

**INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E
BIOLÓGICAS NO PROGNÓSTICO DE LACTENTES
COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA. PROPOSTA
DE UM ESCORE PREDITIVO COM INCLUSÃO DE
POLIMORFISMO GENÉTICO**

WELLINGTON LUIZ MENDES

**Tese de doutorado apresentada à Fundação
Antônio Prudente para a obtenção do título de
Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Luiz Fernando Lopes

**Co-orientadora: Dra. Maria do Socorro Pombo
de Oliveira**

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Mendes, Wellington Luiz

Influência das características clínicas e biológicas no prognóstico de lactentes com leucemia linfocítica aguda: proposta de um escore preditivo com inclusão de polimorfismo genético /

Wellington Luiz Mendes – São Paulo, 2009.

98p.

Tese (doutorado) Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração:

Oncologia.

Orientador: Luiz Fernando Lopes

Descritores: 1. LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA. 2. CRIANÇA. 3. MORTALIDADE 4. POLIMORFISMO GENÉTICO.

**Ao meu querido pai, Nelson Mendes.
Ainda (sempre) saudades...**

De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando,
A certeza de que é preciso continuar,
A certeza de que seremos interrompidos antes
de terminar.

Portanto devemos:

Fazer da interrupção, um caminho novo,
Da queda, um passo novo de dança,
Do medo, uma escada,
Do sonho, uma ponte e,
Da procura, um encontro.

Fernando Sabino

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a **todas as crianças** que conheci e atendi no Departamento de Pediatria do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer – A.C. Camargo. Delas recebi a confiança de um abraço e a alegria de um sorriso, mesmo nos momentos de extrema dor. E a **seus pais**, que me apresentaram ao verdadeiro significado da palavra **coragem**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores **Luiz Fernando Lopes** e **Maria do Socorro Pombo de Oliveira**. Incontestavelmente, tive a sorte de ser orientado por dois dos mais notáveis estudiosos em leucemias da infância no Brasil. Por eles fui questionado e desafiado, mas também fui conduzido e estimulado ao recompensador sentimento que nos traz o trabalho feito com ética e seriedade. A eles minha sincera admiração. Meu eterno agradecimento.

Ao meu grande e melhor amigo **Paulo Romero**, pela sinceridade, parceria diária e por entender os momentos de ausência.

À minha querida irmã **Vivian Mendes** que, utilizando sabiamente toda a calma e paciência que me faltam, ensina-me, com amor, a ver o “outro lado”, sempre.

Aos meus amigos, que têm sido meus defensores perenes. São guias que me conduzem, no caminho certo, ao “longe” onde quero chegar: **Ana Beatriz Cuenca**, **Alfredo Pigatin**, **Fabio Cardoso**, **Rogério Martins**, **Simone Forti**.

Aos meus novos amigos, que trouxeram mais alegria, docilidade e força ao meu viver: **Danielly Vicente**, **Deborah Soares**, **Ricardo Keuchgerian**, **Valeria Dressano**.

À Dra. **Karina Braga Ribeiro** pela inestimável orientação na parte estatística desta tese. Também minha admiração a quem sabe ensinar, quer ensinar e o faz com alegria e leveza.

Às queridas amigas do hospital do Câncer, Enf. Dra. **Andréa Yamaguchi Kurashima** e Dra. **Cecília Maria Lima da Costa**, pela amizade de sempre e pela bondade que trazem consigo e contagiam a todos. É uma honra tê-las como amigas.

Aos doutores **Alois Bianchi**, **Beatriz de Camargo** e **Célia Beatriz Gianotti Antoneli** pelos ensinamentos no início da minha carreira como Oncologista Pediátrico. Agradecimento sincero pelas oportunidades e confiança.

À toda equipe do laboratório da Divisão de Medicina Experimental, Centro de Pesquisa (MedEx) do INCA: **Mariana Emerenciano**, **Juliane Menezes**, **Marcela Mansur**, **Alexandre Figueiredo**, **Márcia Amorim**. Não fossem a alegria, o carinho e a paciência com os quais fui recebido por eles, eu não teria feito “meu primeiro PCR”.

Aos componentes da minha banca de qualificação, Dra. **Maria de Lourdes Chauffaille** e Dra. **Karina Braga Ribeiro** pelas valiosas correções e sugestões neste projeto.

Às amigas da biblioteca do Hospital do Câncer, Sra. **Suely Francisco**, Sra. **Rosinéia Aguiar Carneiro** e Sra. **Francyne Pólen Lima**, pelo apoio, pela competência e pela amizade de tantos anos.

À Sra. **Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari** e Sra. **Luciana Pitombeira** pelo competente trabalho no secretariado do curso de Pós Graduação da Fundação Antônio Prudente.

À minha ex-chefe e sempre amiga Dra. **Maria do Socorro Portella**, pela confiança e crença em minha capacidade de iniciar e seguir em uma nova carreira. Meu sincero agradecimento.

Às Dras. **Márcia Kayath**, **Vanessa Quintas Passos** e **Yara Baxter**. Para mim, modelos de ética e competência.

A **todos** os meus amigos e parceiros do setor de Oncologia da Novartis Biociências Brasil, pelo acolhimento e confiança. Aprendi com eles que os desafios e as dificuldades não são fatores que nos levam ao desânimo, e sim à alegria da superação.

RESUMO

Mendes WL. **Influência das características clínicas e biológicas no prognóstico de lactentes com leucemia linfocítica aguda: proposta de um escore preditivo com inclusão de polimorfismo genético.** São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

As leucemias agudas da infância formam um grupo heterogêneo de doenças hematológicas malignas. Revisando-se sua epidemiologia descritiva e analítica, pode-se enfatizar que além de fatores clínicos e laboratoriais, os aspectos biológicos, como subtipos morfológicos, achados citogenéticos e marcadores moleculares, também interferem de maneira significativa na sobrevida dos pacientes. De forma geral, as leucemias em lactentes têm características epidemiológicas, biológicas e clínicas distintas em relação aos pacientes mais velhos. A maioria dos casos caracteriza-se por alta carga tumoral ao diagnóstico (elevada contagem de leucócitos no sangue periférico, hepatoesplenomegalia ou doença no sistema nervoso central), com células leucêmicas oriundas de precursores pró-B (CD34+, CD19+), ausência de expressão do antígeno CD10, com co-expressão de precursores mielóides (CD15/CD65s) e alta expressão da mieloperoxidase. Sabe-se que a combinação de fatores presentes ao diagnóstico permite a identificação de diferentes grupos de risco, podendo-se definir o prognóstico de cada paciente e conseqüentemente determinar a melhor abordagem terapêutica. **Objetivos:** Analisar as características clínicas e biológicas de pacientes lactentes (< 24 meses de vida), identificar fatores prognósticos clínicos e biológicos, construir escore prognóstico e estimar a probabilidade de sobrevida global (SG) para o grupo estudado. **Casuística e métodos:** Foram analisadas retrospectivamente as informações clínicas e biológicas de 249 pacientes com Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), menores de 24 meses de idade e inscritos na Divisão de Medicina Experimental, Centro de Pesquisa (MedEx, CPq) do Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro,

entre janeiro de 1990 e dezembro de 2003. **Resultados:** O grupo apresentou as seguintes características: discreta predominância do sexo feminino; 74% de raça branca; mediana de idade de 14,1 meses (57% eram lactentes \leq 14 meses de idade); para pacientes \leq 14 meses, 57% tinham entre 6 e 14 meses e 26% tinham \leq 3 meses; 55% dos pacientes apresentavam contagem leucocitária menor que $50 \times 10^9/l$; 54% apresentavam CD10 negativo; 50% dos casos tinham imunofenótipo B comum e 42% eram pró-B, segundo a classificação EGIL; os genótipos *MTHFRC677T* ou *MTHFRT677T* foram mais frequentes que *MTHFRC677C*; o genótipo *MTHFRA1298A* foi mais frequente que o genótipo envolvendo o alelo C; e 81% dos pacientes receberam tratamento segundo o protocolo do GBTLI. A faixa etária \leq 14 meses teve associação estatisticamente significativa com CD10 negativo, classificação EGIL pró-B e presença de rearranjo do gene *MLL*. Por sua vez, o rearranjo do *MLL* foi associado ao CD10 negativo e imunofenótipo EGIL pró-B; 93% dos pacientes pró-B tinham CD10 negativo. Em cinco anos, a SG para todo o grupo foi de 45%. As piores taxas de sobrevida estatisticamente significativas foram observadas nos pacientes \leq 14 meses, com contagem leucocitária ao diagnóstico $> 100 \times 10^9/l$, CD10 negativo, imunofenótipo pró-B e que receberam tratamento outro que não do GBTLI. Para os pacientes \leq 14 meses, o modelo de escore prognóstico apontou a contagem de leucócitos elevada, CD10 negativo, imunofenótipo EGIL pró-B e genótipo *MTHFRC677T* ou *MTHFRT677T* como fatores que afetam a sobrevida global de forma estatisticamente significativa. **Conclusões:** Na casuística estudada, os resultados obtidos mostraram que a LLA em pacientes lactentes origina-se de células mais imaturas e preditivas de doença mais agressiva. A continuação do estudo das características biológicas de forma contínua e ativa se faz necessária em nosso país, assim como o estabelecimento de tratamentos padronizados e feitos cooperativamente.

SUMMARY

Mendes WL. **[Clinical and biologic characteristics on the prognosis of infants with acute lymphoblastic leukemia. proposal of a predictive score including genetic polymorphism]**. São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Childhood acute leukemias are a heterogeneous group of malignant hematologic diseases. Reviewing the descriptive and analytical epidemiology of them, it can be observed that besides clinical and laboratory factors, biological aspects, such as morphological subtypes, cytogenetic features, and molecular markers, interfere significantly on the survival of patients. In a general view, leukemia in infants has different epidemiological, biological, and clinical characteristics compared to older patients. The majority of cases present with high tumor load at diagnosis (high white blood cell count on peripheral blood, hepatosplenomegaly, and CNS involvement), with leukemic cells being phenotypically early B-cell precursor (CD34+, CD19+), lacking the CD10 antigen, while often expressing myeloid precursor antigens (CD15/CD65s) and increased myeloperoxidase expression. It is known that the combination of factors presented at diagnosis allows the identification of different risk groups, defining each patient prognosis and consequently determining the best therapeutic approach. Objectives: To analyze clinical and biological characteristics in infants (< 24 month year old) in order to identify clinical and biological prognostic factors, to prepare a prognostic score, and to estimate overall survival (OS) to the cohort. Patients and methods: Two hundred and forty-nine acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients were retrospectively analyzed according to their clinical and biological information. They were younger than 24 months and enrolled at the Divisão de Medicina Experimental, Centro de Pesquisa (MedEx, CPq) of Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, from January 1990 to December 2003. Results: The following characteristics were found: small

predominance of females; 74% of Caucasian with median age of 14.1 months (57% younger than 14 months); among patients younger than 14 months, 57% were 6 to 14 months old and 26% were younger than 3 months old; 55% presented white blood count $< 50 \times 10^9/l$, negative CD10; 50% common B immunophenotype and 42% early B immunophenotype according to the EGIL classification; *MTHFRC677T* or *MTHFRT677T* genotypes were more frequent than *MTHFRC677C*; *MTHFRA1298A* was more frequent than genotypes involving C allele and 81% of patients received treatment according to GBTLI protocols. Patients younger than 14 months old had statistically significant association with antigen CD10, EGIL early B-cell classification, and presence of *MLL* gene rearrangements. *MLL* rearrangements presented significantly association with negative CD10 and EGIL early B-cell classification; 93% of EGIL early B-cell classification patients presented negative CD10. The entire group presented 45% 5-year overall survival and the worst survival rates were observed in patients younger than 14 months, patients with white blood count $> 100 \times 10^9/l$ at diagnosis, negative CD10, those with EGIL early B-cell classification, and patients who were treated with a protocol different from GBTLI. When only patients younger than 14 months were analyzed, the OS was worse in those with white blood count $> 100 \times 10^9/l$, negative CD10, patients with EGIL early B-cell classification, and those who presented with *MTHFRT677T* or *MTHFRC677T* genotype. For patients under 14 months, the prognostic score model identified the following characteristics as factors that can influence overall survival statistically significant: high white blood cells, negative CD10, pro-B EGIL immunophenotype and *MTHFRC677T* or *MTHFRT677T* genotype. Conclusions: Results have shown that on this cohort ALL originates from very immature cells and can predict an aggressive disease. It is imperative to continue studying its biological characteristics in our country as well as to establish standardized and co-operative treatments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	“Modelo em 2 passos” da leucemogênese em crianças.....	14
Figura 2	Principais parceiros de fusão do gene <i>MLL</i> e suas respectivas frequências nas leucemias agudas da infância.....	17
Figura 3	Diagrama do total de pacientes registrados, excluídos e analisados no presente estudo, segundo o período analisado, 1990 – 2003.....	46
Figura 4	Sobrevida global para todo o grupo de pacientes (n=249).....	54
Figura 5	Sobrevida global nos paciente \leq 14 meses, de acordo com faixas etárias (n=143).....	58
Figura 6	Sobrevida global nos pacientes \leq 14 meses, segundo escore preditivo.....	62
Figura 7	Sobrevida global nos pacientes $>$ 14 meses, segundo escore preditivo.....	64

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Taxas anuais (por milhão de população) da Leucemia Linfocítica Aguda, até 19 anos de idade, em regiões selecionadas.....	5
Tabela 2	Características clínico-laboratoriais dos pacientes com LLA incluídos no Protocolo GBTLI LLA-93.....	9
Tabela 3	Características presentes nas LLAs de lactentes e em crianças maiores de 1 ano de idade.....	11
Tabela 4	Sobrevida livre de eventos em pacientes lactentes portadores de LLA segundo o <i>status</i> do gene <i>MLL</i> (rearranjo presente ou ausente).....	19
Tabela 5	Sobrevida livre de eventos em lactentes menores de 1 ano de idade portadores de LLA, segundo os principais estudos (grupos cooperativos ou registros de câncer).....	20
Tabela 6	Atividade catalítica e risco para desenvolvimento de LLA segundo o genótipo da enzima MTHFR.....	22
Tabela 7	Casuística e idade de lactentes portadores de LLA segundo dados de literatura.....	27
Tabela 8	Número e porcentagem de pacientes segundo características demográficas, por período do estudo.....	47
Tabela 9	Número e porcentagem de pacientes segundo aspectos clínicos e laboratoriais, por período do estudo.....	48

