulação dos genes *HOX*. Dessa forma, o gene *MLL* conjuntamente com alguns genes *HOX*, atuam na especificação e/ou expansão de células hematopoéticas progenitoras (Stem Cells) (Magli et al., 1997; Ernst et al., 2004). Após a vida embrionária, a proteína MLL é necessária para manutenção da transcrição dos genes *HOX*. Então, a ligação entre a proteína MLL, a regulação de gene *HOX* e a hematopoese são de particular importância na fisiopatogenia das leucemias (Li et al., 2005).

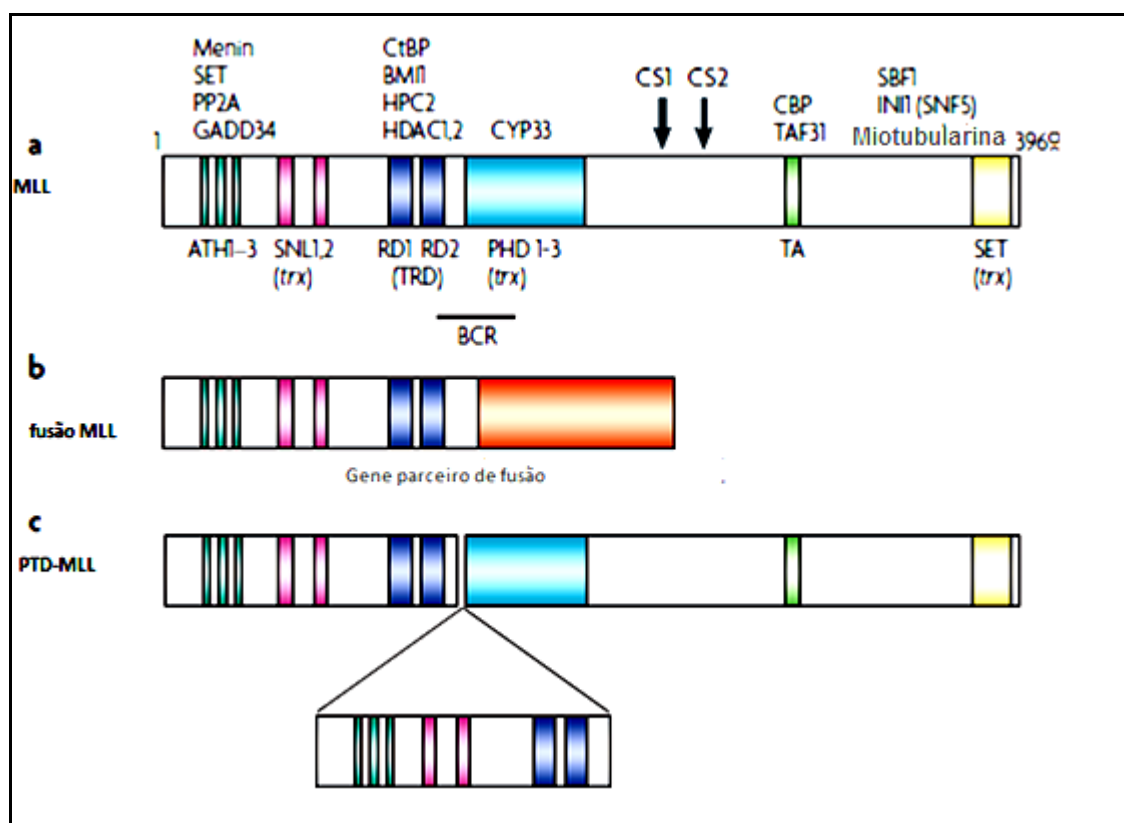


Figura 1-Representação esquemática das regiões do gene *MLL* e regiões de quebras e translocações. Vários domínios funcionais são mostrados: AT em gancho; sinais de localização nuclear, SN1 e SN2; CxxC (MT), motivo rico em cisteína homóloga metiltransferase DNA eMDB1; PHD1-3 em dedo de zinco; regiões CS1 e CS2, TAD, domínio de transativação; SET – domínio SET. TRX – regiões estruturalmente conservadas com a Tritorax da *Drosophila Melanogaster* (TRX). Vários ativadores transcricionais estão também representados. Fonte: Krivsov e Armstrong 2007.

2.1.2 Funções da Proteína MLL

O entendimento do funcionamento da proteína MLL é de importância primordial para leucemogênese. A MLL é uma proteína complexa com diversos domínios funcionais, atua na regulação de genes de transcrição através dos seus domínios AT e MT que se ligam diretamente ao DNA. A região em gancho AT se liga nas regiões ricas em AT da pequena curvatura do DNA e o domínio MT, a uma região rica em cisteína (CXXC) (Birke et al., 2002). A região AT tem função de desmetilação e a MT de metilação nas sequências CpG. A proteína MLL através de sua região RD1 e RD2 também atuam como repressora da transcrição, através do recrutamento de complexos HDAC ou proteínas do grupo polycomb (Xia et al., 2003). O domínio em dedo de zinco (PHD), semelhante a outras proteínas PHD, atua na remodelação da cromatina, além da atividade na regulação transcrional (Slany, 2005). Por conter motivos de auto associação na região em dedos de zinco e na região do domínio SET (motivo também responsável pela metilação de H3K4) (fig 1), acredita-se que a proteína MLL funciona como um dímero ou um oligomérico (Rozovskaia et al., 2000). Ao lado destes domínios, esta proteína, tem dois sinais de localização nuclear, na região N terminal (SNL1 e SNL2), o qual determina um padrão pontilhado de localização nuclear (Fig.1) (Daser e Rabbitts, 2004; Krivtsov e Armstrong, 2007).

A proteína MLL após ser completamente formada, pós transcricionalmente é clivada por uma protease, a taspase 1, em dois fragmentos: um fragmento N-terminal de 320 kDa, com atividade de repressão da transcrição, composto pelos motivos em gancho AT e com suas regiões SNL1 e SNL2 (localização nuclear salpicado 1 e 2), além do domínio MT e o em dedo de zinco (MLLH) e num fragmento C-terminal com 180kD, com forte atividade transcrional que contém o

domínio SET e o TAD (MLLC) (Hsieh et al., 2003). Há uma interação entre os domínios FYRN da MLL, localizado na região terminal N-320, com FYRC e o domínio SET, localizados na região C180 (Fig. 2). Desta forma, estes dois complexos peptídeos MLL (MLLH e MLLC) constroem a estrutura básica, necessária para o supercomplexo multiproteína MLL (MLL-MPSC). Os peptídeos MLL conferem estabilidade e localização subnuclear de pelo menos 27 proteínas adicionais. Este grande complexo nuclear inclui diversas proteínas, com variadas funções, como as WDR5, RBPB5 e ASH2L (Fig. 3) (Couture et al., 2006; Sterward et al., 2006).

Estudos mais recentes mostram que a proteína MLL também se liga ao DNA através de proteínas de ligação. Um exemplo é a proteína de ligação supressora de tumor, conhecida como menin (codificada pelo gene *MEN 1*), ambas (MLL e menin) atuam na regulação da expressão do gene *HOX9* (Yokoyama et al., 2005). Além do *HOX*, existem outros genes alvos do gene *MLL*. Estudos atuais em células de linhagem sugerem, na realidade, que o gene *MLL* exerce um papel global na regulação da transcrição (Milne et al., 2005).

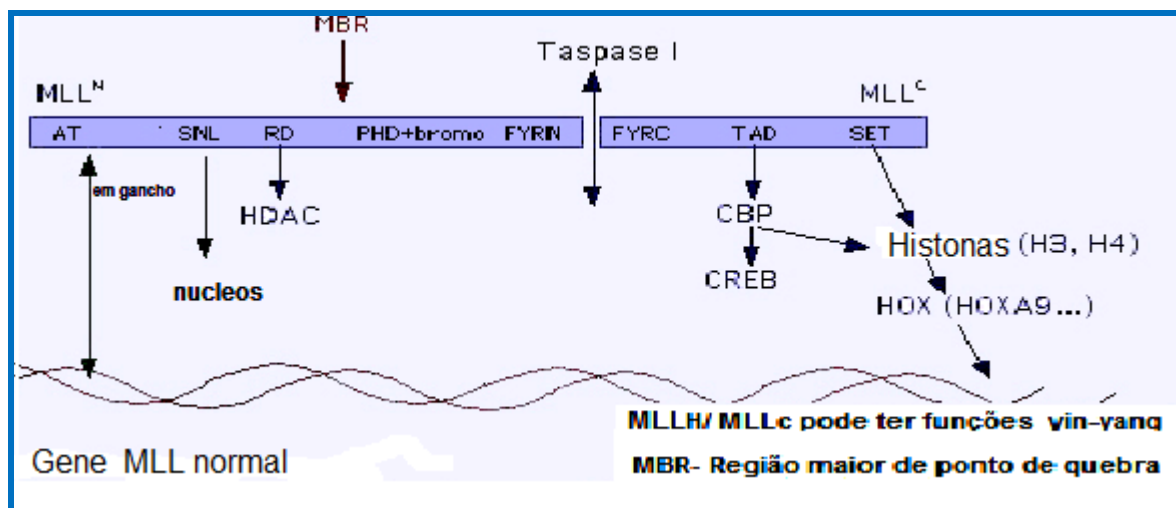


Figura 2- Representação esquemática das funções biológicas da proteína MLL com os principais sítios de transcrição. Três sítios AT em gancho que se ligam a pequena curvatura do DNA; SNL: 2 sinais salpicados de localização nuclear; RD: domínios de repressão; PHD + bromo envolvido na interação proteína-proteína; FYRN e o FYRC domínios associados a p300/p320 N-terminal, chamada MLLH e a proteína C-terminal chamada de MLLc. Uma vez que a proteína MLL é clivada pela taspase em duas proteínas antes de ir pro núcleo, formam um complexo multiproteína com o TFIID. TAD: domínio de transativação e liga o CBP que pode metilar as histonas H3 e H4 na área HOX; SET: domínio SET metiltransferase, metilase H3, incluindo histonas na área HOX para abertura da cromatina e transcrição. Fonte adaptada: Huret JL URL. <http://AtlasGeneticsGenes/Oncology.org/ml1.html>

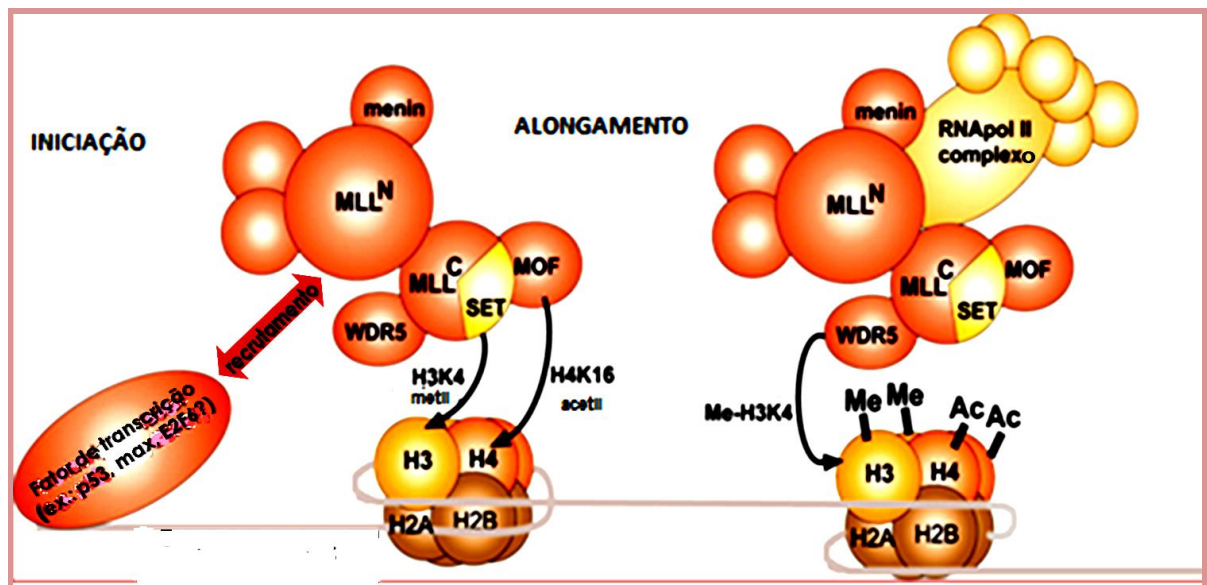


Figura 3- Modelo esquemático do complexo *MLL* na regulação da transcrição. Uma sequência específica do fator de transcrição se liga ao promotor e recruta o complexo *MLL* durante a fase de iniciação da transcrição. O domínio SET da *MLL* metila a lisina 4 da histona H3. Concomitantemente, a lisina 16 da histona H4 é acetilada por MOF. Na fase de alongamento, o complexo *MLL* se acopla com a RNA pol II pela associação como CTD da RNA Pol II com o MLLH, MLLC, e a menin. Além disso, o componente WDR5 especificamente reconhece e metila a lisina 4 da H3. Desta maneira, o modelo de modificação se espalha ao longo de uma região de transcrição ativa. Fonte adaptada: Slany, 2005.

2.1.3 Patogenia do gene *MLL* na leucemia do lactente

As translocações que envolvem o gene *MLL* levam a uma falha no reparamento do DNA nas células hematopoéticas em desenvolvimento (Richardson e Jasin, 2000). A região do ponto de quebra (BCR) entre os éxons 8 e 13 é o alvo para maioria do rearranjos, existindo ao longo desta região sítios de clivagem para topoisomerase II. Esta é uma região na qual a proteína se liga a matriz nuclear e provavelmente contribui para o mecanismo pelo qual ocorrem as translocações. Desta forma, a desregulação deste processo leva as translocações encontradas nas leucemias (Strissel et al., 1998).

Quando um determinado agente mutagênico penetra no organismo rompe a estrutura do gene *MLL* entre as regiões em dedos de zinco e de metilação, ocasionando a perda da região em dedo de zinco, sítio de ligação ao DNA, resultando num segmento truncado. Como os domínios de metilação (MT) e gancho AT são mantidos, esta região fica susceptível a ligações inespecíficas com alteração na metilação, levando a leucemogênese. Por outro lado, a fusão com genes parceiros resulta na codificação de proteínas ricas em serina e prolina. Pelo menos 52 proteínas têm sido descritas, mas apenas algumas são classificadas dentro de 5 grupos (Tabela 1) (Krivtson et al., 2007). No primeiro grupo estão as proteínas ligantes do DNA que se distribuem no citoplasma, na membrana nuclear, no retículo endoplasmático, no golgiossomo e nos ribossomos. Alguns exemplos de proteínas de fusão são AF4 da t(4;11), AF6 da t(6;11), AF9 da t(9;11), ENL da t(11;19) (Meyer et al., 2009). O segundo grupo é formado por proteínas citoplasmáticas do tipo *coiled coil*, tais como: GAS 7, EEN, AF1P, AF6 e AFX (So and Cleary, 2003; So et al., 2003). O terceiro grupo compreende um pequeno grupo de proteínas que inclui as septinas (SEPT2, SEPT5, SEPT6 9 e 11). As

septinas são proteínas citoplasmáticas que parecem estar envolvidas em diversos processos como controle de ciclo celular, tráfego de vesículas e compartimentalização da membrana plasmática, embora o significado específico, ainda permaneça desconhecido. No quarto grupo estão as histonas acetiltransferases p300 e CBP (Rowley et al., 1997; Ida et al., 1997), e ao quinto grupo pertence a MLL-PTD (duplicação parcial *in tandem*), que são resultantes da duplicação interna *in tandem* de éxons específicos (Schichman, 1994).

O achados comuns a todas as fusões do gene *MLL*, à exceção da MLL-PTD, são retenção do domínio AT em gancho e motivo em dedo de zinco CxxC (ambos são essenciais para as fusões do gene *MLL*) assim como, a perda do domínio C-terminal SET, o qual media a metilação da H3K4. Independente da fusão, o gene *MLL* mantém a capacidade de regular positivamente a transcrição dos grupos de genes *HOX A* e diversos outros genes. Na LAL, ainda não está esclarecido, qual dos eventos é o mais importante na indução leucêmica, se a fusão de genes produzindo novos transcritos como a formação de proteínas quiméricas que contêm o motivo em gancho AT ou, se é a dimerização do gene *MLL* (Cherif. 1992; Tkachuk, 1992).

Tabela 1- Frequência dos principais parceiros do gene *MLL* e do grupo das diversas proteínas geradas.

Tabela da fusão dos genes parceiros do <i>MLL</i>				
	Provável fusão	cromossomo		Frequência em leucemia
Grupo 1	provável proteína ligante ao DNA	4q21	AF4	>80% de rearranjos
		9p23	AF9	
		19p13.3	ENL	
		10p12	AF10	
		19p13.1	ELL	
Grupo 2	Citoplasma. Oligomerização do domínio coiled-coil	1q32	EPS15	>10%
		17p13	GAS7	
		19p13	EEN	
		6q27	AF6	
		Xq13	AFX	
Grupo 3	Citoplasma. Família de septinas. Interação com o citoesqueleto. Tem um papel na mitose	Xq22	SEPT2	>1%
		22q11	SEPT5	
		Xq24	SEPT6	
		17q25	SEPT9	
		4q21	SEPT11	
Grupo 4	Nuclear. Histonas acetiltransferases	16q13	CBP	>1%
		22q13	P300	
Grupo 5	Duplicação parcial em Tanden do <i>MLL</i> de exon 5-11(<i>MLL</i> -PTD)	11q23	N/A	4-7% de todas LMA com cariótipos normais

CBP, proteína de ligação CREB; *MLL* leucemia de linhagem mista; N/A não aplicável; PTD Duplicação Parcial em Tanden

Fonte adaptada: Krivtsov et al., 2007

Evidências atuais sugerem que muitos parceiros de fusão do gene *MLL* pertencem a uma rede envolvida na regulação da transcrição, através da remodelação da cromatina e alongamento da transcrição (Slany, 2005). O gene *ELL*, um parceiro do gene *MLL* é um fator de alongamento que se associa a RNA Pol II e a diversas proteínas (Simone et al., 2001). Uma proteína conhecida como DOT1L, uma histona metiltransferase que metila o resíduo de lisina 79 na histona H3 (H3K79), medeia a fusão do rearranjo *MLL*/AF10 (Fig 4) (Okada et al., 2005).

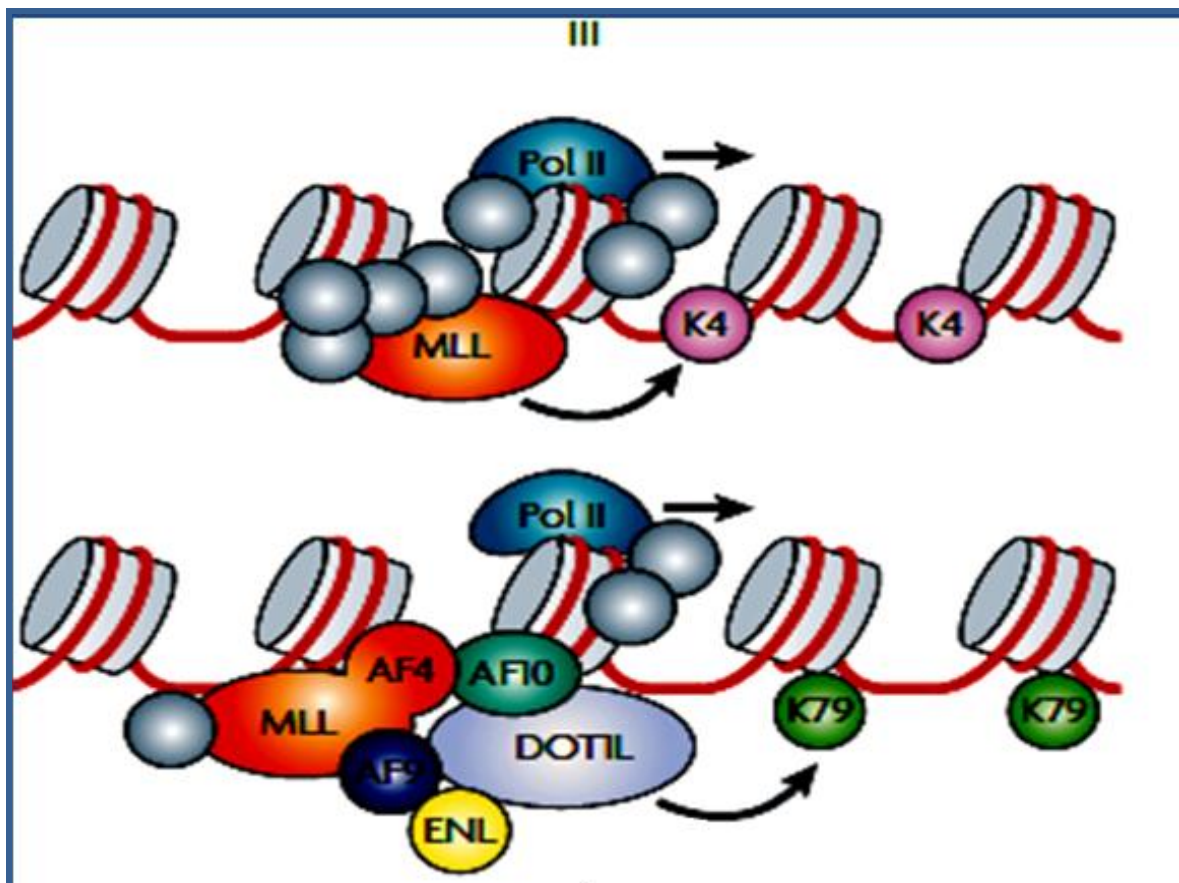


Figura 4- Metilação e transcrição do gene *MLL*, como membro de um complexo multiprotéico, a proteína *MLL* media a metilação de H3K4, nas regiões promotoras dos genes ocupadas pela RNA Pol II. Fonte adaptada: Kritsov et al.,2007

Uma função hipotética das fusões protéicas é mostrada na figura 4. A proteína *MLL* sem a região SET, que tem atividade H3K4 metiltransferase, pode recrutar a Dotilmetilferase H3K79. As fusões do gene *MLL* recrutam a proteína Dotil, nos sítios que são normalmente ocupados pelos promotores do gene *MLL* (como o gene *HOXA*), o que permite a metilação H3K79 dos *Hoxes A*, resultando em expressões aberrantes (Okada et.al, 2005, Couture et al., 2006).

Atualmente, o gene *MLL* é reconhecidamente o gene mais envolvido em translocações, mais de 54 genes de fusões foram identificados por clonagem molecular, pela sequência genômica do ponto de quebra ou pelo transcrito

quimérico (Fig.5) (Huret, 2005). A ocorrência de duplicação parcial do gene *MLL* observada em sangue periférico e em medula óssea de adultos e lactentes normais e em fígados fetais, demonstram que devem existir alterações genéticas adicionais para completa transformação maligna na leucemia do lactente. Mutações nos genes codificadores das proteínas Ras, p53 ou p16 são encontradas em alguns casos, mas são inconsistentes. A proteína íkaros que faz ligação com o DNA é necessária para o desenvolvimento linfóide normal. Isoformas anormais desta proteína foram identificadas em sete lactentes com LLA com t(4;11) ou t(11;19). Dessa forma, a ruptura do gene *IKAROS* hoje em dia é considerada uma alteração adicional na LLA do lactente (Sun, 1999; Felix e Lange, 2006).

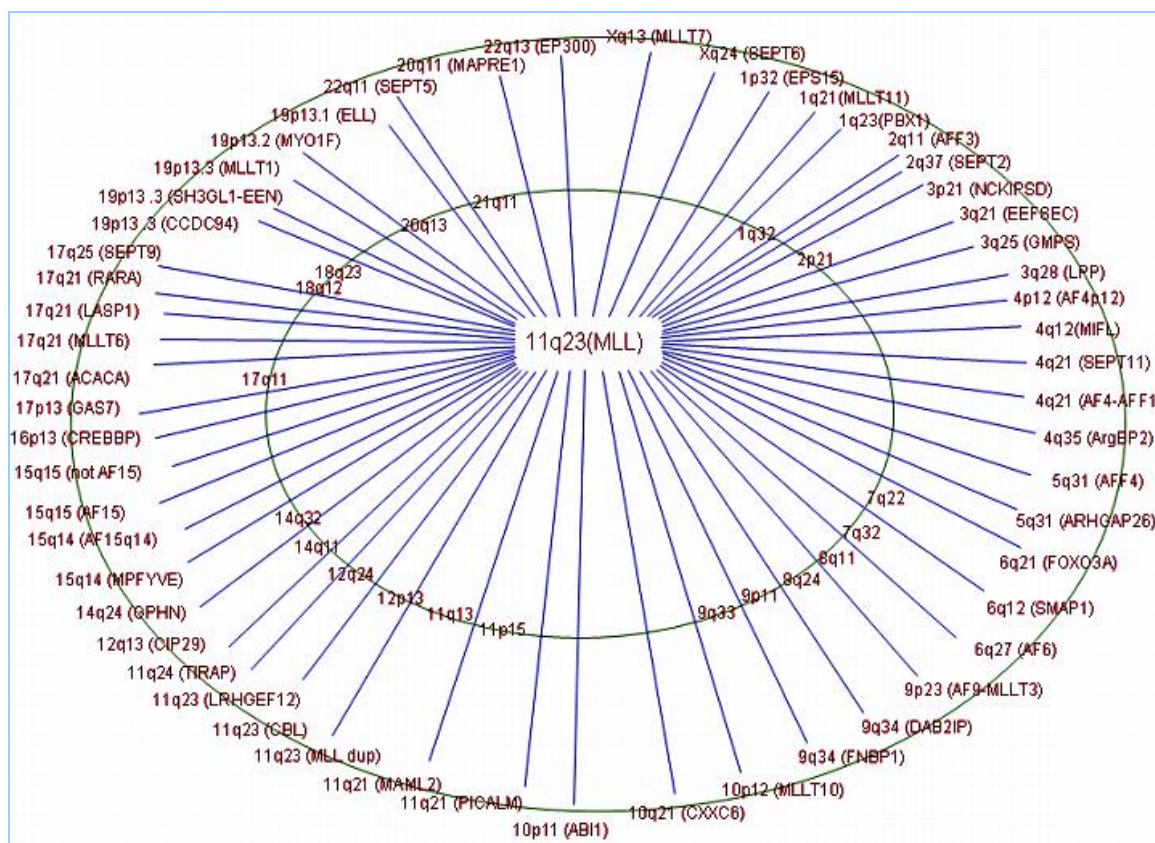


Figura 5- Genes parceiros do MLL. Fonte: Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. Atualizado em 2009. Huret JL URL. <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/MLL.html>

2.1.4 Mecanismo molecular na leucemia aguda do lactente MLL+

Provavelmente existem diferentes mecanismos envolvidos na leucemogênese do LAL, devido à existência de diferentes proteínas MLL aberrantes e certamente ocorre alguma conexão entre estes mecanismos (Fig. 6). Uma proteína aberrante resultante de translocações ou duplicação parcial *in tandem* ocasiona um programa gênico aberrante por diversos mecanismos: (1) por dimerização (ou oligomerização), um mecanismo comum na leucemogênese de diversas proteínas aberrantes (proteínas de fusões parceiras citoplasmáticas, MLL-PTD ou amplificação gênica) (Martin et al., 2003); (2) as aberrantes MPSC-MLL, recrutadoras de complexos remodeladores de cromatina levam a alterações na cromatina produzindo perfis gênicos aberrantes; (3) algumas proteínas de fusões são derivadas da fusão do gene *MLL* com parceiros citoplasmáticos podem agir como reguladores da transcrição via dimerização (ex. MLL-EE); (4) alguns parceiros de fusão podem ligar a molécula sinalizadora para o MPSC-MLL resultando em extensa alteração do perfil gênico. Desta forma, uma proteína MLL aberrante presumidamente afeta o controle celular normal incluindo transdução de sinal e ciclo celular e, possivelmente, tem uma ação direta na expressão gênica, a nível de cromatina de genes alvos, como nos genes *HOX* (Li et al., 2005).

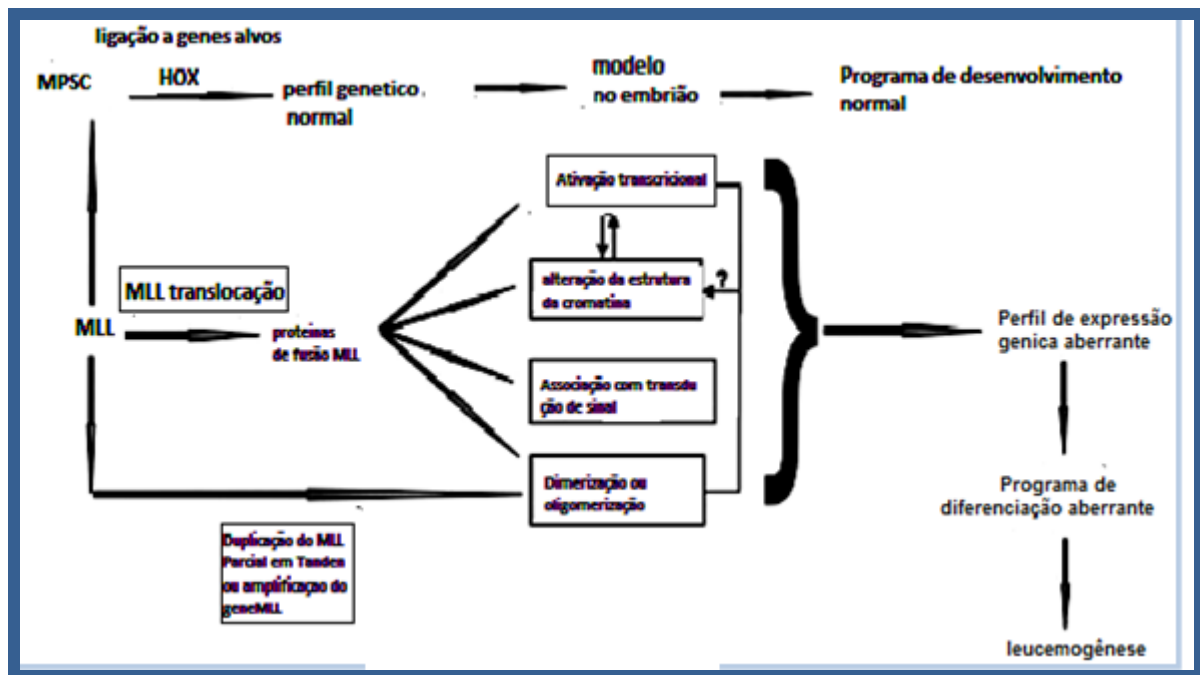


Figura 6- Esquema das múltiplas funções das proteínas normais e aberrantes MLL no programa desenvolvimento hematopoético. A proteína normal é necessária para manter o perfil gênico durante o programa de desenvolvimento hematopoético normal. A proteína aberrante derivada de translocações, duplicação parcial *in tandem* ou amplificação leva a expressão gênica e programa de desenvolvimento aberrante, que eventualmente resultará em leucemia. Diferentes mecanismos estão envolvidos na leucemogênese por proteínas MLL aberrantes e existem conexões entre estes mecanismos. Fonte adaptada: Li-Z-Y et al.,2005.

2.2 Síndrome Mielodisplásica (SMD) na Infância

O termo síndrome mielodisplásica (SMD) refere-se a um grupo de malignidades com displasia dos precursores hematopoéticos que ocasionam citopenia no sangue periférico, a despeito da medula normal ou hiperclular. O diagnóstico das SMD se baseia em uma tabela de critérios mínimos (Quadro 1) e segue a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Quadro 2) que é normalmente usada em pediatria (Hasle et al.,2003).

Quadro 1. Critérios mínimos para o diagnóstico da SMD na infância

Pelo menos dois dos critérios abaixo:

- Citopenia sem explicação
- Morfologia com displasia de duas linhagens
- Anormalidade citogenética clonal adquirida em células hematopoéticas
- Blastos $\geq 5\%$ na medula óssea

Fonte: Hasle et al.,2003

Quadro 2. Classificação da SMD (Síndrome Mielodisplásica) na infância de acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde).

Classificação Pediátrica das SMDs (OMS)
Mielodisplasia / Mieloproliferativa • Leucemia mieloproliferativa juvenil (LMMJ) • Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), somente para secundárias. • Leucemia mielóide crônica, BCR/ABL, negativas (LMC Ph1-)
Doença em portadores da síndrome de Down • Mielopoesse anormal transitória (MAT) • Leucemia Mielóide
Síndrome Mielodisplásica • Citopenia Refratária (CR) - sangue periférico com < de 2% de blastos e medula óssea com > 5% de blastos • Anemia Refratária com excesso de blastos - sangue periférico com 2 - 19 % de blastos e medula óssea com 5 - 19% de blastos • AREB em transformação (AREB-T) - sangue periférico, medula óssea com 5 - 19% de blastos.

Fonte: Hasle et al.,2003.

Na infância, algumas formas de SMD são iguais as do adulto, como a anemia refratária (AR) e a anemia refratária com excesso de blastos (AREB-t), mas algumas, ainda não foram diagnosticadas, como a anemia sideroblástica em anel e a leucemia mielomonocítica crônica, entidade bem definida com características próprias do adulto. Independente do grupo em que esteja definido o diagnóstico, cerca de 1/3 dos pacientes com SMD evoluem para LMA (Hasle et al., 1995; Lopes e Lorand-Metze, 1999).

Uma entidade muito discutida pela difícil classificação morfológica na infância é a leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), que ora se apresenta com achados de SMD e ora de síndrome mieloproliferativa (SMP). Há dificuldades de diagnóstico devido à heterogeneidade da doença. Como malignidade rara, representa menos de 2% das leucemias da infância e na maioria das vezes ocorre na infância precoce (em lactentes) e, principalmente, no sexo masculino. Os pacientes apresentam episódios de infecções recorrentes, anemia, “rash” cutâneo, hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia generalizada. Os achados laboratoriais mostram leucocitose ($<100.000/\text{mm}^3$) com monocitose; anemia com normoblastemia variável; trombocitopenia; elevação da taxa da hemoglobina fetal (Hb-F), das imunoglobulinas e presença de autoanticorpo. A reação para fosfatase alcalina leucocitária pode ser normal ou aumentada, mas o cromossomo Filadélfia está ausente (Hasle et al., 2003).

A estreita associação entre LMMJ com síndromes do tipo Neurofibromatose do tipo I (NF1), síndrome de Noonan (SN) e a síndrome Lentigine (LS) tem sido descrita. A perda do alelo normal do *NF1* é um achado comum nas células dos pacientes com LMMJ e NF1. O gene *NF1* é supressor de tumor, uma GTPase, atua na regulação negativa na via Ras-GTP (Aricó et al., 1997). Cerca de 50% dos

pacientes com SN apresentam mutação na linhagem germinativa, no proto-oncogene *PTPN11*. Este gene codifica a proteína fosfatase 2 tirosina (SHP-2) que exerce importante papel na via de transdução de sinal da hematopoese, liberando sinais de ativação para receptores de fatores de crescimento ligadora para o gene *Ras*. Mutações dos genes *PTPN11*, *KRAS2*, *NRAS* e *NF1* são encontradas em conjunto nos pacientes com LMMJ. Estes dados apóiam a hipótese de que a hiperativação da via de sinalização *Ras* exerce um papel central na LMMJ (Hess et al., 1996; Kratz et al., 2005). A monossomia do cromossomo 7 é a anomalia citogenética mais encontrada, principalmente, em crianças com desordem mielóide e, desta forma, pode ser identificada em todos os subtipos de SMD, assim como na LMA, sendo também um achado freqüente na LMMJ (Kelleher et al., 1991; Yeilipek et al., 1994).

As crianças portadoras de síndrome de Down (SD) apresentam frequentemente, na primeira infância, displasia hematopoética, antes de apresentarem franca leucemia (Zipursky et al., 1994). Cerca de 10% das crianças com SD nascem com a mielopoese anormal transitória (MAT) que na maioria dos casos regride espontaneamente, ao redor dos 3 meses de vida e, raramente evoluem com quadro fatal de fibrose medular e insuficiência renal (Zipursky et al., 1994, 2003; Zwaan et al., 2010). Estudos citológicos, imunológicos, ultraestrutural e molecular das células blásticas dos portadores de MAT mostram que as células precursoras dos megacariócitos apresentam achados comuns dos progenitores eritróide e megacariocítico. Mas, quando a leucemia desenvolve é predominantemente uma proliferação megacarioblástica aguda (Xavier et al., 2009). Cerca de 30% dos portadores de MAT apresentam leucemia aguda nos

quatro primeiros anos de vida e é provável que alterações adicionais ocorram para transformação da MAT em LMAK (Taub, 2004).

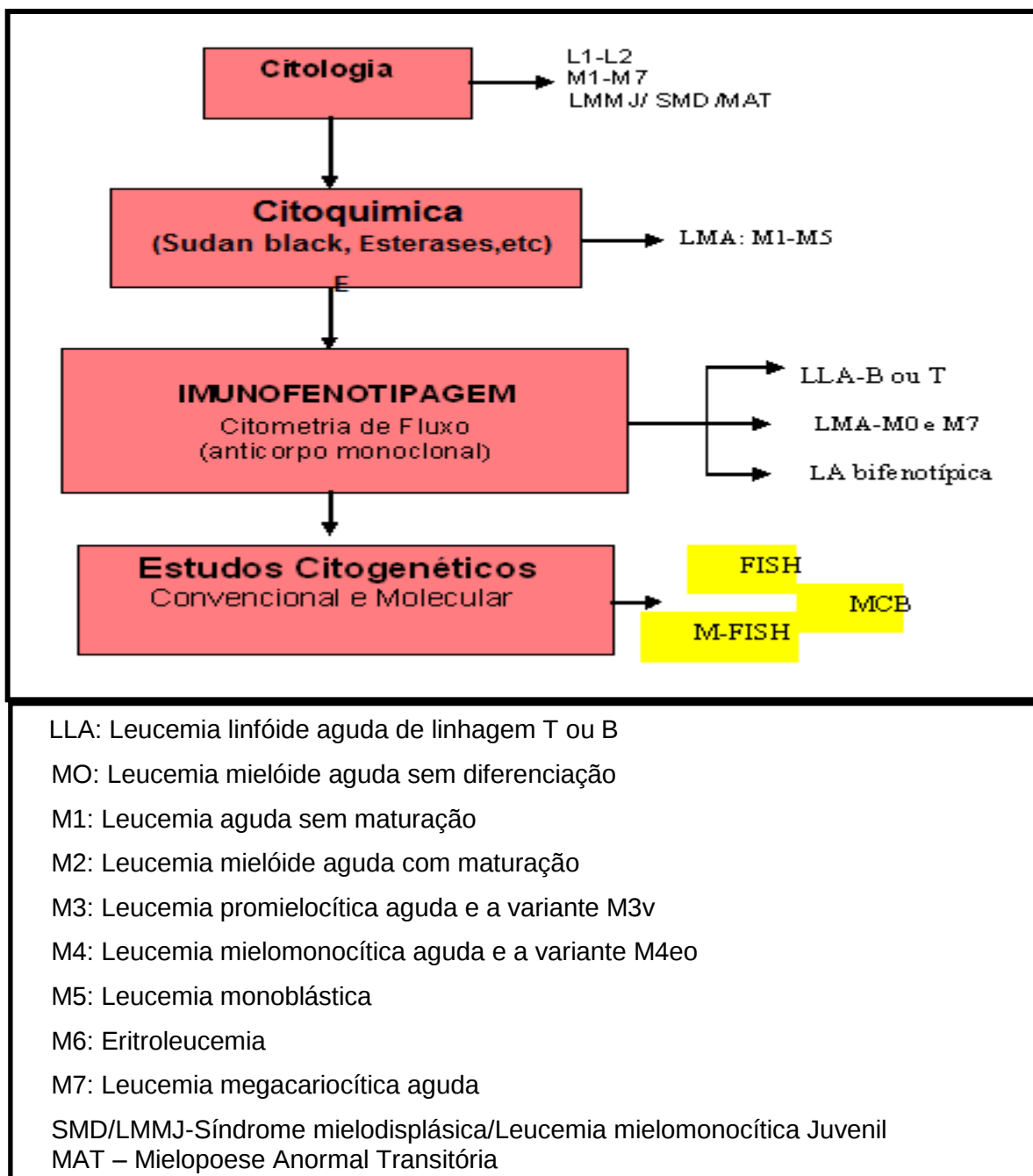
Atualmente, existe considerável interesse em relatos da mutação somática adquirida no éxon 2 do gene de transcrição eritróide/megacariócito, o *GATA-1*. A mutação deste gene em crianças com SD está diretamente relacionada com LMA-K e MAT, indicando que a primeira doença é derivada da segunda (Li et al., 2005; Emerenciano et al., 2006). Malkin et al. (2000) mostraram que a proteína p53 é fundamental para diferenciação megacariocítica e que mutação do gene *TP53* pode levar ao desenvolvimento de LMA-K em portadores de SD.

Têm sido observadas alterações cromossômicas nos portadores de SD com trissomia 21 ou mosaísmo, assim como, nos portadores de MAT (Zubizarreta et al., 1995). Estas alterações cromossômicas não diferem das encontradas nos pacientes com SD e leucemias agudas, o que demonstra que há algo em comum entre as duas entidades. A principal alteração cromossômica descrita na SD (+21 constitucional) com SMD/LMA é a trissomia 8, a qual parece participar do processo mieloproliferativo (Zipursky et al., 1994; Creutzig et al., 1996). Outras alterações descritas nestes pacientes são duplicações 1q ou, mais comumente, trissomia parcial desta região que pode ter um importante papel na patogênese da doença (Fong e Brodeur 1987; Blann et al., 2000).

2.3 Diagnóstico das leucemias no lactente

Para um diagnóstico preciso das leucemias no lactente é necessário um algoritmo de exames sequenciados, como mostra o fluxograma no Quadro 3.

Quadro 3. Fluxograma para o diagnóstico das leucemias no lactente.



Confeccionada pelo autor, de acordo em Bain, 2001 e Hasle et al.,2003.

2.3.1 Morfologia

Até meados da década de 70, os diversos tipos de leucemias eram classificados pelos seus aspectos morfológicos, não havia um consenso para distinguir corretamente as leucemias linfoblásticas e mieloblásticas. Entretanto, em 1976, após a uniformização das leucemias agudas pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) e com a introdução das reações citoquímicas, muitos diagnósticos foram definidos (Bennett et al, 1976). Mas, o diagnóstico da leucemia linfoblástica continuava sendo feito por exclusão, pois os estudos das reações citoquímicas, não eram suficientes para diferenciar as leucemias de linhagem mielóide.

Atualmente, a classificação FAB continua com importância no diagnóstico, mas tem valor limitado no prognóstico. Na classificação FAB, a LLA apresenta dois principais subtipos, L1 e L2, que são baseados no tamanho celular, basofilia citoplasmática, tamanho do núcleo, padrão de cromatina nuclear e presença de nucléolos. Enquanto na LMA são descritos oito subtipos, de M0-M7, com algumas variantes, baseadas no tamanho celular, presença ou ausência de granulações citoplasmáticas, forma e tamanho do núcleo, padrão de cromatina e presença de nucléolos (Bennett et al.,1976,1991). Nos lactentes, os subtipos mais frequentes são M4, M5 e M7, há poucos casos descritos de M1 e M2 e raros os casos com M4eo e M3 (Biondi, 1994; Pui, 1995; Silva et al., 2008).

2.3.2 Imunofenotipagem

Com o progresso das técnicas imunológicas, surgiu a imunofenotipagem, cujo princípio utiliza um anticorpo monoclonal dirigido para o antígeno presente na célula leucêmica. Este método revela com precisão a natureza das células blásticas e a fase celular na qual ocorreu a parada do processo de maturação celular que originou o clone leucêmico. Uma das mais importantes contribuições desta metodologia foi a detecção precoce da mieloperoxidase em células com morfologia indiferenciada, cujas reações citoquímicas eram negativas. Assim, muitos casos de leucemias agudas, antes consideradas indiferenciadas, puderam ser classificados como leucemia mielóide com diferenciação mínima (LMA-M0) ou como leucemias de células pluripotentes. A imunofenotipagem também permitiu o diagnóstico da leucemia megacarioblástica e dos casos de leucemias com expressão de marcadores de mais de uma linhagem, conhecida como leucemias ambíguas que são as leucemias bilíneas e bifenóticas (Foon e Todd, 1986; Bennett et al., 1991).

A citometria de fluxo na LLA permite classificar de linhagem B em pró-B, CALLA e pré-B (presença da imunoglobulina de superfície intracitoplasmática) e a LLA de linhagem T em pró T, Pré-T e T madura (Jennings e Foon, 1997). Nos lactentes menores que 12 meses, o subtipo pró- B é o mais encontrado, após esta faixa etária começam a surgir os casos de LLA- CALLA. São raros os lactentes com LLA pré-B, assim como, de linhagem T (Emerenciano et al., 2007). A incorporação da imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular à classificação morfológica, originou a classificação MIC-M para leucemias agudas, que agrupa as leucemias com a finalidade de reconhecer entidades específicas

que diferem em suas etiologias, mecanismos de leucemogênese, achados clínicos e hematológicos, prognóstico, assim como, a otimização do tratamento (Bain, 2001).

2.3.3 Citogenética Convencional

Nos anos 70 a introdução de técnicas de identificação cromossômica foi de grande importância para a etiologia clonal das leucemias agudas. Os estudos feitos nas décadas de 60 e 70 demonstraram que células tumorais apresentavam marcadores cromossômicos recorrentes com importância diagnóstica e prognóstica (Chaganti et al., 1979). Secker-Walker et al. (1997) foram os primeiros a demonstrar que o número de cromossomos estava relacionado com a evolução clínica e o prognóstico nas crianças portadoras de LLA.

O estudo citogenético classifica a LLA de acordo com o número modal de cromossomos em cinco grupos. Grupo hiperdiplóide, dividido em: hiperdiplóide I (47 a 50 cromossomos) e hiperdiplóide II (mais de 50 cromossomos); Grupo hipodiplóide (menor de 46 cromossomos); Grupo com cariótipo normal (46 cromossomos sem alterações estruturais evidentes) e grupo pseudodiplóide (46 cromossomos, com alterações estruturais e/ou numéricas) (Raimondi, 1993; Heim e Mitelman, 1995).

O grupo hiperdiplóide I representa de 10 a 15% da LLA da infância. Neste grupo o ganho de alguns cromossomos, como +8, +10, +21 e +X são observados, sendo a trissomia do cromossomo 21, a mais frequente, seguida dos cromossomos X, 8 e 10. As alterações estruturais mais frequentemente encontradas, em 6% dos casos, foram anomalias do 1q, 6q, 12p e 19p (Raimond et al., 1992).

O grupo hiperdiplóide II se divide em hiperdiploidia com 51 a 68 cromossomos, casos com near-triploidia (69 a 81 cromossomos) e casos com near tetraploidia (82 a 94 cromossomos). O primeiro subgrupo é observado em 25% a 30% das LLA da infância, e tem como característica um bom prognóstico, ou seja, melhor resposta ao tratamento. A hiperdiploidia é encontrada em crianças entre 2 e 10 anos com leucometria não muito elevada, fenótipo CALLA (CD10) e tem como características comuns cópias extras dos cromossomos 4, 6, 10, 14, 17, 18, 20, 21 e X, duplicação do 1q e isocromossomo 17q, em alguns casos. O ganho isolado do cromossomo 21 é uma anormalidade comum na LLA, ocorrendo em 20% dos casos com alteração citogenética e mais de 90% dos casos com hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos (Raimondi et al., 1992; Paulsson et al., 2005).

O grupo pseudodiplóide ocorre em 40% dos casos, enquanto o grupo com cariótipo normal (sem alteração cromossômica detectável pela citogenética convencional) compreende de 10 a 15%. O grupo hipodiplóide é observado em 7 a 8% das LLA da infância. Na maioria destes casos, há perda do cromossomo inteiro, translocações não balanceadas e formação de cromossomos dicêntricos (Raimondi, 1993).

O estudo citogenético, além de ajudar no entendimento da fisiopatologia, tem sido muito importante para estabelecer fatores de risco no tratamento das leucemias. Enquanto os cariótipos com hiperdiplóide II estão associados a um prognóstico favorável e devem ser tratados apenas com quimioterapia para baixo risco, os pacientes com cariótipos hipodiplóide ou com translocações cromossômicas como t(1;19), devem ser tratados com quimioterapia para alto risco e os portadores de t(4;11) e t(9;22), além de quimioterapia, devem realizar

transplante de medula óssea em primeira remissão (Ribeiro e Pui, 1993; Heerema et al., 1999, Isoyama et al., 2002).

Na LMA, as alterações cromossômicas específicas podem ser de dois tipos, rearranjos cromossômicos balanceados, como translocações e inversões. Estas alterações causam fusão de genes que estão envolvidos na regulação e na diferenciação celular. Os rearranjos cromossômicos não balanceados envolvem perda ou deleção de genes contribuindo para a transformação maligna por perda da função de genes supressores de tumor (Pedersen-Bjergaard e Rowley, 1994).

O estudo citogenético na LAL é bastante peculiar, os fatores prognósticos encontrados em outras leucemias agudas, como t(9;22) e a hiperdiploidia sem alterações estruturais, são raros (Lampert et al., 1992). As anormalidades citogenéticas basicamente envolvem a região 11q23, onde é encontrado o gene *MLL*. Este gene atua em translocações com diversos parceiros, atualmente já foram descritas mais de 54 translocações (Johansson et al., 1998; Heerema et al., 1999). As translocações envolvendo a região 11q23 ocorrem em 80% das LLA e em 50% das LMA, sendo as mais frequentes: a t(4;11) na LLA e a t(9;11) na LMA, enquanto a translocação t(11;19) ocorre em ambos tipos de leucemias. Praticamente todos os casos de leucemia ambígua apresentam algum tipo de rearranjo do gene *MLL* (Fig.7). Alguns casos com cariótipo hiperdiplóide estão associados à translocação t(1;22), específica da LMA-M7 do neonato (Carroll et al., 1991; Lion et al., 1992).

O valor de mau prognóstico do rearranjo do gene *MLL* para maioria dos subtipos de leucemia do lactente é estabelecido. Entretanto, outras anormalidades da região 11q23 tais como, deleção e inversão, nas quais o *MLL* não está rearranjado, apresentam melhor evolução clínica, à exceção são os casos de LMA-

t(9;11), na qual existe o rearranjo do *MLL*, mas não apresentam impacto negativo no prognóstico (Raimondi et al., 1995; Behm et al., 1996, Secker-Walker, 1998). Uma translocação específica e bem estabelecida em lactente com LLA que não envolve o gene *MLL* e associada a bom prognóstico é a t(5;15)(Heerema et al.,1994; Silva et al.,2001).

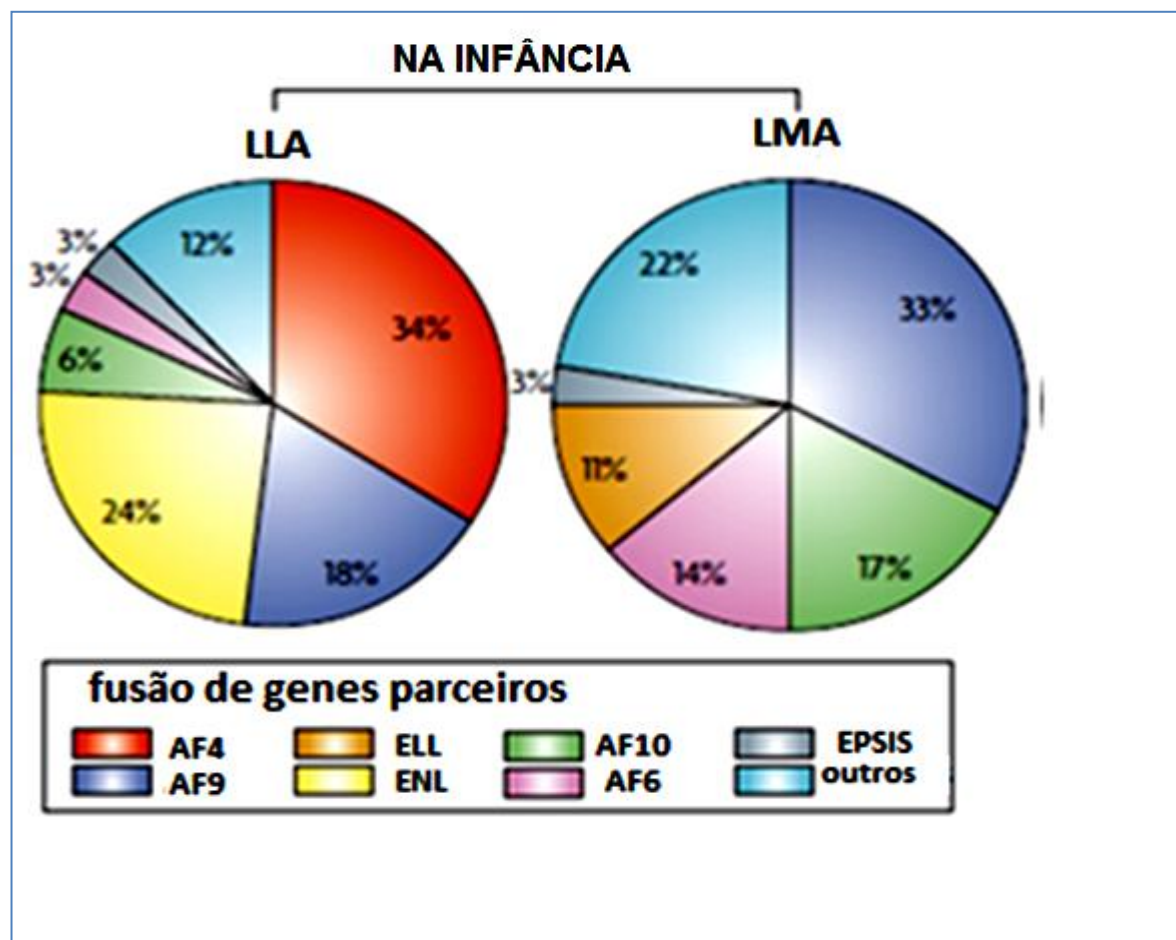


Figura 7- Distribuição da frequência dos genes parceiros do *MLL* na infância. Os principais genes de fusão são: AF4, nas LLA; AF9 na LMA e o ENL em ambas. A fusão do *MLL* é encontrada em praticamente todos os casos de leucemia bifenotípica. Fonte: Krivtsov e Armstrong, 2007.

2.3.4 Citogenética Molecular: FISH, M-FISH, MCB, mMCB

Um grande número de alterações cromossômicas humanas tem sido definidas por técnicas citogenéticas convencionais. Contudo, muitos pacientes apresentam pequenas deleções ou alterações intersticiais que não podem ser detectadas através do bandeamento G. Em adição, cromossomos marcadores ou alguns rearranjos cromossômicos podem ser difíceis, ou mesmo, impossíveis de ser definidos por técnica convencional. A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e suas variantes (cariótipo espectral-SKY, FISH-multicolor, bandeamento multicolorido - MCB) têm ajudado nestes casos e atualmente tem grande importância metodológica na detecção e confirmação de anormalidades cromossômicas humanas (Schrock et al., 1996; Speicher et al., 1996; Liehr et al., 2009).

Na técnica de FISH as sondas são preparadas a partir de nucleotídeos, fragmentos ou sequência de DNA específicos, que são ligadas a uma cadeia de DNA complementar (DNA alvo) no cromossomo a ser estudado. Para localização do DNA alvo, é aplicado um anticorpo marcado com corante fluorescente. A análise é feita em microscopia de fluorescência. Desta forma, a FISH permite a localização precisa de genes ou sequências de DNA diretamente nos cromossomos. Existem diversos tipos de sondas cromossômicas (tabela 2); a CEP (marca o centrômero do cromossomo), WCP (sonda de cromossomo inteiro), sonda específica do telômero e as que são específicas de determinadas regiões ou genes específicos, entre outras (Liehr e Pellestor, 2009)

A técnica de FISH pode ser realizada em metáfases ou núcleos interfásicos de material como sangue periférico, medula óssea, além de peças tumorais. Essa

técnica tem produzido um considerável impacto na análise citogenética por permitir uma análise rápida de um grande número de células, ao mesmo tempo em que favorece o diagnóstico de diversas neoplasias. Além disso, a utilização de sondas do cromossomo inteiro e regiões específicas têm permitido caracterizar diferentes rearranjos cromossômicos.

Tabela 2. Diferentes classes de sondas comumente usadas para análise de FISH em laboratórios clínicos

Tipo	Intensidade da Fluorescência	Aplicação
➤ Sondas para regiões específicas		
Sonda Centromérica	Forte	Identifica alterações numéricas; monossomias; trissomias.
Sonda Telomérica	Moderada a fraca	Identifica rearranjos envolvendo o telômero
➤ Sondas para cromossomos inteiros ou de partes dos cromossomos		
Sonda WCP e PCP	Forte a moderada	Identifica pequenos marcadores ou alterações quando o bandeamento G for inconclusivo.
➤ Sondas locus específica		
para translocação e sondas gênicas	Moderada	Detecta translocações em metáfases ou núcleos interfásicos
Microdeleção	Moderada	Detecta microdeleções em metáfases
Amplificação Gênica	Forte	Detecta aumento no número de cópias gênicas em metáfases e/ou em núcleos interfásicos

Fonte: Liehr e Pellestor, 2009.

No estudo das leucemias, a técnica de FISH pode ser realizada em células em metáfase ou em núcleos interfásicos de sangue periférico e/ou medula óssea, contribuindo para precisão no diagnóstico cromossômico das diversas leucemias. Como o rearranjo do gene *MLL* é freqüente na LAL, a aplicação desta técnica é fundamental para o diagnóstico e prognóstico da doença, (Huret, 2005). A figura 8 mostra as regiões onde a sonda é hibridizada no cromossomo 11, com sua região 3' marcada em vermelho e 5' em verde. Qualquer ruptura desta região com conseqüente translocação produzirá a separação dos sinais de fluorocromos verdes e vermelhos como exemplificado na figura 9.

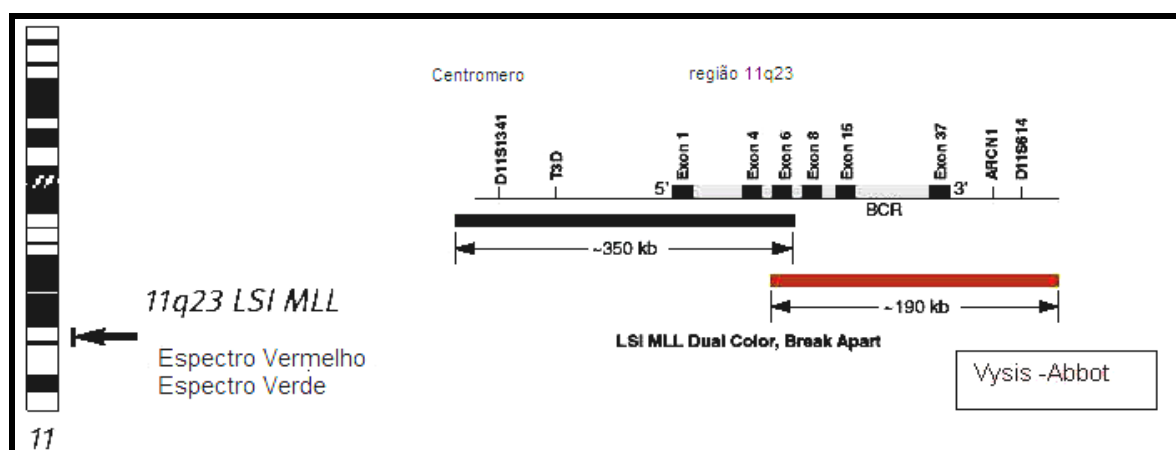


Figura 8. Marcação da região 11q23 com a sonda *MLL* LSI espectro vermelho e verde. Fonte: http://www.abbottmolecular.com/LSIMLLDualColorBreakApartRearrangementProbe_5318.aspx

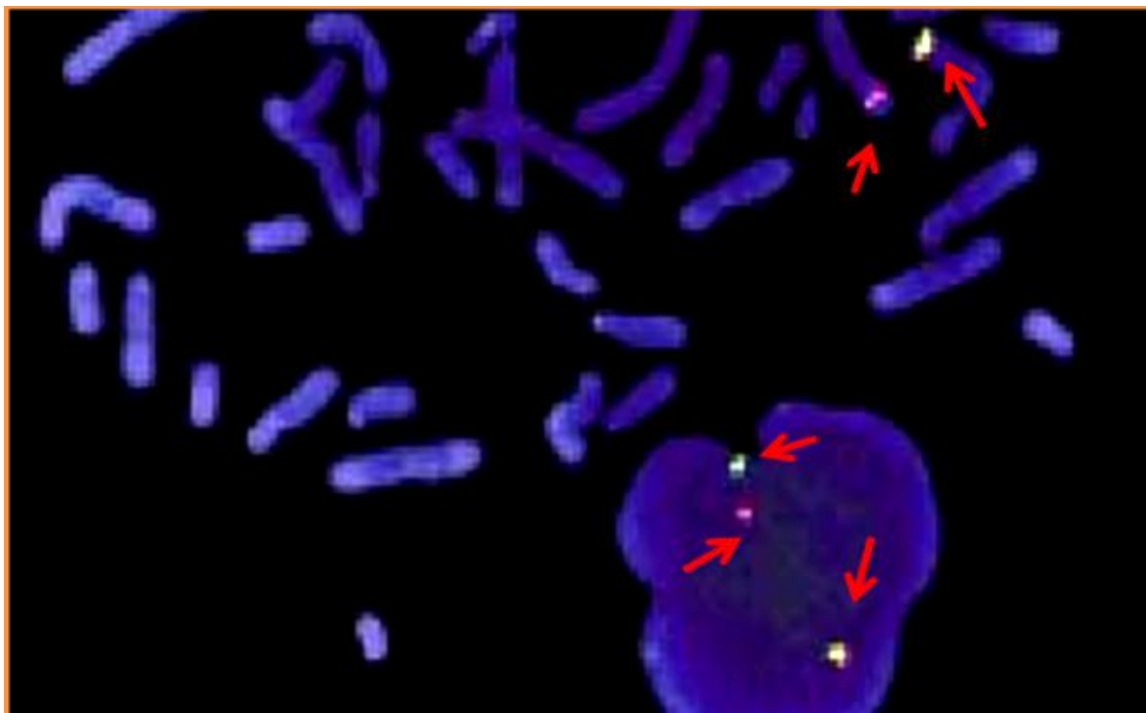


Figura 9. Metáfase e núcleo interfásico com rearranjo do gene *MLL*. Há três sinais, um que corresponde a fusão dos fluorocromos verde e vermelho, dando cor amarelada encontrada no gene normal e outros dois, verde e vermelho, separados que corresponde a translocação do referido gene. Fonte: http://www.abbottmolecular/LSIMLLDualColorBreakAparRearrangementProbe_5318.aspx

As técnicas SKY e M-FISH são variantes da técnica de FISH e permitem visualizar simultaneamente todos os cromossomos humanos, em diferentes cores. Estas técnicas têm a finalidade de elucidar a ocorrência de rearranjos cromossômicos tais como translocações, inserções e alterações estruturais complexas, facilitando consideravelmente a análise do cariótipo. Em ambas as técnicas, as sondas são originadas da marcação e amplificação de cada um dos 24 cromossomos, por DOP-PCR, “degenerate oligonucleotide-primed PCR”. Esta técnica permite a amplificação aleatória do DNA e utiliza sequências degeneradas de nucleotídeos. Ambas, SKY e M-FISH usam um esquema combinatório ligado a fluorocromos distinguíveis espectralmente, mas os métodos diferem após a

hibridização *in situ*, na detecção e discriminação de diferentes combinações de fluorescência (Schrock et al.,1996; Speicher et al.,1996).

Na técnica de SKY a imagem é adquirida na combinação de microscopia epifluorescente, imagem CCD (“charge-coupled device”) e um espectrofotômetro de Fourier. Este aparelho mede a emissão inteira de uma única exposição, em todos os pontos da imagem. Na técnica de M-FISH imagens separadas são capturadas de cada um dos cinco fluorocromos usando filtros de microscópios, estas imagens são então, combinadas em um software. Ambas as técnicas usam pseudocores para os cromossomos baseados em seus fluorocromos específicos (Speicher et al.,1996; Trask, 2002). A figura 10 ilustra os fluorocromos usados para obter cores específicas para os 24 cromossomos.

#	FITC	SpeOra	TexRed	Cy5	DEAC
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
X					
Y					

Figura 10- Fluorocromos usados na identificação dos cromossomos no M-FISH. Uma coluna de 5 cores corresponde aos 5 fluorocromos indicados. A combinação destas cores compõe os 24 cromossomos humanos. Fonte: Liehr et al.,2009.

Como as técnicas de M-FISH e a de SKY, outras técnicas tem sido descritas com a mesma finalidade, entre outras: o FISH 24 cores, FISH COBRA (FISH de ligação de taxa de combinação binária), CCK (cariotipagem de mudança de cor). Apesar de todos esses métodos permitirem reduzir o tempo de análise e facilitar a detecção de rearranjos cromossômicos (translocações, inserções) e identificação de cromossomos marcadores, ainda têm sido descritas limitações quanto a exata localização do ponto de quebra das translocações, assim como identificação de deleções, duplicações e inversões (Trask, 2002, Liehr et al., 2009).

A técnica de bandeamento multicolorido (MCB) (Fig.11) foi inicialmente desenvolvida e testada no cromossomo 5 por Chudoba et al.(1999), posteriormente está técnica foi desenvolvida por Liehr et al. (2002) para os 24 cromossomos humanos.

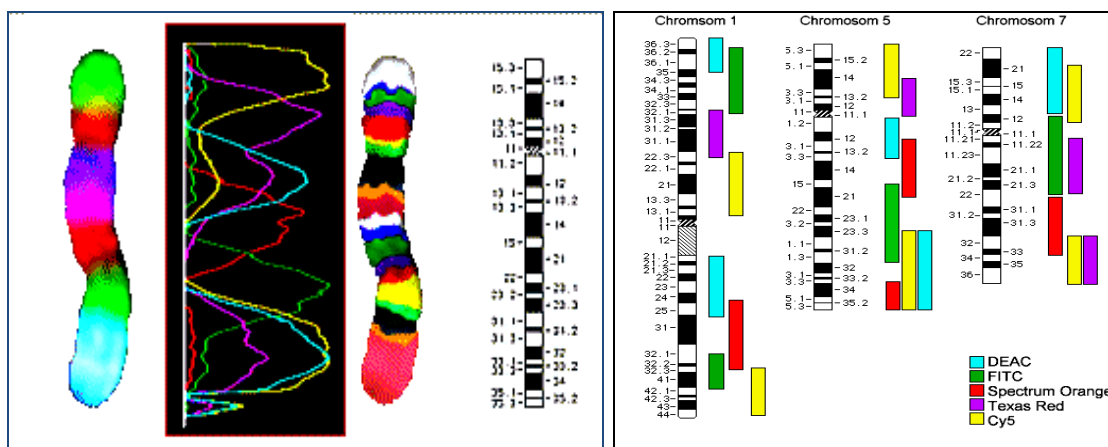


Figura 11. MCB (Bandeamento Multicolorido). As bandas e sub-bandas são marcadas com os fluorocromos específicos de cada região. Facilita a determinação do ponto de quebra em casos de translocações, deleções e inversões dos cromossomos. Fonte: Liehr et al, 2009.

A técnica de MCB foi introduzida com o intuito de determinar a exata localização do ponto de quebra nos cromossomos. Esta técnica pode ser alinhada com o bandeamento G, mas é independente do comprimento do cromossomo analisado apresentando uma maior resolução, quando comparado ao bandeamento G. O MCB permite a diferenciação de áreas de regiões cromossômicas em bandas e sub-bandas. Esta técnica permitiu a realização de uma biblioteca com 138 regiões cromossômicas, através da técnica de microdissecção ao nível de 450-550 bandas específicas do genoma humano e, analisa através de um sistema com pseudocores diferentes, nas regiões cromossômicas específicas. Esta metodologia tem sido extremamente útil no esclarecimento dos rearranjos mascarados em cariótipos complexos (Liehr et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivo realizar um estudo do tipo série de casos (retrospectivo e prospectivo), para identificar e caracterizar as alterações cromossômicas em crianças entre 0- 22 meses com leucemia, nos laboratório de Citogenética do Centro de Oncohematologia Pediátrica (CEONHPE)/Recife e do laboratório do Centro de Tansplante de Medula Óssea do Instituto Nacional do Cancer (CEMO-INCA)/RJ, no período de julho 2000 a agosto 2010.