Tabela 10	Número e porcentagem de pacientes segundo genótipo do <i>MTHFR</i> , por período do estudo.....	49
Tabela 11	Associação entre idade e todas as variáveis do estudo.....	51
Tabela 12	Associação entre status do gene <i>MLL</i> e demais variáveis do estudo.....	52
Tabela 13	Associação entre classificação EGIL e demais variáveis do estudo.....	53
Tabela 14	Probabilidades de sobrevida global em 12 meses, 36 meses e 60 meses para cada período do estudo.....	55
Tabela 15	Probabilidades de sobrevida global em 60 meses de acordo com variáveis demográficas, clínico-laboratoriais, tratamento e genótipo do <i>MTHFR</i>	56
Tabela 16	Probabilidades de sobrevida global em 60 meses de todas as variáveis de acordo com a faixa etária.....	57
Tabela 17	Fatores preditivos para o óbito no grupo de pacientes ≤ 14 meses - análise múltipla (Cox).....	59
Tabela 18	Fatores preditivos para o óbito no grupo de pacientes > 14 meses - análise múltipla (Cox).....	60
Tabela 19	Modelo de pontuação para os fatores preditivos para o óbito no grupo de pacientes ≤ 14 meses.....	61
Tabela 20	Modelo de pontuação para os fatores preditivos para o óbito no grupo de pacientes > 14 meses.....	63

Tabela 21	Número e porcentagem das faixas etárias em lactentes ≤ 14 meses.....	70
Quadro 1	Artigos (Periódico, Ano, Autor e Título) atualmente publicados pelo BCSGIAL.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

AIEOP	<i>Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica</i>
BCSGIAL	<i>Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia</i> (Grupo Brasileiro de Estudo Colaborativo da Leucemia Aguda do Lactente)
BFM	<i>Berlin-Frankfurt-Munster Group</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> (grupamento de diferenciação)
CCG	<i>Children Cancer Group</i>
DFCI	<i>Dana Farber Cancer Institute</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
EGIL	<i>European Group for Immunophenotyping Leukemia</i>
FAB	<i>French-American-British group</i> (Grupo Franco-Americano-Britânico)
FISH	<i>fluorescent in situ hybridization</i> (hibridização <i>in situ</i> por fluorescência)
GBTLI	Grupo Brasileiro para Tratamento da Leucemia na Infância
HR	<i>hazard ratio</i> (risco relativo)
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
MLL	<i>mixed lineage leukemia</i> ou <i>myeloid-lymphoid leukemia</i>
MO	medula óssea
MTHFR	metileno tetrahidrofolato redutase
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
POG	<i>Pediatric Oncology Group</i>
RCBP	Registro de Câncer de Base Populacional
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa)
UK-ALL	<i>Medical Research Council United Kingdom</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Leucemia Linfocítica Aguda na Infância	2
1.1.1	Epidemiologia	2
1.1.2	Fatores prognósticos	6
1.1.3	Experiência brasileira na LLA da infância	6
1.2	Leucemia Linfocítica Aguda em Lactentes	9
1.2.1	Epidemiologia da LLA em Lactentes	11
1.2.2	Fatores prognósticos e sobrevida da LLA em Lactentes	14
1.3	Papel do polimorfismo genético na LLA da infância	20
1.4	Importância de estudo de escore prognóstico	24
2	OBJETIVOS	29
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	31
3.1	Casuística	32
3.1.1	Crterios de elegibilidade	32
3.1.2	Crterios de exclusão	32
3.2	Métodos	33
3.2.1	Variáveis estudadas	38
3.2.2	Análises estatísticas	41
3.3	Aspectos éticos	42
4	RESULTADOS	44
4.1	Análise descritiva	45
4.1.1	Dados demográficos	46
4.1.2	Dados clínico-laboratoriais	47
4.1.3	Dados do polimorfismo do <i>MTHFR</i>	49
4.2	Associações entre variáveis	50
4.2.1	Associação entre faixa etária e demais variáveis	50

4.2.2	Associação entre status do gene <i>MLL</i> e demais variáveis	52
4.2.3	Associação entre classificação EGIL e demais variáveis	53
4.3	Análise de sobrevida	54
4.3.1	Sobrevida global	54
4.3.2	Sobrevida de acordo com variáveis	55
4.3.3	Sobrevida das variáveis de acordo com faixa etária	56
4.4	Análise múltipla	58
4.4.1	Modelo de escore preditivo para os pacientes ≤ 14 meses	58
4.4.2	Modelo de escore preditivo para os pacientes > 14 meses	59
4.5	Construção do escore preditivo	60
4.5.1	Modelo de escore preditivo para os pacientes ≤ 14 meses	60
4.5.2	Modelo de escore preditivo para os pacientes > 14 meses	62
5	DISCUSSÃO	65
6	CONCLUSÕES	82
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

ANEXOS

- Anexo 1** Ficha preenchida ao encaminhamento para diagnóstico do estudo “Leucemias Agudas em Lactentes”.
- Anexo 2** Termo de consentimento livre e esclarecido.
- Anexo 3** Esquemas de Tratamentos Quimioterápicos (Protocolos GBTLI)

O que tem começo, tem fim.
Niccolo Maquiavel (1469 – 1527)

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA NA INFÂNCIA

1.1.1 Epidemiologia

As leucemias representam aproximadamente um terço de todos os cânceres da criança e se apresentam, ainda atualmente, como um desafio para oncologistas, hematologistas e outros profissionais da área de saúde.

As leucemias agudas da infância são um grupo heterogêneo de doenças. Ao ser revisada a epidemiologia descritiva e analítica dessas doenças, pode-se enfatizar os subtipos morfológicos descritos de acordo com a classificação FAB, achados citogenéticos e marcadores moleculares. Parece evidente que subtipos específicos de leucemias têm etiologias distintas e que anormalidades moleculares associadas com subgrupos particulares estão ligadas a mecanismos causais específicos. Contudo, as mutações produzidas nos diversos estágios da leucemogênese devem envolver fatores etiológicos diferentes (GREAVES 1996, 2004; ROSSIG e JUERGENS 2008).

Nos Estados Unidos da América (EUA), as leucemias agudas representam 27% dos cânceres que ocorrem nas crianças menores de 15 anos de idade (GURNEY et al. 1995). Dentre elas, a LLA representa 85% de todas as leucemias na infância. A taxa de incidência anual (por milhão de população) para LLA é de 30,9.

No Brasil, recente publicação envolvendo a análise de 20 RCBP do país observou o predomínio das leucemias como tumor mais freqüente na faixa etária pediátrica (0 a 18 anos), com percentual mediano de 29%, variando entre 19% na cidade de Aracaju e 42,5% em Manaus. Neste estudo, as taxas de incidência encontradas nos registros localizados na região norte do país apresentaram os maiores percentuais para leucemia (acima de 39%). Em relação à faixa etária, a maior incidência de leucemias ocorreu na faixa etária de 1 a 4 anos, informação que se mostra próxima da encontrada na literatura para países com perfil semelhante aos países em desenvolvimento (Ministério da Saúde 2008).

A LLA pode ser classificada de acordo com a classificação FAB (L1, L2 e L3) que leva em conta aspectos morfológicos das células leucêmicas e características imunofenotípicas (pró-B, pré-B, células B ou células T), classificando-as de acordo com o estágio de maturação destas células (BENE et al. 1995). Apresenta picos de incidência relacionados à idade entre 2 e 5 anos (PUI et al. 1996; FORESTIER et al. 2006). Na LLA, o sexo masculino é mais afetado que o feminino, com exceção importante acontecendo nos lactentes (PUI et al. 1996). A LLA apresenta incidência maior na raça branca, e isto parece acontecer em todas as idades (STILLER 2004).

Variações geográficas importantes acontecem na incidência da LLA, como observadas na tabela 1 (PARKIN et al. 1988). As taxas de incidência são maiores nos EUA (entre crianças da raça branca), Austrália, Costa Rica e Alemanha. Taxas intermediárias são encontradas na maioria dos países

da Europa e taxas menores são encontradas na Índia e entre crianças negras dos EUA. A taxa de incidência de LLA em países desenvolvidos é menor que em países em desenvolvimento, porém, no Brasil, estas taxas são similares às observadas nos países desenvolvidos - 4,1/100.000 e 3,6/100.000 para sexo masculino e feminino, respectivamente (GURNEY et al. 1995).

As leucemias agudas são desordens clonais do sistema hematopoiético que surgem de mutações em uma única célula que, então, é passada para todas as suas descendentes. Na maioria dos casos, as anormalidades genéticas que originam as leucemias agudas são adquiridas e não herdadas, porém, 5% dessas leucemias estão associadas com síndromes genéticas hereditárias (TAYLOR e BIRCH 1996). Além disto, uma variedade de polimorfismos herdados pode contribuir indiretamente para o risco de desenvolvimento de leucemia, o que inclui genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo carcinogênico e detoxificação e aqueles que estão envolvidos na resposta imune às infecções NORPPA 1997, SINNETT et al. 2006).

Anormalidades genéticas adquiridas estão associadas a leucemias agudas, assim como algumas síndromes genéticas (IZRAELI et al. 2007). Vários estudos sugerem risco 10 a 20 vezes maior de leucemia em crianças portadoras da Síndrome de Down (ROSS et al. 2005). Casos de leucemia aguda megacarioblástica (LMA-M7) chegam a ser 500 vezes mais frequente em crianças portadoras de Síndrome de Down do que em crianças sem esta anormalidade cromossômica (HITZLER e ZIPURSKY 2005). Tem sido

descrita também a presença da mutação do gene *GATA1*, importante para a maturação dos megacarioblastos, com o risco elevado de LMA-M7 em pacientes com Síndrome de Down (HITZLER e ZIPURSKY 2005; MAGALHÃES et al. 2006).

Várias outras hipóteses são consideradas como possíveis fatores etiológicos das leucemias. Estudos epidemiológicos discutem a relação com radiação ionizante, exposições químicas como pesticidas, consumo de álcool e cigarro pelos pais, uso materno de maconha, etc (LINET et al. 1997; LUBIN et al. 1998; ROSSIG e JUERGENS 2008).

Tabela 1 - Taxas anuais (por milhão de população) de Leucemia Linfocítica Aguda, até 19 anos de idade, em regiões selecionadas.

População	Ambos os sexos	Masculino	Feminino
Costa Rica	44,7	47,5	41,9
Austrália, New South Wales	37,9	41,9	33,8
Alemanha, Registro de Câncer Infantil	36,4	39,1	33,5
EUA, SEER (brancos)	32,9	35,9	29,7
Canadá, Províncias do Oeste	30,1	33,2	26,7
Itália, Torino	29,6	33,9	25,2
Hungria	27,7	30,9	24,4
Suécia	27,0	28,2	25,7
Finlândia	26,4	30,2	22,4
Canadá, Províncias do Atlântico	18,8	20,5	17,2
China, Shangai	18,4	20,4	16,2
Brasil, São Paulo	14,2	15,9	12,4
Cuba	13,6	15,0	12,1
Nova Zelândia (Maori)	12,5	19,2	5,7
Kuwait, Kuwait	11,9	10,9	12,9
Índia, Registro de Câncer de Bombay	11,0	13,2	8,6

SEER: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program.

Fonte: PARKIN et al. (1988)

1.1.2 Fatores prognósticos

A identificação de fatores prognósticos relacionados ao paciente e à própria doença tornou-se imperativa para a adequação do tratamento destes pacientes. Há trinta anos, quase toda criança portadora de leucemia morria da doença. Após a introdução e os avanços no estudo das leucemias, ficou claro que as leucemias agudas na infância poderiam ser divididas em subtipos que apresentavam fatores prognósticos diferentes. O conceito de terapia adaptada de acordo com o risco da leucemia foi introduzido na década de 70. A partir de então, houve a definição de grupos de riscos específicos para a LLA, que vêm sendo aceitos até os dias de hoje, considerando-se algumas variáveis como contagem de leucócitos ao diagnóstico, idade, imunofenótipo dos blastos, sexo, resposta à terapia de indução (avaliada por meio da redução do número de blastos no sangue periférico ou na medula óssea) e anormalidades cromossômicas (PUI e CRIST 1987; STANULLA et al. 2007).

1.1.3 Experiência brasileira na LLA da infância

A experiência brasileira no tratamento da LLA da infância teve início em 1980 com os protocolos do Grupo Brasileiro para Tratamento de Leucemias na Infância (GBTLI) (BRANDALISE et al. 1993). Esta experiência inicial contou com 80 centros brasileiros registrando o total de 994 pacientes tratados de acordo com 3 protocolos consecutivos, no período de 1980 a 1988: GBTLI-80 (Julho/1980 até Julho/1982 com 203 pacientes registrados), GBTLI-82 (Agosto/1982 até Julho/1985 com 360 pacientes registrados) e

GBTLI-85 (Agosto/1985 até Dezembro/1988 com 431 pacientes registrados). Foram analisados 713 pacientes, evidenciando-se sobrevida livre de eventos (SLE) em 8 anos de 50%, 55% e 70%, respectivamente. Os resultados do protocolo -85, de acordo com a faixa etária, mostraram que a SLE em 6,5 anos foi de 46% para os pacientes menores de 1 ano de idade e de 62% para os maiores de 1 ano. De uma maneira geral, as conclusões desta primeira experiência brasileira no tratamento da LLA mostraram as dificuldades de um estudo multicêntrico em um país em que nem todos os centros oncológicos ofereciam as mesmas condições de suporte clínico aos pacientes, com grande número de violações dos protocolos. Porém, revelou também a melhora da sobrevida nas crianças portadoras desta doença no Brasil.

O quarto protocolo do GBTLI foi o LLA-93, onde foram registrados 867 casos consecutivos de LLA no período entre outubro/1993 e setembro/1999. A tabela 2 mostra as características clínico-laboratoriais dos pacientes inscritos neste estudo. Para todo o grupo, a sobrevida global (SG) e a SLE em 6 anos foram de 70% e 68%, respectivamente. Neste protocolo, observaram-se apenas 23 pacientes (2%) menores de 12 meses de vida ao diagnóstico, com SG em 3,7 anos de 30%. No grupo menor de 12 meses e com presença de blastos em sangue periférico no D8 de tratamento, a SLE mostrou o pior resultado (0%). **(dados ainda não publicados)**.

Baseado na experiência dos resultados dos estudos LLA-80, -82, -85 e -93, foi elaborado o conceito para o protocolo GBTLI LLA-99. Neste protocolo, entre o período de outubro/2000 e dezembro/2006 foram incluídos

1.041 pacientes, sendo 1.001 avaliados. Até novembro/2006, os resultados apresentados sobre este protocolo mostravam SG e a SLE em 5 anos de 76% e 74%, respectivamente, para todo o grupo de pacientes. Entre os pacientes classificados como “alto risco” encontravam-se os pacientes menores de 12 meses de idade. Este grupo totalizou 27 pacientes (5,5%). A SLE em 5 anos nesta faixa etária foi de 7,2% (**dados não publicados**).

De modo geral, estes resultados evidenciam o mau prognóstico dos lactentes portadores de LLA, avaliados em consecutivos estudos do GBTLI, deixando claro que análises mais extensas sobre esta faixa etária devem ser feitas.

Tabela 2 - Características clínico-laboratoriais dos pacientes com LLA incluídos no Protocolo GBTLI LLA-93.