3.2 Objetivos Específicos

1. Definir os achados citogenéticos divididos por faixa etária (< de 6 meses, de 6 meses até 12 meses; >12 meses até 22 meses);
2. Relacionar a classificação morfológica (subtipo FAB) com os achados citogenéticos;
3. Descrever as alterações cromossômicas constitucionais associadas à leucemia do lactente;
4. Verificar a frequência do rearranjo do gene *MLL* nos portadores de LA do lactente até a idade de 22 meses;
5. Caracterizar molecularmente o rearranjo do gene *MLL* e quando indicado outros rearranjos, em núcleos interfásicos através do FISH nos pacientes sem metáfases;
6. Caracterizar molecularmente cariótipos complexos e alterações cromossômicas crípticas através do FISH, M-FISH e MCB.

4. Material e Métodos

4.1 Pacientes

Foram estudadas as características clínicas e citogenéticas de 83 crianças portadoras de leucemia de novo, com idade inferior a 22 meses, que deram entrada nos laboratórios de citogenética do CEONHPE e do CEMO/INCA-RJ no período de julho 2000 a agosto 2010.

4.2 Métodos

4.2.1 Amostras

As amostras de medula óssea (MO) dos pacientes foram colhidas nos referidos centros de diagnóstico e tratamento. Para o diagnóstico da doença foi realizada uma punção diagnóstica da medula óssea e 5 lâminas para citomorfologia e reações de citoquímica. Nesta ocasião foram retirados entre 5 a 10 mL de sangue da medula óssea, em seringas estéreis e heparinizadas, que foram enviadas para os laboratórios de citogenética e de marcadores celulares, dos respectivos centros. Os estudos citogenéticos moleculares pelas técnicas M-FISH e MCB, entre outras técnicas, foram realizados no laboratório de genética do Instituto de Antropologia e Genética Humana da Universidade de Jena/Alemanha.

4.2.2 Citogenética Convencional

As preparações cromossômicas foram realizadas a partir de cultura de medula óssea (MO) e/ou sangue periférico (SP) utilizando técnicas de obtenção e identificação cromossômica, de acordo com Testa et al. (1985). As células da MO

e/ou SP de cada paciente foram cultivadas em meio de cultura composto de RPMI 1640 (SIGMA) e soro bovino fetal (20%) em tubos Falcon. As células foram incubadas durante 24 horas em estufa a 37°C. Após 22hs foi adicionada colchicina (SIGMA) na concentração de 0,05µg/mL. No fim da incubação as culturas foram retiradas e as lâminas testes foram confeccionadas. Para análise cromossômica convencional as lâminas foram coradas com Giemsa a 2% (Merck) diluído em tampão fosfato (pH 6,8) por 6 minutos, para verificação do índice mitótico e qualidade das metáfases.

4.2.3 Bandeamento G

O bandeamento G foi realizado segundo Seabright (1971), com modificações. Os cromossomos foram identificados e classificados de acordo com o ISCN (2009). A análise cromossômica foi realizada em microscopia óptica e a documentação realizada com o sistema de captura de imagens Cytovision da Applied Imaging. Para cada paciente foram analisadas 20 células. Um caso foi considerado anormal quando mais de três metáfases apresentaram a mesma alteração cromossômica. A presença de células normais, concomitantes com as células anormais, foi usada como parâmetro para afastar a possibilidade de uma alteração cromossômica constitucional. A exclusão de alterações constitucionais foi realizada nos pacientes com 100% de alterações cromossômicas não recorrentes e, naqueles com anomalia dos cromossomos X e Y, através da análise cariotípica do sangue periférico, estimulado por fitohemaglutinina.

4.2.4 Citogenética Molecular

4.2.4.1 Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

A sonda LSI MLL “Dual Color break apart” (Abbott Molecular/Vysis) foi usada na análise do rearranjo do gene *MLL* nos lactentes estudados. Os casos com rearranjos cromossômicos complexos e/ou suspeitos de outras anormalidades, para confirmação da citogenética clássica, foram estudados também com sondas comerciais para outros genes alvos específicos tais como: LSI BCR/ABL (Abbott Molecular/Vysis), para a translocação t(9;22); LSI TEL/AML1 (Abbott Molecular/Vysis), para a translocação t(12;21), WCP7 (Abbott Molecular/Vysis), de acordo com a metodologia do fabricante. Foram utilizadas também em alguns casos sondas centroméricas e subcentroméricas, assim como as técnicas de M-FISH, MCB e mMCB (sondas de fabricação própria cedidas pelo laboratório de citogenética molecular do Instituto de Genética Humana e Antropologia da Universidade de Jena, Alemanha).

1. Pré-tratamento das lâminas – as lâminas foram preparadas com o material a ser estudado um dia anterior ao procedimento, em seguida foram colocadas em uma solução crescente de etanol 75%, 95% e 100% por 3 minutos cada. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em uma solução 10 mM HCL e 500uL de pepsina (20mg/mL) a 37° C por 5min. Em seguida em PBS1X por 5 minutos, e então numa fixação com a solução de formaldeído com cloreto de magnésio por 10min. Após este período foram lavadas em PBS por 5 minutos e em seguida novamente desidratadas na série crescente de etanol, 70%, 90% e 100% (3 minutos para cada concentração).

2. Desnaturação do DNA Cromossômico e das Sondas – a desnaturação foi realizada simultaneamente numa placa aquecedora a 73°C por 3 minutos e em seguida as lâminas foram colocadas para hibridização em camara úmida a 37°C por 24h para o FISH e MCB e 72h para o M-FISH

3. Lavagem pós-hibridização - Foi realizada com 1XSSC a 62-65°C por 5 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas numa solução de 0,4x SSC: IGEPAL a TA (temperatura ambiente) por 5 minutos sob agitação. Em seguida, foram colocadas no PBS1X por 5 minutos e então lavadas com água deionizada. Após este período as lâminas foram desidratadas em solução crescente de etanol, 70%, 90% e 100% (3 minutos cada). Após a secagem das lâminas foi aplicado o corante DAPI (Vysis).

4. Análise – As análises citogenéticas foram realizadas em microscópio de fluorescência Olympus BX 51 e a documentação através do sistema da captura de imagens Cytovision (Applied imaging).

4.2.4.2 FISH multicolorido (M-FISH) e bandeamento multicolorido de todos os cromossomos (mMCB)

Para a realização do M-FISH e mMCB foram aplicadas 24 sondas de cromossomos inteiros humanos contendo cinco fluorocromos Rodamina, Vermelho-Texas, FITC (fluorescein isothiocyanate), DEAC (diethylaminocoumarin), Cyanine 5, fornecendo um padrão diverso de pseudocores para cada cromossomo. As imagens foram capturadas processadas e analisadas utilizando um microscópio de

fluorescência equipado com Sistema de captura digital para FISH e programas para análise de imagem, ISIS (MetaSystem) Heidelberg/Alemanha.

4.2.4.3 Bandeamento cromossômico multicolorido (MCB)

Para o MCB foram aplicadas sondas marcadas com cinco fluorocromos diferentes para regiões (bandas) específicas de cada cromossomo, seguindo a técnica introduzida por Liehr et al.(2009). Tanto para a técnica M-FISH como para a técnica MCB os procedimentos foram os mesmos usados para a técnica de FISH com a diferença que as sondas estavam com marcação indireta e sofreram procedimentos específicos como descrito a seguir.

As sondas foram diluídas em tampão de hibridização (dextran sulfato) com o COT1 (Roche, cat no. 158074), sendo 10 mg para o MCB e 25 mg para o M-FISH, a seguir desnaturadas no termociclador por 5 min a 75° C, posteriormente a 4° C por 2 minutos e logo a seguir a 37° C por 30 minutos. A desnaturação do material biológico foi feita com formamida 70% em uma placa aquecedora 73-74° C por 3 minutos, em seguida colocadas em solução de etanol 70% a -20° C, posteriormente a 95% e 100%, 3 minutos cada. Após as lâminas estarem secas foram aplicadas as sondas e vedadas com uma lamínula com uma cola específica para hibridização, e colocadas em uma câmara úmida por 24 horas para as sondas WCP e MCB e 72 h para o M-FISH e mMCB.

Após esta etapa, as lâminas sofreram lavagens rápidas semelhante ao FISH, sendo feita outra etapa com uma solução (Marvel 0,2g e 2 mL do 0,4SSC-Tween) própria para lavagens de lâminas que foram hibridizadas com sondas biotinizadas e/ou digoxigenadas. De acordo com a sonda a ser utilizada, foram

aplicados anticorpos específicos. Em caso de sondas marcadas com biotina o anticorpo usado foi a Streptavidina marcada com FITC (1:250) ou Cy5 (1,5:50) e, para digoxigenina, a antidigoxigenina, marcada com Rodamina ou Fluoresceína (1-8:10). Após aplicação dos anticorpos, as lâminas foram levadas para câmara úmida a 37° C por 40 minutos. A seguir foram lavadas por duas vezes no 4x SSCTw e uma vez na água deionizada e então desidratadas em solução crescente de etanol 70-95-100%. Em seguida as lâminas foram coradas com o DAPI e mantidas a 25° C podendo ser analisadas em até 30 dias. As análises foram feitas no microscópio Zeiss, programa Isis MetaSystem, seguindo o ISCN (2009).

5. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC/UPE) e do Instituto Nacional do Câncer (INCA/RJ) (Anexo 1). Os pais ou responsáveis pelos pacientes foram orientados sobre a proposta de estudo e foram informados de todos os critérios para a inclusão no projeto e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

6. RESULTADOS

No período de julho de 2000 a agosto de 2010 foram estudados 83 lactentes (0 - 22 meses), portadores de leucemias *de novo*. Os diagnósticos foram assim especificados: 73 pacientes com LAL, sendo 47 LLA, 23 LMA e três leucemias com linhagem ambígua. Dez casos foram classificados como SMD, sete como doença em portadores de SD, seis eram portadores de LMA e um caso de MAT, uma paciente neurofibromatose foi incluída neste grupo. Um paciente foi classificado no grupo SMP/SMD e um com AREB-t no grupo de SMD (figura 12). Dos 83 lactentes, 24% eram <6 meses, 45% tinham entre 6 e 12 meses e 31% entre 12 até 22 meses (Fig. 13). Houve predomínio do sexo masculino (56%) em relação ao feminino (44%).

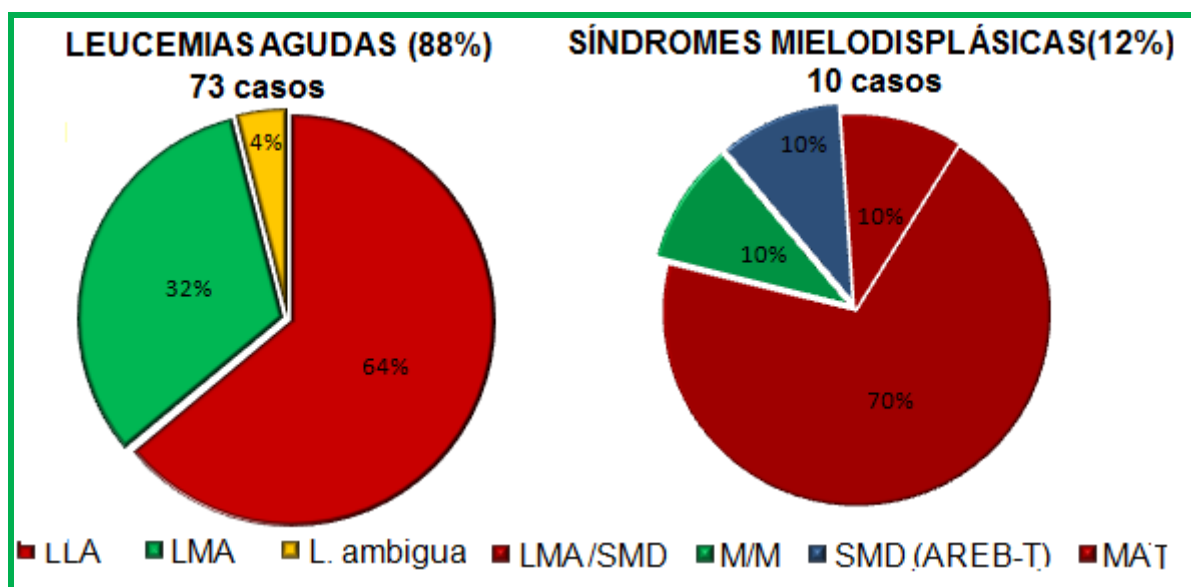


Figura 12- Portadores de Leucemia *de novo* (83 casos): Percentual de casos de Leucemias Agudas (LA) e Síndromes Mielodisplásicas (SMD). LLA = leucemia linfóide aguda; LMA = leucemia mielóide aguda; L.Ambiguas= leucemia bifenotípica/bilineal; Doença em portadores de SD = LMA/SMD e MAT; SMD= Síndrome mielodisplásica; M/M= mielodisplasia/mieloproliferativa.

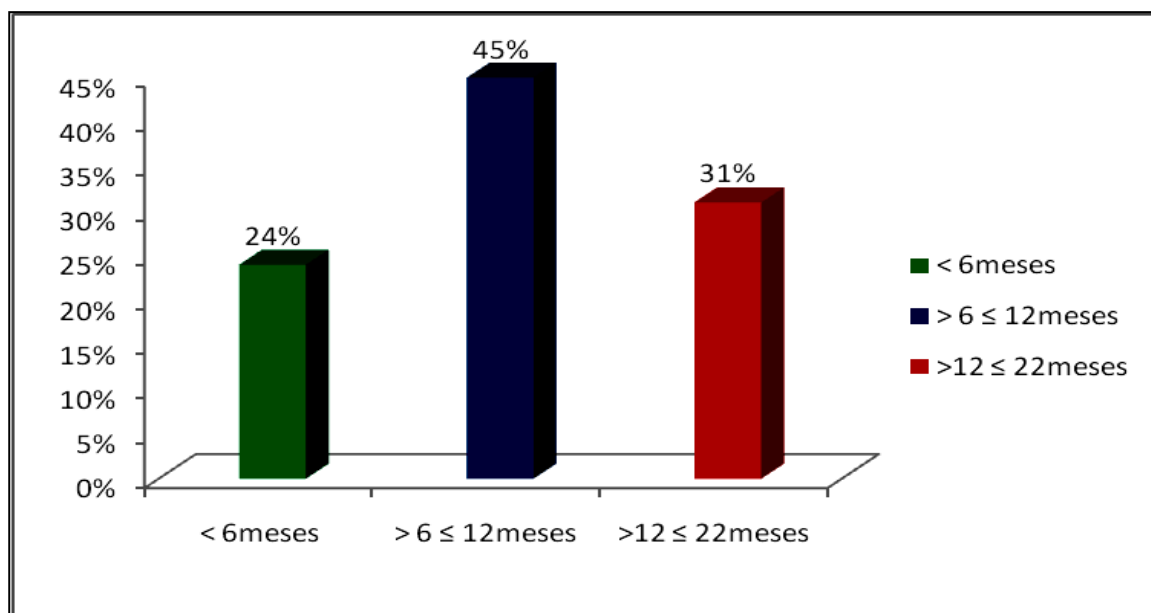


Figura 13- Faixa etária dos lactentes com leucemia aguda e SMD.

As características clínicas e citogenéticas foram estudadas em 47 lactentes com LLA (tabela 3). A relação entre os sexos foi de 1:1 e a idade variou de 5 dias a 22 meses, com a mediana de 10 meses (média 11 meses), 68% tinham idade inferior a 12 meses.

O estudo citogenético foi realizado em todos os casos de LLA e o bandeamento G definiu o perfil citogenético em 34 casos (72%), portanto 13 casos (28%) não apresentaram mitoses e/ou não apresentaram condições de análise. Dos 34 casos analisados, sete casos (21%) foram normais, 13 casos (38%) tinham anormalidades da região 11q23 e 14 lactentes (41%) apresentaram outras alterações não relacionadas a região 11q23 .

Tabela 3. Dados clínicos, citogenética convencional e molecular dos lactentes com LLA.

Casos	FAB	Idade	S e X o	Citogenética (banda G)	Citogenética FISH - MLL	Molecular outras técnicas (MFISH, mMCB, MCB, etc)	Resultado definitivo
1.	LLA	15m	M	S/ citog	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	MLL(-)
2.	LLA	4m	M	S/ mitose -	Nuc ish(5'MLLsep3'MLL)[63]/ (5'MLLcon 3'MLLx2)[37]	NR	MLL(+)
3.	LLA	17m	M	49,XY,t(9;22)(q34;q11), +9,+1,+18	Sem material	NR	49,XY,t(9;22)(q34;q11), +9,+16+18 MLL(NR)
4.	LLA	10m	F	46,XX, t(4;11)(q21;q23)	Nuc ish(5'MLLsep3'MLL)[42]/ (5'MLLcon 3'MLLx2)[58]	NR	46,XX, t(4;11) MLL(+)
5.	LLA	16m	F	S/ mitose -	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'MLLcon3'MLLx2)[100]	NR	MLL(-)
6.	LLA	5m	F	46,XX,t(4;11)(q21;q23)	sem Material	NR	46,XX, t(4;11)(q21;q23) MLL (NR)
7.	LLA	12m	F	S/ citogenética	Nuc ish(5'MLLx1,3'MLLx1[13] / (3'MLL,5'ML,5'con3'MLLx2)[87]	NR	MLL- del(11q23)
8.	LLA	10m	M	S/ mitose	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'MLLcon3'MLLx2)	NR	MLL(-)
9.	LLA	8m	F	S/ mitose	Nucish(5'MLLx3,3'MLLx3)[20]/ (5'MLLcon 3'MLLx2)[80]	NR	MLL - superexpressão
10.	LLA	12m	F	46, XX, del(11q23)	sem Material	NR	46, XX, del(11q) MLL (NR)

Casos	FAB	Idade	S e X o	Citogenética (banda G)	Citogenética	Molecular	Resultado definitivo
					FISH - MLL		
11.	LLA	8m	F	S/ mitose	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'MLLcon3'MLLx2)[100]	NR	MLL(-)
12.	LLA	5 dias	F	46,XX,t(4;11)(q21;q23)	Nucish(5'MLLsep3'MLL)[86]/ (5'MLLcon 3'MLLx2)[14]	NR	46,XX, t(4;11)(q23;q23) MLL(+)
13.	LLA	17 m	M	46,XY	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'MLLcon3'MLLx2)[200]	NR	46,XY MLL(-)
14.	LLA	11m	F	S/ citogenética	Nuc ish(5'MLLsep3'MLL)[42] /(5'MLLcon 3'MLLx2)[58]	NR	MLL(+)
15.	LLA	8m	M	46,XY,del(11q23)	sem Material	NR	46,XY,del (11q23) MLL (NR)
16.	LLA	12m	F	47,XY,+8, del(11q23)[2] / 47,XY,+8[12] / 46,XY[6]	sem Material	NR	47,XY,+8, del(11q23) MLL (NR)
17.	ProB	3m	M	46,XY,t(4;11)(q21;q23)	sem Material	NR	46,XY,t(4;11)(q23;q21) MLL (NR)
18.	LLA	7m	M	Sem citog	Nuc ish(5'MLLsep3'MLL)[40]/ (5'MLLcon 3'MLLx2)[60]	NR	MLL(+)
19.	LLA	9m	M	S/ mitose	Nuc ish (5'MLLsep3'MLL)[30]/ (5'MLLcon 3'MLLx2)[70]	NR	MLL(+)

Casos	FAB	Idade	S e X o	Citogenética (banda G)	Citogenética	Molecular Outras técnicas (MFISH, mMCB, MCB etc)	Resultado definitivo
					FISH - MLL		
20.	LLA	13m	M	47,XY, dup(1)	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	47,XY, dup(1) MLL(-)
21.	LLA	4m	F	46,XX	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	46,XX MLL(-)
22.	LLA	0m	M	46,X,-Y,+?14	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	Wcp14 (-)	45,X,-Y(?) MLL(-)
23.	LLA	7m	M	S/ mitose	Nuc ish(5'MLLsep3'MLL)[86]/ (5'MLLcon3'MLLx2)[14]	NR	MLL(+)
24.	LLA	9m	M	s/ mitose	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	MLL(-)
25.	LLA	19m	F	49,XY,t(1;19)(q21;p13);t(1;20) q21;p13)+21c,marc	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	49,XY,t(1;19)(q21;p13); t(1;20)q21;p13),+21c,+marc[30] MLL(-)
26.	LLA	19m	M	>50 cromossomos	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	>50 cromossomo MLL(-)
27.	LLA	10m	F	46,XX,del(11q23)	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	46,XX,del(11q23) MLL(-)
28.	LLA	22m	F	46,XX	Sem material	NR	46, XX MLL(NR)

Casos	FAB	Idade	S e X o	Citogenética (banda G)	Citogenética	Molecular	Resultado definitivo
					FISH - MLL	Outras técnicas (MFISH, mMCB, MCB etc)	
29.	LLA	15m	M	46,XY, t(1;19)(q21;p13)	Nucish(5'MLL,3'MLLx2)[86]/ (5'MLL,3'MLLx1)[14]	NR	46,XY,t(1;19) MLL-del(11q23)
30.	LLA	5dias	M	46,XY, t(4;11)(q21;q23)	Nuc ish(5'MLLsep3'MLL)[86]/ (5'MLLcon3'MLLx1)[14]	NR	46,XY, t(4;11)(q21;q23) MLL(+)
31.	LLA	11 m	F	47, XX, der14,t(14;?)	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	MCB e WCP 14 (+)	47,XX,+14 MLL(-)
32.	preB	14m	M	46,XY,der(19)(1;19)(p21;p13)	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	46,XY,der(19)(1;19)(p21;p13) MLL(-)
33.	LLA	10m	F	46,XX	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	46,XX MLL(-)
34.	LLA	12	F	46,XX, t(8;14)(q24;q11)		NR	46,XX, t(8;14)(q24;q11) MLL(-)

Casos	FAB	Idade	S e X o	Citogenética (banda G)	Citogenética FISH - MLL	Molecular Outras técnicas (MFISH, mMCB, MCB, etc)	Resultado definitivo
35.	LLA	3m	F	46,XX,t(11;19)(q23;p13), +2mar	Nuc ish (5'MLLsep3'MLL)[86]/ (5'MLLcon 3'MLLx2)[14]	MCB 3 (11pcp) + subt12pter wcp5 +subtel12pter MCB4 (9pcp) + subtle 20pter +20qte MCB 12 (7pcp) + subtel 5pter MCB 16 (6pcp) + wcp20 MCB 20 (4pcp) + cep16 mMCB 46,XX,der(3)t(3;12)(p14;q13), der(4)t(4,20)(q13;p13.3),der(5)t (5;12)(p15.2;p13.3),t(11;19)(q23; p13),der(12)t(5;12;3)(5pter>5p1 5.3::12p13.3>12q13::3p14>3pte r),der(16)t(16;20)(p11.1;q12),de r(20)t(4:20:16)(4qter>4q13: :20p13.3>20q12::16p11.1> 16pter	46,XX,der(3)t(3;12)(p14;q13.1), der(4)t(4,20)(q13;p13.3),der(5)t (5;12)(p15.2;p13.3),t(11;19)(q23; p13),der(12)t(5;12;3)(5pter>5p1 5.3::12p13.3>12q13::3p14>3pte r),der(16)t(16;20)(p11.1;q12),de r(20)t(4:20:16)(4qter>4q13: :20p13.3>20q12::16p11.1> 16pter
							MLL(+)
36.	ProB	8m	M	46,XY	Nuc ish (5'MLLsep3'MLL)[86] /(5'MLLcon 3'MLLx2)[14]	NR	46,XY,t(11q23;?)
							MLL(+)
37.	PreB	20m	F	> 56cromossomos	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	>56 cromossomos
							MLL(-)
38.	LLA	2m	F	46,XX, t(1;11)(q21;q23)	Ish46,XX,t((1;11)(p33;q23.3) del(11)(q23.3) Nuc ish5'MLLx2,3'MLLx1/ '5'MLLsep3'MLL)40/50	MCB 1, 11(+)	Ish46,XX,t(1;11)(p33;q23.3), del(11)(q23.3)
							MLL(+)

Casos	FAB	Idade	S e X o	Citogenética (banda G)	Citogenética FISH - MLL	Molecular Outras técnicas(MFISH, mMCB, MCB etc)	Resultado definitivo
39.	LLA	10m	M	46, XY+add(14)(q21)?	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	WCP 14 (-)	46,XY MLL(-)
40.	LLA	20m	M	S/ mitose ao diagnostico Recidiva: 46,XX,+10?,20?,(add22q?) [4]/45,XX,-20?[4]/46, XX,+9,- 20[2]	Nuc ish(5'MLL,3'MLL,5'Lcon3'MLLx2)[100]	Nucish(ABL1x2,BCRx2)[200]/ Nucish(9Z1x2)[100] Nucish(10Z1x2)[102]/ (10Z1x1)[4] Nuc ish(20Z1x2)[116]/ (20Z1x1)[23]	46, XX, -20 MLL (-) BCR/ABL(-)
41.	Calla	15m	M	48,XX,+12, +21, add(12p)	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	TEL/AML1 + ;WCP12/21 MCB=12(7pcp)/18(6pcp); CEP12/18	48,XX,+10,dic(12;18)(p12;p11.2 t(12;21)(p12;q22),+21,der(21) t(12;21)(p12;q22) TEL/AML (+) MLL(+)
42.	Calla	12m	M	46, XY, +min	Nuc ish (5'MLLx1,3'MLLx1)[42] /5'MLLcon3'MLL1)[58].	Nuc ish (Cmycx2)[100] Nucish(ABL1x2,BCRx2)[100]	47, XY, +d min Superexpressão MLL Cmyc -normal
43.	Pro-T	18m	M	46,XY	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	46,XY MLL(-)
44.	Calla	10 m	F	S/ mitose	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	MLL (-)

Casos	FAB	Idade	S e X o	Citogenética (banda G)	Citogenética FISH - MLL	Molecular Outras técnicas (MFISH, mMCB, MCB etc)	Resultado definitivo
45.	Pro B	5m	M	46,XY, del(11q23), add(9p)?	Nuc ish(5'MLLsep3'MLL)[86] / (5'MLLcon 3'MLLx2)[14]	WCB=9 ,11 MCB =19	46,XY,t(11;19)(q23;p13.3) MLL (+)
46.	Calla	12m	F	46,XY, inv(11q23;p13)	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	MCB 11 (-)	46,XY, inv(11q23;p13) MLL (-) Inv(11) não visualizada
47.	Calla	4m	F	46,XY[7]	Nucish(5'MLLx2,3'MLLx1)[12] (5'MLLcon3'MLLx2)[88]	NR	Deleção 3'MLL 12%

NR = não realizado; M = masculino; F = feminino

As alterações envolvendo a região 11q23 (Fig. 14) foram encontradas em 13 casos, cinco casos de t(4;11) (4,6,12,17,30) (Fig. 15), um caso a t(11;19) e, em um a t(1;11) referentes aos casos 35 e 38, respectivamente. Cinco pacientes (38%) apresentaram deleção da região 11q23 (casos 10,15,16,27,45) e um apresentou inversão 11q23 (caso 46).

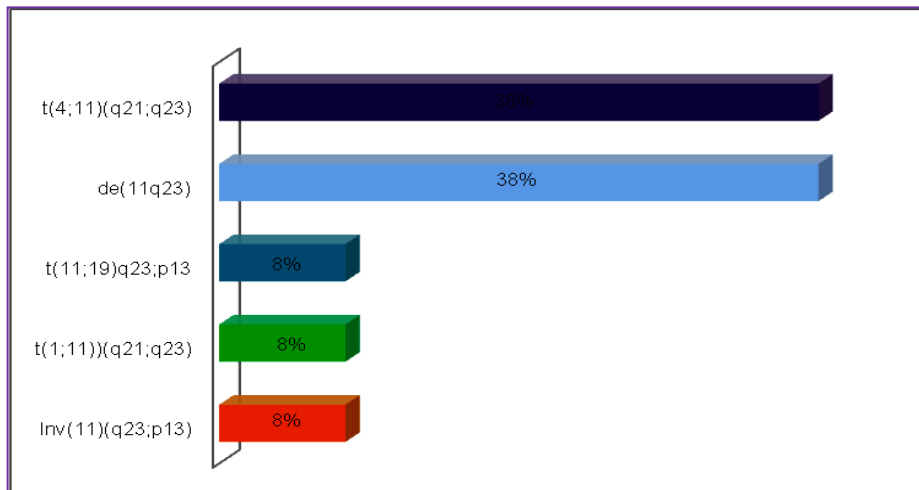


Figura 14 - Anormalidades da região 11q23 por bandeamento G na LLA do lactente (N=13).

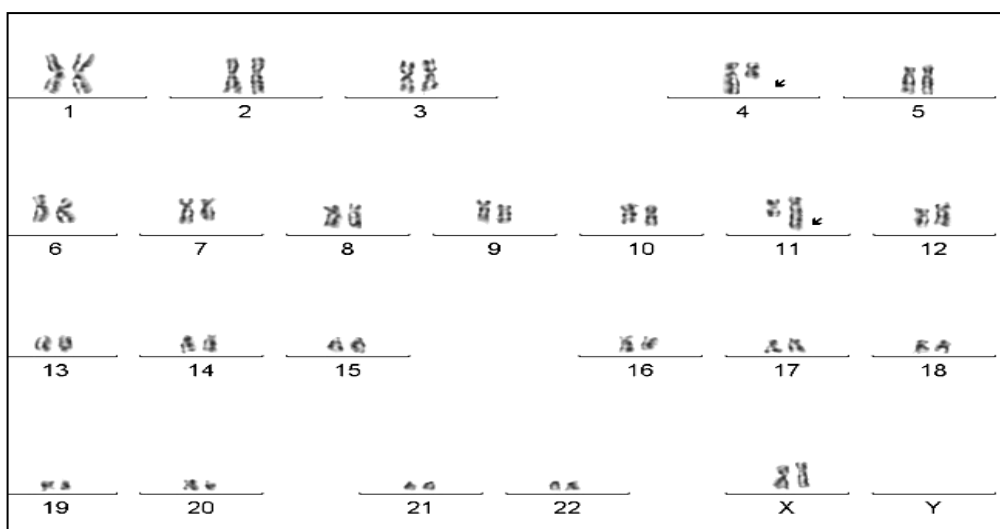


Figura 15 - Cariótipo com bandeamento G no caso 6 (LLA) 46,XX,t(4;11)(q21;q23).

Em 16 casos foram encontradas anormalidades não relacionadas a região 11q23, como cariótipos complexos (casos 25, 35, 40, 41), alteração no cromossomo 14 (casos 22, 31, 34, 39), cromossomo diminuto (caso 42). Três pacientes apresentaram hiperdiploidia (casos 3, 26, 37), sendo que o caso 3 apresentou concomitantemente a $t(9;22)(q34;q11)$. Duplicação do cromossomo 1 (caso 20) e a $t(1;19)(q21;p13)$ (casos 25, 29, 32)(Fig 16).

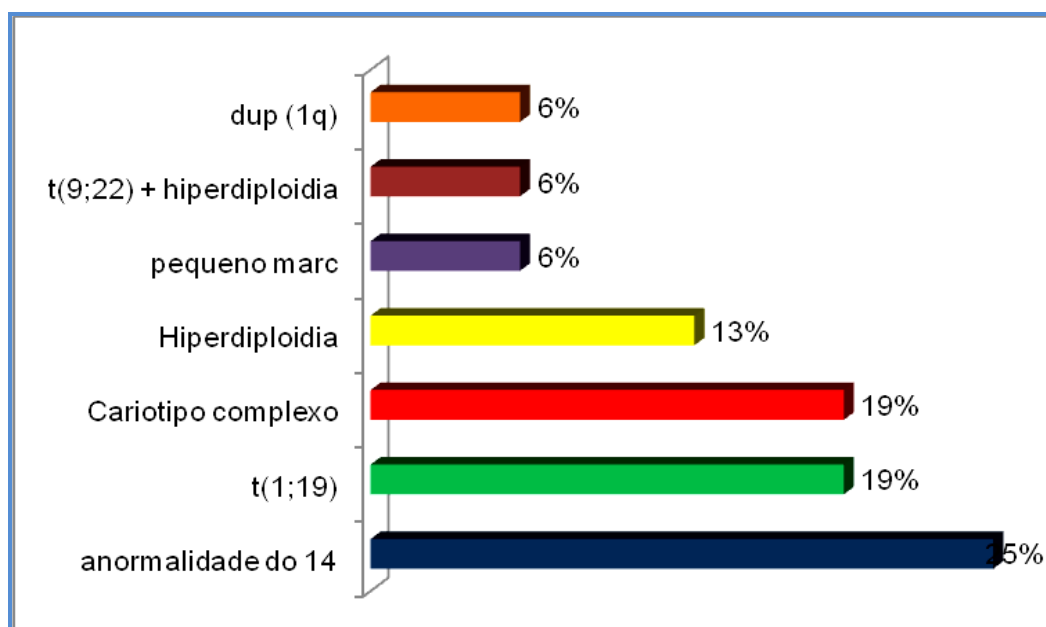


Figura 16- Anormalidades citogenéticas não relacionadas a região 11q23 na LLA dos lactentes (N=16).

A pesquisa das anormalidades do gene *MLL* foi feita pela técnica de FISH com a sonda LSI *MLL*. Dos 47 (85%) casos de LLA estudados, sete pacientes não tiveram material para análise (casos 3,6,10,15,16,17,28) e entre os 40 casos analisados, 17 (42%) apresentaram anormalidades do gene *MLL*. As alterações envolvendo o gene *MLL* foram rearranjados em 11 casos (2,4,12,14,18,19,23,30,35,36,45), deleção do gene *MLL* encontrada nos casos (7,29,47), o caso 38 apresentou uma deleção e translocação simultaneamente, outra anormalidade observada foi superexpressão do *MLL*, nos casos 9 e 42. (Fig.17).