	Nº de casos	(%)
Nº de pacientes inscritos	867	100
Nº de pacientes excluídos	14	1,5
Total de pacientes analisados	853	98,5
Raça		
Branca	627	73,3
Não branca	226	26,5
Idade (anos)		
< 1	23	2
≥ 1 e < 10	637	75
≤ 10	196	23
Sexo		
Masculino	436	51
Feminino	417	49
Leucometria inicial (/mm³)		
< 50.000	630	74
≥ 50.000 e < 100.000	93	11
≥ 100.000	127	15
Grupos de risco		
RBV	154	18
RB	293	34
AR	406	48
Envolvimento inicial de SNC	15	1,7
Imunofenotipagem		
T	74	13
Pré-B	513	87
Não realizados	197	-
Não relatados	69	-
Antígeno Calla (CD 10)		
Positivo	447	52
Negativo	76	9
Não realizado	300	39

RBV= risco básico verdadeiro; RB= risco básico; AR= alto risco.

1.2 LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA EM LACTENTES

De uma forma geral, as leucemias em lactentes possuem características epidemiológicas, biológicas e clínicas distintas em relação aos pacientes maiores (Tabela 3).

A maioria dos casos de LLA em lactentes é geralmente caracterizada por alta carga tumoral ao diagnóstico, que pode ser representada por

elevada contagem de leucócitos no sangue periférico, hepatoesplenomegalia ou presença de doença em Sistema Nervoso Central (SNC). Fenotipicamente, estas células leucêmicas são de precursores pró-B (CD34+, CD19+), com ausência de expressão do antígeno CD10 (ou antígeno CALLA), com co-expressão de precursores mielóides (CD15/CD65s) e alta expressão da mieloperoxidase. Estes achados sugerem que esta leucemia surge de células progenitoras B muito imaturas com características tanto linfóides como mielóides, ou seja, que não sofreram diferenciação totalmente linfóide (ALVARADO et al. 1998; SILVERMAN 2007; PIETERS et al. 2007; ZWEIDLER-MCKAY e HILDEN 2008).

Os rearranjos que envolvem o gene *MLL*, localizado no cromossomo 11, são encontrados em 70% a 90% das leucemias de lactentes, sendo os rearranjos mais comuns as t(4;11)(q21;q23) – a fusão entre os genes *MLL* e *AF4* são observadas em até 70% destas leucemias, t(11;19) – fusão entre os genes *MLL* e *ENL* em até 15% dos casos, e a t(9;11) – fusão entre os genes *MLL* e *AF9* em até 4% dos casos (BIONDI et al. 2000; HARRISON et al. 2005; HILDEN et al. 2006).

É importante ressaltar que estas 3 características – ausência da expressão de CD 10, co-expressão de marcadores mielóides e rearranjo do gene *MLL* – estão interligadas, e sua presença é inversamente relacionada à idade do lactente (LUCIANI et al. 2006; SILVERMAN 2007; ZWEIDLER-MCKAY e HILDEN 2008).

Tabela 3 - Características presentes nas LLAs de lactentes e em crianças maiores de 1 ano de idade.

	<i>0 – 1 ano (%)</i>	<i>1 – 18 anos (%)</i>	<i>Referência</i>
Leucócitos >100.000/ μ l ao diagnóstico	58	6	CHESSELLS 2002a; MORICKE 2005; TOMIZAWA 2007
SNC ao diagnóstico	14	1,5	HILDEN 2006; PIETERS 2007
Imunofenótipo			
Células B	96	86	BORKHARDT 2002; MORICKE 2005; PIETERS 2007
Células T	4	13	
CD10 negativo	55	3	MORICKE 2005; HILDEN 2006; PIETERS 2007
Co-expressão de antígenos mielóides	28	5	DORDELMANN1999; BORKHARDT 2002
Rearranjo do gene <i>MLL</i>	70-80	2-4	PUI 2003; HILDEN 2006; TOMIZAWA 2007;

SNC = Sistema Nervoso Central

1.2.1 Epidemiologia da LLA em Lactentes

A leucemia é a segunda maior causa de câncer em crianças menores de 1 ano de idade, representando aproximadamente 5% a 10% de todos os casos de leucemias na infância, com incidência de 44 por milhão em lactentes, ou aproximadamente 200 lactentes diagnosticados com leucemia nos EUA a cada ano (MÖRICKE et al. 2005; RIES et al. 2007). Nesta faixa etária, a incidência anual de LLA (20 por milhão) é quase o dobro da incidência de Leucemia Mielóide Aguda (10,6 por milhão) (LINET et al. 1999).

De uma forma geral e segundo dados de registros de câncer em criança ou de grupos cooperativos internacionais para o tratamento da LLA na infância, a taxa de incidência na faixa etária menor de 1 ano de idade varia entre 2,4% a 4% do total de pacientes portadores de LLA até 18 anos

de idade (NG et al. 2000; COEBERGH et al. 2006; BARRY et al. 2007; OUDOT et al. 2008).

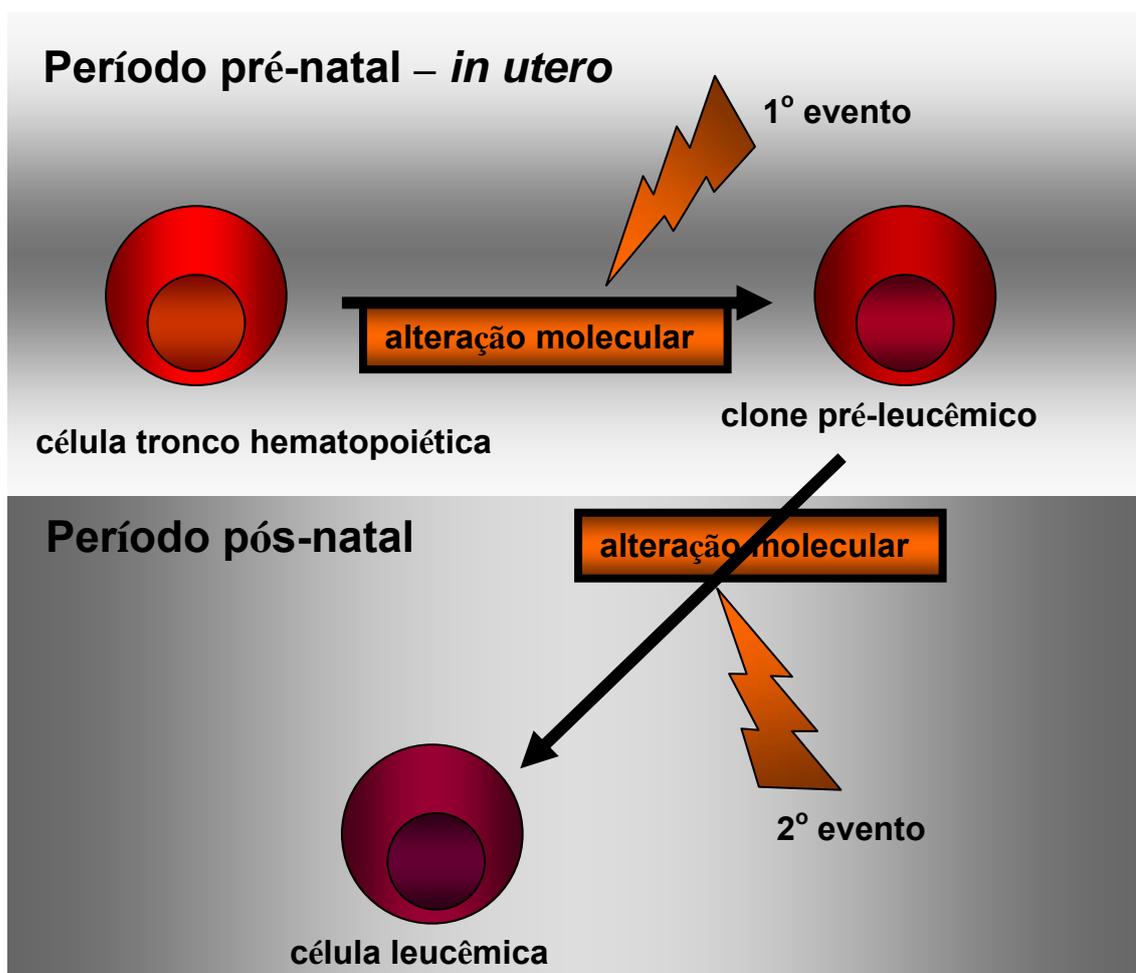
Os estudos de leucemias em lactentes gêmeos monozigóticos contribuíram muito para o entendimento da epidemiologia e história natural das leucemias em lactentes. Com base nos achados moleculares envolvendo as leucemias da infância, vários estudos em gemelares foram realizados e proporcionaram importantes discussões e descobertas sobre sua etiologia. A taxa de concordância de LLA na infância entre gêmeos monozigóticos é de 5% a 10%. Esta observação pode sugerir uma predisposição genética, porém irmãos não gêmeos não parecem ter risco aumentado de leucemia. A presença de potenciais fatores leucemogênicos no ambiente intra-uterino, que é dividido entre irmãos, também não consegue explicar as taxas de concordância entre gêmeos monozigóticos, já que gêmeos dizigóticos (com placentas separadas) não apresentam risco elevado de leucemia (ROSSIG e JUERGENS 2008). Todas estas ponderações levam à hipótese de que a leucemia pode se originar na época pré-natal em um gêmeo e ser transmitida, via placenta, para o outro gêmeo (FORD et al. 1993).

Outras evidências da origem pré-natal podem ser descritas por meio de 2 estudos com amostras de sangue coletadas ao nascimento (crianças não gêmeas que mais tarde foram diagnosticadas com LLA), onde foram identificadas tanto a $t(4;11)$ quanto $t(12;21)$ (GALE et al. 1997; WIEMELS et al. 1999). No primeiro estudo, os pacientes foram diagnosticados com 5 a 24 meses de idade, e a $t(4;11)$ já estava presente ao nascimento (GALE et al.

1997). No segundo estudo, as crianças foram diagnosticadas durante o período de pico de incidência da LLA (2 a 5 anos), resultando na identificação de transcritos da fusão entre os genes *TEL* e *AML1* em 8/11 crianças estudadas, incluindo apenas 1 par de gêmeos idênticos (WIEMELS et al. 1999). Estes estudos podem confirmar a afirmação de que o início pré-natal da leucemia acontece *in útero*.

Estudos maiores revelaram também que alterações genéticas são comumente achadas ao nascimento, como MORI et al. (2002) que identificaram rearranjos genéticos típicos de LLA ou de LMA em até 1% de recém-nascidos. Fica claro, então, que a maioria das crianças não desenvolvem leucemia, o que significa que um segundo “evento” deve acontecer no período pós-natal em uma minoria das crianças e que deflagra o início da leucemia.

Estas observações foram a base para o “modelo em 2 passos” atualmente aceito (Figura 1). Uma primeira mutação que afeta a célula precursora (ou a célula tronco hematopoiética) acontece ainda *in útero*, induzindo a uma anormalidade molecular específica, e dando origem ao clone pré-leucêmico. Este clone ficará silencioso na maioria das crianças e, em uma minoria delas, um segundo evento, que ocorrerá no período pós-natal, levará ao comando para a transformação maligna e consequente leucemia.



Fonte: Adaptado de ROSSIG e JUERGENS (2008).

Figura 1 – “Modelo em 2 passos” da leucemogênese em crianças.

1.2.2 Fatores prognósticos e sobrevida da LLA em Lactentes

A LLA em lactentes tem sido associada a vários achados clínicos conhecidamente desfavoráveis em relação ao prognóstico, como hiperleucocitose, hepatoesplenomegalia, doença em SNC ao diagnóstico. Outros achados biológicos, como a ausência de expressão do antígeno CD10, a co-expressão de antígenos mielóides e a presença de mutações do gene *MLL*, também foram descritos como fatores desfavoráveis nas

leucemias de lactentes (NG et al. 2000; HILDEN et al. 2006; LUCIANI et al. 2006; PIETERS et al. 2007).

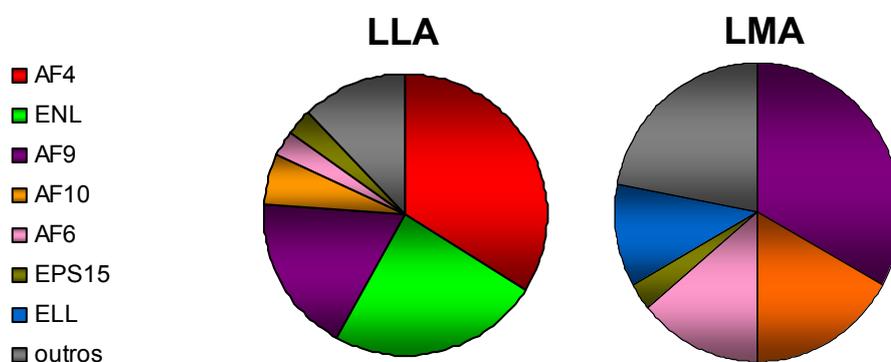
A idade foi identificada como importante fator prognóstico em vários trabalhos envolvendo lactentes portadores de LLA (REAMAN et al. 1999; MÖRICKE et al. 2005; HILDEN et al. 2006; PIETERS et al. 2007). A maioria destes trabalhos relata a faixa etária menor que 12 meses como a de pior prognóstico para os pacientes de LLA. Estes trabalhos foram capazes de mostrar também que, dentro desta faixa etária, quanto menor a idade do paciente, mais sombrio se mostra seu prognóstico.

Em relação à idade, há de ser ressaltada a importância da sua associação com a presença de alterações citogenéticas, que influenciam na sobrevida destes pacientes. PUI et al. (2002) identificaram que lactentes menores de 6 meses portadores de LLA e que apresentavam alteração do 11q23/*MLL* mostravam os piores resultados, embora somente a alteração do 11q23 tenha sido fator prognóstico independente. Vários outros estudos foram capazes de provar esta associação inversa entre a idade e a frequência de rearranjo do gene *MLL*, fato este também relacionado à ocorrência do imunofenótipo CD10 negativo e à co-existência de marcadores mielóides. Por exemplo, o rearranjo do *MLL* está associado com 90% de casos com CD10 negativo, e apenas com 20% de casos com CD10 positivo (GREAVES 1996). O fato é que, quanto mais jovem o paciente portador de LLA, maior a frequência de translocações do *MLL*.

- **Gene *MLL***

O gene *Mixed Lineage Leukemia (MLL)* é um homólogo humano do gene *Trithorax* da *Drosophila*, que é um regulador importante do desenvolvimento. O *MLL* ocupa uma extensão de aproximadamente 90kb no cromossomo 11 na região 11q23 e codifica uma proteína de 3.969 aminoácidos com um peso molecular de aproximadamente 430kDa, que se liga ao DNA e metila a histona H3 lisina 4 (H3K4), regulando positivamente a expressão gênica, incluindo os genes da família *HOX*. A proteína *MLL* está expressa em todas as células hematopoiéticas, incluindo as células-tronco e as células progenitoras (KRIVTSOV e ARMSTRONG 2007). As translocações cromossômicas envolvendo o gene *MLL* possuem uma elevada incidência nas leucemias agudas dos lactentes, ocorrendo em até 90% dos casos (BIONDI et al. 2000; HARRISON et al. 2005; HILDEN et al. 2006). Aproximadamente dois terços das translocações do *MLL* são identificadas por técnicas de citogenética convencional; as demais são detectadas apenas por FISH, usando sondas específicas para o gene-alvo. Estas translocações se originam durante eventos de recombinação ilegítimos que resultam na permuta de fragmentos entre cromossomos não-homólogos. As fusões do *MLL* e muitas outras translocações encontradas nas leucemias são provavelmente resultantes de uma falha no reparo adequado da quebra da dupla-fita, durante o desenvolvimento das células hematopoiéticas. Atualmente já foram descritos mais de 87 parceiros de fusão do gene *MLL* com diversas funções e domínios funcionais variáveis, e dentre estes, 51 foram clonados e analisados molecularmente (MEYER et al.