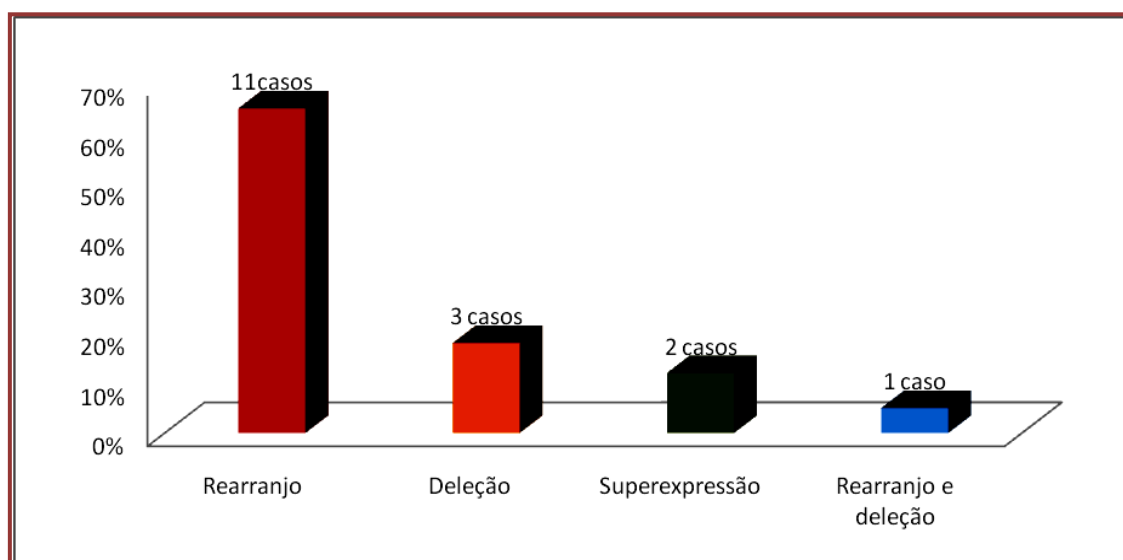


Figura 17- Frequência das alterações da região 11q23 encontrada na LLA (n=17).

Em alguns casos selecionados foram aplicadas as técnicas M-FISH, MCB e em raros casos o mMCB, sondas WCP (cromossomo inteiro), CEP (centromérica), PCP (cromossomo parcial) assim como, outras sondas específicas de fusões gênicas, tais como: BCR/ABL e ETV6(TEL)/RUNX1(AML1), como descreveremos a seguir.

A suspeita de anormalidades do cromossomo 14 nos casos 31 e 39 foram investigadas com as sondas WCP e MCB do cromossomo 14, permitindo definir a trissomia do cromossomo 14, no caso 31 (Fig. 18), mas não foram detectadas anormalidades do cromossomo 14 no caso 39. No caso 35 com $t(11;19),+2mar$, o uso de sondas CEP, WCP, MCB, subtelomérica e da região qter pode confirmar as translocações envolvidas no cariótipo complexo (Fig. 19). No caso 38 com $t(1;11)$ e $del(11q23)$, a aplicação das sondas MLL, WCP e MCB do cromossomo 11, confirmou a $t(1;11)$ e a deleção 3'MLL (Fig.20). Outro paciente com LLA (caso 20) onde a banda G mostrou $del(11q23)$, a FISH evidenciou rearranjo do *MLL* e o uso de WCP, MCB do 9,11,19, respectivamente, mostrou uma $t(11;19)$ (Fig. 21).

O paciente 41 com LLA apresentou um cariótipo complexo com $add(12p)$ monossomia do cromossomo 18 e tetrassomia 21. O estudo com a sonda ETV6/RUNX1 revelou duplo rearranjo TEL/AML1, tetrassomia 21 e deleção de um alelo ETV6. O M-FISH detectou as alterações descritas e uma $t(12;18)$. O MCB revelou um ponto de quebra na região 12q12. Os CEP dos cromossomos 12 e 18 mostraram um $dic(12;18)$ (Fig. 22).

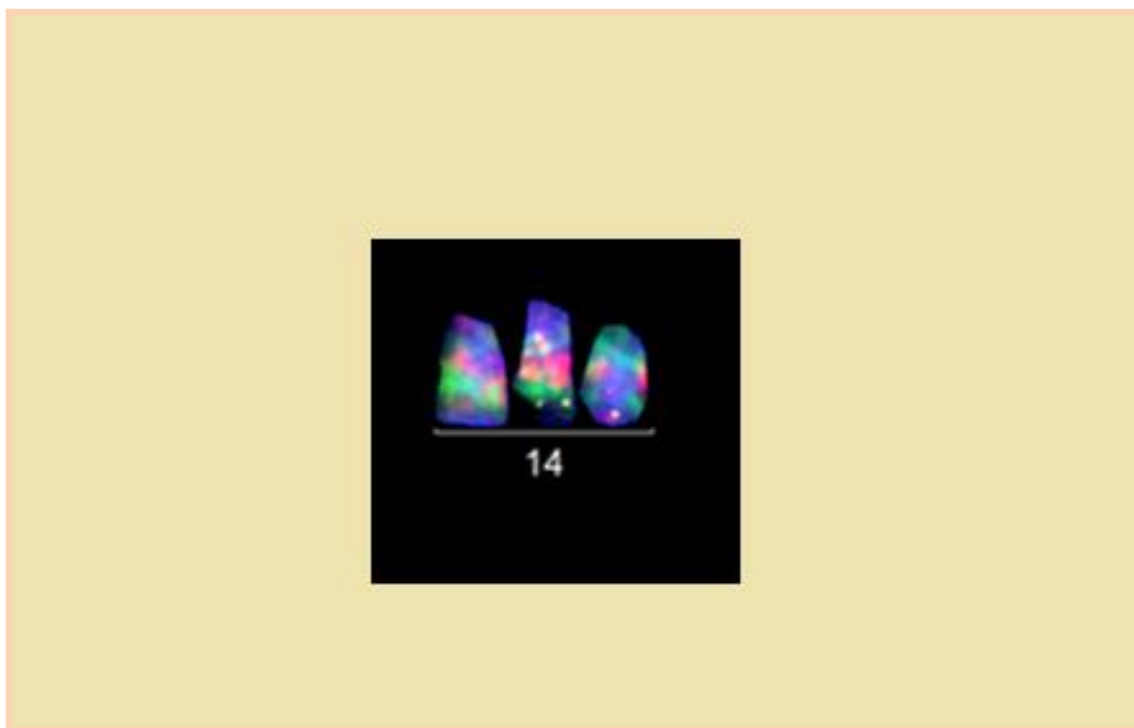


Figura 18 - MCB no caso 31 (LLA) mostrando a trissomia 14.

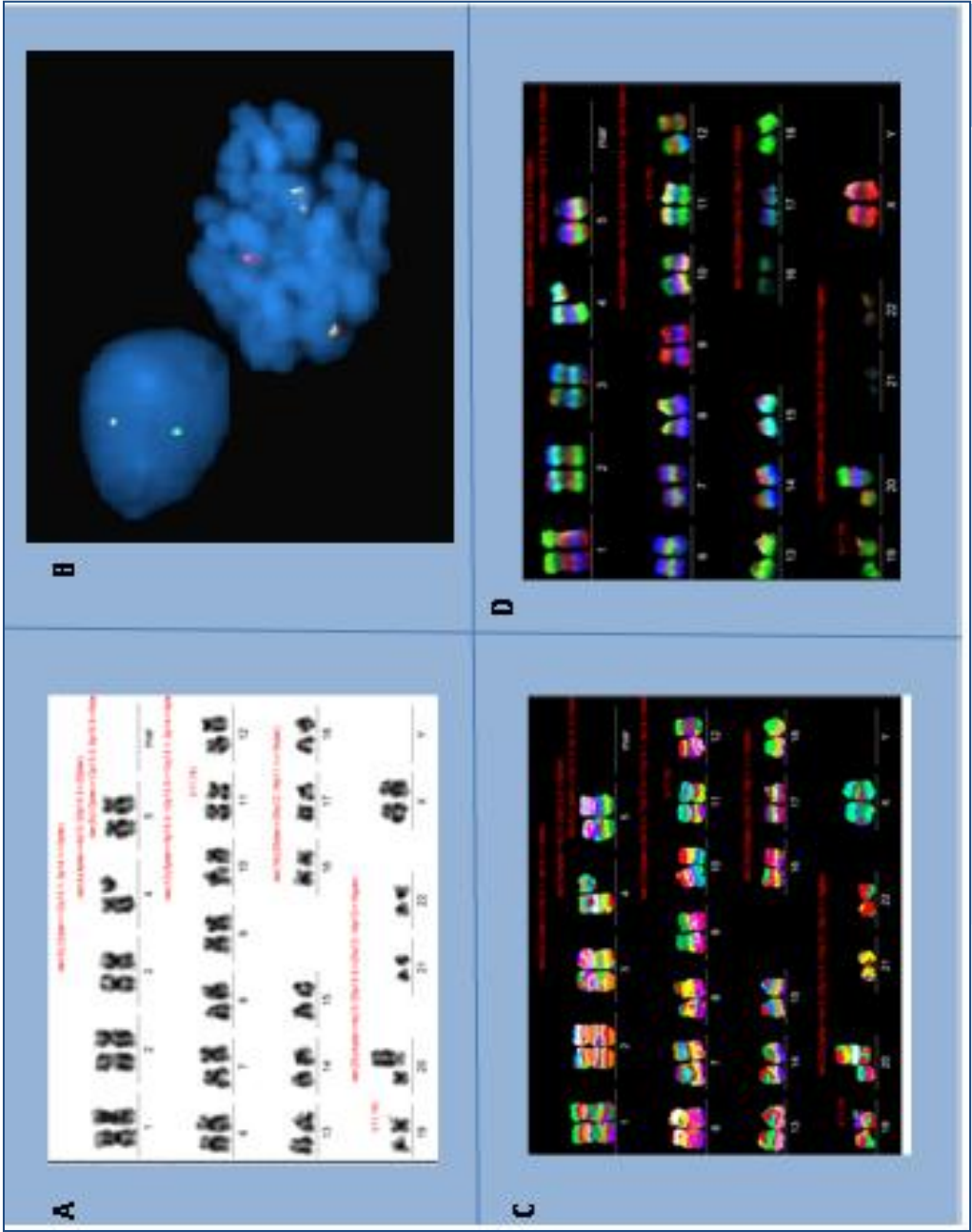


Figura 19- Dados citogenéticos do caso 35 com LLA.
A) Cariótipo complexo por banda G; **B)** FISH mostrando o rearranjo do gene *MLL* em interfase e metáfase; **C e D)** mMFISH.

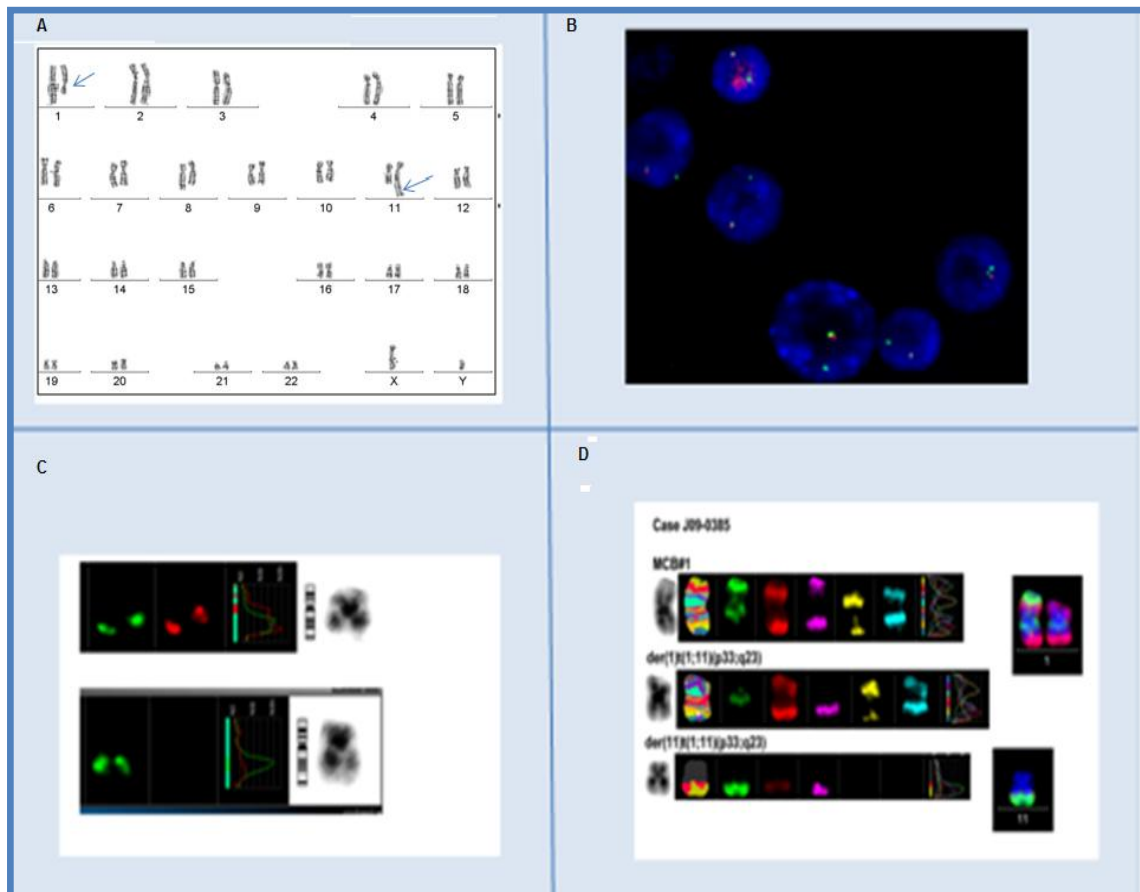


Figura 20- Dados citogenéticos do caso 38 com LLA. **A)** Cariótipo com banda G mostrando $t(1;11)(q21;q23)$; **B)** FISH mostra o rearranjo do gene *MLL*; **C)** deleção da região 3'*MLL*; **D)** MCB 1 e 11 mostrando a $t(1;11)(p33;q23)$.

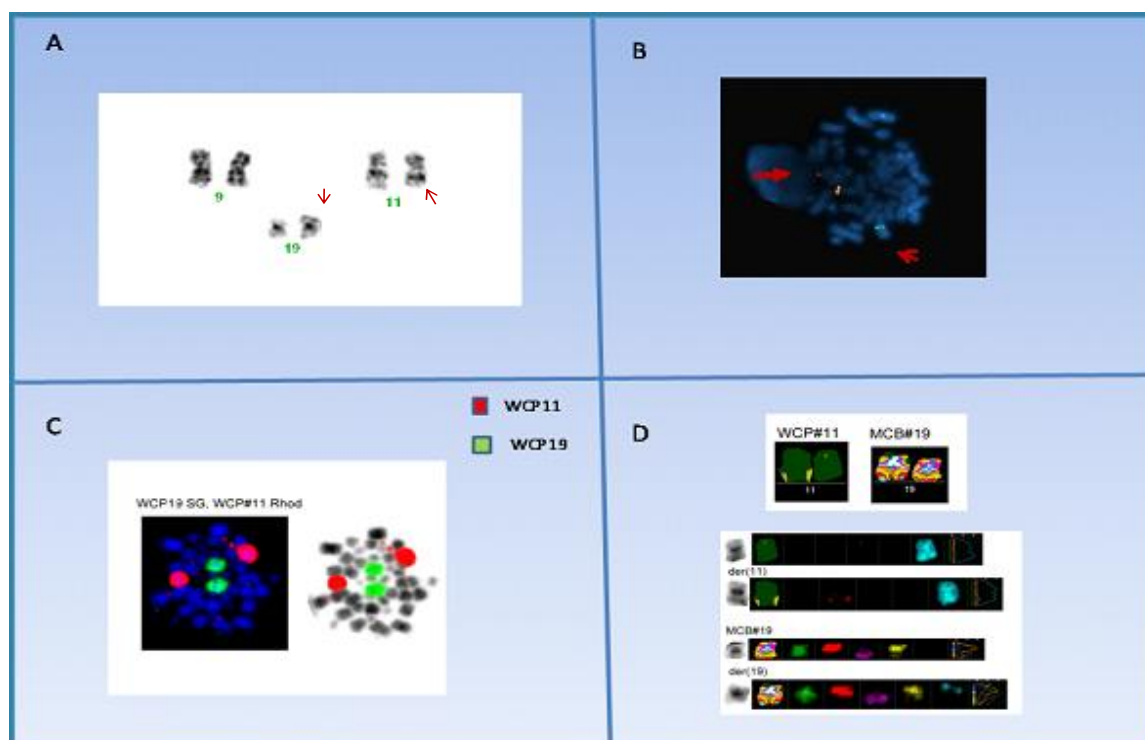


Figura 21- Dados citogenéticos do caso 45 com LLA. **A)** Cariótipo parcial com banda G mostrando del(11q23); **B)** FISH com sonda *MLL* em metafase evidenciando rearranjo do gene *MLL*; **C)** WCP 11 e WCP 19; **D)** WCP 11 e MCB 19 mostra a t(11;19).

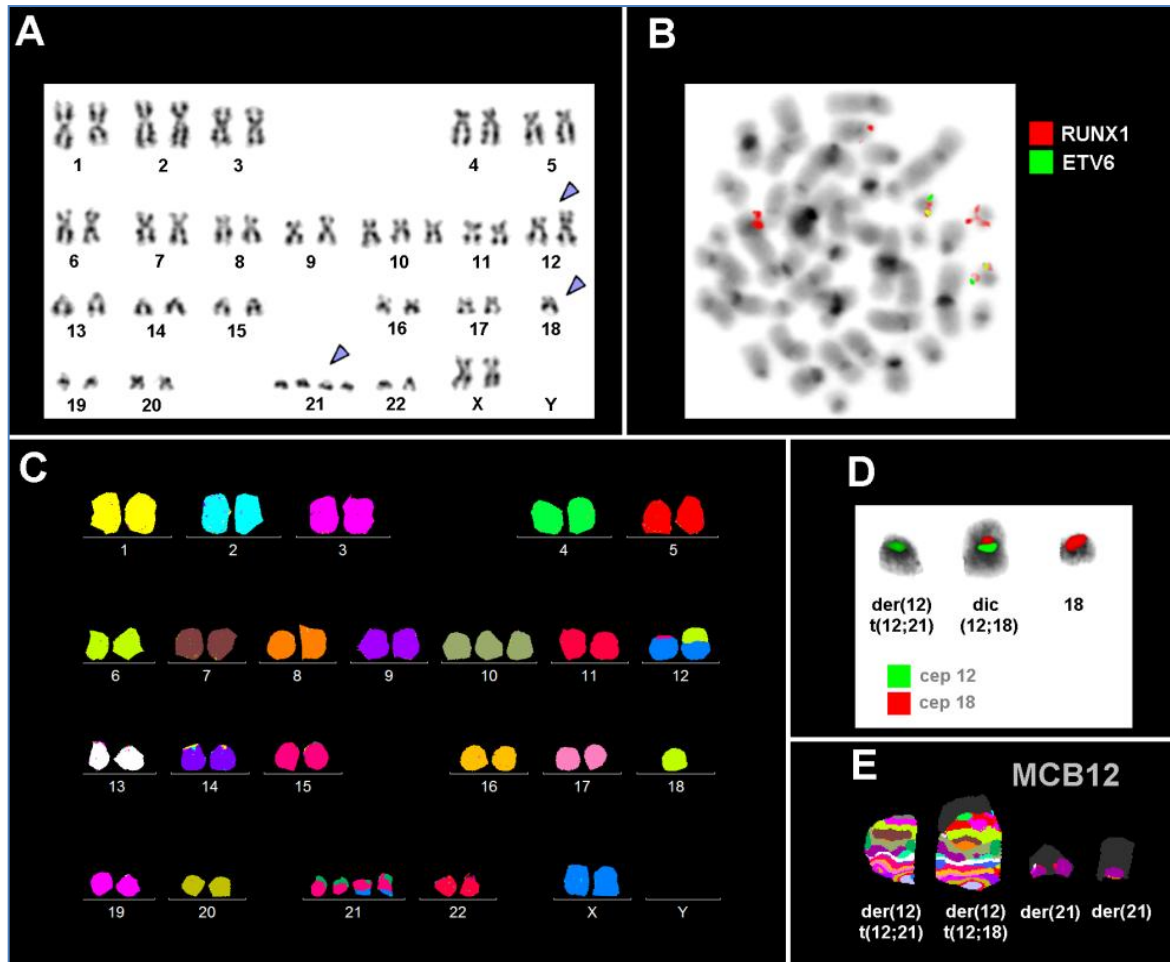


Figura 22- Dados citogenéticos do caso 41 com LLA. **A)** Cariótipo com banda G mostrando a $\text{add}(12)$, -18 e tetrassomia 21; **B)** FISH confirma a tetrassomia 21 e duplo rearranjo (fusão) ETV6/RUNX1; **C)** M-FISH confirma a tetrassomia 21, $\text{t}(12;18)$ e $\text{t}(12;21)$; **D)** CEP 12 e 21 mostrando $\text{dic}(12;18)$; **E)** MCB 12 mostra o $\text{der}(12)\text{t}(12;21)$ e $\text{der}(12)\text{t}(12;18)$.

Os resultados clínicos e citogenéticos dos 23 pacientes estudados com LMA estão ilustrados na tabela 4. Dezesesseis (70%) pacientes eram do sexo masculino e sete (30%) do sexo feminino, uma proporção de 2/1. A idade variou de 2 meses a 21 meses. Os subtipos morfológicos encontrados foram LMA-M5 em nove casos; LMA-M7 em três casos; LMA-M2 um caso; LMA-M4 e LMA-M4Eo em um caso cada; oito pacientes não tiveram classificação morfológica (Fig. 23).

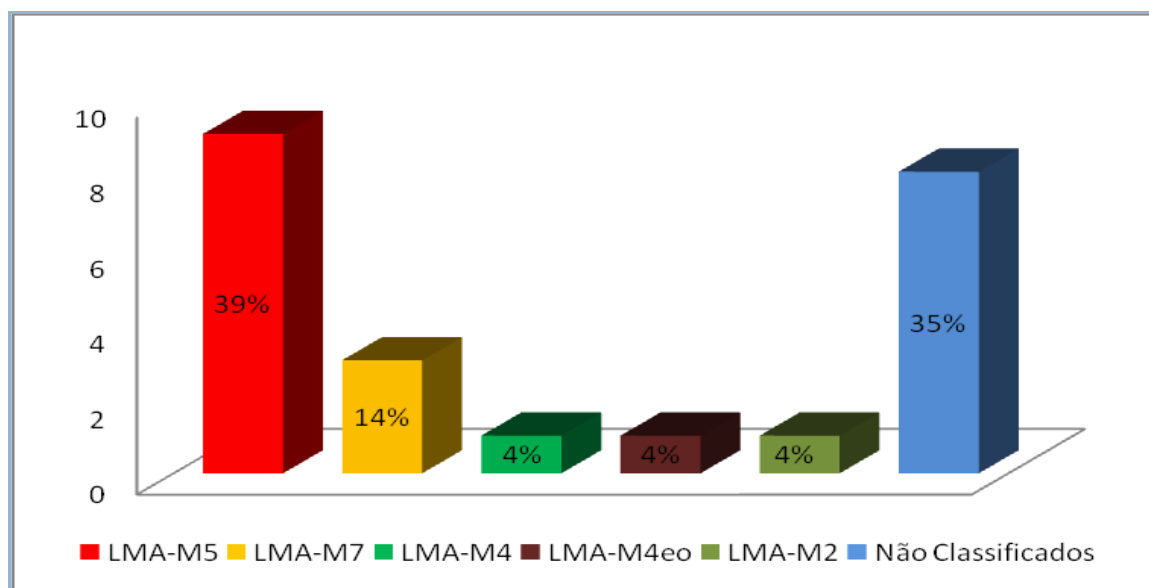


Figura 23 - Classificação FAB na LMA dos lactentes (N=23).

Tabela 4 - Dados clínicos, citogenética convencional e molecular dos lactentes com LMA.

Casos	S e x o	FAB	Idade	Citogenética (bandeamento G)	Citogenética Molecular		Resultado definitivo
					FISH MLL	Outras técnicas (M-FISH, mMCB, MCB,)	
1.	M	LMA	6m	Sem citogenética	Nucish(5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2) [100]	NR	MLL(-)
2.	M	M5	2m	46,XY;del11p(1.2)	sem Material para FISH	NR	46,XY;del11p(1.2) MLL (NR)
3.	M	LMA	17m	46, XY,del(11)(q23)	46,XYish (3'MLLx2,5'MLLx2)[5]/ Nucish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	46,XY MLL(-)
4.	M	LMA	5m	46,XY, i(9q)?	Nucish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	pcp 9p/9q (-)	46,XY MLL(-)
5.	M	M7	9m	46,XX	Nucish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	MFISH-46,XX; WCP1,8,17,22	46,XX MLL(-)
6.	M	M4	7m	46,XY,t(1;11)(p21;q23)	sem Material	sem Material	46,XY,t(1;11)(p21;p32) MLL (NR)
7.	M	LMA	5m	46,XY	Nucish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	46,XY MLL(-)
8.	M	LMA	7m	49,XX,+6,+9,+14	Nucish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	49,XX,+6,+9,+14 MLL(-)

Casos	S e x o	FAB	Idade	Citogenética (bandeamento G)	Citogenética		Molecular	Resultado definitivo
					FISH MLL			
9.	F	M2	9m	Sem mitose	Nucish(5'MLLsep3'MLL)[86]/ (5'MLLcon3'MLLx2)[14]		NR	MLL(+)
10.	F	M5	8m	46, XX, del(11q23)	Sem material		Sem material	46, XX, del(11q23) MLL (NR)
11.	M	M5	20m	46,XY,t(1;11)(q21;q23)	Sem material		Sem material	46,XY,der(11),t(1;11)(q21;q23) MLL(NR)
12.	F	LMA	21m	46,XX, add(11)(q23)	Nucish(5'MLLsep3'MLL)[90]/ (5'MLLcon3'MLLx)[10]		Wcp=9;11.	46,XX,t(9;11)(p?;q23) MLL(+)
13.	M	LMA	4m	46,XY;der(7);t(q32;?); del(12p);+19	Nucish(5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]		47,XY,del(5)(q21),der(7)t(7;?)(q32;),d el(12)(p12),+19[5]/47,XY,der(7) t(7;?)(q32;?),del(12)(p12),+19[13]	47,XY,del(5)(q21),der(7)t(7?) (q32;?),del(12)(p12),+19[5]/47, > der(7)t(7;?)(q32;?), del(12)(p12),+19[13]/ 46,XY[2] MLL(-)
14.	M	M5	8m	46,XY, t(9,11)(p22;q23)	Nucish(5'MLLsep3'MLL)[20]/ (5'MLLcon3'MLLx2)[80]		NR	46,XY, t(9,11))(p?;q23) MLL(+)
15.	M	M5	12m	47,XY,+ 8, der(11q23)	Nucish(5'MLLsep3'MLL)[90]/ (5'MLLco3'MLLx2)[10]		NR	46,XY,+8,der(11q23) MLL(+)
16	F	M5	7m	46,XX,t(9;11)(p22;q23)	Nucish(5'MLLsep3'MLL)[86]/ (5'MLLcon3'MLLx2)[14]		NR	46,XX,t(9;11)(p22;q23) MLL(+)
17	M	M5	7 m	46,XY,t(9;11)(p22;q23)	Nuc ish(5'MLLsep3'MLL)[20]/ (5'MLLcon3'MLLx2)[80]		Wcp=9;11;19 MCB 9 e 11	46,XY,t (9;11)(p12;q23) MLL(+)

Casos	S e x o	FAB	Idade	Citogenética (bandeamento G)	Citogenética FISH MLL	Molecular Outras técnicas (M-FISH, mMCB, MCB, etc)	Resultado definitivo
18	F	M7	18m*	54,XX,+5,+6,+11,+12,+19,+20,+21,+21/46,XX,del(13q)	Nucish(5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[82] (5'MLL,3'MLL,5'con 3'MLLx4)[14]/ (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx3)[4]	MCB 13= del(13q)	54,XX,+5,+6,+11,+12,+19,+2,+21,+21/46,XX del 13q Superexpressão <i>MLL</i>
19	M	M5	11m	46,XY,t(9;11)(p12;q23)	Nuc ish(5'MLLsep3'MLL)[70]/ (5'MLLcon 3'MLLx2)[30]	NR	46,XY t(9;11)(p12;q23) MLL(+)
20	F	M5	8 m	46,XX	Nucish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	MFISH = del(7q) MCB 7	46,XX, del (7q) MLL(-)
21	M	LMA	20m	46,XY,del(9p)	46,XY,ish(3'MLLx2, 5''MLLx2)[5] Nucish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	46,XY,del (9p) MLL(-)
22	F	M7	12m	46,XX, add(9)(q?)	Nucish (5'MLL,3'MLL,5'MLLcon3'MLLx2)[95]	Nucish(D7Z1x2)[16]/nucish(D7Z1x1) [5]/(D7Z1x2)[95] 46,XX,ish(ABL1x2,BCRx2)[100] Pcp 9p/9q	46,XX MLL(-) BCR/ABL (-)
23	M	M4e0	12m	46,XY,t(1;16)(p22;?)(p11.2), t(3;1)(p24;q22)	Nucish (5'MLL,3'MLL,5'MLLcon3'MLLx2)[95]	46,XY,der(1)t(1;16)(16q22::1p22-1qter),t(3;10)(p24;q22),der(16)t(1;16)(16p13.1::16q22::1p22-1pter	46,XY,der(1)t(1;16)(16q22::1p22-1qter),t(3;10)(p24;q22), der(16)t(1;16)(16pter-16p13.1::16q22::1p22-1pter) MLL(-)

NR = não realizado; M = masculino; F = feminino

O estudo citogenético realizado nos 23 lactentes com LMA definiu o perfil citogenético em 21 pacientes (Fig.24). Os casos 1 e 9 não apresentaram metáfases para análise. Três casos (5,7,20) tiveram o cariótipo normal. Dez apresentaram alterações da região 11q23 (casos 3,6,10-12,14-17,19) sendo: t(1;11) em 20% dos casos (6 e 11) (Fig 25) e t(9;11) em 40% dos casos (14,16,17,19). A del(11q23) foi observada em dois casos (3,10), um caso (15) com der(11q23) e caso 16 com add(11q23). Oito pacientes apresentaram alterações cromossômicas não relacionadas à região 11q23. O caso 2 com del(11)(p12), os casos 8 e 18 hiperdiploidia. Três pacientes tiveram suspeita de anormalidade do cromossomo 9 (casos 4, 21 e 22). O caso 13, apresentou um cariótipo complexo com um der(7q) e o caso 23 uma t(1:16).

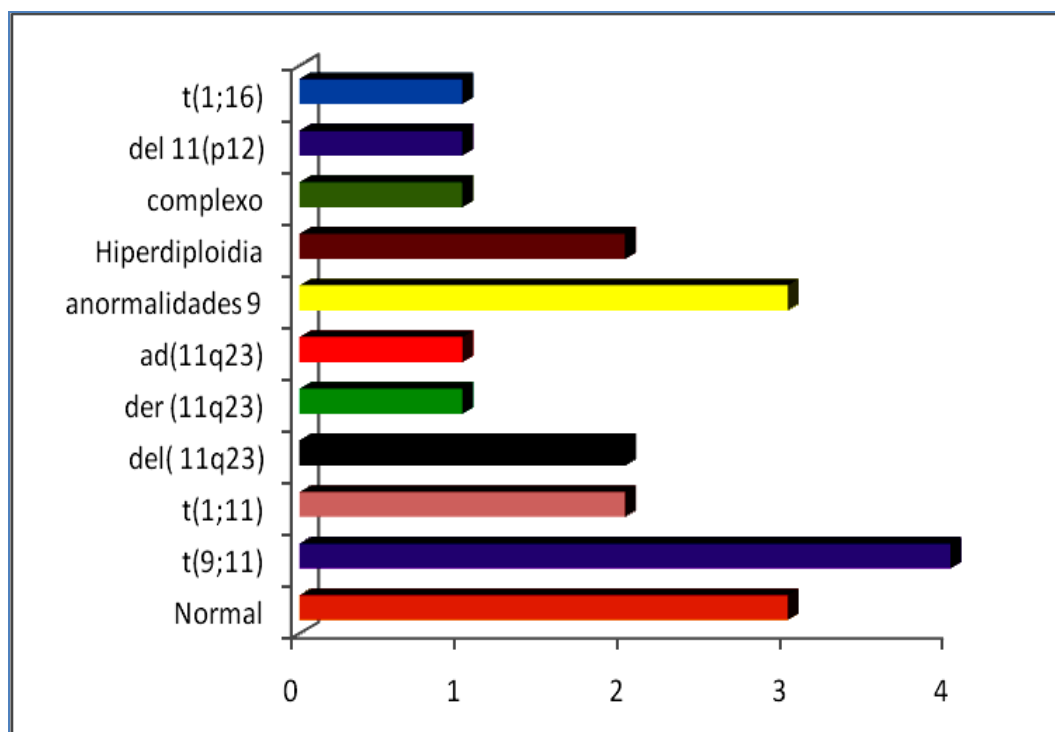


Figura 24 - Alterações citogenéticas por bandeamento G na LMA dos lactentes (n=21).