2006). Para a detecção de fusão com parceiros conhecidos, a técnica mais utilizada é a RT-PCR, que pode ser realizada tanto de forma simples, quanto combinando alvos (*multiplex*). Como padrão-ouro para definição do *status* do *MLL*, é utilizada a análise por FISH, na qual mesmo que não se saiba o parceiro, é possível saber se o *MLL* está rearranjado. Os cinco parceiros mais frequentes são os fatores de transcrição *AF4*, *ENL*, *AF9*, *AF10* e *AF6* (KRIVTSOV e ARMSTRONG 2007). A Figura 2 mostra de forma esquemática os parceiros de fusão do *MLL* e a frequência com que esta parceria ocorre nas leucemias da infância. Esta alta promiscuidade leva ao questionamento sobre a contribuição destes diversos parceiros na leucemogênese, sendo difícil determinar se contribuem com funções comuns ou se provocam efeitos diversos.



Fonte: Adaptado de KRIVTSOV e ARMSTRONG (2007).

Figura 2 - Principais parceiros de fusão do gene *MLL* e suas respectivas frequências nas leucemias agudas da infância.

Sabendo-se que os parceiros de fusão possuem características diferentes (como por exemplo, o fato de estarem associados a diferentes aspectos da regulação transcricional), a fusão com cada um deles promove

a eliminação de uma grande porção da região 3' do *MLL*, e a conexão da porção restante com o parceiro correspondente. Então, as proteínas quiméricas *MLL* formam padrões pontuados no núcleo, indicando que a localização da fusão protéica e seus alvos potenciais são principalmente determinados pela atividade de ligação ao DNA da porção do *MLL* e não pelo parceiro de fusão. Estes achados indicam que a capacidade de transformação da proteína *MLL* truncada sozinha é ineficaz, sugerindo que um ganho de função através do gene parceiro seja fundamental.

Finalizando esta breve revisão sobre a importância do gene *MLL* na LLA do lactente, é importante mostrar como o prognóstico e a sobrevida dos pacientes lactentes são afetados quando há rearranjo envolvendo o gene *MLL*. Podem-se citar os resultados de dois estudos que mostraram piores resultados em lactentes portadores de LLA em que translocações envolvendo o cromossomo 11 foram detectadas. HILDEN et al. (2006), identificaram, por meio de RT-PCR e citogenética convencional, os parceiros mais comuns de fusão com o *MLL* (*AF4*, *ENL* e *AF9*). A SLE em 5 anos para os pacientes que apresentavam translocações entre o *MLL* e os parceiros comuns descritos variou de 22% a 30%, enquanto que nos pacientes que apresentavam rearranjos do *MLL* com outros parceiros “menos comuns”, a SLE em 5 anos alcançou 53%. Na mesma linha de análise, o grupo Interfant-99 também encontrou diferença na SLE em 4 anos entre os pacientes portadores do rearranjo do *MLL* com seus parceiros comuns, variando de 33% a 36%, em contraste com o rearranjo com outros parceiros (PIETERS et al. 2007). A Tabela 4 mostra as principais evidências descritas em

literatura quanto à menor sobrevida dos pacientes lactentes portadores de LLA que apresentam rearranjo do gene *MLL*.

Tabela 4 - Sobrevida livre de eventos em pacientes lactentes portadores de LLA segundo o *status* do gene *MLL* (rearranjo presente ou ausente).

Nome do Protocolo	Período do estudo	SLE - rearranjo <i>MLL</i> presente (%)	SLE – rearranjo <i>MLL</i> ausente (%)	Referência
BFM-83, -86, -90	1983-1995	28	56	DORDELMANN 1999
Interfant-92/UKALL-92	1992-1999	~30	48	CHESELLS 2002b
AIEOP-91/95	1995-2000	38	68	BIONDI 2006
CCG1953	1996-2000	34	60	HILDEN 2006
POG-9407	1998-2000	40	65	DREYER 2007
JILSG <i>MLL</i> 96/98	1995-2001	39	96	TOMIZAWA 2007
Interfant-99	1999-2006	37	74	PIETERS 2007

- **Sobrevida da LLA em Lactentes**

Ao contrário do que tem sido observado na LLA em pacientes maiores que 2 anos de idade, que vem alcançando taxas de sobrevida maiores que 70%, as crianças menores de 12 meses de idade apresentam menores taxas de sobrevida (MÖRICKE et al. 2005; MOGHRABI et al. 2007; BIONDI et al. 2006; HILDEN et al. 2006; TOMIZAWA et al. 2007; PIETERS et al. 2007). Em estudos prévios, incluindo a experiência de grupos cooperativos no tratamento de leucemias agudas, a SLE nos lactentes apresentou taxas que variaram de 42% a 70%. A Tabela 5 mostra as taxas de SLE nos principais estudos sobre LLA em lactentes.

Tabela 5 - Sobrevida livre de eventos em lactentes menores de 1 ano de idade portadores de LLA, segundo os principais estudos (grupos cooperativos ou registros de câncer).

Nome do Protocolo	Período do estudo	Número de pacientes < 1 ano de idade	SLE (%)	Referência
CCG-107; -1883	1984-1993	237	33-39 (4 anos)	REAMAN 1999
UK-ALL-92	1992-1999	86	33 (4 anos)	CHESELLS 2002a
Study XIIIB	1994-1998	10	70 (5 anos)	PUI 2004
ALL-BFM(-86,-90,-95)	1986-1999	119	43 (8 anos)	MORICKE 2005
DFCI ALL 95-01	1996-2000	14	42 (5 anos)	MOGHRABI 2007
AIEOP-91/95	1991-2000	52	45 (5 anos)	BIONDI 2006
CCG1953	1996-2000	115	41,7(5 anos)	HILDEN 2006
MLL-96; -98	1995-2001	102	50,9(5 anos)	TOMIZAWA 2007
Interfant-99	1999-2006	482	47 (4 anos)	PIETERS 2007

CCG= Children Cancer Group; UK-ALL= United Kingdom-Acute Lymphoblastic Leukemia; ALL-BFM= Acute Lymphoblastic Leukemia-BFM group; DFCI-ALL= Dana Farber Cancer Institute Group; AIEOP= Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica.

1.3 PAPEL DO POLIMORISMO GENÉTICO NA LLA DA INFÂNCIA

Enquanto aspectos clínicos e biológicos das leucemias são vastamente descritos, pouco se sabe sobre os fatores que influenciam a susceptibilidade genética à leucemia. De uma forma geral, o câncer esporádico, como a LLA, é uma doença complexa na qual o efeito de genes de “baixa penetrância” pode ser modulado por fatores externos, modificando, então, o risco individual ao câncer. Tem sido descrito que DNA variantes de genes metabolizadores de carcinógenos são preditores de risco para LLA em crianças, o que vem de encontro à suposição de que fatores de susceptibilidade genética têm um importante papel na leucemogênese

(KRAJINOVIC et al. 1999; SINNETT et al. 2000). Polimorfismos genéticos nas enzimas metabolizadoras de drogas são comuns e podem contribuir para o risco de desenvolvimento da LLA na infância (KRAJINOVIC et al. 1999; DAVIES et al. 2002; BALTA et al. 2003). Também, variações na atividade de enzimas implicadas no metabolismo do ácido folínico, como as que podem ocorrer com a enzima metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR), que desempenha papel indireto na síntese do DNA, podem ter importância na susceptibilidade à leucemia (WIEMELS et al. 2001; KRAJINOVIC et al. 2004). A deficiência de folato induz ao dano cromossômico, à formação de organelas frágeis e micronúcleos, fatores geralmente associados à tumorigênese (KIM 2000). Como a MTHFR tem função importante no metabolismo do folato, qualquer mudança na sua atividade, que resulte de polimorfismos no gene correspondente, pode modificar a susceptibilidade ao câncer (BOLUFER et al. 2006). Existem 2 polimorfismos comuns no gene *MTHFR*: uma transição do aminoácido C para T no nucleotídeo 677 (C677T), e uma transversão A para C na posição 1298 (A1298C) (WEISBERG et al. 1998). SKIBOLA et al. (1999) demonstraram a associação entre estes 2 polimorfismos com menor risco (fator protetor) de desenvolvimento de LLA em pacientes adultos, com a hipótese de que ambos os polimorfismos (que na forma homozigótica leva à diminuição da atividade da enzima e ao aumento do pool de metileno-THF, com redução do pool de metil-THF) podem reduzir a incorporação errônea de uracil ao DNA, diminuindo o risco de danos ao cromossomo e consequentemente diminuindo o risco de desenvolver leucemia.

KRAJINOVIC et al. (2004), em estudo realizado em crianças, sugeriram efeito protetor da variante homozigótica CC1298, e também que os genótipos CC677 e AA1298 estavam associados a um risco maior de desenvolvimento de LLA, quando comparados aos outros genótipos. Nesta última citação, os autores sugerem que crianças com atividade normal da enzima MTHFR são mais susceptíveis à LLA do que as crianças que apresentam atividade reduzida da enzima associada à presença dos alelos T677 e C1298. Explicando mais claramente, as crianças que são carreadoras dos alelos T677 e C1298 parecem ter susceptibilidade menor à LLA, principalmente os homozigotos para uma ou outra variante: **T677T/A1298A** ou **C677C/C1298C** (Tabela 6).

Tabela 6 - Atividade catalítica e risco para desenvolvimento de LLA segundo o genótipo da enzima MTHFR.

Genótipo	Atividade catalítica da enzima MTHFR	Risco para LLA	Referência
677			
CC	Normal	↑	Krajnovic 2004
CT	Reduzida	↓	Franco 2001; Zanrosso 2006
TT	Reduzida	↓	Pereira 2006 (em adultos)
1298			
AA	Normal	↑	Krajnovic 2004
AC	Reduzida	↓	Zanrosso 2006 (em crianças não brancas)
CC	Reduzida	↓	Krajnovic 2004

↑ = elevado; ↓ = diminuído

A experiência brasileira no estudo da importância do polimorfismo da MTHFR e o desenvolvimento de LLA pode ser evidenciada por meio de 3 trabalhos: i) FRANCO et al. (2001) determinaram a prevalência das

mutações do *MTHFR* C677T e A1298C em crianças menores de 15 anos com LLA por meio de estudo caso-controle. Os achados indicaram que *MTHFR*C677T foi associada à menor risco de desenvolver LLA, enquanto que *MTHFR*A1298C não afetou significativamente o risco de desenvolvimento de LLA na população estudada; ii) ZANROSSO et al. (2006) estudaram a influência dos polimorfismos *MTHFR*677C>T e *MTHFR*1298A>C para o risco de LLA também por meio de estudo caso-controle. Os autores relataram que não houve associação entre os polimorfismos 677C>T ou 1298A>C e risco de LLA na amostra total (casos e controles), contudo o alelo 677T foi associado à diminuição do risco de desenvolver LLA em crianças não brancas. Neste estudo, o polimorfismo 1298A>C apresentou-se como um fator de risco importante para o desenvolvimento de LLA; iii) PEREIRA et al. (2006) publicaram meta-análise sobre este assunto, com o objetivo de avaliar a associação entre os polimorfismos C677T e A1298C e o risco de LLA. A meta-análise do polimorfismo C677T incluiu 13 estudos com um total de 4.894 indivíduos (crianças e adultos). O genótipo TT não teve associação estatisticamente significativa com a redução de risco para LLA em crianças. Porém, indivíduos homozigóticos para o alelo 677T exibiram uma diminuição de 2,2 vezes no risco para LLA em adultos. Nenhuma associação entre a variante A1298C e susceptibilidade para LLA em adultos ou crianças foi encontrada.

O presente trabalho não terá como objetivo investigar o risco de aparecimento de LLA em lactentes, de acordo com o polimorfismo do gene *MTHFR* encontrado nos mesmos, mas sim adicionar esta variável ao modelo

de escore prognóstico, estudando-se a possibilidade deste fator genético interferir na caracterização do prognóstico deste grupo de pacientes.

1.4 IMPORTÂNCIA DE ESTUDO DE ESCORE PROGNÓSTICO

A combinação de fatores presentes ao diagnóstico permite a identificação de diferentes grupos de risco. Isto tem utilidade na determinação do prognóstico do paciente e na determinação da melhor abordagem terapêutica.

Para as leucemias, bem como para outras neoplasias, a importância do significado **prognóstico** das variáveis relacionadas às características clínicas dos pacientes, às suas alterações genéticas e moleculares e ao tipo de tratamento empregado tem sido demonstrada em diversos estudos. Negligenciar este fato pode gerar importantes problemas na interpretação de resultados de trabalhos científicos, incluindo a impossibilidade de atribuir exclusivamente à terapêutica as diferenças de sobrevida.

A razão pela qual esses fatores não são incorporados aos principais esquemas de classificação e tratamento reside na dificuldade de mensurá-los objetivamente. O desenvolvimento de índices que incluam os mais importantes fatores prognósticos de uma neoplasia é fundamental, pois eles proporcionam uma estimativa melhor e mais individualizada do prognóstico. A construção de um escore prognóstico deve obedecer a critérios científicos rigorosos (FIELDING e HENSON 1993):

- os fatores estudados devem apresentar significado biológico;

- o tamanho da amostra deve ser suficiente para evitar julgamentos precipitados consequentes a erros estatísticos (tipos I ou II). O número da amostra pode aumentar o poder estatístico para identificar fatores prognósticos não identificados em estudos anteriores;
- deve ser feito esforço para evitar viés de seleção dos pacientes do estudo;
- as ferramentas estatísticas utilizadas devem ser adequadas para a determinação do valor prognóstico independente de uma nova variável, sendo necessária sua comparação, através de análise multivariada, com os fatores prognósticos já estabelecidos.

Obedecendo a estes critérios, o trabalho em discussão atingirá um dos 5 maiores propósitos da análise multivariada: atribuir pontuações a variáveis importantes e combiná-las em um único escore para uma melhor estimativa da evolução clínica dos pacientes (CONCATO et al. 1993).

Não há descrição na literatura sobre escore prognóstico em pacientes lactentes com LLA. Nenhum dos trabalhos citados desenvolveu escores prognósticos.

Comparando esta coorte com os relatos já descritos em literatura (Tabela 7), poderá ser observado que a mesma representa casuística única em termos populacionais. Este estudo não fez análise dos resultados de determinado protocolo, mas estudou as características clínicas e biológicas que poderiam ter importância como fator prognóstico nesta faixa etária, baseado em dados encontrados na literatura.

Há na literatura médica atual inúmeros trabalhos que referem a construção de escores prognósticos em diversas doenças oncológicas e em diversas faixas etárias, com a intenção de determinar quais pacientes terão maior risco para determinados eventos (como exemplos o óbito e a recaída) durante o curso de suas doenças.

Como exemplo de fatores prognósticos identificados em uma determinada doença está o trabalho de PASSMORE et al. (1995), que propuseram novo sistema de escore prognóstico “FPC” (hemoglobina fetal, plaquetas e citogenética) para crianças com Leucemia Mielomonocítica Crônica Juvenil (LMMC). Os critérios clínicos, morfológicos e citogenéticos foram analisados em um grupo de 68 crianças com Síndrome Mielodisplástica (SMD), do *Hospital For Sick Children, London UK*, no período de 1971 – 1991 onde 50% dos pacientes foram classificados como LMMC segundo a classificação FAB. Os autores concluíram que o grupo com pior prognóstico foi aquele com HbF maior que 10%, plaquetas abaixo de $40 \times 10^9/l$ e presença de 2 ou mais anormalidades do cariótipo. O grupo com escore 0 apresentou 5 anos de sobrevida, enquanto aqueles que apresentavam escore 2 ou 3 morreram antes de 4 anos do diagnóstico. Outros fatores prognósticos estão associados ao subtipo de SMD e seu tratamento, como os descritos por HASS e GARDNER (1996).

Tabela 7 - Casuística e idade de lactentes portadores de LLA segundo dados de literatura.

Autor	Número de pacientes	Idade	Período estudado	Referência
Pieters et al.	482	< 12 meses	1999-2005	Lancet 2007
Nagayama et al.	101	< 12 meses	1995-2002	Blood 2006
Biondi et al.	52	< 12 meses	1991-2000	Hematologica 2006
Hilden et al.	115	< 12 meses	1996-2000	Blood 2006
Ishii et al.	116	< 12 meses	1995-2001	Pediatr Blood Cancer 2006
Pui CH et al.	149	< 12 meses	1983 - 1995	Leukemia 2003
Chessells JM et al. ^a	118	< 12 meses	1987 - 1999	Leukemia 2002
Chessells JM et al. ^b	126	< 18 meses	1992 - 1999	Br J Haematol 2002
Borkhardt A et al.	77	< 12 meses	1994 - 2000	Leukemia 2002
Cabrera ME et al.	18	< 18 meses	1989 - 1999	Rev Med Chile 2001
Isoyama K et al.	62	< 12 meses	1977 - 1995	Pediatr Int 1999
Dordelmann M et al.	106	< 12 meses	1983 - 1995	Blood 1999
Heerema NA et al.	135	< 12 meses	1988 - 1993	Leukemia 1999
Reaman GH et al.	234	< 12 meses	1984 - 1993	J Clin Oncol 1999
Frankel LS et al.	82	< 12 meses	1984 - 1990	J Pediatr Hematol Oncol 1997
Pui CH et al.	96	< 24 meses	1980 - 1994	Leukemia 1996
Ferster A et al.	28	< 12 meses	1982 - 1989	Br J Haematol 1994

Em 1997, GREENBERG et al. (1997) propuseram o Sistema Internacional de Escore para Prognóstico (IPSS) em SMD para pacientes adultos. Foram avaliadas variáveis que apresentavam impacto na evolução para Leucemia Mielóide Aguda (porcentagem de blastos na medula óssea, anormalidades citogenéticas e número de citopenias no sangue periférico), e

para sobrevida (somados idade e sexo à lista). Após estudo da citogenética, os pacientes foram subdivididos em riscos: a) bom quando o cariótipo era normal, -Y sozinho, del(5q) sozinho; b) ruim quando o resultado era complexo (≥ 3 anormalidades) ou cromossomo 7 anormal; e c) intermediário quando apresentava outras anormalidade. Este sistema de classificação mostrou-se útil para o planejamento terapêutico desta patologia em adultos e vem sendo utilizado até hoje.

A importância de escores prognósticos também repousa no fato de que este pode ser de ajuda na prática clínica diária, envolvendo parâmetros de fácil acesso pelos médicos no momento da consulta clínica. SOUTO et al. (1997), estudando 59 pacientes portadores de SMD, elaboraram um sistema de escore que se mostrou mais prático e rápido em relação a escores previamente estabelecidos. Este escore foi capaz de identificar os pacientes de alto risco, risco intermediário e baixo risco para óbito, mas utilizando parâmetros [porcentagem de células blásticas na medula óssea, nível de hemoglobina (g/dl), contagem de leucócitos ($\times 10^9/l$) e a relação EM (eritróide/mielóide)] considerados essenciais na caracterização da doença destes pacientes.

Este mesmo grupo elaborou outro sistema de escore prognóstico em pacientes portadores de Leucemia Mielóide Crônica (LMC) que permitiu a identificação, já ao diagnóstico, de diferentes grupos de risco para óbito. Este tipo de escore pode ser útil na determinação da abordagem terapêutica do paciente desde o início de seu tratamento (BRAGA et al. 1996).

*Eu amo aquele que deseja o impossível.
Johan Wolfgang Von Goethe (1748 – 1832)*

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

- 1 Analisar as características clínicas e biológicas em pacientes lactentes (< 24 meses de vida);
- 2 Identificar fatores prognósticos clínicos e biológicos;
- 3 Construir escore prognóstico;
- 4 Estimar a probabilidade de sobrevida global para o grupo estudado.

É necessário ter o caos cá dentro para gerar uma estrela.
Friedrich Nietzsche (1844 – 1900)

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

O presente estudo retrospectivo foi realizado a partir de informações clínicas de pacientes enviadas para diagnóstico no Laboratório do Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrica - Divisão de Medicina Experimental, Centro de Pesquisa (MedEx, CPq), Instituto Nacional de Câncer (INCA), como parte do Grupo Cooperativo Brasileiro de Estudo da Leucemia Aguda no Lactente (BCSGIAL – *Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia*) entre o período de Janeiro de 1990 e Dezembro de 2003.

3.1.1 Critérios de elegibilidade

Foram considerados elegíveis para este estudo todos os pacientes menores de 24 meses de idade, com diagnóstico de Leucemia Linfocítica Aguda.

3.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos todos os pacientes admitidos no período do estudo que não tinham informação sobre data de nascimento, data do diagnóstico ou data de seguimento.

3.2 MÉTODOS

Realizou-se análise retrospectiva dos casos notificados no estudo epidemiológico-molecular da CPq-INCA, entre o período de Janeiro de 1990 e Dezembro de 2003. Os casos eram provenientes de instituições hospitalares dos estados da Bahia, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo e Distrito Federal.

As variáveis clínicas e laboratoriais analisadas foram coletadas de fichas preenchidas ao encaminhamento para diagnóstico do “Estudo sobre Leucemias Agudas do Lactente” (Anexo 1).

Para definição do subtipo celular da LLA e identificação dos rearranjos do gene *MLL*, foram enviadas amostras biológicas (medula óssea e sangue periférico) ao laboratório.

Os testes diagnósticos foram a avaliação morfológica dos aspirados de medula óssea e esfregaço de sangue periférico, análise do perfil imunofenotípico por citometria de fluxo e análises citogenéticas convencionais e moleculares.

- **IMUNOFENOTIPAGEM**

Na imunofenotipagem, painel padrão foi utilizado para os seguintes anticorpos monoclonais: CD79a, CD7, CD22, CD19, CD10, CD13, CD33, CD41/42, CD34 e aMPO, TdT (conforme ficha Anexo 1). Dependendo do padrão de reatividade das células blásticas em determinadas áreas identificadas pelo CD45 por citometria de fluxo, os casos foram considerados

positivos para um determinado antígeno se $\geq 30\%$ das células expressavam tal antígeno, de acordo com os critérios estabelecidos pelo Grupo Europeu para a Caracterização Imunológica das Leucemias - classificação EGIL (BENE et al. 1995). Em resumo, os casos de LLA eram oriundos de células da linhagem B (pró-B, pré-B ou célula B madura) se pelo menos 30% das células leucêmicas analisadas fossem positivas para CD19 ou CD24 e menos que 30% positivas para CD2, CD5 e CD7. Os casos foram classificados como oriundos de células da linhagem T se pelo menos 30% dos blastos isolados fossem positivos para CD2, CD5 ou CD7 e menos de 30% fossem positivos para CD19 ou CD24.

- **CITOGENÉTICA CONVENCIONAL POR BANDEAMENTO G E MOLECULAR**

Foi realizada a citogenética convencional após cultura de pequena duração e colchecinizacão para obtenção de mitoses. Análise de pelo menos 20 metáfases e a definição de anormalidade cromossômica foi descrita de acordo com o Sistema Internacional para a Nomenclatura de Citogenética Humana (MITELMAN 1995). A citogenética molecular foi realizada por meio de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) nos casos previamente analisados por RT-PCR cujos resultados foram negativos para *AF4/MLL*, inconclusivos ou em casos com material biológico insuficiente para os testes de citogenética convencional ou análise molecular, conforme descrito por EMERENCIANO et al. (2006).

- **REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE VIA TRANSCRIPTASE REVERSA**

A investigação da presença do rearranjo do gene *MLL* com parceiros mais prevalentes (*AF4*, *AF9* e *ENL*) foi feita por meio da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR), em todas as amostras dos pacientes cujas análises citogenéticas (banda G) foram negativas ou inconclusivas (ausência de crescimento de células na cultura, ausência de metáfases suficientes para a análise).

- **Extração de RNA e síntese do cDNA**

RNA total foi preparado com o uso de kit de reagente TRIzol (Gibco/BRL, Carlsbad, CA, USA, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi armazenado a -70°C até ser realizada a síntese do cDNA. O cDNA foi gerado por transcrição reversa de 5µg de RNA total usando-se Ready-To Go™ T-Primed First-Strand Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA, 2001), e armazenado à -20°C. As integridades do RNA e cDNA foram examinadas por amplificação de um fragmento do gene *GAPDH*, usando os *primers* F1 (5'-TGACCCCTTCATTGACCTCA-3') e R1 (5'-AGTCCTTCCACGATACCAAA-3').

- **Análise do RT-PCR**

A presença da fusão *MLL/AF4* foi feita por RT-PCR utilizando-se os primers já descritos por BIOMED-1 Concerted Action (VAN DONGEN et al. 1999). A linhagem celular RS4 foi utilizada como controle positivo na fusão gênica *MLL/AF4*. A detecção das demais translocações *MLL/ENL*,

MLL/ELL, *MLL/AF9* e *MLL/AF10* foram feitas com primers descritos previamente (RUBNITZ et al. 1996; ANDERSSON et al. 2001). Como não dispunhamos de nenhuma linhagem celular para a fusão dos genes *MLL/ENL*, *MLL/ELL*, *MLL/AF9* e *MLL/AF10*, foram usadas amostras de pacientes cujas alterações foram previamente reconhecidas pela citogenética convencional (EMERENCIANO et al. 2006). As reações foram executadas em termo-ciclador (PCR-System 9700 Gene Amp[®], Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), como se segue: 95°C por 60 segundos para descongelamento inicial, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos, e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Para observação, os produtos do PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% seguido por coloração com brometo de etídio.

- **HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA**

Análises de metáfases (quando disponíveis) e interfases foram documentadas de acordo com os critérios descritos por HOPMAN et al. (1994). Pelo menos 200 células foram analisadas em cada amostra pelo *software* FISH (Cytovision, Applied Imaging, San Jose CA, USA). A hibridização foi realizada utilizando-se sonda *dual color*, segundo o protocolo recomendado por *Vysis Incorporation*. No caso de rompimento do gene *MLL*, as células em interfase/metáfase mostram um sinal laranja e verde localizados proximalmente, representando o gene *MLL* normal. A presença de sinal laranja e verde separados indica quebra no *MLL*. Nas células em

metáfase, a transposição do sinal laranja a um cromossomo derivativo indica translocação da parte 3' do gene *MLL*.

- **POLIMORFISMOS DO GENE *MTHFR***

A genotipagem do *MTHFR* foi feita por meio de PCR. As regiões contendo os polimorfismos 677 e 1298 foram amplificadas separadamente. Para o nucleotídeo 677, foram usados os primers CCTTGAACAGGTGGAGGCC (intrônico) e CAAAGAAAAGCTGCGTGATGAT (exônico) (158bp), e para o nucleotídeo 1298, foram usados os primers GCAAGTCCCCCAAGGAGG e GGTCCCCACTTCCAGCATC (145bp). As reações de PCR (50ml) continham 50mM KCl, 10 mM TrisZHCl (pH 8,3), 2,5 pmol de cada NTP, 1,25 unidades de polimerase Taq, e 80 ng de DNA, sendo submetidas a 40 ciclos (1 min a 94oC, 1 min a 60oC, 1 min a 72oC). O resultado da amplificação foi monitorado por eletroforese em agarose. O restante da reação foi submetida a digestão com *HinF1* (para o nucleotídeo 677) ou *MbolI* (para o nucleotídeo 1298) e depois submetido a eletroforese em 0,7% de agarose com 2% de Synergel (Diversified Biotech). Para o nucleotídeo 677, um produto não digerido do PCR (158bp) indicou um o tipo homozigoto (selvagem), 3 bandas de 158, 130 e 28 bp indicaram o tipo heterozigoto e 2 fragmentos de 130 e 28 bp indicaram variante homozigótica individual. Para o nucleotídeo 1298, 3 fragmentos de 29, 37 e 79 bp indicaram o tipo selvagem, 4 fragmentos de 29, 37, 79 e 108 bp indicaram tio heterozigoto e 2 fragmentos de 37 e 108 indicaram variante homozigótica individual.

3.2.1 Variáveis Estudadas

As variáveis consideradas no estudo continham informações acerca do paciente, dados clínicos e laboratoriais à época do diagnóstico, diagnóstico propriamente dito, determinação do polimorfismo *MTHFR* e seguimento.