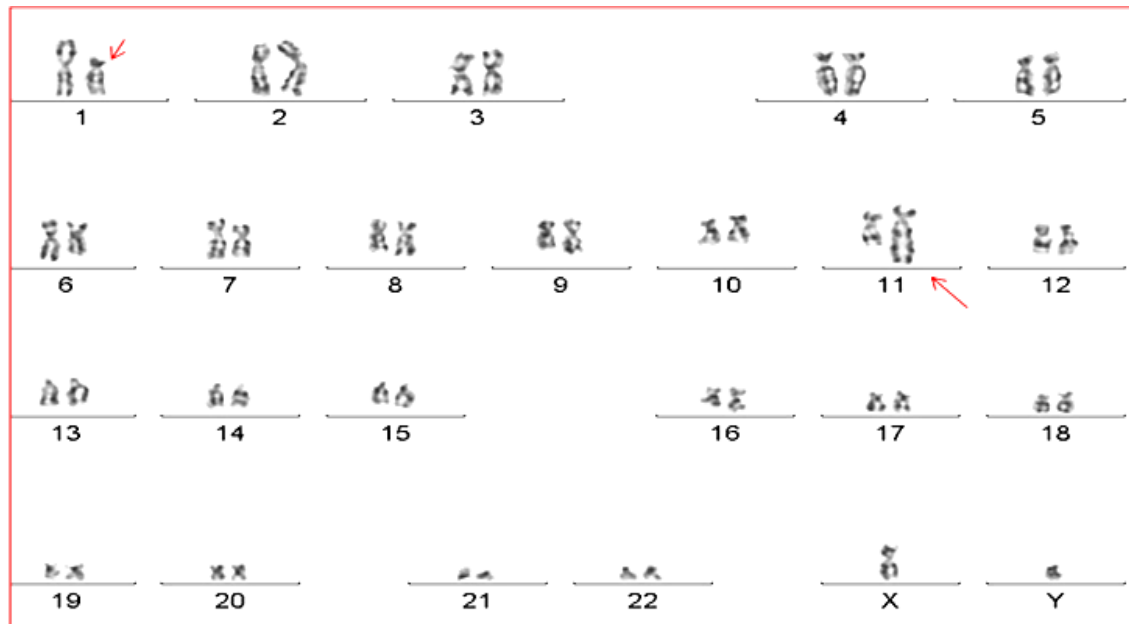


Figura 25 - Cariótipo com banda G no caso 6(LMA-M4),46,XY,t(1;11)(p32;q23).

A investigação do rearranjo do gene *MLL* por FISH nos pacientes com LMA foi realizado em 19 casos, quatro não tiveram material para o procedimento (casos 2,6,10,11). Sete apresentaram rearranjo do *MLL* (casos 9, 12, 14, 15, 16, 17, 19) e 12 não apresentaram o rearranjo (casos 1,3,4,5,7,8,13,20,21,22, 23). O caso 18 apresentou superexpressão do *MLL* (Fig. 26).

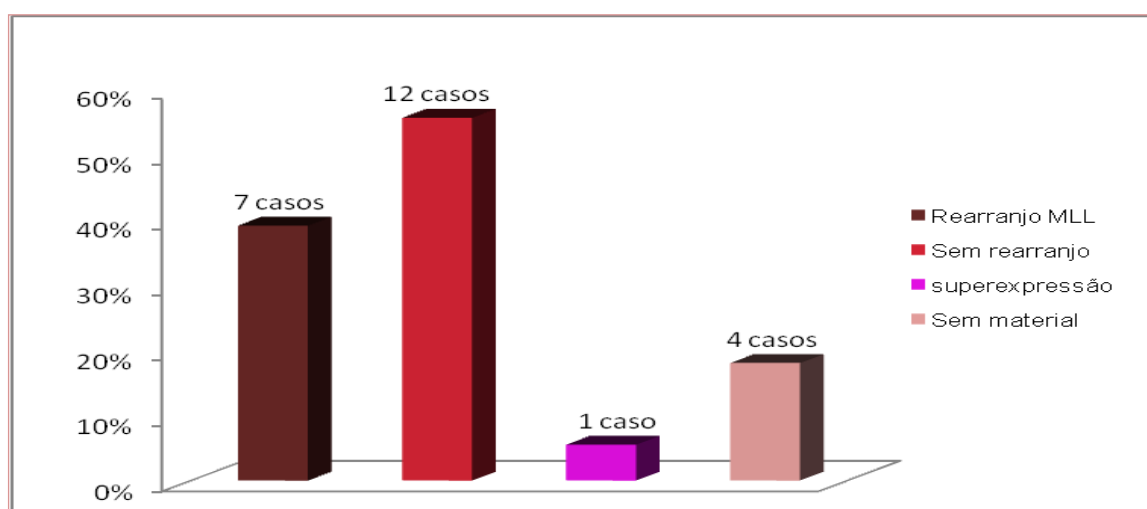


Figura 26 - Estudo do rearranjo do *MLL* na LMA do lactente (n=23).

O uso de outras sondas como WCP e PCP dos cromossomos 9,11,19 permitiram definir no caso 12 a $\text{add}(11)(q23)$ como $\text{t}(9;11)$. Os casos 3 e 14, no qual o bandeamento G evidenciou $\text{t}(9;11)$ e $\text{del}(11)(q23)$, respectivamente, não apresentaram anormalidades do *MLL*.

Métodos citogenéticos moleculares adicionais foram realizados nos casos 4,5,12,17,18,20,22 e 23. O caso 4 com suspeita de um $\text{i}(9)$, o uso de PCP 9p/q não confirmou anormalidades. O caso 5, com LMA-M7, cujo estudo por banda G não foi possível ser realizado devido a má qualidade das metáfases, a realização do M-FISH e WCP dos cromossomos 1,8,17 e 22 definiu o cariótipo como normal. No caso 17 o WCP e MCB dos cromossomos 9,11 e 19 confirmaram a $\text{t}(9;11)(p12;q23)$ (Fig.27). O caso 18, uma LMA-M5 com hiperdiploidia, apresentava um clone com $\text{del}(13)(q13;q21)$ confirmada pelo MCB 13 (Fig. 28). O caso 20, uma LMA-M5 com cariótipo normal sem rearranjo do *MLL*, o uso de m-MCB e CEP 7 com a St7q, diagnosticou uma deleção 7q (Fig.29). O caso 22 o uso do PCP 9p/q, CEP7, pesquisa do rearranjo do *MLL* e BCR/ABL não mostraram anormalidades. O caso 23, uma LMA-M4eo, a investigação do rearranjo entre genes *CBFB* e *MYH11* revelou a $\text{inv}(16)$ mascarada na $\text{t}(1;16)$ (Fig.30).

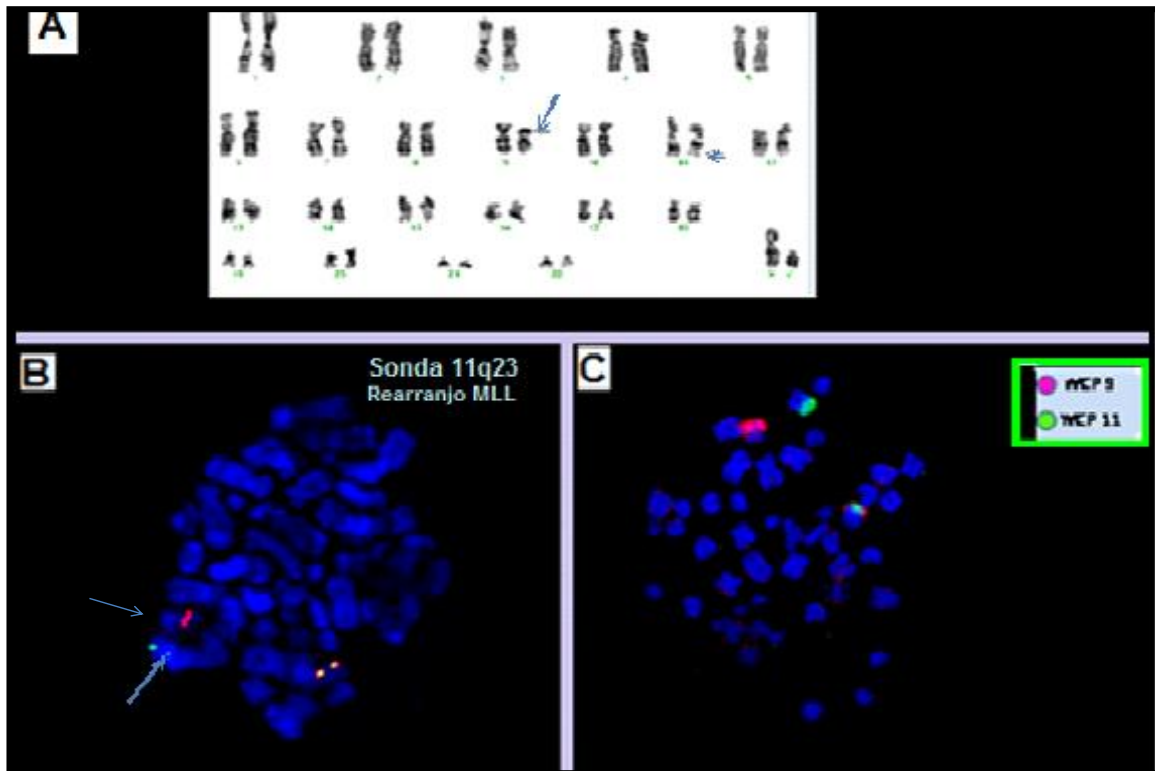


Figura 27- Dados citogenéticos do caso 17 com LMA-M5. **A)** Cariótipo com banda G mostrando a t(9;11)(p12;q23); **B)** FISH confirmando o rearranjo do gene *MLL*; **C)** WCP 9 e 11 mostrando a t(9;11).

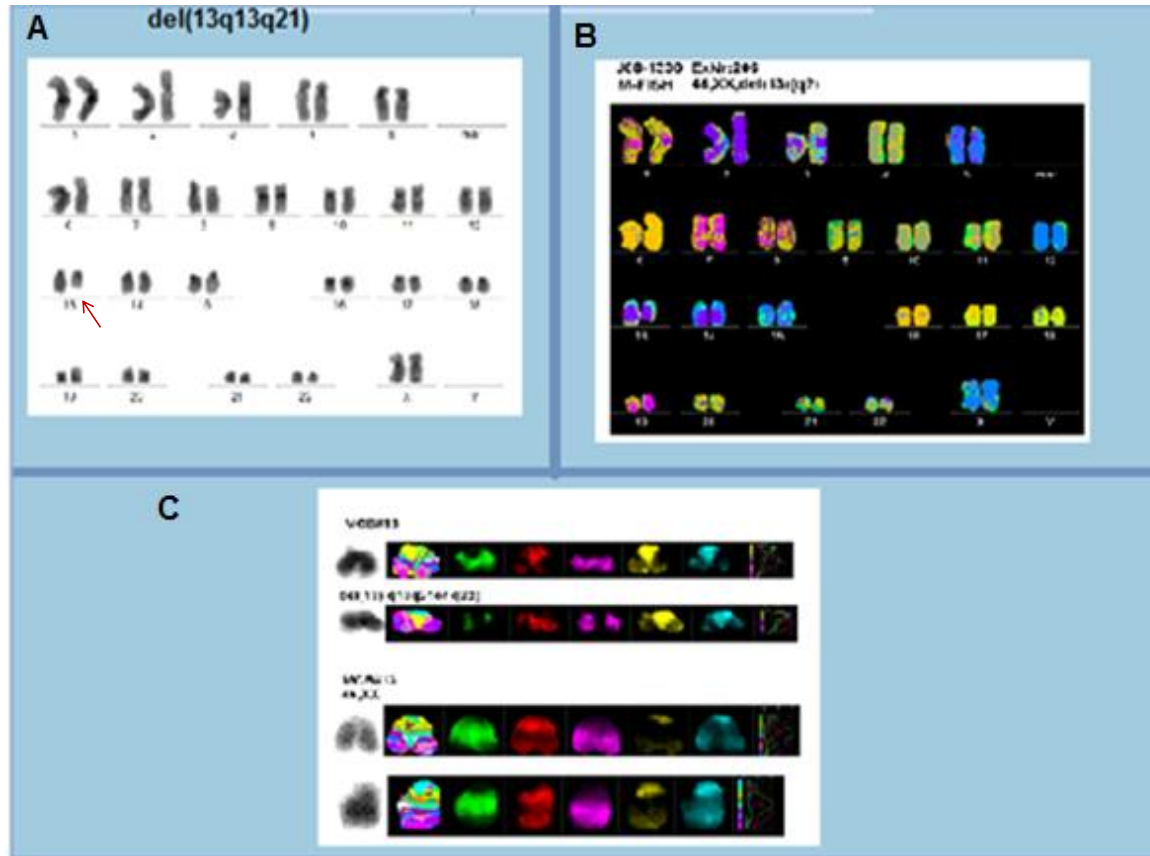


Figura 28- Dados citogenéticos do caso 18 com LMA-M7. **A)** Cariótipo com banda G mostrando a del(13q); **B)** M-FISH mostrando cariótipo sem alteração; **C)** MCB confirmando a del(13q).

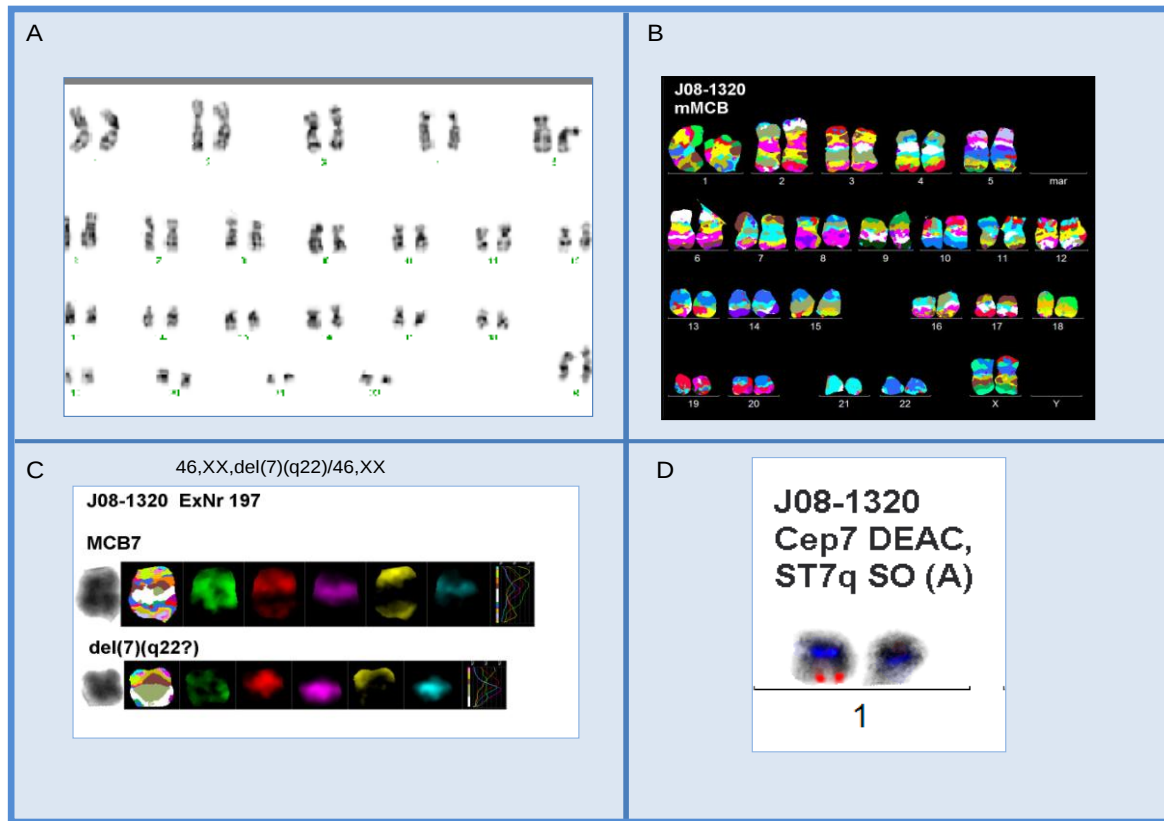


Figura 29- Dados citogenéticos do caso 20 com LMA-M5. **A)** Cariótipo com banda G 46,XX; **B)** mMCB revelando cariótipo normal; **C)** MCB 7 exibindo del(7q22?); **D)** CEP 7 ST7q exibindo del(7q).

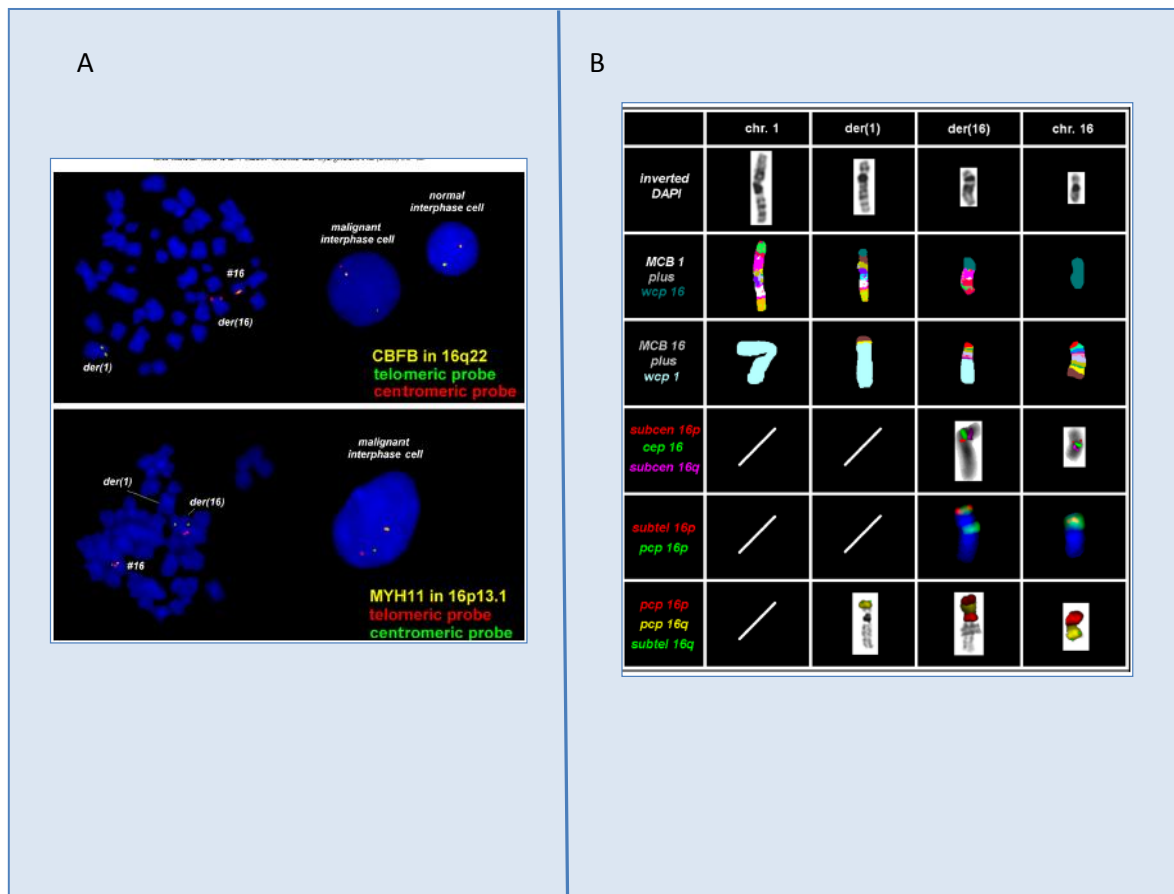


Figura 30- Dados citogenéticos do caso 23 com LMA-M4eo. **A)** FISH com sonda para o *CBFB* e *MYH11* usando uma sonda telomérica e centromérica mostra a fusão do gene em um alelo em ambas metáfase e núcleos, respectivamente; **B)** Citogenética por banda G, MCB e M-FISH são mostrados para os cromossomos 1 normal e derivados dos cromossomos 1 e 16. A combinação dos métodos são mostrados na coluna 1. O MCB mostrados estabeleceu a complexidade do rearranjo e sonda adicionais de regiões específicas e locus específicas incluindo pcp dos 16p e 16q, concomitante com a subtelomérica 16qter revela o rearranjo críptico da *inv(16)(p13.1q22)* mascarada pela *t(1;16)*.

Os resultados dos dados clínicos e citogenéticos dos pacientes com L ambíguas (bifenóticas/bilineal) estão ilustrados na Tabela 5. Este tipo de leucemia representou 4% (3/82) dos casos da nossa amostragem, dois meninos com 6 e 9 meses e uma menina com 14 meses. O caso 1 apresentou trissomia 21, como única anormalidade (Fig. 31). O caso 2, com t(9;19) e rearranjo do *MLL*, sondas WCP e MCB para os cromossomos 9, 11 e 19, assim como M-FISH, detectou uma translocação mascarada em três vias t(9;11;19) (Fig. 32). O caso 3 com leucemia bilineal e t(9;11) não apresentou rearranjo do gene *MLL*.

Tabela 5- Dados clínicos, citogenética convencional e molecular dos lactentes com leucemia de linhagem ambígua

Caso	Sexo	Idade	FAB	Citogenética (bandeamentoG)	Citogenética Molecular		Resultado definitivo
					FISH MLL	Outras técnicas (MFISH, mMCB, MCB etc)	
1	F	14m	bifenotípica	47,XX,+21	Nuc ish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	Wcp 21 Nuc ish(TELx2,ETV6 x2)	47,XX+21 MLL(-) TEL / ETV6(-)
2	M	6m	bifenotípica	46,XY,t(9;19)(p13;p13)	Nuc ish(5'MLLsep3'MLL)[75] /(5'MLLcon 3'MLLx2)[15]	MFISH- Ish46,XY,t(9;11;19),der(9);t(9;11)(p11.2); der(11)t(11;19)(q23;p13.1),der(19)t(9;19) (p11.2p13.1) MCB = 9,11,19	Ish46,XY,t(9;11;19),der(9) t(9;11)(p11.2);der(11)t(11;19) (q23;p13.1),der(19)t(9;19) (p11.2;p13.1) MLL (+)
3	M	9 m	LA bilineal	46,XY,t(9;11)(p22;q23)	Nucish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	NR	46,XY MLL (-)

NR = não realizado; M = masculino; F = feminino

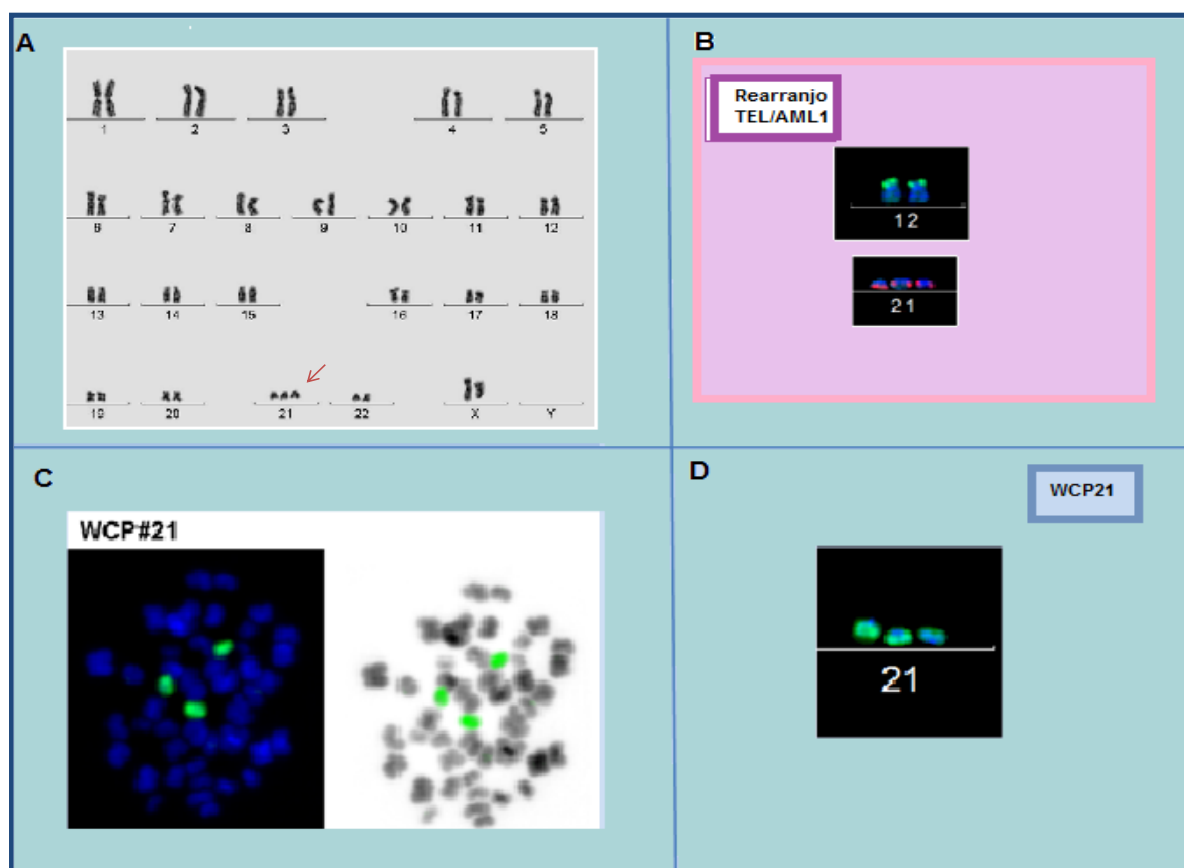


Figura 31- Dados citogenéticos do caso 1 com L bifenotípica. **A)** Cariótipo com banda G-46,XX,+21; **B)** FISH para o rearranjo TEL/AML1 foi negativo; **C e D)** WCP 21 mostra a trissomia 21.

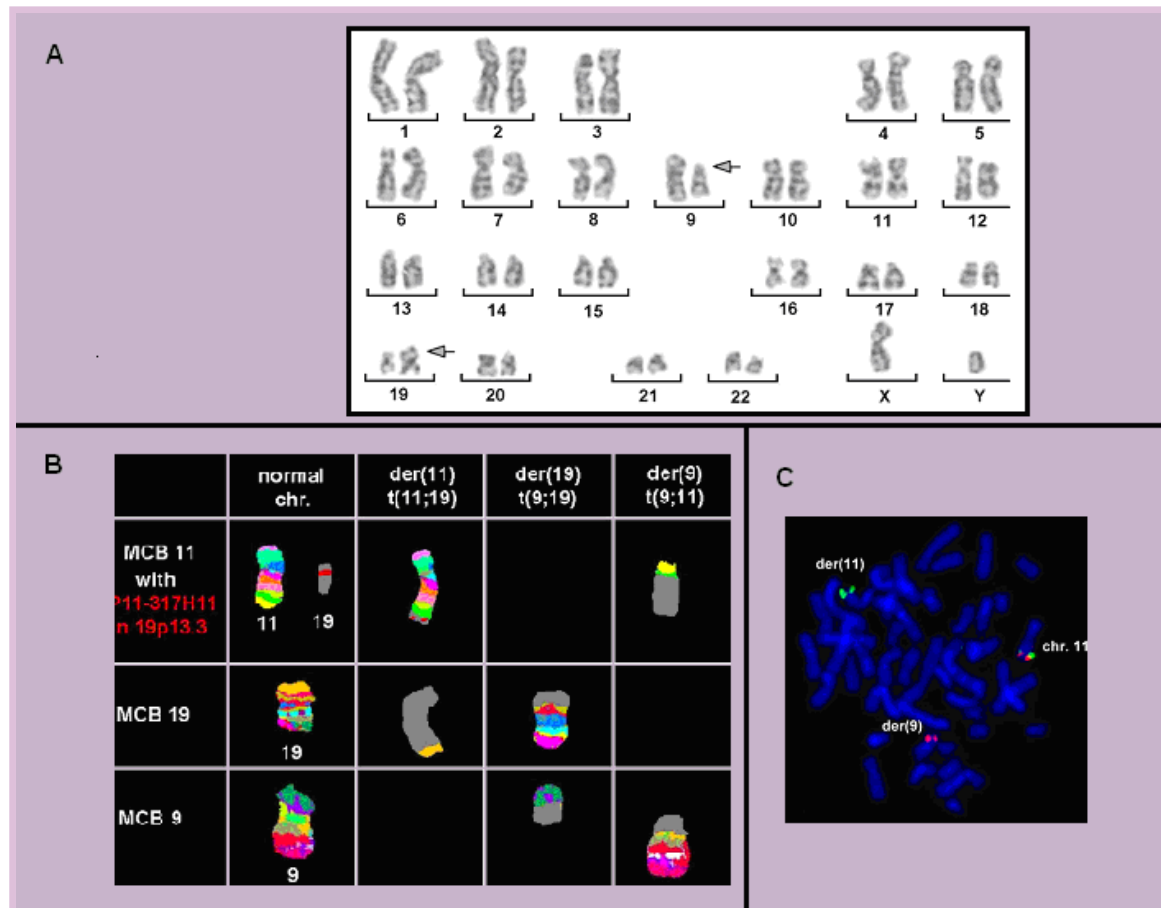


Figura 32- Dados citogenéticos do caso 2 com L bifenotípica. **A)** Cariótipo com banda G – 46,XY,t(9;19)(p13;p13); **B)** MCB dos cromossomos 9;11;19, revelando a translocação em três vias t(9;11;19); **C)** PCP dos cromossomos 9 e 11 mostra o der(11) e o der(9)t(9;11).

A figura 33 correlaciona as anormalidades do gene *MLL* com a idade e os tipos FAB, LLA e LMA. No lactente com LLA, a doença incide desde os primeiros dias de vida até 12 meses e vai desaparecendo após esta idade, enquanto na LMA atinge a criança após os 6 meses e se mantém após 12 meses.

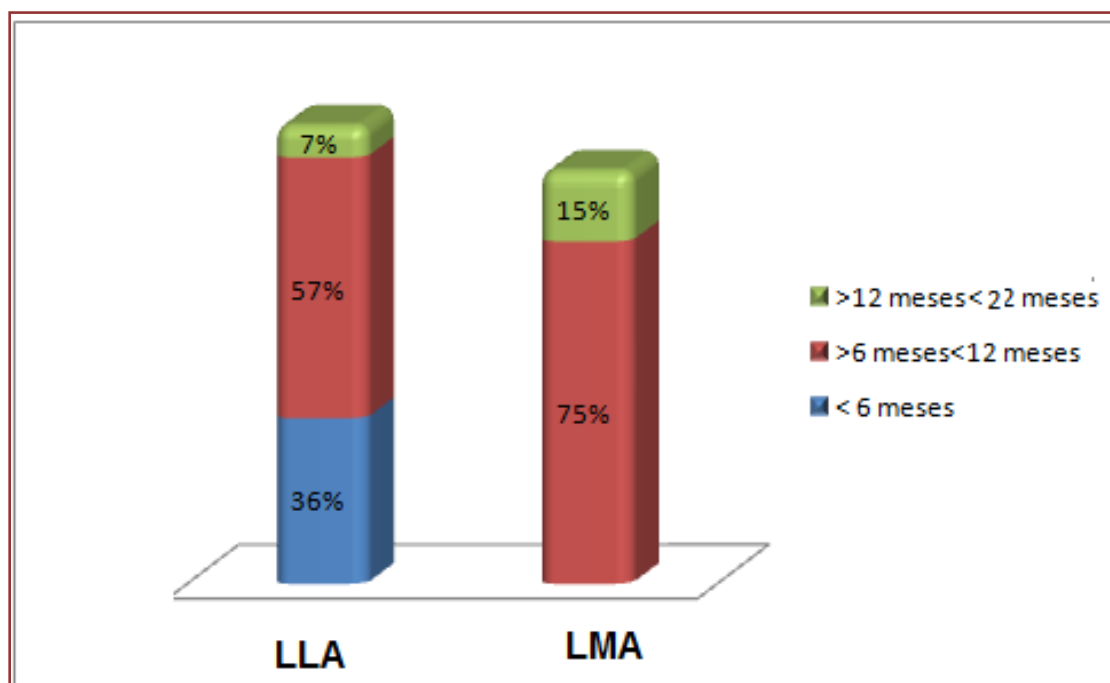


Figura 33- Frequência do rearranjo do MLL nas LAL em relação a faixa etária

Os resultados dos dados clínicos e laboratoriais dos dez pacientes com SMD estão ilustrados na tabela 6, de acordo com a classificação OMS para SMD (Quadro 2). Oito pacientes foram diagnosticados como doença em portadores de SD, destes o caso 3 com MAT e sete como leucemia mielóide (casos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). O caso 9 com LMA e Neurofibromatose (NF1) foi incluído neste grupo. Com exceção do caso 10, FAB LMA-MO, todos eram LMA-M7 (casos 4, 5, 6, 7, 8,9). O paciente com LMMJ (caso 2) foi classificado no grupo Síndrome Mielodisplasia/Mieloproliferativa (SMP/SMD) e o caso 1, com Síndrome de Kostman e AREB-t no grupo SMD. Na maioria dos pacientes com LMA em SD a análise citogenética, mostrou cariótipos complexos com translocação envolvendo o cromossomo 1 (casos 4,6,8,9), com exceção do caso 10 que apresentou um cromossomo em anel (Fig 34). Para definição destes cariótipos foram necessárias técnicas moleculares como M-FISH, MCB, BAC, WCP e PCP.

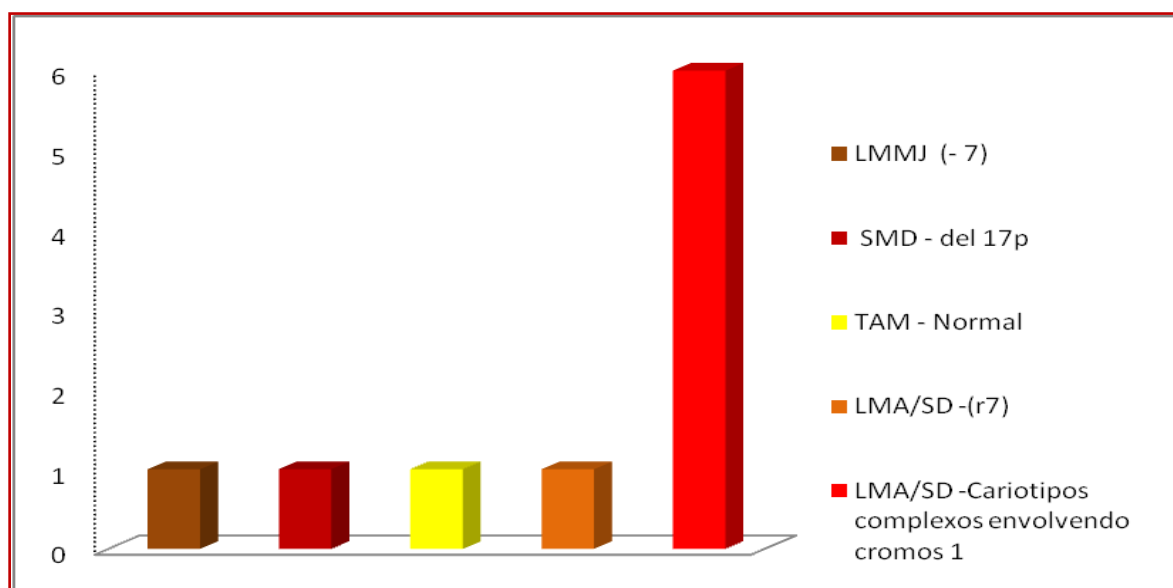


Figura 34- Achados citogenéticos na SMD do lactente.