A seguir são descritas cada variável do estudo:

- Sexo:
 - Masculino
 - Feminino
- Raça - foi considerada a raça sugerida pela mãe ou responsável pelo paciente no momento do diagnóstico da leucemia:
 - Branco
 - Não branco
- Idade (meses):
 - ≤ 14 meses de idade
 - > 14 meses de idade
- Época do diagnóstico de leucemia - dividida de acordo com os exames utilizados para diagnóstico disponíveis em cada período:
 - Período 1 (1990-1994): a caracterização biológica dos casos foi realizada por meio de análise morfológica do aspirado da medula óssea e citoquímica, testes imunofenotípicos e citogenética convencional;
 - Período 2 (1995-1999): a caracterização dos casos foi realizada com exames de imunofenotipagens, citogenética

convencional e molecular com sonda específica para *MLL* (Southern Blot);

- Período 3 (2000-2004): a análise de RT-PCR foi incorporada aos exames de diagnóstico, além do FISH.
- Hepatomegalia: foi determinada clinicamente, por meio de exame físico e mensuração da distância entre RCD e borda inferior do órgão palpado, em centímetros. Foi utilizado o percentil 50 como categoria desta variável:
 - $\leq 4\text{cm}$
 - $> 4\text{cm}$
- Esplenomegalia: foi determinada clinicamente, por meio de exame físico e mensuração da distância entre RCE e borda inferior do órgão palpado, em centímetros. Foi utilizado o percentil 50 como categoria desta variável:
 - $\leq 4\text{cm}$
 - $> 4\text{cm}$
- Presença de linfonodos patológicos palpáveis:
 - Sim
 - Não
- Número de leucócitos ao diagnóstico ($\times 10^9/\text{l}$):
 - 0 – 50
 - 51 – 100
 - >100

- Blastos – determinados pela quantidade de blastos encontrados na análise da medula óssea (descrita em porcentagem). Foi utilizado o percentil 50 como categoria desta variável:
 - $\leq 82\%$
 - $> 82\%$

- Subtipo FAB - segundo classificação descrita por BENNET et al. (1976):
 - L1
 - L2

- Status do antígeno CALLA (CD10):
 - Positivo
 - Negativo

- Imunofenótipo: segundo critérios descritos pelo Grupo Europeu para a Caracterização Imunológica das Leucemias [EGIL] (BENE et al. 1995)
 - pró-B
 - LLA B comum
 - pré-B
 - LLA T

- Presença de rearranjo do gene *MLL*:
 - Presente
 - Ausente

- Determinação do polimorfismo no gene *MTHFR*:

- C677T
- C677C
- T677T
- A1298C
- A1298A
- C1298C
- Protocolo de tratamento – de acordo com o esquema de tratamento que era recomendado em cada uma das instituições que participaram deste trabalho (o Anexo 3 detalha todos os esquemas de tratamento do GBTLI utilizados):
 - GBTLI
 - outros
- Data da última informação;
- “*Status*” do paciente na data da última informação:
 - vivo
 - morto
 - perdido de seguimento

3.2.2 Análises Estatísticas

A análise descritiva foi feita por meio de medidas de tendência central (média e mediana), dispersão (desvio padrão), análise comparativa das características clínicas e biológicas (qui-quadrado), estimativa da probabilidade de sobrevivência pelo método de Kaplan-Meier (KAPLAN e MEIER 1958).

As diferenças nas curvas de sobrevida foram testadas de acordo com o teste de *log-rank* e a análise da influência de fatores prognósticos pelo modelo dos riscos proporcionais de Cox (COX 1972).

Em todas as análises o intervalo de confiança calculado foi de 95% e foi utilizado o nível de significância de 5%.

O escore preditivo foi construído atribuindo-se pontos numéricos a cada variável baseado no valor da HR, e dividindo-se este número pelo menor valor do β do modelo. À partir de cada valor obtido, este foi aproximado para um número inteiro, ou o número inteiro foi somado de 0,5 (KURASHIMA et al. 2005).

As análises de sobrevida e construção de escore prognóstico foram feitas quando havia, no mínimo, 36 meses de acompanhamento.

Os critérios para consideração de um paciente perdido de seguimento foi a falta de informação atualizada maior que 1 ano após a última informação registrada. Estes pacientes foram excluídos da análise de sobrevida.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

Todas as informações coletadas neste projeto foram objeto de sigilo no seu tratamento, não tendo sido veiculadas informações individuais de pacientes. Todos os familiares responsáveis pelas crianças participantes deste estudo receberam um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2), aprovado pelos comitês de ética institucionais. Para aprovação foi

necessária a assinatura dos pais ou responsáveis; os casos cujos pais ou responsáveis não concordaram em participar do estudo, após o devido esclarecimento sobre os objetivos do mesmo, foram excluídos da análise.

Eu prefiro o erro do entusiasmo à indiferença do bom senso.
Anatole France (1844 – 1924)

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DESCRITIVA

No período entre 1990 e 2003 foram registrados no BCSGIAL 335 pacientes menores de 24 meses de vida com informação de diagnóstico de LLA (Figura 3). Destes, 86 foram excluídos pelos seguintes motivos:

- mudança do diagnóstico para outra doença hematológica: 6 pacientes:
 - 1 paciente – Leucemia Mielóide Aguda M4 (LMA-M4),
 - 1 paciente – Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC),
 - 2 pacientes – Síndrome Mieloproliferativa da Síndrome de Down,
 - 1 paciente sem definição do tipo de leucemia;
 - 1 paciente com LLA-L3;
- sem informação sobre data de nascimento ou data de diagnóstico ou data de seguimento (impossibilitando as análises de sobrevida para o presente estudo): 80 pacientes.

Assim, o total de 249 pacientes foi analisado, distribuídos da seguinte forma: Período 1 com 50 pacientes, Período 2 com 86 pacientes e período 3 com 113 pacientes.

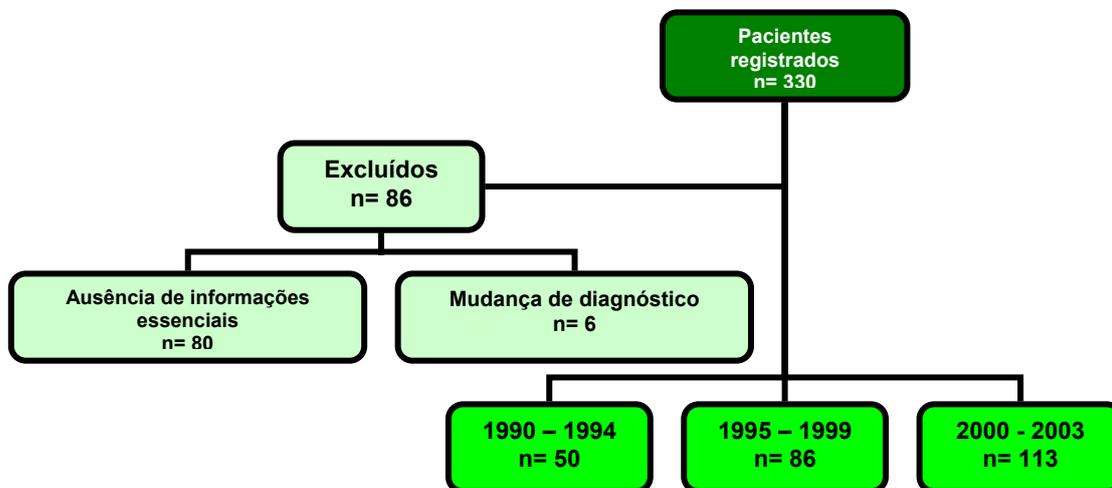


Figura 3 - Diagrama do total de pacientes registrados, excluídos e analisados no presente estudo, segundo o período analisado, 1990 – 2003.

4.1.1 Dados demográficos

Entre os períodos analisados, não houve diferença significativa referente à idade e cor da pele.

Em relação ao sexo, enquanto que no Período 1 não houve predominância de nenhum gênero, no Período 2 houve predominância discreta do sexo feminino (57%) e no Período 3, discreta predominância do sexo masculino (52%). Na Tabela 8 estão resumidas as características demográficas demográficas da coorte estudada.

A maioria dos pacientes foi classificada por suas mães ou responsáveis, no momento do diagnóstico, como sendo da cor branca (185 pacientes – 74% - em todos os 3 períodos da análise).

A média e mediana de idade para todo o grupo foram de 12,8 meses e 14,1 meses, respectivamente. Não se notou diferenças significantes entre média e mediana de faixa etária para cada período estudado: Período 1: média= 12,7 meses e mediana= 14,2 meses; Período 2: média= 12,8 meses e mediana= 14,1 meses; Período 3: média= 13 meses e mediana= 13,9 meses.

Considerando-se apenas a faixa etária ≤ 14 meses de idade, sem relacioná-la aos períodos do estudo, a frequência de pacientes ≤ 3 meses, de 3 a 6 meses e ≥ 6 meses foi de 37 (26%), 25 (17%) e 81 (57%), respectivamente, com média de 7,8 meses.

Tabela 8 - Número e porcentagem de pacientes segundo características demográficas, por período do estudo.

VARIÁVEL	CATEGORIA	PERÍODO			Total n (%)
		Período 1 n (%)	Período 2 n (%)	Período 3 n (%)	
Sexo	Masculino	25 (50)	37 (43)	59 (52)	121 (49)
	Feminino	25 (50)	49 (57)	54 (48)	128 (51)
Raça	Branca	37 (74)	70 (81)	78 (69)	185 (74)
	Não branca	13 (26)	16 (19)	35 (31)	64 (26)
Faixa etária	≤ 14 meses	27 (54)	50 (58)	66 (58)	143 (57)
	> 14 meses	23 (46)	36 (42)	47 (42)	106 (43)

4.1.2 Dados clínico-laboratoriais

Os principais aspectos clínicos e laboratoriais ao diagnóstico são mostrados na Tabela 9.

Não houve diferença significativa em relação aos aspectos clínicos e laboratoriais nos períodos avaliados. De forma geral, notou-se uma maior

frequência de visceromegalias nestes pacientes. Em 60% dos casos não houve relato de linfonodos palpáveis.

Os aspectos laboratoriais nos mostraram maior frequência de casos com menos que $50 \times 10^9/l$ leucócitos (55%), seguida de 30% de casos com mais de $100 \times 10^9/l$ leucócitos.

Tabela 9 - Número e porcentagem de pacientes segundo aspectos clínicos e laboratoriais, por período do estudo.

VARIÁVEL	CATEGORIA	PERÍODO			
		Período 1 n (%)	Período 2 n (%)	Período 3 n (%)	Total n(%)
Aspectos clínicos					
Hepatomegalia (cm)	≤ 4	19 (38)	33 (41)	38 (53)	90 (44)
	> 4	31 (62)	48 (59)	34 (47)	113 (56)
Esplenomegalia (cm)	≤ 4	19 (38)	29 (35)	32 (45)	80 (39)
	> 4	31 (62)	53 (65)	39 (55)	123 (61)
Presença de linfonodos palpáveis	Sim	16 (38)	34 (42)	40 (39)	90 (40)
	Não	26 (62)	47 (58)	62 (61)	135 (60)
Aspectos laboratoriais					
Número de leucócitos ($\times 10^9/l$)	0 – 50	30 (60)	42 (50)	64 (58)	136 (55)
	51 – 100	6 (12)	14 (17)	16 (14)	36 (15)
	> 100	14 (28)	28 (33)	31 (28)	73 (30)
Blastos (%)	≤ 82	24 (49)	40 (47)	47 (50)	111 (49)
	> 82	25 (51)	45 (53)	46 (50)	116 (51)
FAB	L1	36 (73)	75 (87)	69 (83)	180 (83)
	L2	13 (27)	11 (13)	14 (17)	38 (17)
CD10	Positivo	21 (57)	40 (52)	58 (54)	119 (54)
	Negativo	16 (43)	37 (48)	49 (46)	102 (46)
EGIL	pró-B	15 (42)	37 (46)	41 (38)	93 (42)
	pré-B	--	2 (03)	3 (03)	5 (02)
	B comum	21 (58)	35 (44)	56 (52)	112 (50)
	pró-T	--	6 (07)	8 (07)	14 (06)
MLL	Presente	7 (35)	24 (51)	26 (39)	57 (42)
	Ausente	13 (65)	23 (49)	41 (61)	77 (58)
Tratamento					
Protocolo	GBTLI	25 (64)	45 (80)	44 (98)	114(81)
	Outros	14 (36)	11 (20)	1 (02)	26 (19)

O subtipo FAB L1 foi o mais relatado na avaliação da morfologia da medula óssea (83% de todos os casos), assim como a maioria dos casos apresentava positividade para o antígeno CD10 (54%). Segundo a classificação EGIL, 50% dos pacientes apresentavam leucemia de células B comum, 42% pró-B. Apenas 6% dos casos eram pró-T e 2% pré-B.

Em relação ao gene *MLL*, em 58% dos casos não foi encontrada alteração, contra 42% dos pacientes com alteração neste gene.

A informação sobre o protocolo terapêutico utilizado mostra que o tratamento dos pacientes foi, na grande maioria dos casos (81%), feito com os protocolos do GBTLI (-85, -93 e -99). Foi possível verificar, entre os 3 diferentes períodos, que a informação sobre a utilização dos protocolos do GBTLI foi se tornando cada vez maior com o passar do tempo, passando de 64% no Período 1 para 98% no Período 3.

4.1.3 Dados do polimorfismo do MTHFR

A Tabela 10 mostra a frequência dos genótipos do *MTHFR677* e *MTHFR1298* na população estudada em cada período.

Tabela 10 – Número e porcentagem de pacientes segundo genótipo do MTHFR, por período do estudo.

VARIÁVEL	CATEGORIA	PERÍODO			Total n(%)
		Período 1 n (%)	Período 2 n (%)	Período 3 n (%)	
<i>MTHFR677</i>	CC	3 (37)	11 (48)	29 (50)	43 (48)
	CT/TT	5 (63)	12 (52)	29 (50)	46 (52)
<i>MTHFR1298</i>	AA	6 (100)	14 (70)	28 (51)	48 (59)
	AC/CC	--	6 (30)	27 (49)	33 (41)

4.2 ASSOCIAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS

4.2.1 Associação entre faixa etária e demais variáveis

A Tabela 11 mostra a associação entre a idade e as variáveis do estudo.

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre idade e sexo, raça, hepatomegalia, presença de linfonodos palpáveis, número de leucócitos ($\times 10^9/l$), subtipo FAB, e genótipos do *MTHFR*. Não houve também, associação entre idade e os períodos do estudo ($p=0,86$, dado não mostrado na Tabela 10).

Tabela 11 - Associação entre idade e todas as variáveis do estudo.

VARIÁVEL	CATEGORIA	IDADE		p*
		≤14 meses	>14 meses	
Sexo	Masculino	64 (45)	57 (54)	0,100
	Feminino	79 (55)	49 (46)	
Raça	Branca	112 (78)	73 (69)	0,062
	Não branca	31 (22)	33 (31)	
Hepatomegalia (cm)	≤ 4	46 (40)	44 (50)	0,101
	> 4	69 (60)	44 (50)	
Esplenomegalia (cm)	≤ 4	37 (32)	43 (49)	0,009
	> 4	79 (68)	44 (51)	
Presença de linfonodos palpáveis	Sim	50 (39)	40 (41)	0,423
	Não	78 (61)	57 (59)	
Número de leucócitos (x10 ⁹ /l)	0 – 50	68 (48)	68 (66)	0,160
	51 – 100	23 (16)	13 (13)	
	> 100	51 (36)	22 (21)	
Blastos (%)	≤ 82	55 (43)	56 (57)	0,029
	> 82	73 (57)	43 (43)	
FAB	L1	99 (82)	81 (83)	0,443
	L2	22 (18)	16 (17)	
CD10	Positivo	55 (42)	64 (70)	<0,001
	Negativo	75 (58)	27 (30)	
EGIL	pró-B	72 (55)	21 (23)	<0,001
	pré-B	4 (03)	1 (01)	
	B comum	52 (39)	60 (65)	
	pró-T	4 (03)	10 (11)	
MLL	Presente	43 (59)	14 (23)	<0,001
	Ausente	30 (41)	47 (77)	
Protocolo	GBTLI	68 (87)	46 (74)	0,041
	Outros	10 (13)	16 (26)	
MTHFR677	CC	20 (43)	23 (53)	0,233
	CT/TT	26 (57)	20 (47)	
MTHFR1298	AA	27 (66)	21 (53)	0,159
	AC/CC	14 (34)	19 (47)	

*p = probabilidade descritiva do valor do qui-quadrado calculado

As variáveis que mostraram associação estatisticamente significativa com a idade foram: esplenomegalia, blastos, CD10, classificação EGIL, status do gene *MLL* e o protocolo de tratamento utilizado.