Tabela 6- Dados clínicos, citogenética convencional e molecular dos lactentes com SMD

Casos	Sexo	Idade	FAB	Citogenética convencional	Citogenética Molecular		Cariótipo definitivo
					FISH MLL	Outras técnicas (MFISH, mMCB, MCB etc)	
1	M	2m	LMA/SMD (S.Kostman)	46XY,del(18)(p11)	Sem material pra FISH	NR	46XY,del(18)(p11)
2	M	5m	LMMJ	45,XY,-7	NR	Ish45,XY,-7[3] WCP7	45XY,-7
3	M	20d	MAT(SD)	46,XY	Nuc ish 3'MLL,5'ML,5'con3'MLLx2[100]	NR	46,XY MLL (-)
4	F	20m	LMA-M7/ SMD(SD)	48,XX,t(1;16)(q21;q12.), der(16)t(9;16)(q13;q12.1),+21	S/ Material	mMCB=48,XX,t(1;16)(q31-q32;q23), der(5)t(1;5)(q31q32;p13),der(16) t(16;1;5)(q23;q31-q32;p13)+21c[15]	48,XX,t(1;16)(q31q32;q23), der(5)t(1;5)(q31q32;p13), der(16)t(16;1;5)(q23;q31-q32;p13)+21c
5	M	11m	LMA-M7 / SMD(SD)	47,XY,+1,add(5)(p14),der(7)(p15),der(17)t(1;17)(q21;p22)+21	S / Material	NR	47,XY,+1,add(5)(p14),der(7)(p15), der(17)t(1;17)(q21;p22)+21
6	F	17m	LMA-M7/ SMD(SD)	47,XX,der(17)t(1;17), (q32;p13),+21	S / Material	MCB=47,XX,der(17)t(1;17)(q32;p13),+21	47,XY,der(17)t(1;17)(q32;p13),+21
7	F	16m	LMA-M7/ SMD(SD)	S/ mitose	Nuc ish 5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2[100]	NR	MLL(-)
8	M	20m	LMA-M7/ SMD(SD)	47,XY,der(19)t(1;19)(q24;p13.3),der(20)t(1;20)(q24;q11.2),+21c	Nuc ish (3'MLL,5'ML,5'con3'MLL x 2)[100]	MFISH- 47,XY,der(19)t(1;19)(q31;p13.3) der(20)t(1;20)(q31;q12-13.1),r(20)(p11.2;q12),+21c[53]/47,XY,der(2)t(2;11)(q37.3;q12-13);der(19)t(1;19)(q31;p13.3)/der(20)t(1;20)(q31;q12-13.1),+21	47,XY,der(19)t(1;19)(q31;p13.3),der(20)t(1;20)(q31;q12-13.1),r(20)(p11.2;q12),+21c[53]/47,XY,der(2)t(2;11)(q37.3;q12-13), der(19)t(1;19)(q31;p13.3),der(20)t(1;20)(q31;q12-13.1),+21c[5] MLL (-)

Casos	S e x o	Idade	FAB	Citogenética convencional	Citogenética FISH MLL	Molecular Outras técnicas (MFISH, mMCB, MCB etc)	Cariótipo definitivo
9	F	5m	LMA-M7 NF1	46,XX,del(5)(q31),add(10) (q26)?,del(10)(q22), der(19)t(11;19)(q13;p1)	Nucish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx3)[92]	MFISH- 46,XX,der(5)t(5;10)(q12;?),der(6)(6;1 7)(p2?;p11.2),der(10)t(1;10)(q25orq3 1;q26),del(17)(p11.2)der(19) t(11;19)[cp5] Nuc ish <i>TP53</i> (p53x2) [70]/(p53x1)[30]	46,XX,der(5)t(5;10)(q12;?), der(6)(6;17) (p2?;p11.2),der(10)t(1;10)(q25or q31;q26), del(17)(p11.2)der(19) t(11;19)[cp5] Deleção <i>TP53</i> Overexpressão
10	M	12m	LMA-M0/ SMD(SD)	45,XY,-7,+r(7?), +21c	Nucish (5'MLL,3'MLL,5'con3'MLLx2)[100]	MCB7 e MCB21/ Subtel 7pter e 7qter RP11-810J17 em 7p15.3 ate 21.49Mb; RP11-79G16 em 7p21.2 ate 13.97Mb; RP11-1141E10 em 7q34 ate 142.24Mb; RP11-30712 em 7q35 ate 143.71Mb	47,XY,r(7)(7p15.37~p21.2;7q34~7q35),+21c MLL (-)

NR = não realizado; M = masculino; F = feminino

O paciente com LMMJ (caso 2) apresentou monossomia 7 e o WCP do 7 confirmou a monossomia do 7 (Fig. 35) (Anexo 3). O caso 4, com t(1;16) e um der(16)t(9;16), o mMCB mostrou der(1)t(1;5),der(16)t(16,1,5),der(16)t(1;16) (Fig.36). O caso 6 com der(17)t(1;17) o MCB do 17 confirmou o der(17)t(1;17) (Fig. 37). O caso 8 com der(19) e der(20), o MCB dos cromossomos 1,11,19 e 20 mostrou der(19)t(1;19), der(20)t(1;20), der(2)t(2;11) e o r(20) não visualizado no bandeamento G (Fig.38) .

O caso 9 com LMA-M7 e NF1 apresentou um cariótipo complexo com del(5q), del(10q), add(10q), além do der(11q)t(11;19)(q13;p13). A FISH revelou superexpressão do *MLL* e o M-FISH mostrou o envolvimento do cromossomo 1 no der(10)t(1;10) além do der(5)t(5;10), der(6)t(6;17), del(17p) e o der(11)t(11;19). A sonda para o gene *TP53* mostrou deleção (Fig. 39) (Anexo 3). O paciente 3 com SD e MAT apresentou cariótipo normal e o caso 1, com síndrome de Kostman e AREB-t, apresentou del(18p), mas não teve material para o estudo molecular. O caso 10 com LMA-M0 e SD, o MCB do cromossomo 7 e o uso de BAC para genes específicos das regiões terminais deste cromossomo, definiu a exata região telomérica perdida e posterior religação para formação do cromossomo em anel (Fig. 40) .

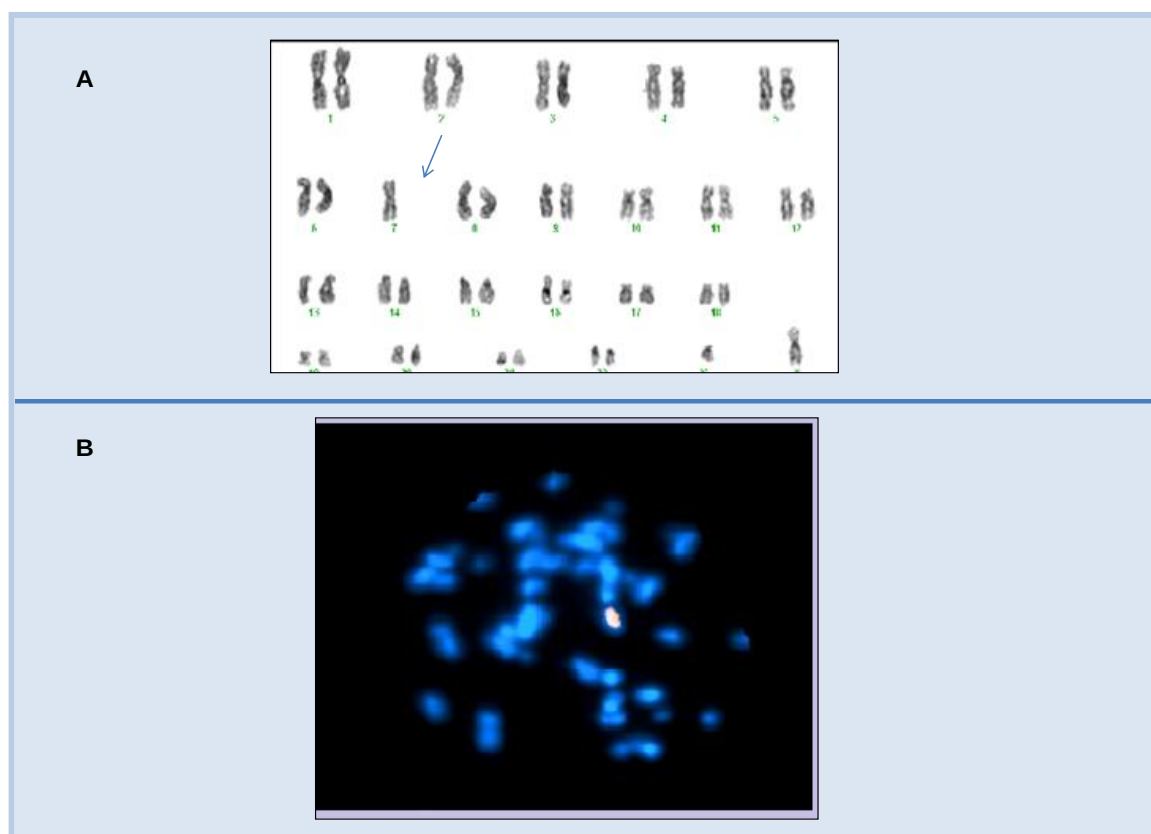


Figura 35- Dados citogenéticos do caso 2 com LMMJ. **A)** Cariótipo por banda G mostra a monossomia 7; **B)** FISH WCP 7 mostra a monossomia 7.

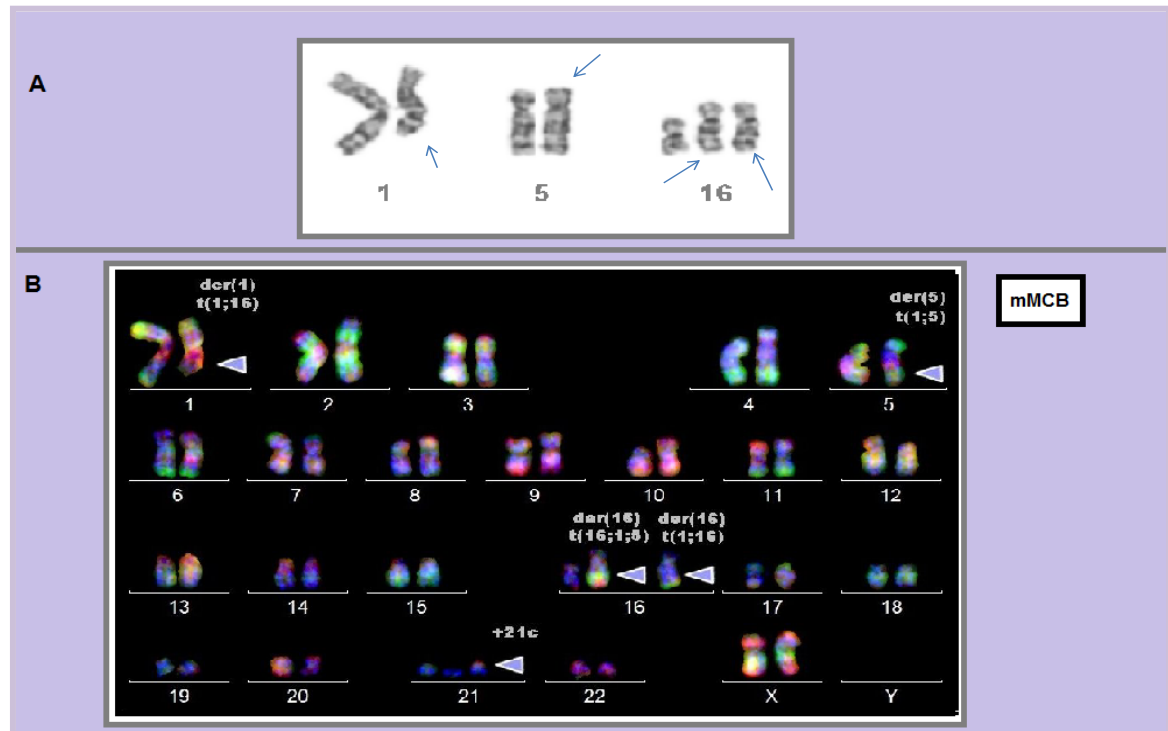


Figura 36 - Dados citogenéticos do caso 4 com SMD. **A)** Cariótipo complexo parcial mostra anormalidade dos cromossomos 1, 5 e trissomia16; **B)** mMCB mostra o der(1)t(1;5),der(16)t(16;1;5),der(16)t(1;16), +21c.

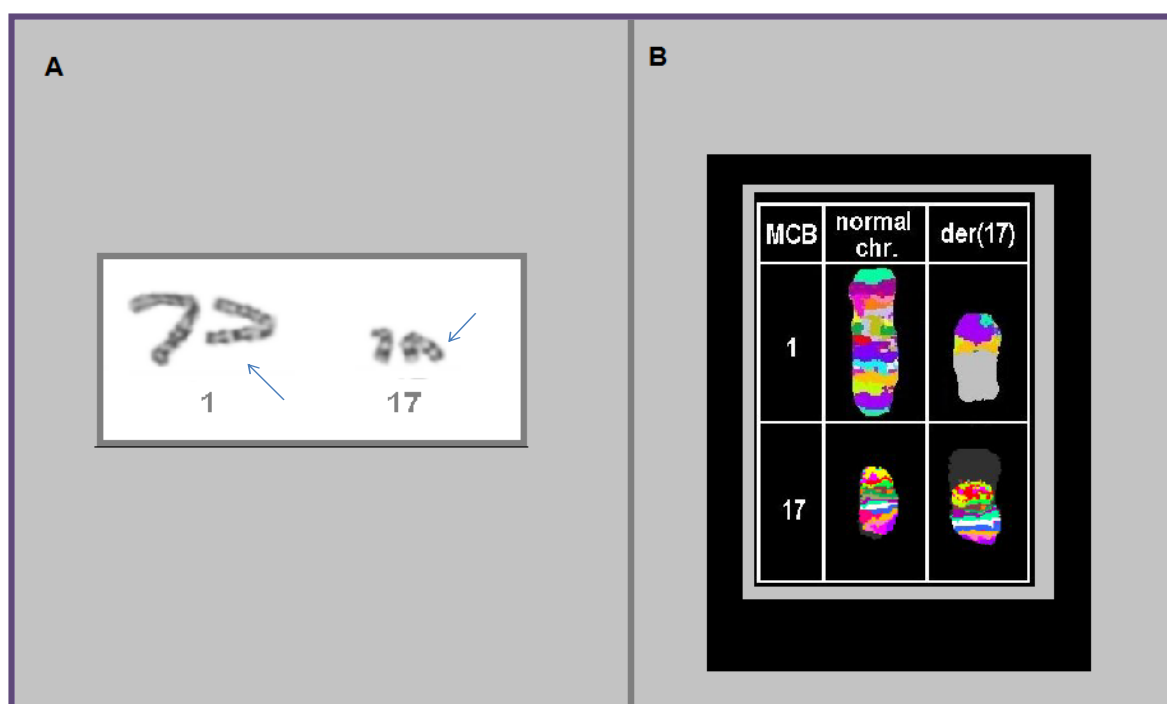


Figura 37- Dados citogenéticos do caso 6 com LMA/SMD. **A)** Cariótipo parcial mostra o der(17)t(1;17); **B)** MCB 1 e 17 mostra o der(17)t(1;17).

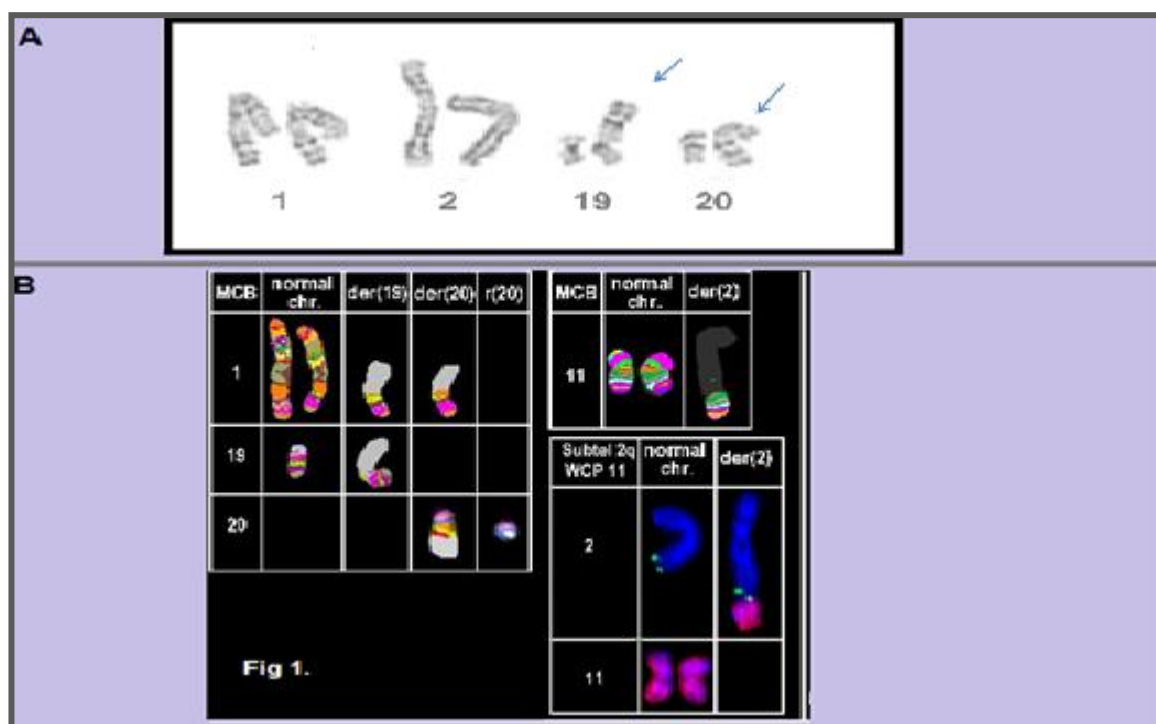


Figura 38 - Dados citogenéticos do caso 8 com LMA/SMD. **A)** Cariótipo parcial mostrando os der(19)t(1;19) e der (20)t(1;20); **B)** MCB 1, 11, 19 e 20 mostrando der 19t(1;19) e o der(20)t(1;20) der(2) t(2;11) e o r(20).

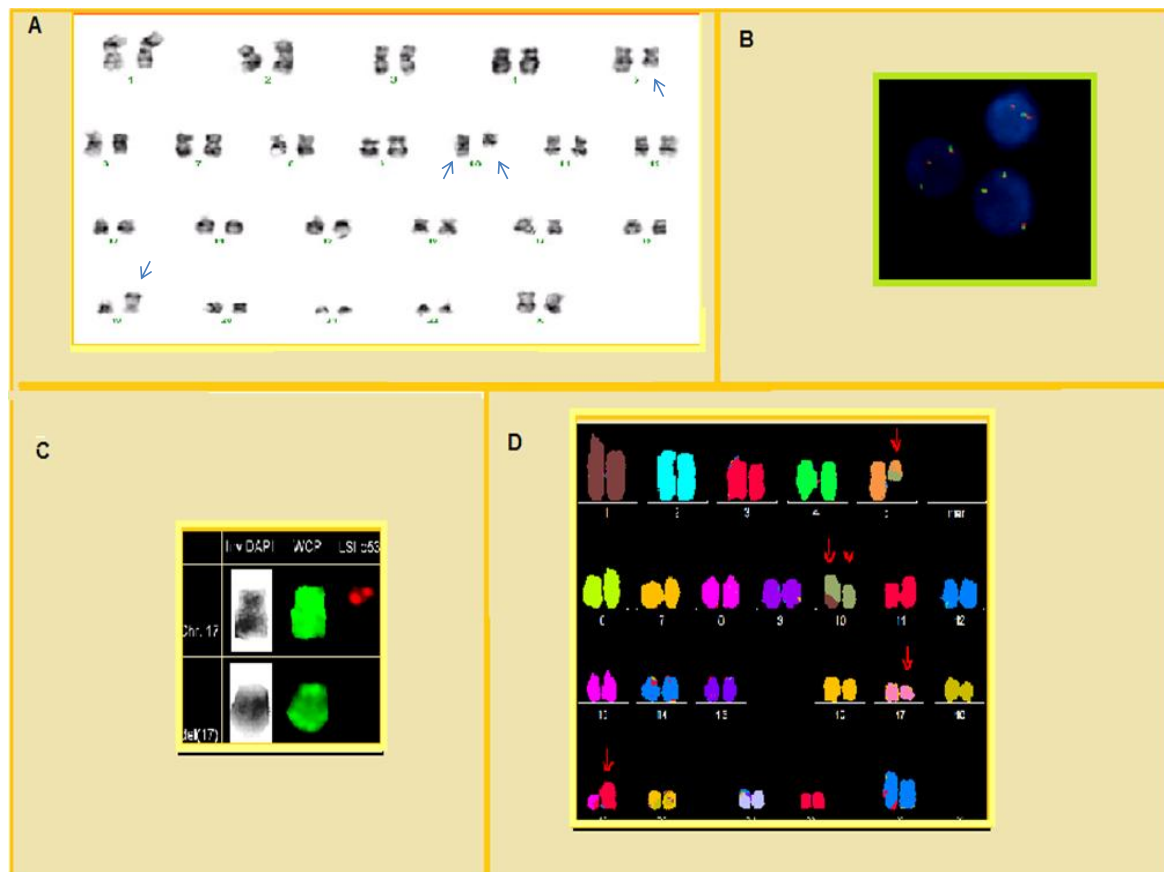


Figura 39 - Dados citogenéticos do caso 9 (LMA-M7 e Neurofibromatose).
A) Cariótipo complexo com del(5q),del(10q),der11,t(11;19) (q13; p13);
B) FISH mostra + 11q; **C)** FISH mostra a del (TP53);
D) M-FISH:46XX,der(5)t(5;10),der(10)(1;10),del(10)(q?),del(17)(p?),
 der(19)t(11;19).

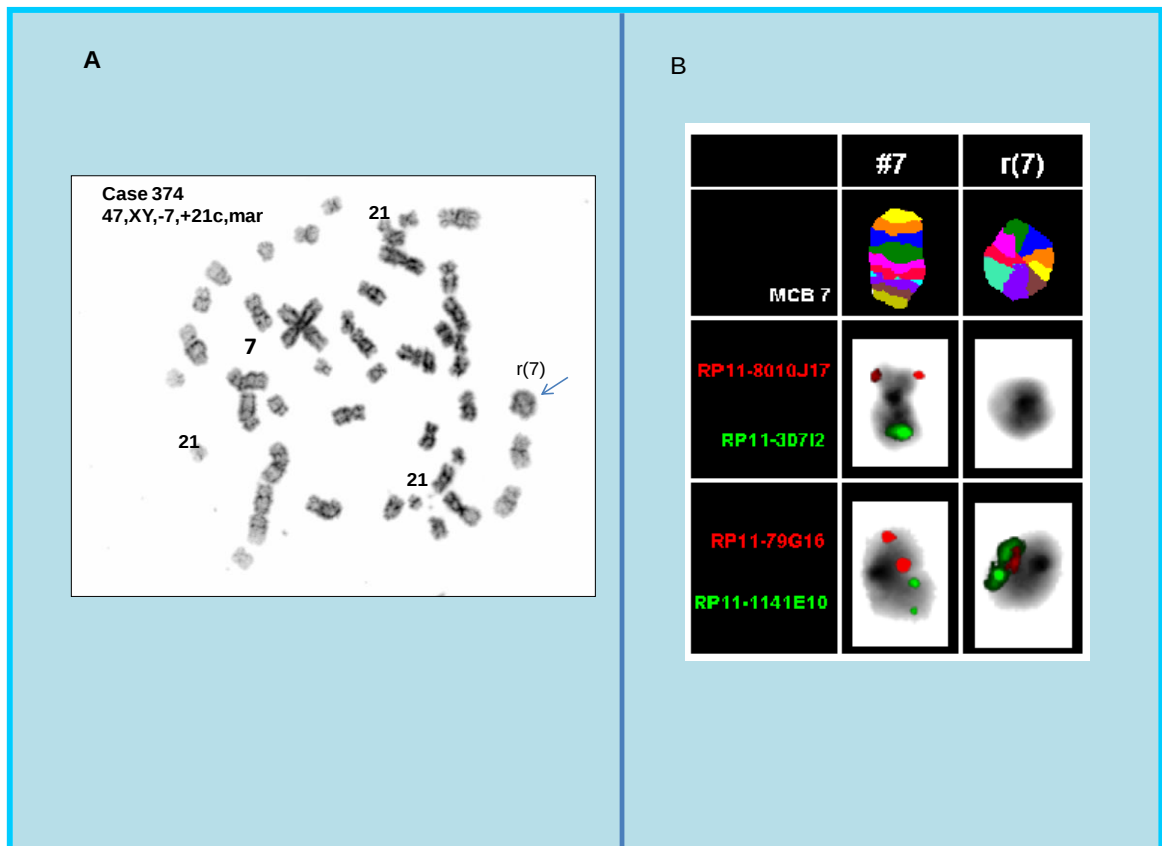


Figura 40 - Dados citogenéticos do caso 10 com SMD/LMA. **A)** Bandeamento G mostrando cariótipo parcial com r(7); **B)** MCB 7 mostra o r(7) e os BAC RP 1179G16 e RP 111141E10 a região de fusão no anel.

7. DISCUSSÃO

As leucemias que acometem os lactentes (LL) apresentam um desafio para oncologistas e citogeneticistas devido à marcante heterogeneidade na forma de apresentação clínica que está, provavelmente, ligada a diferentes anormalidades genéticas, susceptibilidade individual, assim como das células afetadas pela transformação maligna (Ross, 2000).

As LL são raras, existindo cerca de 30 casos por milhão de nascidos vivos / ano, representando 3-5% das leucemias da infância. Os tipos mais encontrados são as leucemias agudas (95%) que ocorre principalmente no sexo feminino. Enquanto nas leucemias em faixa escolar ocorre o tipo linfóide (4:1), nos lactentes a relação entre os tipos linfóide/mielóide é de 2:1 (Felix e Lange, 2006). Cerca de 5% a 10% das leucemias mielóide nos lactentes são síndromes mielodisplásicas (SMD) ou síndromes mieloproliferativas (SMP) (Luna-Fineman et al.,1999).

No Brasil, ainda não existe um estudo de base populacional para LL e não se conhece a real incidência da doença. Os lactentes representaram 2% e 2,3%, entre 590 e 688 crianças estudadas com LA pelo grupo brasileiro para tratamento de leucemia aguda na infância (GBTLI-93 e 99), respectivamente.

Os resultados dos estudos citogenéticos de 83 lactentes com leucemia em dois centros de referência para a doença, CEONHPE e CEMO/INCA-RJ, mostraram que 88% são leucemias agudas e 12% são SMD. A relação entre LLA/LMA foi 2:1 e diferentemente da literatura houve predomínio do sexo masculino na LMA, 2:1 e para LLA a relação foi 1M:1F (Felix e Lang, 2006).

Aproximadamente 75% das LL apresentam anormalidades cromossômicas com 1/3 dos casos apresentando translocações específicas. Estas translocações

estão associadas a certas características clínicas e biológicas (Pieters, 2003). Como as translocações são os principais fatores de impacto no prognóstico da doença, a análise citogenética é essencial na avaliação inicial dos pacientes com leucemia aguda (Watanabe et al., 2003).

Nas leucemias agudas do lactente (LAL), os estudos por bandeamento G (GBG) têm revelado que as anormalidades da região 11q23 ocorrem em 50% dos casos e, entre as anormalidades encontradas, as translocações são mais frequentes, (Pieters, 2003). No presente trabalho, o estudo citogenético por GBG realizado em 34/47 dos portadores de LLA e em 20/23 casos de LMA mostrou o envolvimento da região 11q23 em 38% e 50%, respectivamente, sendo as translocações 54% na LLA e 60% na LMA. A importância da busca das alterações biológicas na LAL, associada às translocações envolvendo a região 11q23 e os consequente rearranjo gênico, advém da provável natureza adquirida *in utero*, decorrente de substâncias ingeridas pela genitora com função de inibidores da topoisomerase II, à semelhança das leucemias secundárias decorrente de tratamento quimioterápico, além da gravidade, que está diretamente relacionada ao prognóstico da doença (Ross et al., 1995).

Os estudos genéticos têm permitido identificar alterações cromossômicas que estão diretamente relacionados a um determinado subtipo de leucemia. A clonagem de genes envolvidos em translocações cromossômicas tem mostrado que a maior consequência molecular das alterações cromossômicas é a criação de genes quiméricos, levando, desta forma, à produção de proteínas quiméricas que estão diretamente relacionadas à leucemogênese (Ayrton e Cleary, 2001). Estes estudos têm possibilitado a criação de estratégias terapêuticas moleculares

direcionadas para o rearranjo gênico, como é fato para os portadores de rearranjos gênicos *BCR/ABL* (Nashed et al., 2003).

O intrigante na LAL é como um único gene pode estar relacionado a diferentes tipos de leucemia? Determinadas circunstâncias fazem com que o gene *MLL* se torne envolvido em diversas translocações cromossômicas. Atualmente são descritos mais de 104 rearranjos diferentes e 64 proteínas de fusões foram identificadas (Meyer et al., 2009). Este gene, dependendo do tipo do cromossomo parceiro, se associa a um subtipo particular de leucemia, podendo explicar o papel das fusões gênicas na especificidade do fenótipo do tumor. A proteína quimérica, desta maneira, pode influenciar no tipo da leucemia, se a translocação ocorreu numa célula progenitora (Dobson, 1999).

As translocações mais frequentes descritas na LLA do lactente é a $t(4;11)$ e $t(11;19)$ que correspondem a 70% dos casos. A $t(4;11)$ parece ser exclusiva da LLA e o gene *AF4*, localizado na região 4q21, é o mais envolvido. Esta anormalidade é o protótipo da leucemia do lactente, acomete menores de 6 meses, cursa com leucometria muito elevada, visceromegalias, infiltração em SNC e prognóstico sombrio (Johansson et al., 1995). O mau prognóstico da $t(4;11)$ foi explicado por Xia et al. (2005) ao demonstrarem que a fusão *MLL-AF4* induz leucemia da célula hematopoética Totipotente, como na LMC. Este estudo não diferiu dos demais onde a $t(4;11)$ é a mais encontrada e com exceção do caso 4, todos lactentes eram menores de 6 meses (Heerema et al., 1994, Bardini et al., 2010). Se o rearranjo *MLL/AF4* per si é a causa da leucemia não se sabe, é provável que existam mutações adicionais, como é provável que a via molecular necessária para diferenciação celular linfóide apresente anormalidades (Dobson et al., 1999).

Sun et al. (1999), intrigados com a ocorrência de transcritos quiméricos em fígado e medula óssea de fetos e de lactentes normais, sugeriram que a fusão *MLL-AF4* pode ser necessária, mas não suficiente para transformação neoplásica dos precursores linfóides e concluíram que a expressão de algumas isoformas do gene *Ikaros* impede a localização de alguns genes na heterocromatina centromérica, sendo assim incapazes de silenciar genes específicos de linhagem, isto contribui para infidelidade, frequentemente observada na LAL. Neste contexto, Bardini et al. (2010) estudaram as aberrações cooperativas do gene *MLL*, como a perda de heterozigosidade, em lactentes e crianças mais velhas portadoras da t(4;11) e encontraram que os lactentes com LLA e rearranjo *MLL/AF4* apresentam uma doença biologicamente distinta. Enquanto que crianças mais velhas requerem um mecanismo com diversas etapas, com envolvimento de diversos genes, para transformação do completo fenótipo leucêmico, no lactente o rearranjo *per se*, tem maior papel na leucemogênese.

A segunda translocação mais encontrada na LLA do lactente é a t(11;19), que representa 13% das LAL (Moonrman et al.,1998). Para Gibbos et al. (1990), a t(11;19) é tão frequente quanto a t(4;11), encontradas em 7 e 6 casos respectivamente, entre 20 lactentes (0-18 meses de idade) de 311 crianças estudadas com LA. As LL com t(11;19) apresentam comportamento clínico semelhante aos com t(4;11), os pacientes apresentam alta contagem leucocitária, organomegalias e envolvimento do SNC. Os blastos são pró-B com marcadores mielóides, pré-B ou LMA, do subtipo LMA-M4 e M5, em contraste com a t(4;11), que só tem sido relatada em lactentes com LLA. Esta translocação apresenta dois diferentes pontos de quebra na região 19p13 (19p13.1 e 19p13.3) e, conseqüentemente, duas entidades clínicas, ambas envolvendo a região 11q23.

O envolvimento da região 19p13.1 está relacionado com a LMA, enquanto a região 19p13.3 está descrita em LLA, LMA, leucemias bifenotípicas e, mais raramente em LLA-T (Huret, 2010). No presente estudo a t(11;19)(q23;p13.3) foi encontrada em dois (6%) pacientes com LLA (casos 35 e 45). O caso 35 com cariótipo complexo e leucocitose moderada (37.000/mm³), que entrou em remissão e continua vivo, enquanto o paciente 45 com exagerada leucocitose (3.000.000/mm³), sem anormalidades citogenéticas adicionais, teve curta sobrevida, indo a óbito por doença progressiva.

Em portadores de LMA a t(9;11) representa 37% dos casos e o gene parceiro envolvido é o *AF9* (Prieto et al., 1990; Felix e Lange, 2006). Esta foi a principal translocação na LMA neste estudo e representou 67% dos casos. A t(9;11) tem grande importância, devido ao impacto no prognóstico. Apesar da presença do rearranjo do gene *MLL*, o tratamento é feito apenas com poliquimioterapia, não existe indicação de transplante de medula óssea. Estudos em camundongos, nos quais a t(9;11) foi induzida, mostraram que prévio ao desenvolvimento da leucemia aguda, existe uma fase de mieloproliferação. Estes dados sugerem que a doença, na maioria dos animais, se inicia com a proliferação de um pool de mieloblastos, do qual os precursores leucêmicos aumentam como resultado de mutações secundárias ou decorrente da formação de uma proteína *MLL* de fusão estável. Outro fato importante é que apenas uma pequena proporção dos casos com t(9;11) desenvolvem leucemia linfóide, sugerindo que a translocação cromossômica ocorre, não usualmente em uma célula progenitora mielóide comissionada, mas em um progenitor precoce, que mantém a habilidade de diferenciação ao longo das linhagens linfóide e mielóide e então originam qualquer tipo de leucemia. O período de latência destes casos

sugere que mutações secundárias deverão ocorrer antes da evidência da leucemia (Dobson et al., 1999).

A $t(1;11)$ foi a terceira translocação mais freqüente neste estudo, observada em dois casos de LMA (33%) e um caso de LLA (14%). Essa translocação envolveu a região 1(q21) nos casos de LMA-M4 e M5 e na LLA envolveu a região 1(p32). Neste tipo de translocação, o ponto de quebra na região 1q tem importância no fenótipo da doença. Cerca de 10 casos com $t(1;11)(q21;q23)$ foram descritos em lactentes e os fenótipos foram LMA M4/M5 e raramente LLA. A translocação se apresentou como única anomalia ou como derivativo do cromossomo 1, a exceção de um lactente com trissomia do 22, dois apresentavam translocação em três vias (*three way*), uma era portadora da síndrome de Turner, os outros casos não apresentavam anormalidades citogenéticas associadas (Colonge-Rame et al., 2005). O envolvimento da região 1p32 na $t(1;11)$ foi inicialmente descrita por Kaneko (1996) em dois pacientes com LLA, posteriormente outros casos foram descritos. A $t(1;11)(p32;q23)$ pode ocorrer em qualquer faixa etária e não apresenta um fenótipo específico, ou seja, pode ocorrer tanto em LLA como em LMA (Busson-Le et al., 1999).

Raimondi et al. (1995) ao estudar 14 pacientes com deleção 11q23 e três com $inv(11)(p13,q23)$ observaram que existe diferença para a patogenicidade e os mecanismos das translocações balanceadas e não balanceadas da região 11q23. Os pacientes com deleção sem rearranjo do gene *MLL* cursavam com leucometria mais baixa, não havia grandes visceromegalias e infiltração do SNC. Dessa forma, concluíram que as translocações não balanceadas da região 11q23 são de mau prognóstico, se houver rearranjo do *MLL*, em uma translocacão não visualizada pela citogenética convencional.

Nos portadores de LLA foram encontradas também translocações não relacionadas a região 11q23, tais como: t(1;19) e a t(9;22) e t(8;14). Estas translocações são descritas, normalmente, em crianças em idade escolar e em geral estão associadas a um subtipo e significância específica no prognóstico (Raimondi et al., 1993; Peter et al., 2009).

A t(1;19)(q23;p13) ocorre em 5% das leucemias da infância, em pré-escolar e em escolar. Está associada ao fenótipo pré-B e tem prognóstico discutível entre intermediário e ruim (Pui et al., 1995). A t(9;22) é descrita na LLA da infância em torno 3-5% das LLA e 1% das LMA, em geral, está associada a proteína p190, diferentemente da LMC que apresenta a p210. Esta translocacão, na maioria dos casos da LLA, indica mau prognóstico (Nashed et al., 2003). A t(8;14)(q24;q11) ocorre em apenas 0,5 a 1,3% de todos casos de LLA e 2% das LLA-precoces T e mais raramente em L-bifenótípicas (T e B). Esta translocacão é rara em lactentes, cursa com alta leucometria, envolvimento do SNC e cursa com mau prognóstico (Lange et al., 1992)

Emerenciano et al. (2000), investigando os aspectos clínicos e moleculares de 207 lactentes no Brasil, encontraram além dos rearranjos associados ao *MLL*, outros rearranjos, tais como: *ETV6/RUNX1* e *E2A/PBX1*. Os rearranjos *BCR/ABL*, *PML/RARA* e *AML-1/ETO* representaram 4%, 2% e 1%, respectivamente. Este estudo confirma que as alterações da região 11q23 são mais encontradas em crianças menores de 12 meses no Brasil, como em outras regiões do mundo, mas a medida que a criança vai crescendo as alterações envolvendo esta região vão diminuindo e surgindo novas alterações características de crianças maiores.

Além de translocações envolvendo a região 11q23, foram encontradas neste trabalho pacientes com deleção (casos 10,15,27,45) e inversão (caso 46)

associadas ou não ao rearranjo do gene *MLL*, corroborando com os dados da literatura (Raimond et al., 1995; Harbott, 1998). Algumas deleções podem ser visíveis pelo GBG, mas podem ocorrer deleções submicroscópicas, apenas vistas pela citogenética molecular, e nestes casos, o cariótipo é dito normal (Moon et al., 2007).

A análise citogenética convencional detecta alterações na região 11q23 em 46% das LLA e 45% das LMA (Lampert et al., 1992), mas há casos sem metáfases ou com metáfases insuficientes para análise e, ainda os casos com cariótipos complexos, translocações mascaradas e rearranjos crípticos, assim é de suma importância a aplicação de técnicas moleculares para precisar alterações cromossômicas, nesta população de pacientes.

Um cariótipo dito normal pode apresentar rearranjos através de estudos moleculares. Neste contexto, o cariótipo normal pode ser interpretado pelo menos de três maneiras (1) as células analisadas normais e as do clone leucêmico não estavam em divisão; (2) o cariótipo parecia normal, mas existiam inserções crípticas ou translocações indetectáveis pela citogenética convencional, podendo ser visíveis apenas por métodos citogenéticos moleculares (FISH, MCB); (3) o cariótipo normal por ambas as técnicas convencional e molecular. Assim um paciente com cariótipo normal, sem translocação da região 11q23, não significa, essencialmente, que o evento genético primário, como a fusão do *MLL*, não está presente nas células leucêmicas (Watanabe et al., 2003).

Uma importante alteração citogenética que sinaliza um falso diagnóstico, quanto ao rearranjo do *MLL*, é a ocorrência de translocações mascaradas, na qual a alteração principal não aparece, estando mascarada em outra translocação. Estes são casos de translocações envolvendo 3 ou mais

cromossomos, em três vias (three way), ou as translocações “jumping” que são translocações que envolvem diversos genes, pulando de um para outro, mascarando alguns (Cuthbert et al., 1999; Giugliano et al, 2001; Marques-Salles et al., 2009). As técnicas citogenéticas moleculares são essenciais para definição destes casos, na identificação dos cromossomos envolvidos, que na maioria dos casos não são visíveis pela citogenética convencional.

Neste trabalho, a investigação de alterações do gene *MLL* por FISH foi realizada em 63 lactentes com leucemia aguda: 40 com LLA, 19 com LMA e 3 com leucemia bifenotípica. Na LLA, 11 (65%) pacientes apresentaram rearranjo do gene *MLL*, três casos de deleção 11q23 (18%) e em dois (12%) superexpressão deste gene. Contudo no paciente 27, com del(11q23), não foram encontradas anormalidades do gene *MLL*. Nos pacientes com LMA, a FISH detectou 7 casos com rearranjo do gene *MLL* (37%) e um (5%) paciente com superexpressão. Nas leucemias bifenotípicas o rearranjo do gene *MLL* foi detectado no paciente 2. O paciente 3 com t(9;11) por GBG, o FISH não evidenciou anormalidades no gene *MLL*.

Moon et al. (2007) destacaram a importância do FISH ao estudar 223 pacientes com malignidades hematológicas, ressaltando que além das deleções submicroscópicas do gene *MLL*, as deleções de outros genes foram freqüentes. Dos cinco casos com LLA que apresentaram del(11q23) pelo bandeamento G, apenas o caso 45 teve material para estudo, neste paciente havia rearranjo do gene *MLL*, enquanto no paciente 7, sem análise pelo GBG, a FISH mostrou a deleção de um alelo deste gene.

Além da deleção 11q23 comumente encontrada, são descritas deleções submicroscópicas do tipo 3'MLL, na qual há perda do sinal vermelho(1F:1R/0G).

Segundo Barber et al. (2004), estes casos podem ser considerados translocação do *MLL* para um cromossomo parceiro, com posterior perda desta região. No caso 38, t(1;11)(q21;q23) a FISH mostrou uma deleção 3'*MLL*, além do rearranjo do gene *MLL*. O caso 47, com cariótipo normal, apresentou apenas a deleção 3'*MLL*.

Pais et al., (2005), investigando as alterações do gene *MLL* por FISH na LLA de lactentes, encontraram em 5% das células 2 sinais de fusão (2F) e 2 verdes extras (2G) com ausência do sinal vermelho (0R), indicando um raro padrão, enquanto a citogenética convencional mostrava alteração da região 11q23, e explicou que os sinais verdes extra, devem ser o resultado da duplicação do *MLL*, seguido por quebras na região 3' e auto fusão do 5' no *MLL* aberrante. No caso 10 foi observado um padrão de sinais 1G-2F, mas não havia metáfases suficientes para uma melhor investigação da alteração cromossômica nesse paciente.

A presença de 3 ou 4 sinais da fusão do gene *MLL* foi encontrada nos casos (8,10,12) de LLA e em em dois casos de LMA (casos 9 e 22). A superexpressão do gene *MLL* é definida como a presença de pelo menos uma cópia extra do gene *MLL*, que pode ser na forma de duplicação parcial *in tandem* (PTD). Esta alteração é descrita associada a trissomia do cromossomo 11, uma rara aneuploidia que é pouco detectada pela análise de citogenética convencional, necessitando assim de técnicas moleculares (Strout et al., 1998; Cox et al., 2003).

Outra importante anormalidade descrita é a amplificação intracromossômica da região 11q23 do gene *MLL*, reconhecida como região homogeneamente corada (hsr) ou na presença de múltiplas cópias do *MLL*, na

forma de duplo minutes (dmin), isocromossomo 11q, cromossomo mar ou der(11) e nas polissomias do 11. Anormalidades numéricas do cromossomo 11, tais como trissomias ou tetrassomias também podem resultar em cópias adicionais do gene *MLL* ocasionando superexpressão. Esta é uma nova entidade com patogenicidade descrita, principalmente, em portadores de LMA. Neste contexto, Arnauld et al. (2005), estudando 239 pacientes com LMA encontraram superexpressão em 20 pacientes (8,4%), sendo os sinais adicionais, em seis pacientes, decorrentes de trissomia do 11, havendo também um pequeno clone com tetrassomia, não detectado pela citogenética convencional.

A observação de pequenos marcadores supranumerários é intrigante e de difícil análise. Encontramos no lactente com LLA CALLA+ (caso 48) com um cromossomo diminuto que apresentou um sinal extra do gene *MLL* em 15% das células. O estudo do rearranjo *BCR/ABL* e gene *c-MYC* foram normais. Este lactente está vivo em remissão da doença (+ 77 meses).

Desta forma, a introdução de técnicas moleculares como M-FISH e MCB, associadas ao uso de sonda para genes específicos, sondas WCP, CEP e subteloméricas têm servido para identificar anormalidades anteriormente impossíveis de definição. Estas técnicas moleculares são utilizadas na tentativa de esclarecer marcadores, rearranjos crípticos ou pouco visualizados e translocações mascaradas. Para esta avaliação é necessário que os casos apresentem metáfases de regular a boa qualidade para serem analisadas. Estas metodologias puderam ser aplicadas em oito casos de LLA (31,35,38,39,40,41,45 e 46) e em sete casos de LMA (4,5,12,13,17,18,22) e nos três casos de leucemia bifenotípica e nas SMDs (2,4,6,8,9,10).

O MCB tem sido de grande importância uma vez que pode oferecer maior precisão das bandas e sub-bandas, ao mesmo tempo em que permite uma melhor visualização de inversões cromossômicas (Liehr et al., 2009). A paciente 46 com LLA e inv(11)(q23p13), além do FISH não evidenciar o rearranjo do *MLL*, o MCB para o cromossomo 11 não pode comprovar a inversão desta região. Havia escassez de metáfases para análise e o pequeno clone evidenciado na citogenética convencional, não pode ser detectado, o que podemos sugerir uma limitação da técnica. Infelizmente a paciente apresentou recaída e morreu de doença progressiva.

A importância do estudo citogenético molecular para desmascarar translocações e rearranjos crípticos foi bem exemplificada em alguns casos descritos neste estudo. O caso 35 com LLA e t(11;19) com dois cromossomos marcadores, cujos estudos por M-FISH e MCB identificaram dois marcadores envolvidos em translocações complexas, não visíveis pela citogenética convencional. No caso 41, uma lactente com LLA-CALLA, na qual o estudo citogenético por bandeamento G revelou trissomia 21 e adição na região 12p, a FISH com a sonda locus específica identificou o rearranjo *ETV6/RUNX1*. O uso das sondas WCP dos cromossomos 12 e 21, confirmou tetrassomia 21 e visualizou duplo rearranjo *RUNX1/ETV6* associado a deleção do gene *AML1*. Como havia uma adição 12p a aplicação do M-FISH pode desvendar o envolvimento do cromossomo 17q12 na translocação. A aplicação da sonda centromérica para os cromossomos 17 e 12 identificou cromossomo dicêntrico 12q e 17q. Normalmente a translocação t(12;21) ocorre em casos de LLA-CALLA, em crianças em fase escolar e cursa com bom prognóstico, mas alguns pacientes apresentam recidiva da doença. Atualmente, algumas alterações estão implicadas

no comportamento adverso da doença, como a duplicação do *RUNX1*, deleção do *AML1* e do *RUNX1*. Estas anormalidades só podem ser detectadas por técnicas de citogenética molecular (Peter et al., 2009). Outro exemplo foi do lactente 2 com leucemia bifenotípica e uma rara t(9;19) associada ao rearranjo do *MLL*, o uso do M-FISH e MCB do 11, pode demonstrar uma translocação em três vias t(9;11;19) (Anexo 3). Um caso semelhante foi o paciente 23 com LMA-M5Eo e t(1;16), onde a análise molecular mostrou que na realidade o paciente apresentava inv(16) com posterior t(1;16) (Anexo 3).

Apesar da associação entre anormalidades do cromossomo 7 e LMA ser um achado pouco freqüente (4-5% dos casos) na infância, as alterações podem ser na forma de deleção 7p/7q, monossomia ou translocações (Hasle et al., 2007). Em geral, os pacientes com LMA e monossomia 7 ou del(7q) tem prognóstico ruim, sendo necessário fazer tratamento com quimioterapia e transplante de medula óssea, na primeira remissão (Kalwinsky et al., 1990). Nesta casuística, dois pacientes com LMA apresentaram anormalidades do cromossomo 7. O caso 20 com LMA-M5 e cariótipo normal, a análise por MCB e sonda CEP/locus específica 7q, detectou uma deleção 7q em 50% das células. O caso 13, com LMA não especificada, o estudo por BGB mostrou um cariótipo complexo envolvendo o der(7q32), não havia metáfases para estudo molecular, não sendo possível demonstrar o cromossomo parceiro envolvido na translocação.

O Grupo Brasileiro de Síndrome Mielodisplásica da infância (GCB-SMD-PED) vem estudando crianças com SMD (Lopes e Lorand-Metze, 1999) e em 2006 Lopes e cols. publicaram um estudo com 93 crianças com SMD, avaliados pela leucometria entre outros critérios clínico-laboratoriais. Assim foram classificados 58 pacientes como SMD e 14 como LMMJ, neste trabalho não

houve menção aos casos de LMA em portadores de SD. A SMD tem uma taxa anual de 4,0 casos/milhão de crianças (Hasle et al., 1995; 2000). Dos 83 lactentes estudados neste trabalho, 10 (12%) tiveram seus diagnósticos baseados nos critérios da classificação da OMS para SMD. Sete eram portadores de SD, sendo cinco portadores de LMA-K e um LMA-M0, que corresponderam a 21% dos casos de leucemia mielóide do lactente. Um lactente com SD apresentou a MAT (caso 3) e assim como o caso 2, com LMMJ (anexo 3) foram classificados como SMD/SMP. O paciente 1 com AREB-t foi classificado como SMD.

A associação entre síndromes congênicas e hereditárias com leucemia em idade precoce tem sido descrita (Strahm e Malkin, 2006; Zwaan et al., 2010). No presente estudo, 11% (9/83) das leucemias estavam relacionadas a síndromes congênicas ou hereditárias. Sete lactentes eram portadores de SD, um paciente era portador de NF1 e outro de síndrome de Kostman.

Cerca de 5% a 10% das LMA no lactente se apresentam inicialmente como SMD ou SMP. Em geral, as SMD com anomalias do cromossomo 7, seja como monossomia ou del(7q), evoluem para LMA e tem prognóstico reservado. Nos portadores de SD-LMA, a anomalia do cromossomo 7 tem significado diferente dos não-SD. Há poucos relatos descritos de anomalias do cromossomo 7 em LMA-SD (Bunin et al., 1991). Um paciente descrito por Kobaysashi et al., (2005) com SD/LMA-K e r(7), foi precedido de um quadro de MAT e teve uma evolução rápida com refratariedade ao tratamento. O paciente 10 com SD e LMA-M0 do presente trabalho apresentou r(7) ao diagnóstico e o uso do MCB, mMCB e BAC do cromossomo 7 foi imprescindível para definição do cromossomo em anel, assim como, da região telomérica de fusão. Infelizmente, não pudemos avaliar o impacto

no prognóstico, pois o paciente foi a óbito por complicações infecciosas, na fase pós-indução do tratamento.

O risco dos portadores da SD evoluírem para leucemia aguda é 10-20 vezes maior, embora todas as crianças tenham trissomia 21, apenas 10% dos recém-nascidos desenvolvem MAT e menos de 1% desenvolvem leucemia aguda. Entretanto, estes pacientes têm um risco 600 vezes maior de desenvolver o subtipo M7 (LMA-K/SD). Há pouco conhecimento sobre as anormalidades constitucionais levando a leucemia, mas nestes casos, o papel do cromossomo 21 adicional no desenvolvimento da leucemia é apoiado pela observação que as células leucêmicas de lactentes, com mosaicismo da trissomia 21, estão seletivamente envolvidas no clone leucêmico. Por outro lado, tem sido descrito quebras de diversos genes no cromossomo 21 em leucemias. O gene *RUNX1*, localizado no 21q21, codifica um fator de transcrição e está envolvido em 25% dos casos de LLA da infância e em 15% das LMA, sendo essencial para hematopoese normal (Hasle et al., 2000). Como não foram detectadas mutações do gene *RUNX1* em LMA-K/SD, parece que as mutações deste gene, não estão envolvidas na patogênese da doença. Contudo, este achado não pode excluir um papel patogênico do aumento expressão do gene *RUNX1* no desenvolvimento da LMA-K na SD (Gurbuxani et al., 2004). Estas observações apóiam a teoria que a leucemogênese na SD, necessita também de várias etapas, na qual o progenitor adquire múltiplas lesões genéticas, durante a progressão para leucemia aguda. A trissomia 21 é o primeiro evento, mas não é suficiente para a expansão do megacarioblastos, vistos na MAT. A recente descoberta da mutação do gene *GATA1*, que ocorre muito precocemente, tanto no portador de MAT como LMA-K, sugere que a ruptura deste gene é essencial para segunda etapa no

desenvolvimento da leucemia na SD. É provável que a mutação do gene *GATA-1* leve ao bloqueio da diferenciação megacariocítica e que o aumento da expressão de outros genes no cromossomo 21, produza uma vantagem proliferativa (Hasle et al., 2000).

O motivo do quadro clínico de muitos pacientes com MAT remitem espontaneamente, pode ser explicado pela natureza das células hematopoéticas fetais serem de origem hepática. Este processo seria, então, resolvido com a perda deste microambiente, com o nascimento. Como estas células não são francamente leucêmicas, mas proliferantes, são levadas a adquirir mutações adicionais que, desta maneira, resultam em verdadeira na leucemia aguda. Fatores coadjuvantes a estes são as mutações adicionais do gene *TP53*, alteração na atividade da telomerase ou anormalidades cariotípicas adicionais, como a trissomia do cromossomo 8, além de mutações do gene *FLT3*, *NRAS/Kras* (Gurbuxani et al., 2004).

Um fato que chama atenção nos pacientes avaliados, portadores de síndromes congênitas e LMA-K, é que todos os casos analisados apresentaram cariótipos complexos com translocações envolvendo o cromossomo 1. Como foi descrito por Silva et al. (2009) ao descrever quatro destas crianças com SD com MAT e LMA-K. Nestes casos, além da trissomia do cromossomo 21, foi encontrada em três pacientes a mutação do gene *GATA-1*, associada a translocação não balanceada, envolvendo o cromossomo 1.

Várias síndromes hereditárias estão associadas com malignidade e decorrem de pelo menos quatro tipos de anormalidades gênicas: a) mutação celular de um protooncogene; b) inativação na linha germinativa de ambos alelos de um gene recessivo; c) anormalidades cromossômicas grosseiras e d)

inativação na linha germinativa de um alelo de gene supressor de tumor (Shannon,1998). No caso específico da NF1 existe um risco elevado para neoplasias mielóides, onde a perda do alelo *NF1* está associada a malignidade hematológica e a deleção da região 17(p13) ocorre como segundo evento. A mutação do gene *TP53* ocorre em menos de 10% dos casos de LMA e está frequentemente associada a del(17p13). A perda dos genes supressores de tumor, neurofibromina e *TP53*, ambos responsáveis pelo controle do ciclo celular, certamente contribuem para a célula se dividir descontroladamente, ocasionando leucemia (Marques-Salles et al., 2010). A paciente 9, com neurofibromatose (NF1) e LMA-K, apresentou cariótipo complexo com translocação envolvendo o cromossomo 1 e, entre outras anormalidades cariotípicas apresentou, der(11)t(11;19)(q13;p?) e del(17p) com deleção do gene *TP53* (Anexo 3). Atualmente é descrita a associação de cariótipo complexo e PTD (duplicação parcial *in tandem*), que em alguns casos estão relacionados com trissomia 11q, cariótipo complexo e pior prognóstico. Em muitos casos existe também del(5q), indicando a existência de uma associação coordenada entre o gene *TP53* e um provável gene supressor de tumor, localizado na região 5q que foi deletada (Lail et al., 1995).

Como os cariótipos nos portadores de LMA-K são complexos, técnicas como M-FISH e MCB e sondas específicas são imprescindíveis para definição completa dos cariótipos. Dessa forma, sugerimos que os lactentes, quando portadores de síndromes congênicas, como SD, ou hereditárias, como as Síndromes de Kostman, de Noonan e a neurofibromatose, sejam categorizados nos diferentes grupos de SMD.

8. CONCLUSÕES

1. Os resultados dos estudos citogenéticos nos portadores de LL nos dois centros de referências (CEONHPE e CEMO/INCA), não diferiram dos estudos Internacionais, nos quais predominam a t(4;11) na LLA e a t(9;11) na LMA. Entretanto, foram encontradas raras anormalidades nesta população, como a trissomia 14, a translocação mascaradas em três vias, t(11; 9;19), a inv 16 mascarada na t(1;16), e o cromossomo 7 em anel, entre outras.
2. Na LLA houve predomínio das anormalidades da região 11q23, principalmente da t(4;11) e deleção 11q23. Nas LMA, subtipos M4 e M5 as anormalidades citogenéticas encontradas foram t(9;11), cariótipos normais, anormalidade do cromossomo 7 e hiperdiploidia. Os portadores de SD com SMD apresentaram cariótipos complexos com anormalidades envolvendo o cromossomo 1.
3. As anormalidades citogenéticas na LLA variaram com a idade: 0 a 6 meses- t(4;11); entre 6 e 12 meses, outras anormalidades da região 11q23; maiores de 12 meses, anormalidades não relacionados a região 11q23, tais como, t(1;19), e hiperdiploidia, assim como cariótipos normais. Anormalidades do cromossomo 14 ocorreu entre 6 e 12 meses. Na LMA as anormalidades citogenéticas não teve predomínio em relação a idade. Além da t(9;11) e t(1;11) foram observados cariótipos normais, anormalidades do cromossomo 7 e hiperdiploidia.
4. A alteração cromossômica constitucional predominante foi a trissomia 21, encontrada em 7/10 pacientes com SMD.

5. Anormalidades no *gene MLL* ocorreu na LLA desde o período neonatal até os 12 meses, quando foi desaparecendo, enquanto na LMA ocorre após os 6 meses persistindo além dos 12 meses de idade;
6. Todos os cariótipos complexos e anormalidades crípticas puderam determinados usando técnicas adicionais como MCB, mMCB, M-FISH e de sonda genes específicas.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Alexander FE, Patheal SL, Biondi A, Brandalise S, Cabrera ME, Chan LC, Chen Z, Cimino G, Cordoba JC, Gu LJ, Hussein H, Ishii E, Kamel AM, Labra S, Magalhães IQ, Mizutani S, Petridou E, Pombo-Oliveira MS, Yuen P, Wielms JL and Greaves MF (2001). Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. *Cancer Research* 61: 2542-2546.
- Arnaud B, Douet-Guibert N, Morel F, Le Bris MJ, Herry A, Banzakour S, Bourquard P, Morice P, Le Calvez G, Marion V, Abgrall JF, Berthou C, De Braekeleer M (2005). Screening by fluorescence in situ hybridization for MLL status at diagnosis in 239 unselected patients with acute myeloblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 161: 110-115.
- Ayrton PM and Cleary ML (2001). Molecular mechanism of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene* 20:5695-5707.
- Aricò M, Biondi A and Pui C-H (1997). Juvenile Myelomonocytic Leukemia. *Blood*, 90: 479-488
- Aventín A, La Starza R, Casas S, Nomdedéu J, Queipo de Llano MP, Cimino G, Lo Coco F, Sierra JD and Mecucci C (2003). MLL tandem duplication in two cases of acute myelocytic leukemia with unbalanced translocations: der(16)t(11;16)(q23;p13) and der(18)t(11;18)(q22;p11.2). *Cancer Genet Cytogenet* 142: 8-12.
- Bain BJ (2001). The morphological, immunophenotypic, cytogenetic and molecular genetic (MIC-M) classification of acute leukemia. *Exp Oncol*. 23:11-16.
- Barber KE, Ford AM, Harris RL, Harrison CJ, Moorman AV. (2004). MLL translocations with concurrent 3' deletions: Interpretation of FISH results *Genes Chrom. Cancer*. 41(3):266-271.
- Bardini M, Spinelli R, Bungaro S, Mangano E, Corral L, Cifola I, Fazio G, Giordan M, Basso G, De Rossi G, Biondi A, C Battaglia, Cazzanig G (2010). DNA copy-number abnormalities do not occur in infant ALL with t(4;11)/MLL-AF4 Leukemia 24, 169–176.
- Behm FG, Raimondi SC, Frestedt JL, Liu Q, Crist WM, Downing, JR, Rivera GK, Kersey JH, Pui CH (1996). Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. *Blood* 87: 2870-287.
- Bennett J.M, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR and Sultan C (1976). Proposals for the classification of the acute leukemias French-American-British(FAB) cooperative group. *Brit. J. Haematol*. 33:451-458.
- Bennett J.M, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR and Sultan C (1991). Proposals for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol* 78:125-129.
- Bernhard WG, Gore I, Kibby RA (1951). Congenital leukemia. *Blood* 6: 990.
- Birke M, Schreiner S, García-Cuellar M-P, Mahr K, Titgemeyer F, Slany R K.(2002). The MT domain of the proto-oncoprotein MLL binds to CpG-containing DNA and discriminates against methylation. *Nucleic Acids Res* 30(4): 958-965.

- Blann MM, Morgan LD, Oblender M, Heinen B, Williams J and Tonk VS (2000). Duplication of 1q in a child with Down syndrome and myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 119:74-76.
- Busson-Le C M, Salomon-Nguyen F, Hillion J, Bernard OA, Berger R (1999). MLL-AF1q fusion resulting from t(1;11) in acute leukemia. *Leukemia*. 13 (2):302-306.
- Bunin N, Nowell PC, Belasco J, Shah N, Willoughby M, Farber PA, Lange B (1991) Chromosome 7 abnormalities in children with Down syndrome and preleukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 54(1):119-120.
- Carroll A, Civin C, Schneider N, Dahl G, Pappo A, Bowman P, Emami A, Gross S, Alvarado C, Phillips C, Krischer J, Crist W, Head D, Gresik M, Ravindranath Y and Weinstein H (1991). The t(1;22)(p13;q13) is nonrandom and restricted to infants with acute megakaryoblastic leukemia: a pediatric oncology group study. *Blood* 78: 748-752.
- Catovsky D, Matutes E, Buccheri V, Shetty V, Hanslip J, Yoshida N and Morilla R (1991). A classification of acute leukaemia for 1990s. *Ann Hematol* 62: 16-21.
- Chaganti RSK, Miller DR, Meyers PA and German J (1979). Cytogenetic evidence of the intrauterine origin of acute leukemia in monozygotic twins. *N Engl J Med* 300:1032-1034.
- Chan LC, Greaves MF and Mc Pelgram S (1985). Contribution of immunophenotyping to the classification and differential diagnosis of acute leukaemia. *Lancet* 1: 475 - 479.
- Cherif D, Der-Sarkissian H, Derré J, Tokino T, Yusuke N, Berge R (1992). The 11q23 breakpoint in acute leukemia with t(11;19)(q23;p13) is distal to those of t(4;11), t(6;11) and t(9;11). *Gene Chrom. Cancer* 4:107-112.
- Cimino G, Moir DT, Canaani O, Williams K, Crist WM, Katzav S, Cannizzaro L, Lange B, Novell PC, Croce CM, Canaani E (1991). Cloning of ALL-1, the locus involved in leucemias with t(4;11)(q21;q23) and t(11;19)(q23;p13) chromosome translocations. *Cancer Res*, 51: 6712.
- Cimino G, Rapanotti MC, Sprovieri T and Elia L (1998). ALL1 gene alterations in acute leukemia: Biological and clinical aspects. *Haematol*. 83:350-357.
- Chudoba I, Plesch A, Lorch T, Lemke J, Claussen U, Senger G (1999) High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 84: 156-160.
- Collonge-Rame MA 2005. t(1;11)(q21;q23). *Atlas Genet Cytogenet Oncol*. URL <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t111D1004.html>
- Couture JF, Collazo E, Trievel RC (2006). Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5. *Nature Struct. Mol. Biol.* 13, 698–703.
- Cox MC, Panetta P, Venditti A, Del Poeta G, Franchi A, Buccisano F, Tamburini A, Maurillo L, Amadori S (2003). Comparison between conventional banding analysis and FISH screening with an AML- specific set of probes in 260 patients. *The Hematology Journal*. 4: 263–270.
- Cuthbert G, McCullough S, Finney R, Breese G, Bown N. 1: *Genes Chromosome and Cancer* (1999). Jumping translocation at 11q23 with MLL gene rearrangement and interstitial telomeric sequences. *Gene Chrom. Ca* 24 (4):295-8
- Creutzig U, Ritter J, Vormoor J, Ludwig WD, Neimeyer C, Reinisch I, Stollmann-Gibbels B, Zimmermann M, Harbott J (1996). Myelodysplasia and acute myelogenous leukemia in Down's syndrome. A report of 40 children of the AML - BFM Study Group. *Leukemia* 10:1677-1686.

- Daser A and Rabbitts TH (2004). Extending the repertoire of mixed-lineage leukemia gene MLL in leukemogenesis. *Genes Dev* 18:665-674.
- de Jesus Marques-Salles T, Liehr T, Mkrtchyan H, Raimondi SC, Tavares de Souza M, de Figueiredo AF, Rouxinol S, Jordy Macedo FC, Abdelhay E, Santos N, Macedo Silva ML (2009). A new chromosomal three-way rearrangement involving MLL masked by a t(9;19)(p11;p13) in an infant with acute myeloid leukemia. *Cancer Genet.Cytogenet.*189(1):59-62.
- Dobson CL, Warren AJ, Pannell R, Forster A, Lavenir I, Corral J, Smith AJH and Rabbitts (1999). The MLL-AF9 gene fusion in mice controls myeloproliferation and specifies acute myeloid leukaemogenesis. *EMBO J* 18:3564-3574.
- Dou Y, Milne T A , Ruthenburg A J, Lee S , Lee J W , Verdine G L , Allis C D, Roeder R G (2004). Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nature Scrtut Mol Biol* 13:852-854.
- Emerenciano M, Agudelo Arias DP, Coser VW, de Brito GD, Macedo Silva ML, Pombo-de-Oliveira MS (2006). Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia. *Pediatric Blood Cancer* 47: 549-554.
- Ernst P, Fisher JK, Avery W, Wade S, Foy D,Korsmeyer SJ (2004). Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene in blood cell differentiation. *Dev Cell* 6: 437- 443.
- Fair K, Anderson M, Bulanova E, Mi H, Tropschug M, Diaz MO (2001). Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells. *Mol Cell Biol* 21:3589 - 3597.
- Felix CA and Lange BJ (2006). Leukemia in Infants. *The Oncologist* 4:225-240.
- Fong C and Brodeur GM (1987). Down's syndrome and leukemia. *Epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. Cancer Genet. Cytogenet.* 28: 55-76.
- Foon KA and Todd RF (1986). Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 68: 1-31.
- Fröhling S, Skelin S, Liebisch C, Scholl C, Schlenk RF, Dohner H et al. (2002). Comparison of cytogenetics and molecular cytogenetic detection of chromosome abnormalities in 240 consecutive adult patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*; 20: 2480–2485.
- Geenblatt MA, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54:4855-4878.
- Gibbons B, Katz FE, Ganly P, Chessels (1990). Infant acute lymphoblastic leukemia with t(11;19). *Br. J. Haematol* 74: 264-269..
- Giugliano E, Rege-Cambrin G, Scaravaglio P, Serra A, Wlodarska I, Emanuel B, Saglio G and Hagemeijer A (2001). MLL-AF6 fusion resulting from a new three-way translocation t(6;11;7) in a patient with acute myeloid leukemia *Leukemia*15(10) 1674-1676.
- Goldhamer, SM & Barnney, B.F (1936). Myelogenous leukemia with cutaneous involvement. *JAMA* 107:1041-1042.
- Greaves MF (1993). Stem cell. Origins of leukaemia and curability. *Br. J. Cancer* 67: 413- 423.
- Greaves MF (2003). Leukemia in twins: lesons in natural history. *Blood* 102(7); 321-2333.
- Green T (1996). Master regulator unmasked – hematopoiese - News and Views. *Nature* 383: 575-577.