4.2.2 Associação entre status do gene *MLL* e demais variáveis

A Tabela 12 mostra apenas as associações estatisticamente significativas entre o status do gene *MLL* e demais variáveis do estudo, com exceção à faixa etária, já mostrada na Tabela 10 ($p < 0,001$). Nesta associação, a variável EGIL foi avaliada apenas com as categorias LLA comum e pró-B, devido ao pequeno número das outras duas categorias.

As variáveis que mostraram associação estatisticamente significativa com o status do gene *MLL* foram: idade, sexo, esplenomegalia, número de leucócitos ao diagnóstico, blastos, CD10 e classificação EGIL.

Tabela 12 - Associação entre status do gene *MLL* e demais variáveis do estudo.

VARIÁVEL	CATEGORIA	STATUS <i>MLL</i>		p*
		presente	ausente	
Sexo	Masculino	22 (39)	48 (62)	<0,001
	Feminino	35 (61)	29 (37)	
Esplenomegalia (cm)	≤ 4	13 (27)	30 (48)	0,018
	> 4	35 (73)	32 (52)	
Número de leucócitos (x10 ⁹ /l)	0 – 50	23 (41)	52 (67)	0,003
	51 – 100	7 (12)	10 (13)	
	> 100	26 (47)	15 (20)	
Blastos (%)	≤ 82	18 (33)	43 (60)	0,002
	> 82	37 (67)	29 (40)	
CD10	Positivo	11 (20)	55 (79)	<0,001
	Negativo	45 (80)	15 (21)	
EGIL	pró-B	46 (84)	13 (20)	<0,001
	B comum	9 (16)	52 (80)	

*p = probabilidade descritiva do valor do qui-quadrado calculado

4.2.3 Associação entre classificação EGIL e demais variáveis

A Tabela 13 mostra apenas as associações estatisticamente significativas entre a classificação EGIL e demais variáveis do estudo, com exceção à faixa etária, já mostrada na Tabela 10 ($p < 0,001$). Da mesma forma que na associação anterior (status do gene *MLL* e variáveis), também aqui a variável EGIL foi avaliada apenas com as categorias LLA comum e pró-B, devido ao pequeno número das outras duas categorias.

As variáveis que mostraram associação estatisticamente significativa com a classificação EGIL foram: idade, sexo, raça, número de leucócitos ao diagnóstico, blastos e CD10.

Tabela 13 - Associação entre classificação EGIL e demais variáveis do estudo.

VARIÁVEL	CATEGORIA	EGIL		p*
		LLA comum	pró-B	
Sexo	Masculino	65 (58)	34 (37)	0,002
	Feminino	47 (42)	59 (63)	
Raça	Branca	76 (68)	75 (81)	0,027
	Não branca	36 (32)	18 (19)	
Número de leucócitos ($\times 10^9/l$)	0 – 50	67 (61)	41 (45)	0,050
	51 – 100	15 (14)	14 (15)	
	> 100	28 (25)	37 (40)	
Blastos (%)	≤ 82	55 (54)	30 (34)	0,006
	> 82	47 (46)	57 (66)	
CD10	Positivo	103 (95)	6 (7)	<0,001
	Negativo	5 (05)	85 (93)	

*p = probabilidade descritiva do valor do qui-quadrado calculado.

4.3 ANÁLISE DE SOBREVIDA

4.3.1 Sobrevida Global

A mediana de seguimento foi de 23 meses (1 mês – 6,5 meses).

A sobrevida global para todos os pacientes estudados após 12 meses, 36 meses e 60 meses, foi de 66%, 50% e 45%, respectivamente, independente do protocolo terapêutico utilizado e do período de estudo (Figura 4).

A sobrevida global após 60 meses, para cada período do estudo, foi de 29% no Período 1, 46% no Período 2 e 52% no período 3, conforme apresentado na Tabela 14.

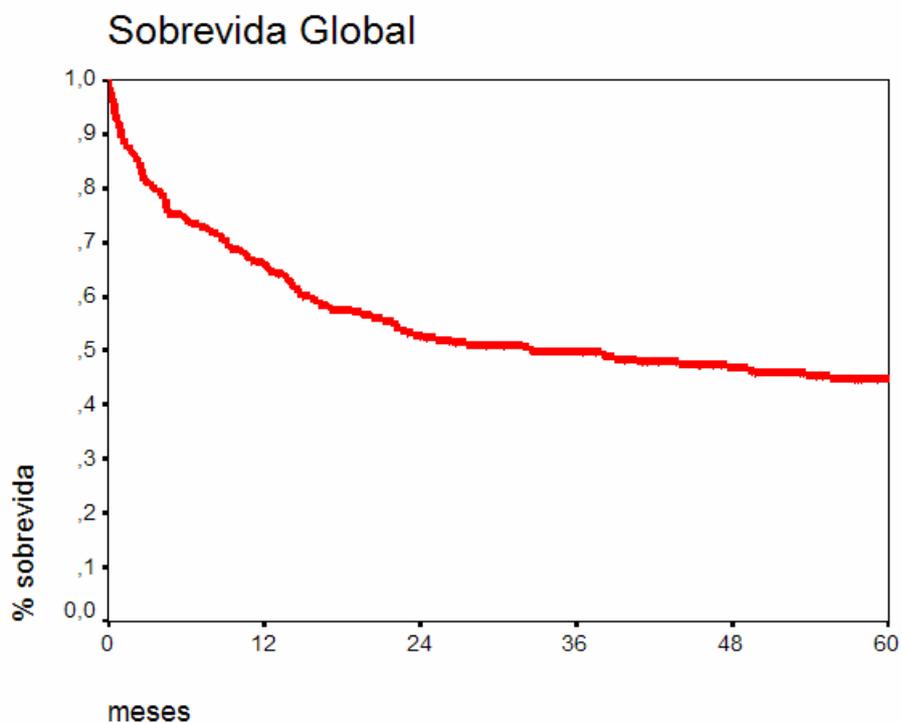


Figura 4 – Sobrevida global para todo o grupo de pacientes (n=249).

Tabela 14 - Probabilidades de sobrevida global em 12 meses, 36 meses e 60 meses para cada período do estudo.

PERÍODO	SOBREVIDA		
	12 meses (%)	36 meses (%)	60 meses (%)
Período 1	60	39	29
Período 2	68	50	46
Período 3	68	54	52

4.3.2 Sobrevida de acordo com variáveis

A análise de sobrevida não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação ao sexo, presença de hepato e esplenomegalia, presença de linfonodos palpáveis e genótipo *MTHFR1298* (Tabela 15).

As melhores taxas de sobrevida foram encontradas nas seguintes categorias: pacientes com faixa etária > 14 meses, pacientes com contagem leucocitária menor que $50 \times 10^9/l$, positividade para o antígeno CD10, leucemia classificada de acordo com o subtipo EGIL LLA comum e pacientes tratados com protocolos do GBTLI.

Tabela 15 – Probabilidades de sobrevida global em 60 meses de acordo com variáveis demográficas, clínico-laboratoriais, tratamento e genótipo do *MTHFR*.

Variável	Categoria	Sobrevida em 60 meses (%)	p*
Sexo	Masculino	42	0,941
	Feminino	47	
Raça	Branca	42	0,123
	Não branca	53	
Faixa Etária	≤ 14 meses	39	0,019
	> 14 meses	52	
Hepatomegalia (cm)	< 4	40	0,562
	> 4	44	
Esplenomegalia (cm)	< 4	43	0,821
	> 4	42	
Presença de linfonodos palpáveis	Sim	44	0,790
	Não	44	
Número de leucócitos (x10 ⁹ /l)	0 – 50	54	<0,001
	51 – 100	38	
	> 100	29	
Blastos (%)	< 82	49	0,070
	> 82	38	
FAB	L1	48	0,386
	L2	36	
CD10	Positivo	53	0,004
	Negativo	37	
EGIL	pró-B	33	0,003
	pré-B	80	
	B comum	53	
	pró-T	50	
MLL	Presente	37	0,222
	Ausente	44	
Protocolo	GBTLI	56	0,017
	Outros	30	
<i>MTHFR677</i>	CC	52	0,165
	CT/TT	36	
<i>MTHFR1298</i>	AA	45	0,732
	AC/CC	44	

*p = log rank

4.3.3 Sobrevida das variáveis de acordo com faixa etária

As sobrevidas em 60 meses de cada variável foram calculadas segundo a faixa etária (Tabela 16).

Na faixa etária ≤ 14 meses as taxas de sobrevida em 60 meses mostraram-se estatisticamente significativas para as seguintes variáveis:

contagem de leucócitos ao diagnóstico, CD10, classificação EGIL e genótipo *MTHFR677*.

Tabela 16 - Probabilidades de sobrevida global em 60 meses de todas as variáveis de acordo com a faixa etária.

Variável	Categoria	Sobrevida em 60 meses			
		≤14 meses (%)	*p	>14 meses (%)	*p
Sexo	Masculino	43		41	
	Feminino	35	0,184	65	0,045
Raça	Branca	38		47	
	Não branca	42	0,746	64	0,117
Hepatomegalia (cm)	< 4	32		49	
	> 4	39	0,498	54	0,598
Esplenomegalia (cm)	< 4	38		47	
	> 4	37	0,526	54	0,403
Presença de linfonodos palpáveis	Sim	40		49	
	Não	39	0,697	51	0,927
Número de leucócitos (x10 ⁹ /l)	0 – 50	56		53	
	51 – 100	25		59	
	> 100	25	0,002	39	0,254
Blastos (%)	< 82	45		53	
	> 82	32	0,062	49	0,805
FAB	L1	42		55	
	L2	27	0,773	48	0,440
CD10	Positivo	54		53	
	Negativo	28	0,002	62	0,494
EGIL	pró-B	24		61	
	B comum	55	<0,01	51	0,498
<i>MLL</i>	Presente	31		55	
	Ausente	42	0,200	45	0,648
Protocolo	GBTLI	46		72	
	Outros	30	0,333	28	0,002
<i>MTHFR677</i>	CC	53		51	
	CT/TT	22	0,039	52	0,761
<i>MTHFR1298</i>	AA	36		56	
	AC/CC	29	0,602	57	0,728

*p = log rank

Em relação à faixa etária > 14 meses, as variáveis que apresentaram significância estatística foram: sexo e protocolo utilizado.

Foi analisada também a sobrevida global em 60 meses nos pacientes ≤ 14 meses de acordo com as faixas etárias ≤ 3 meses (19%), 3 a 6 meses

(11%) e ≥ 6 meses (56%), mostrando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). (Figura 5).

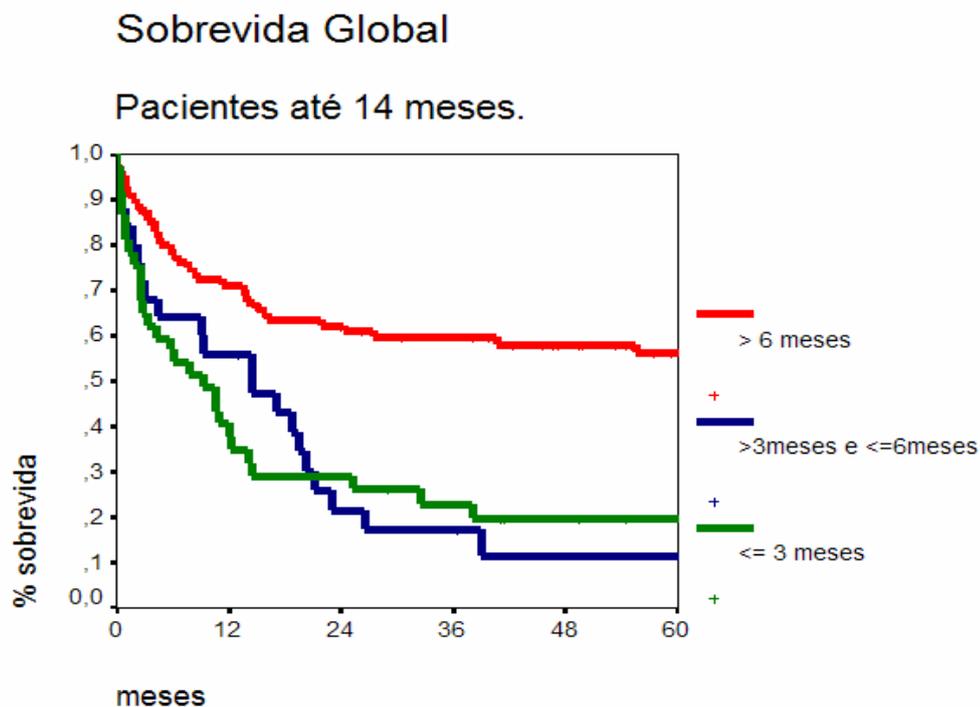


Figura 5 – Sobrevida global nos paciente ≤ 14 meses, de acordo com faixas etárias (n=143).

4.4 ANÁLISE MÚLTIPLA

Na análise conjunta, a escolha das variáveis foi baseada na magnitude do efeito prognóstico na sobrevida para cada variável.

4.4.1 Análise Múltipla para o grupo de pacientes ≤ 14 meses

As variáveis com valor prognóstico que permaneceram foram (Tabela 17):

- contagem de leucócitos ao diagnóstico

- classificação EGIL
- CD10
- genótipo *MTHFR677*.

Tabela 17 - Fatores preditivos para o óbito no grupo de pacientes ≤ 14 meses - análise múltipla (Cox).

Variável	Categoria	HR bruta	HR ajustada*	IC95% HR ajustada**	P
Leucócitos ($\times 10^9/l$)	0 – 50	1,00	1,00		
	51 – 100	2,05	0,98	[0,71;10,06]	0,146
	> 100	2,26	1,16	[1,21;8,48]	0,019
EGIL	B comum	1,00	1,00		
	Pró-B	2,50	62,64	[3,51;1117,6]	0,005
CD10	Positivo	1,00	1,00		
	Negativo	2,10	0,02	[0,00;0,32]	0,007
<i>MTHFR</i>	CC	1,00	1,00		
	CT/TT	2,26	2,56	[1,05;6,20]	0,038

*HRajustada: Hazard ratio ajustada

**IC 95%: Intervalo de Confiança

4.4.2 Análise Múltipla para o grupo de pacientes > 14 meses

As variáveis com valor prognóstico que permaneceram foram (Tabela 18):

- sexo
- protocolo

Tabela 18 - Fatores preditivos para o óbito no grupo de pacientes > 14 meses - análise múltipla (Cox).