- Gurney JG, Severson RK, Davis S, Robison L L (1995). Incidence of cancer in children in the United States: sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic types. *Cancer*.75: 2186-2195.
- Gurbuxani S, Vyas P, Crispino JD (2004). Recent insight into the mechanisms of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. *Blood* 103(2): 399-406.
- Haltrich I, Kost-Alimova M, Kovács G, Kriván G, Matáska J, Klein G, Fekete G and Imreh S (2006). Jumping translocation of 17q11-qter and 3q25-q28 duplication in a variant Philadelphia t(9;14;22)(q34;q32;q11) in a childhood chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Citogenet*. 164: 74-80.
- Harbott J, Verellen-Dumoulin CH, Moorman AV and Secker-Walker LM (1998). Hematological malignancies with a deletion of 11q23: cytogenetic and clinical aspects. *Leukemia*.12: 823-827.
- Hartley SE and Sainsbury C (1981). Acute leukemia and the same chromosome abnormality in monozygotic twins. *Human Genet*. 58: 408-410.
- Hasle H, Kerndrup G and Jacobsen BB (1995). Childhood myelodysplastic syndrome in Denmark: incidence and predisposing conditions. *Leukemia* 9: 1569-1572.
- Hasle H, Haunstrup C, Mikkelsen M (2000). Risk of leukaemia and solid tumors in individuals with Down's syndrome. *The Lancet*; 355. 165-169.
- Hasle H, Niemeyer CM, Chessels JM, Baumann I, Bennett JM, Kerndrup G and Head DR (2003). A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia* 7:277-82.
- Hasle H, Alonzo TA, Auvrignon A, Behar C, Chang M, Creutzig U, Fischer A, Forestier E, Fynn A, Haas O A, Harbott J, Harrison C J, Heerema N A, van den Heuvel-Eibrink M M, Kaspers GJL, Locatelli F, Noellke P, Polychronopoulou S, Ravindranath Y, Razzouk B, Reinhardt D, Savva NN, Stark B, Suciu S, Tsukimoto I, Webb DK, Wojcik D, Woods W G, Zimmermann M, Niemeyer C M., Raimondi S C (2007). Monosomy 7 and deletion 7q in children and adolescents with acute myeloid leukemia: an international retrospective study. *Blood* 109 (11):4641-4647.
- Heerema NA, Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, Lee MK, Hutchinson R, Lange BJ, Steinherz PG, Bostrom B, Gaynon PS and Uckun F (1999). Hypodiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Cancer Group. *Blood* 94: 4036-4045.
- Heerema NA, Arthur DC, Sather H, Albo V, Feusner J, Lange BJ, Steinherz PG, Zeltzer P, Hammond D and Reaman GH (1994). Cytogenetic features of infants less than 12 months of age at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia: Impact of the 11q23 breakpoint on outcome: A report of the children's cancer group. *Blood*. 83: 2274-2284.
- Heim S and Mitelman F *Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells*. 2nd Ed., by Wiley-Liss, Inc. USA. 1995. 536pp.
- Hengstler JG, Heimerdinger CK, Schiffer IB, Gebhard S, Sangemüeller, Tanner B, Bolt HM and Oesch F (2002). Dietary topoisomerase II-poisons: contribution of soy products to infant leukemia? *EXCLI Journal* 1:8-14.
- Hess JL, Zutter MM, Castleberry RP and Emanuel PD (1996). Juvenile chronic myelogenous leukemia. *Am J of clin pathol* 105:238-248.

- Hitzer JK, Cheung J, Li Y, Scherer SW, Zipursky A(2003). Gata 1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood* 101(11): 4301- 4304
- Hogge DE (1994). Cytogenetics and oncogenes in leukemia. *Curr Opin in Oncol.* 6:3-13.
- Hsieh JJ, Ernst P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ (2003). Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Mol Cell Biol.* 23: 186-194.
- Hunger SP, Mc Gavran L, Meltesen L, Parker NB, Kassenbrock CK and Bitter MA (1998). Oncogenesis in utero: fetal death due to acute myelogenous leukaemia with an MLL translocation. *Br. J. Haematol.* 542: 103-542.
- Huret JL. MLL (myeloid / lymphoid or mixed lineage leukemia). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* October 2005. URL [http:// www.infobiogen.fr/services/chromacancer/anomalies/11q23ID1030.html](http://www.infobiogen.fr/services/chromacancer/anomalies/11q23ID1030.html).
- Huret JL. t(11;19)(q23;p13.3). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* July 2010. URL: [http:// AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t1119ENL.html](http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t1119ENL.html)
- Ida K, Kitabayashi I, Taki T, Taniwaki M, Noro K, Yamamoto M, Ohki M, Hayashi Y(1997) Adenoviral E1A associated protein p300 is involved in acute myeloid leukemia with t(11; 22) (q23;q13). *Blood* 90:4699-4704.
- Isoyama K, Eguchi M, Hibi S, Kinukawa N, Ohkawa H, Kawasaki H, Kosaka Y, Oda T, Oda M, Okamura T, Nishimura S, Hayashi Y, Mori T, Imaizumi M, Mizutani S, Tsukimoto I, Kamada N, Ishii E (2002). Risk-directed treatment of infant acute lymphoblastic leukaemia based on early assessment of MLL gene status: results of the Japan Infant Leukaemia Study (MLL 96). *Br J Haematol.* 118(4):999-1010
- Israel MA. Molecular and cellular biology of pediatric malignancies. In: *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* 3 ed, Philadelphia: Ed. J.B Lippincon Company, 1997. pag. 39-64.
- ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Cytogenetic & Genome Research). Editors: Shaffer LG and Tommerup N. Ed. Karger.
- Johansson B, Moorman AV, Haas AA, Watmore AE, Cheung KL, Swanton S and Secker-Walker LM (1998). Hematologic malignancies with t(4;11)(q21;q23). A cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. *Leukemia* 12: 779-787.
- Kalwinsky DK, Raimondi SC, Shell MJ et al. Prognostic importance of cytogenetic subgroups in de novo pediatric acute nonlymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1990;8:75-83.
- Kaneko Y, Maseki N, Takasaki N, Sakuri M, Hayashi Y, Nakazawa S, Mori T, Sakuri M, Takeda T, Shikano T, Hiyoshi Y(1986). Clinical and Hematologic Characteristics in Acute Leukemia with 11q23 Translocations. *Blood* 67(2):484-491.
- Kelleher JF and Carbone TV (1991). Monosomy 7 syndrome in an infant with neurofibromatosis. *The Am J of Pediat Hematol/Oncol.* 13:338-341.
- Kobayash k-i, Usamia I, Kubotaa M, Nishioa T, Kakazub N Chromosome 7 abnormalities in acute megakaryoblastic leukemia associated with Down syndrome(2005) *Cancer Genet and Cytogenet.*158 (2):184-187.
- Kobayashi H, Espinosa III, Thirman MJ, Gill HJ, Anthony A F, Diaz M O, Le Beau MM, Rowley JD. (1993). Heterogeneity of Breakpoints of 11q23

- Rearrangements in Hematologic Malignancies Identified With Fluorescence In Situ Hybridization. *Blood* 82: 547-551.
- Kratz C P, Niemeyer C M., Castleberry R P, Cetin M, Bergsträsser E, Emanuel P D, Hasle H, Kardos G, Klein C, Kojima S, Stary J, Trebo M, Zecca M, Gelb B D, Tartaglia M, and Loh M L (2005). The mutational spectrum of PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome/ myeloproliferative disease. *Blood*. 106(6): 2183–2185.
- Krivtsov AV & Armstrong SA (2007). MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nature Rev. Ca.* 7:823-833.
- Lail JL, Preudhomme C, Zandecki M, Flactif M, Vanrumbeke M, Leppeley P i JL, Wattel E, Fenaux P. (1995). Myelodysplasia syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion: an entity characterized by specific disgranulopoiesis and high incidence of P53 mutations. *Leukemia* 9:370-381.
- Lampert F, Harbott J and Ritterbach J (1992). Cytogenetic findings in Acute Leukaemias of Infants. *Br J Cancer* 66: 520-522.
- Lange BJ, Raimondi SC, Heerema N, Nowell PC, Minowada J, Steinherz PE, Arenson EB, O'Connor R, Santoli D (1992). Pediatric leukemia/lymphoma with t(8;14)(q24;q11) Leukemia; 6:613-8
- Li Z, Godinho FJ, Klusmann JH, Garriga- Canut M, Yu C, Orkin SH (2005). Developmental stage-selective effect of somatically mutated leukemogenic transcription factor GATA-1. *Nat Genet.* 37 (6): 613-619.
- Li Z-Y, Liu D-P, Liang C-C (2005). New insight into the molecular mechanisms of MLL- associated leukemia. *Leukemia* 19:183-190.
- Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, ALMA Kuechler A, Claussen U (2002). Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *International Journal of Molecular Medicine* 9: 335-339.
- Liehr T, Mrasek K, Kosyakova N, Mkrtchyan H, Melo J, Polityko A, Brecevic L. *Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) - Application Guide Multiplex FISH and Spectral Karyotyping*. Capter 1. Pag 175-180, 2009.
- Lion T, Haas O.A, Harbott J, Bannier E, Ritterbach J, Jankovic M, Fink M, Stojimirovic A, Herrmann J, Riehm HJ, Lampert F, Ritter J, Koch H and Gadner H (1992) The t(1;22)(p13;q13) is nonrandom marker specifically associated with a megakaryoblastic leukemia in young children. *Blood*. 79: 3325-3330.
- Lopes LF and Lorand-Metze I (1999). Childhood myelodysplastic syndrome in a Brazilian population. *Pediatr Hematol Oncol* 16:347-353.
- Lopes LF; lorand-Metze I, Mendes WL, Seber A, Melo LN (2006). Síndrome mielodisplásica na infância- Rev. bras. hematol. Hemoter 28(3):226-237.
- Lowengart RA, Peters J.M, Cicioni C, Buckely J, Bernstein L, Preston-Martin S and Rappaport E (1987). Childhood leukemia and parents' occupational and home exposures- *JNCI*. 79: 39-46.
- Luna-Fineman S, Shannon KM, Lange BJ (1995). Childhood monosomy 7: epidemiology, biology and mechanistic implications. *Blood*; 85:1985-1999.
- Magli MC, Largman C, Lawrence HJ (1997). Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation. *J Cell Physiol*. 173:168-177.
- Mahmound HH, Ridge SA, Behm FG, Pui CH, Ford AM, Raimondi SC and Greaves MF (1995). Intrauterine monoclonal origin of neonatal concordant acute lymphoblastic leukemia in monozygotic twins. *Medic and Pediatr Oncol*. 24:77-78.

- Malkin D, Brown EJ, Zipursky A. (2000) The role of p53 in megakaryocyte differentiation and the megakaryocytic leukemias of Down syndrome. *Cancer Genet Cytogenet.* 116:1-5.
- Martin ME, Milne TA, Bloyer S, Galoin K, Shen W, Gibbs D Brock HW, Slany R, Hess JL (2003). Dimerization of MLL fusion proteins immortalizes hematopoietic cells. *Cancer Cell* 4:197-207.
- Marques Salles TJ, Mkrtchyan H, Leite EP, Soares-Ventura EM, Muniz MTC Silva E F, Liehr T, Silva MLM, Santos N (2010). Complex karyotype defined by molecular cytogenetic FISH and M-FISH in an infant with acute megakaryoblastic leukemia and neurofibromatosis. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 200:167-169
- Marschalek R, Nilson I, Löchner K, Greim R, Siegler G, Greil J, Beck JD and Fey HG (1997). The structure of the human *ALL-1/MLL/HRX* gene. *Leuk and Lymph.* 27: 417- 428.
- Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, Ben Abdelali R, Macintyre E, De Braekeleer E, De Braekeleer M, Delabesse E, de Oliveira MP, Cavé H, Clappier E, van Dongen JJ, Balgobind BV, van den Heuvel-Eibrink MM, Beverloo HB, Panzer-Grümayer R, Teigler-Schlegel A, Harbott J, Kjeldsen E, Schnittger S, Koehl U, Gruhn B, Heidenreich O, Chan LC, Yip SF, Krzywinski M, Eckert C, Möricke A, Schrappe M, Alonso CN, Schäfer BW, Krauter J, Lee DA, Zur Stadt U, Te Kronnie G, Sutton R, Izraeli S, Trakhtenbrot L, Lo Nigro L, Tsauro G, Fechina L, Szczepanski T, Strehl S, Ilencikova D, Molkentin M, Burmeister T, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R (2009). New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*, 23, 1490–1499.
- Milne T A, Dou Y, Martin M E, Brock H W, Roeder R G, Hess JL (2005). MLL associates specifically with a subset of transcriptionally active target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14765-14770.
- Moon HW, Chang YH, Kim TY, Oh BR, Min HC, Kim BK, Ahn HS, Cho HI, Lee DS(2007). Incidence of submicroscopic deletions varies according to disease entities and chromosomal translocations in hematologic malignancies: investigation by fluorescence in situ hybridization *Cancer Genet Cytogenet.* 174 (2):127-31.
- Okada Y, Feng Q, Lin Y, Jiang Q, Li Y, Coffield V M, Su L, Xu Gu, Zhang Y (2005). hDOT1L Links histone methylation to leukemogenesis. *Cell.* 121:167-178.
- Paisa A, Kadama P A, Raje G, Sawanta M, Kabrea S, Jain H, Advanib S, Banavali S (2005). Identification of various MLL gene aberrations that lead to MLL gene mutation in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and infants with acute leukemia. *Leukemia Research*: 29:517-526.
- Paulsson K, Johansson B (2005). High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosom Cancer*: 48(8):637-60.
- Pedersen-Bjergaard J & Rowley JD (1994). The balanced and unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and contribute differently to malignant transformation. *Blood* 83: 2780-2786.
- Peter A, Heiden T, Taube T, Köner G, Seeger K (2009). Interphase FISH on TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukaemia relapse- analysis of clinical relevance of additional TEL and AML1 copy number changes. *Eur J Haematol* 83:420-432.
- Pierce, M. I. Leukemia in the newborn infant. *J Pediatr.* 54: 691-706 1959.

- Pieters R. Biology and treatment of infant leukemia in news directions for clinical research. Human Press. New Jersey pg 61(2003).
- Peter A, Heiden T, Taube T, Köner G, Seeger K (2009). Interphase FISH on TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukaemia relapse- analysis of clinical relevance of additional TEL and AML1 copy number changes. *Eur J Haematol* 83:420-432.
- Pombo-de-Oliveira MS, Awad EL, Forono L, Matutes E, Morilla R, Luzzato L, Catovsky D (1986). Lymphoblastic leukaemia in siamese twins: Evidence for identity. *The Lancet* 25: 123-124.
- Prieto F, Palau F, Badia L, Beneyto M, Perez-Sirvent ML, Orts A, Castel V (1990). 11q23 Abnormalities in children with acute nonlymphocytic leukemia (M4-M5) – association with previous chemotherapy. *Cancer Genet Cytogenet* 45: 1-11.
- Pui CH, Kane JR and Crist WM (1995). Biology and treatment of infant leukemias. *Leukemia* 9: 762-769.
- Quesnel S and Malkin D (1997). Genetic predisposition to cancer and familial cancer syndromes. *Pediatr. Clin. N. Am.* 44(4): 791-808.
- Raimondi SC (1993). Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 81: 2237-2251.
- Raimondi SC, Roberson KP, Pui, C-H, Behm FG., Rivera GK. (1992). Hyperdiploid (47-50) Acute Lymphoblastic Leukemia in Children *Blood*, 79 (12):3245-3252.
- Raimondi SC, Frestedt JL, Pui CH, Downing JR, Head DR, Kersey JH and Behm FG (1995). Acute lymphoblastic leukemia with deletion of 11q23 or a novel inversion (11) (p13q23) lack MLL gene rearrangements and have favorable clinical features. *Blood* 86: 1881-1886.
- Resnik KS and Brod BB (1993). Leukemia cutis in congenital leukemia. Analysis and review of the world literature with report of an additional case. *Arch Dermatol.* 129(10):1301-1306. Review.
- Ribeiro RC & Pui CH (1993). Prognostic factors in childhood acute lymphoblastic. *Hematol Pathol* 7: 121-142.
- Ribeiro RC, Oliveira MSP, Fairclough D, Hurwitz C, Mirro J, Behm FG, Head DR, Silva MLM, Raimondi SC, Crist WM and Krance R (1993). Acute megakaryoblastic leukemia in children and adolescents: a retrospective analysis of 24 Cases. *Leuk and Lymph* 10: 299-306.
- Richardson C and Jasin, M (2000). Frequent chromosomal translocations induced by DNA Double-strand breaks. *Nature*:405:697-700.
- Rinsky RA, Smith A B, Hornung R, Filloon TG, Young R.J, Okun AH and Landrigan PJ (1987). Benzene and leukemia. An epidemiologic risk assessment. *N. Engl J Med.* 316:1044-50.
- Ross JA, Potter JD and Robison LL (1995). Infant leukemia, topoisomerase II inhibitors, and the MLL gene. *JNCI.* 86: 1678-1680.
- Rowley JD, Reshmi S, Sobulo O, Musvey T, Anastasi J, Raimondi S, Schneider NR, Barredo JC, Cantu ES, Schlegelberger B, Behm F, Doggett NA, Borrow J, Zeleznik-Le N (1997). All patients with the t(11:16)(q23;p13.3) that involves MLL and CBP have treatment - related hematologic disorders. *Blood* 90:535-541.
- Rozovskaia T, Rozenblatt-Rosen O, Sedkov Y, Burakov D, Yano T, Nakamura T, Petruck S, Ben-Simchon L, Croce C M, Mazo A, Canaani E (2000). Self-association of the SET domains of human ALL-1 and of Drosophila TRITORAX and ASH1 proteins. *Oncogene* 19:351-357.

- Schichman SA (1994). ALL1 partial tandem duplication in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6236-6239.
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell, Wienberg, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-AM I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996). Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*.273: 494-497.
- Seabright M (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-972.
- Secker-Walker LM. (1998) General report on the European Union Concerted Action Workshop on 11q23. *Leukemia* 12: 776-778.
- Shannon KM, O'Connell P, Martin GA, Paderanga D, Olson K, Dinndorf P, McCormick F (1994) Loss of the normal NF1 allele from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant myeloid disorders. *N Engl J Med*. 330:597-601.
- Shannon K (1998) Genetic Predispositions and Childhood Cancer. *Environ Health Perspect.*;106 (3):801-816
- Silva MLM, Brito GD, Simões F, Otero L, Land MGPL, Guerra MC, Marques-Salles TJ, Oliveira-de-Pombo MS (2001) A new case of t(5;15)(p15;q11-q13) in infant acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 130:87-88.
- Silva MLM, Raimond S, Abdelhay E, Gross Madeleine, Mkrtch H, Figueiredo A F, Ribeiro RC, Marques-Salles TJ, Sobral ES, Land MPG, Liehr T (2008). Banding and molecular cytogenetic studies detected a CBFB-MYH11 fusion gene that appeared as abnormal chromosomes 1 and 16 in a baby with acute myeloid leukem FAB M4-E. *Cancer Genet Cytogenet*.182: 56-60.
- Silva ML M, Pombo-de-Oliveira M S, Raimondi S C, Mkrtchyan H, Abdelhay E, Figueiredo A F, Souza M T, Garcia D RN, Soares de Ventura E M, Sousa A M, Liehr T (2009). Unbalanced chromosome 1 abnormalities leading to partial trisomy1q in four infants with Down syndrome and acute megakaryocytic leukemia. *Molecular Cytogenetics* 2(7):1-6.
- Simone F, Polack PE, Kaberlein JJ, Luo RT, Levitan DA, Thirman MJ (2001). EAF1, a novel ELL associated factor that is delocalized by expression of the MLL-ELL fusion protein. *Blood* 98:201-209.
- Slany RK (2005). Chromatin control of gene expression: Mixed-lineagen leukemia methyltransferase SETs the stage for transcription. *PNAS*. 102(41):14481-14482. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0507401102.
- So CW & Cleary ML (2003). Common mechanism for oncogenic activation of MLL by forkhead family proteins. *Blood* 110:633-639.
- So CW, Lin M, Ayton PM, Chen EH, Cleary ML (2003). Dimerização contribute to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell* 4:99-110.
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet*. 1996 12(4):368-75.
- Starke H, Raida M, Trifonov V, Clement JH, Locanveric IF, Heller A., Bleck C, Nietzel A, Rubtsov N, Claussen U, Liehr T (2001). Molecular cytogenetic Characterization of an acquired minute supernumerary marker chromosome as sole abnormality in a case clinically diagnosed as atypical Philadelphia negative chronic myeloid leukemia(2001) *British Journal of Hematology* 113: 435-438.

- Steward, MM, Lee J-S, O'Donovan A, Wyatt M, Bernstein BE, Shilatifard A (2006). Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nature Struct. Mol. Biol.* 13: 852–854.
- Strahm B and Malkin David. Hereditary cancer predisposition in children: Genetic basis and clinical implications(2006) *Int. J. Cancer*: 119, 2001–2006.
- Strissel PL, Strick R, RowleyJD, Zeleznik-Le NJ (1998). An *in vivo* topoisomerase II cleavage site and a DNase I hypersensitive site colocalize near exon 9 in MLL breakpoint cluster region. *Blood* 92: 3793 – 3803.
- Sun L, Heerema N, Crotty L, Wu X, Navara C, Vassilev A, Sensel M, Reaman GH and Uckun FM (1999). Expression of dominant negative and mutant isoforms of antileukemic transcription factor ikaros in infant acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl.Acad. Sci.USA* 96: 680-685.
- Taub JF (2004) Down syndrome and Leukemia – it's in the cards. *Blood* 103: 2434.
- Testa JR, Misawa S, Oguma N, van Slaten,K and Wiernick, PH (1985). Chromosomal alterations in acute leukemia patients studied with improved culture methods. *Cancer Res* 45: 430-434.
- Tkachuk DC, Kohler S and Cleary ML (1992). Involvement of homologous drosophila Trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 71: 691-700.
- Xavier AC, Ge Y and Taub JW. (2009). Down syndrome and malignancies: a unique clinical relationship: a paper from the 2008 william beaumont hospital symposium on molecular pathology.
- Xia ZB, Anderson M, Diaz MO, Zeleznik-Le NJ (2003). MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the co repressor C-terminal-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*.100:8342-8347.
- Watanabe N, Kobayashi H, Ichiji O, Yoshida MA, Kikuta A, Komada Y, Sekine I, Horiukoshi Y, Tsunematsu Y, Yano M, Nakadate H, Kaneko Y (2003). Cryptic insertion and translocation or nondividing leukemic cells disclosed by FISH analysis in infant acute leukemia with discrepant molecular and cytogenetic findings. *Leukemia*. 17:876-882.
- Yeilipek MA, Lüleci G, Velipaaolu S, Berker S and Yeiü O (1994). Monosomy 7 myelodisplasia in childhood: two cases reports. *Acta Haematologica* 92:36-38.
- Yokoyama A, Wang Z, Wysocka J, Sanyal M, Aufiero DJ, Kitabayashi I, Herr W, Cleary ML (2005). Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1- like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol* 24(13):5639-49.
- Ziermin van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa RIII, Patel Y, Harden A, Rubinelli P, Smith SD, LeBeau M, Rowley JD and Diaz MO (1991). Identification of a gene MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocation associated with human leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 8: 10735-10739.
- Zipursky A, Thorner P, De Harven, Christesen H, Doyle J (1994). Myelodisplastic and acute megakarioblastic leukemia in Down's syndrome. *Leuk Res*. 18:163-171.
- Zipursky A (2003).Transient leukemia- a benign form of leukaemia in newborn infants. *Br J Haematol*120:930-938.
- Zussman WV, Khan A and Shayesteh P (1967). Congenital Leukemia. *Cancer*. 20:1227-1233.

- Zubizarreta P, Sackmann FM, Barbieri MAF (1995). Transient Myeloproliferative Disorder Associated With Trisomy 21, a Wide Range Syndrome: Report of Two Cases with Trisomy 21 Mosaicism. *Medical and Pediatric Oncology* 25:60-64.
- Zwaan CM, Reinhardt D, Hitzler J, Vyas P (2010). Acute leukemias in children with Down syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am.* 24(1):19-34.

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1 - Aprovação do projeto “Estudo Citogenético nas Leucemias do Lactente” no Comitê de Ética do Hospital Universitário Osvaldo Cruz (HUOC).



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Pavilhão Ovidio Montenegro – 1º andar

Rua Arnóbio Marques, 310 – Santo Amaro – 50100-130 – Recife-PE.

Fone: (81) 2101.1530 – Fone/Fax: (81) 2101.1536

E-mail: cep@huoc.org.br

Reunido: 11/12/2007

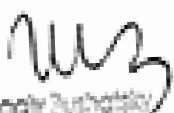
Projeto CEP/HUOC 153/2007

Projeto: “Estudo citogenético nas leucemias do lactente”

Pesquisador Principal: Terezinha de Jesus Marques Salles

Resultado:

- Projeto de pesquisa APROVADO.


Magaly Burchett
Coordenadora de Residência
de Enfermagem HUOC/USC
Matr.: 5439 - CDEEN 41434

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo Citogenético nas Leucemias do Lactente

Nome do Responsável: _____

Você, em breve, será submetido a um estudo citogenético. Por isso está sendo convidado a participar de uma pesquisa que envolve análise cromossômica de células de aspirado de medula óssea ou de sangue periférico.

Os estudos citogenéticos são coadjuvantes no diagnóstico morfológico e de um fator de risco de recaída da doença. Além disso, estes estudos são a base fundamental para detectar genes envolvidos na leucemogênese e contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde inclui o diagnóstico citogenético de pacientes com hemopatias malignas para classificar o diagnóstico clínico e o risco de recaída da doença.

Este estudo contribuirá como desenvolvimento clínico, diagnóstico e experimental dos pacientes com leucemia mielóide aguda da infância.

Para você decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DO ESTUDO

Realizar um estudo tipo série de casos (retrospectivo e prospectivo) para identificar e caracterizar as alterações cromossômicas em pacientes com leucemia do latente, atendidos no Centro de Oncohematologia Pediátrica (CEONHPE) do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) - Recife e no Laboratório de Citogenética do CEMO/INCA no período de Julho de 2000^a agosto de 2010.

PROCEDIMENTO DO ESTUDO

Se você concordar em participar deste estudo citogenético será coletado 2 amostras do seu aspirado de medula óssea, pelo procedimento de punção de medula óssea ou sangue periférico numa quantidade variante de 5 a 10 mililitros (referente a uma colher de sopa) para serem submetidas a exame de citogenética. A amostra de aspirado de medula óssea ou sangue periférico será encubado e será cultivada, a partir deste material, uma cultura celular, onde o objetivo é obter metáfases, as quais serão devidamente estudadas, por microscopia óptica, apontando as anomalias cromossômicas envolvidas na leucemia do lactente

Para exames envolvidos neste estudo será utilizada uma parte do material (sangue) obtido para realização de exames rotineiros.

RISCOS

O seu tratamento será o mesmo caso você participe ou não deste estudo. A coleta de aspirado de medula óssea ou sangue periférico para o estudo coincidirá com a coleta de aspirado de medula óssea ou sangue periférico para os exames rotineiros de forma a não ser prevista punção de medula óssea ou de sangue adicional. Essas punções para exames laboratoriais, que são parte de seu tratamento regular, podem resultar em dor no local da punção ou manchas rochas transitórias chamadas de equimoses. No entanto, essas coletas de material não oferecem maior risco à sua saúde, uma vez que, são realizadas por profissionais especializados. Dessa forma, não há risco adicional aos existentes para os exames de rotina durante o tratamento padrão ou nenhum risco adicional conhecido.

BENEFÍCIOS

O estudo citogenético será de grande relevância para o seu tratamento, pois permitirá o fornecimento de indicação diferencial de diagnóstico e escolha de tratamento apropriado para o risco da doença e possibilita a cura da doença.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital Oswaldo Cruz e equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano recorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente pela sua participação no estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação o estudo a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

O médico responsável por sua internação pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização.

AUTORIZAÇÃO PARA MENORES

Nos casos em que o paciente for menor de idade os pais ou responsáveis também deverão concordar com a participação do menor neste estudo. Sendo estes consultados e devidamente esclarecidos sobre os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios do estudo.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a Dra. Terezinha de Jesus Marques Salles nos telefones (81) 3422-0908/9451-7243. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante no estudo clínico, também pode consultar uma terceira pessoa imparcial integrante do Comitê de Ética do Hospital Oswaldo Cruz, telefone (81) 2101-1536/1530.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA
(Responsável pelo paciente)

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

Recife, _____ de _____ de 2010.

Nome do Paciente

Responsável pelo do Paciente (letra de forma)

Assinatura de testemunha (se necessário)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento)

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA
(Paciente Menor de 18 anos)**

Através deste termo e após os esclarecimentos devidos, quanto ao tratamento a ser submetido, o (a) menor _____, na condição de seu responsável legal, concordo com o respectivo tratamento, consciente dos riscos, vantagens e possíveis efeitos adversos que possam ser resultantes do mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Desta maneira, apresento meu livre consentimento para que o (a) paciente acima indicado (a) participe do referido tratamento.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

Recife, _____ de _____ de 200__

Assinatura do responsável pelo paciente

Nome do responsável pelo paciente (letra de forma)

(Assinatura de testemunha, se necessário)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

Assinatura da pessoa que obteve o consentimento

10.2 Anexo 3

- **Produção Científica** – Artigos publicados durante o período do doutorado
No período de 2008 a 2010 foram publicados os seguintes artigos:

1. SOARES-VENTURA, E. M.; Mkrtchyan, H.; **MARQUES-SALLES, T. J.**; Silva M.; Santos, N.; AMARAL, B. A. S.; Liehr T.; ABDELHAY, E; Silva, M.L.M.; Cartaxo-Muniz, MT. Molecular cytogenetics reveals complex karyotype in apparent t(8;13) therapy-related acute myeloid leukemia M2 after fibrosarcoma. Leukemia Research, v. 00, p. in press, 2010.
2. **MARQUES-SALLES, T. J.**; Barros, J.E.X.S. ; VENTURA, E.; MUNIZ, M. T. C.; Santos, N.; SILVA, E. F.; Silva, M.L.M.; Liehr T.; Mkrtchyan, H.; Unusual childhood biphenotypic acute leukemia with a yet unreported t(3;13)(p25.1;q13). Leukemia Research, v. 34, p. 206-207, 2010.
3. **MARQUES-SALLES, T. J.**; Mkrtchyan, H.; Leite, E.P.; VENTURA, E.; MUNIZ, M. T. C.; SILVA, E. F.; Liehr T.; Silva, M.L.M.; Santos, N. Complex Karyotype Defined by Molecular Cytogenetic FISH and M-FISH in an Infant with Acute Megakaryoblastic Leukemia and Neurofibromatosis. Cancer Genetics and Cytogenetics, v. 200, p. 167-169, 2010.
4. Mkrtchyan, H.; GARCIA, D. R. N.; SOARES-VENTURA, E. M.; Liehr T.; Felix, G.R.; **MARQUES-SALLES, T. J.**; ABDELHAY, E.; Silva, M.L.M. Molecular cytogenetic studies characterize near-triploid complex karyotype in a child with acute. Cancer Genetics and Cytogenetics, v. 197, p. 71-74, 2010.
5. **MARQUES-SALLES, T. J.**; LIEHR, T.; Mkrtchyan, H.; Raimondi, S.C.; SOUZA, M. T.; FIGUEIREDO, A.F de ; ROUXINOL, S.; Jordy F.C.; ABDELHAY, E.; SANTOS, N.; Silva, M.L.M. A new chromosomal three-way rearrangement involving MLL masked by a t(9;19)(p11;p13) in an infant with acute myeloid leukemia FAB-M5. Cancer Genetics and Cytogenetics, v. 189, p. 59-62, 2009.
6. FIGUEIREDO, A F de; Mkrtchyan, H.; Liehr T.; SOARES-VENTURA, E. M.; **MARQUES-SALLES, T. J.**; Santos, N.; Ribeiro R.C.; ABDELHAY, E.; Silva, M.L.M. A case of childhood acute myeloid leukemia AML (M5) with a neocentric chromosome neo(1)(qter->q23~24::q23~24->q43->neo->q43->qter) and tetrasomy of chromosomes 8 and 21. Cancer Genetics and Cytogenetics, v. 193, p. 123-126, 2009.
7. Silva, M.L.M.; Raimondi, S.C.; ABDELHAY, E; GROSS, M.; Mkrtchyan, H.; FIGUEIREDO, A F de; Ribeiro, R.; **Salles, T.J.M.**; Sobral, E.; LAND, M.; LIEHR, T. Banding and Molecular cytogenetic studies detected a CBFb-MHY11 fusion gene that appeared as abnormal chromosomes 1 and 16 in a baby with acute myeloid leukemia FAB M4-Eo. Cancer Genetics and Cytogenetics, v. 182, p. 56-60, 2008.

8. **Marques-Salles, Terezinha de Jesus;** Soares-Ventura, Eliane Maria; Oliveira, Nathalia Lopes de; Silva, Mariluze; Assis, Reijane; Moraes, Vera Lúcia Lins de; Otero, Luize; Fernandez, Teresa; Pombo-de-Oliveira, Maria do Socorro; Muniz, Maria Tereza Cartaxo; Santos, Neide. Myeloproliferative syndrome of monosomy 7: a brief report. Genet. mol. biol;31(1):36-38, 2008.