Variável	Categoria	HR bruta	HR ajustada*	IC95% HR ajustada**	p
Sexo	Masculino	1,00	1,00		0,006
	Feminino	1,81	5,47	[1,62;18,48]	
Protocolo	GBTLI	1,00	1,0		0,005
	Outros	3,28	3,33	[1,45;7,66]	

*HRajustada: Hazard ratio ajustada

**IC 95%: Intervalo de Confiança

4.5 CONSTRUÇÃO DO ESCORE ATRAVÉS DO MODELO DA ANÁLISE MÚLTIPLA

Baseado nas variáveis com valor estatisticamente significativo, procedeu-se à construção de um modelo que contivesse valor preditivo máximo em relação à experiência conjunta do tempo de sobrevivência dos pacientes estudados.

4.5.1 Modelo de escore preditivo para os pacientes ≤ 14 meses

Foi possível analisar-se 40 pacientes para o desenvolvimento de um escore preditivo nos pacientes ≤ 14 meses de idade. As variáveis que foram incluídas no modelo, conforme acima citados, foram:

- contagem de leucócitos ao diagnóstico
- classificação EGIL
- CD10
- genótipo *MTHFR677*

O modelo de pontuação para os fatores preditivos para o óbito no grupo etário ≤ 14 meses é mostrado na Tabela 19.

Tabela 19 - Modelo de pontuação para os fatores preditivos para o óbito no grupo de pacientes ≤ 14 meses.

VARIÁVEL	CATEGORIA	PONTOS
Contagem de leucócitos ao diagnóstico ($\times 10^9/l$)	<50	0
	50 a 100	1,0
	> 100	1,5
Classificação EGIL	B comum	0
	pró – B	4,5
CD10	Positivo	0
	Negativo	4,5
Genótipo <i>MTHFR677</i>	CC	0
	TT/CT	1,0

A somatória dos pontos para cada paciente nos forneceu um escore final do paciente permitindo dividir a nossa população pelo percentil 75, de acordo com o risco de óbito.

- Grupo A: 33/40 pacientes (82%) e somatória dos pontos ≤ 10.5
- Grupo B: 7/40 pacientes (18%) e somatória dos pontos > 10.5

A probabilidade de sobrevida global em 60 meses para os grupos foi de (Figura 6): ($p=0,154$).

- Grupo A: a probabilidade de sobrevida global em 5 anos é 40,4%
- Grupo B: a probabilidade de sobrevida global em 5 anos é 0%

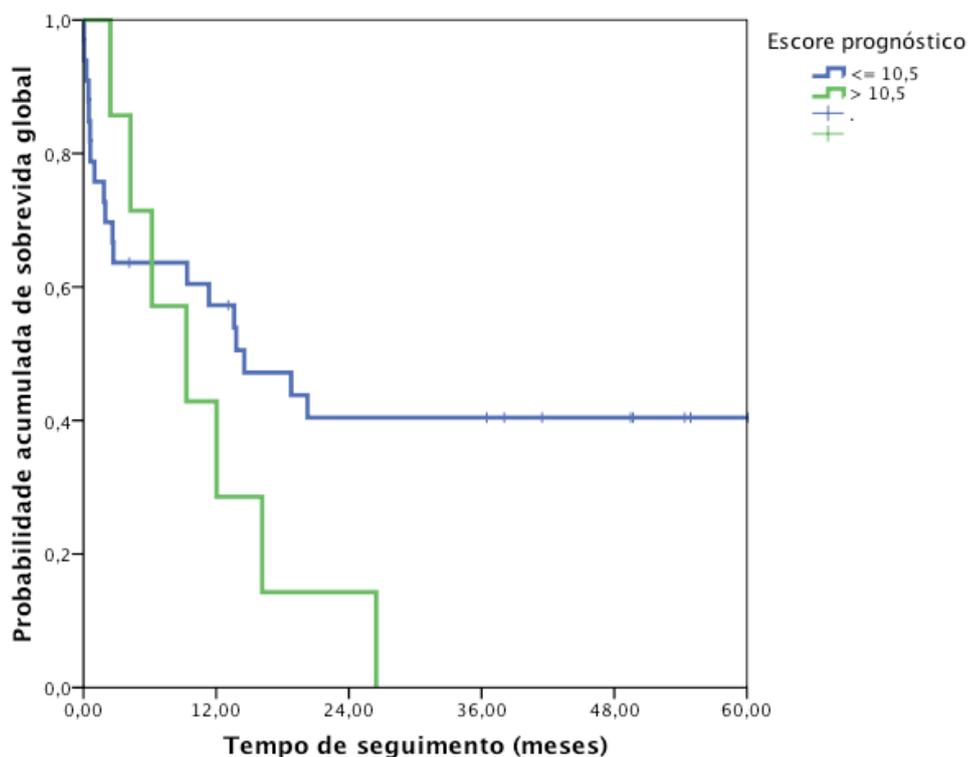


Figura 6 - Sobrevida global nos pacientes ≤ 14 meses, segundo escore preditivo.

4.5.2 Modelo de escore preditivo para os pacientes > 14 meses

No grupo de pacientes > 14 meses, foi possível analisar 62 pacientes para o desenvolvimento de um escore preditivo. As variáveis que foram incluídas no modelo, conforme acima citados, foram:

- sexo
- protocolo

Nos pacientes > 14 meses de idade, o modelo de pontuação para os fatores preditivos para o óbito é mostrado na Tabela 20.

Tabela 20 - Modelo de pontuação para os fatores preditivos para o óbito no grupo de pacientes > 14 meses.

VARIÁVEL	CATEGORIA	PONTOS
Sexo	Masculino	0
	Feminino	1,5
Protocolo	GBTLI	0
	Outros	1,0

A somatória dos pontos para cada paciente nos forneceu um escore final do paciente permitindo dividir a nossa população também pelo percentil 75, de acordo com o risco de óbito.

- Grupo A: 17/62 pacientes (27,4%) e somatória dos pontos igual a 0 (zero)
 - Grupo B: 35/62 pacientes (56,5%) e somatória dos pontos entre 1 e 1,5
 - Grupo C: 10/62 pacientes (16,1%) e somatória dos pontos igual a 2,5
- A probabilidade de sobrevida global em 60 meses para os grupos foi de (Figura 7): ($p < 0,001$).
- Grupo A: a probabilidade acumulada de sobrevida global após 5 anos foi de 94,1%
 - Grupo B: a probabilidade acumulada de sobrevida global após 5 anos foi de 59,8%
 - Grupo C: a probabilidade acumulada de sobrevida global após 5 anos foi de 10%.

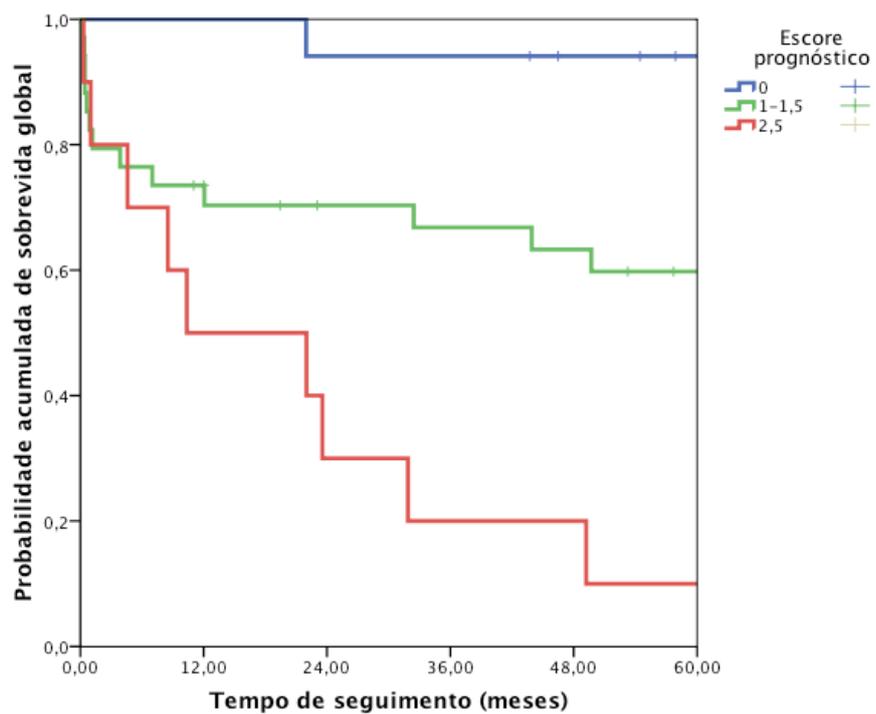


Figura 7 - Sobrevida global nos pacientes > 14 meses, segundo escore preditivo.

Eu jamais iria para a fogueira por uma opinião minha, afinal, não tenho certeza alguma. Porém, eu iria pelo direito de ter e mudar de opinião, quantas vezes eu quisesse.
Friedrich Nietzsche (1844 – 1900)

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Embora bastante rara, a leucemia é o segundo câncer mais frequente em lactentes, o que pode representar uma incidência de 5% a 10% das leucemias na infância, com uma incidência de 44 por milhão de lactentes, ou aproximadamente 200 lactentes diagnosticados nos EUA a cada ano (RIES et al. 2007). No Brasil, a recente publicação do INCA, referente à incidência de câncer na criança e adolescente, apontou a maior taxa de incidência (ajustada por idade) de LLA em pacientes menores de 12 meses por 1.000.000 de crianças e adolescentes em Belo Horizonte (56,09), no período entre 2000 e 2001, e a menor taxa em Fortaleza (4,85), no período entre 1998 e 2002 (Ministério da Saúde 2008).

A definição “histórica” de lactentes, quando estamos nos referindo às leucemias, está baseada na informação de que crianças menores de 1 ano de idade têm resposta pobre ao tratamento quimioterápico quando comparadas às faixas etárias maiores. Neste trabalho, estão incluídos pacientes menores de 24 meses, visto que EMERENCIANO et al. (2006) publicaram estudo do BCSGIAL onde analisaram a LLA de 140 pacientes menores de 24 meses, mostrando que a faixa etária de pacientes que tinham até 14 meses de idade ao diagnóstico apresentava dominância de casos com imunofenótipo pró-B e *MLL* positivo ($p < 0,0001$).

Os períodos aqui determinados se referem basicamente ao acesso dos pacientes aos centros especializados no diagnóstico e tratamento de

neoplasias. No Brasil, até o início da década de 90, o diagnóstico de leucemia aguda era baseado quase que exclusivamente na análise morfológica do aspirado de medula óssea e células circulantes no sangue periférico. À partir de 1995, a imunofenotipagem por citometria de fluxo e os exames de citogenética se tornaram mais acessíveis, pelo menos, aos maiores centros oncológicos. No entanto, foi aproximadamente após 10 anos que os recursos da biologia molecular garantiram seu espaço na complementação do diagnóstico das leucemias agudas. Embora de grande utilidade nas decisões terapêuticas, o acesso a marcadores moleculares ainda são direcionados pelos laboratórios de pesquisas acadêmicas.

O BCSGIAL, desde a sua criação em 1999, vem crescendo como grupo cooperativo, fato evidenciado aqui neste trabalho pelo número crescente de pacientes inscritos nos 3 períodos avaliados. Inicialmente 50 pacientes foram notificados no Período 1, passando a 113 pacientes no Período 3, que tem como limite o ano de 2003. A primeira publicação de resultados do BCSGIAL foi em 2001, quando SILVA et al. (2001) descreveram o caso de um paciente de 5 meses de idade ao diagnóstico que apresentava a $t(5;15)(p15;q11-q13)$ associada com um prognóstico favorável. Desde então, são 10 artigos já publicados que relatam a experiência do grupo, desde de seus aspectos moleculares e biomarcadores até fatores de exposição ambiental associados à etiopatogenia das leucemias dos lactentes no Brasil (Quadro 1). No entanto, nenhum trabalho foi realizado para avaliar o impacto de tais biomarcadores na sobrevivência destas crianças. Portanto, nosso trabalho se propôs analisar se a somatória

dos aspectos clínicos e moleculares pode formar um escore preditivo capaz de orientar a realização de um protocolo terapêutico adaptado à realidade brasileira.

Quadro 1 - Artigos (Periódico, Ano, Autor e Título) atualmente publicados pelo BCSGIAL.

Periódico, ano	Autor	Título
Blood Cells Mol Dis. 2008	Pombo de Oliveira MS	Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia.
Leuk Lymphoma. 2008	Emerenciano M	Clinical relevance of FLT3 gene abnormalities in Brazilian patients with infant leukemia.
Br J Cancer. 2008	Koifman S	High birth weight as an important risk factor for infant leukemia.
Braz J Med Biol Res. 2007	Emerenciano M	Acute leukemia in early childhood.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006	Pombo-de- Oliveira MS	Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy.
Pediatr Blood Cancer. 2006	Emerenciano M	Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia.
Haematologica. 2004	Mendes W	The apparent excess of acute promyelocytic leukemia in infant acute leukemias in Brazil.
Leukemia. 2003	Macrini CM	MLL AT-hook sequence is strongly conserved in infant acute leukemia with or without MLL gene rearrangement.
Cancer Genet Cytogenet. 2001	Silva ML	A new case of t(5;15)(p15;q11-q13) in infant acute lymphoblastic leukemia.

Em relação aos dados demográficos, observou-se equilíbrio entre os sexos (relação de 1,05F:1M). Em revisão da literatura, o sexo feminino tem sido encontrado em uma frequência discretamente maior, com relação que varia de 1,08F:1M até 1,2F:1M (GURNEY et al. 1997; PIETERS et al. 2007).

A raça branca foi mais frequente que a não branca (74% x 26%). GURNEY et al. (1997), relatando a incidência de câncer em lactentes até 12 meses de idade, referiram incidência 32% maior na raça branca que na raça negra. Especificamente em lactentes portadores de LLA, a raça branca também tem sido relatada como a mais acometida pelos estudos do CCG, em 2 publicações sobre 3 protocolos consecutivos para o tratamento da LLA em lactentes (REAMAN et al. 1999; HILDEN et al. 2006). Este aspecto não pode ser analisado nesta coorte, tendo em vista as dificuldades de definição de raça no Brasil.

Nossa casuística encontrou um número maior de pacientes na faixa etária ≤ 14 meses de idade (57% vs. 43%). Ao contrário, PUI et al. (1996) publicaram uma série de 96 pacientes lactentes menores que 24 meses com LLA, relatando que 70% dos pacientes eram maiores de 12 meses. Já CABRERA et al. (2001) analisaram 18 lactentes menores de 18 meses de idade, sendo 72% menores que 14 meses.

Ao ser analisada apenas a faixa etária ≤ 14 meses, encontrou-se média de 7,8 meses e maior número de pacientes acima dos 6 – 14 meses (54%). O fato da idade aqui considerada ser 14 meses (e não 12 meses de idade, como em outros trabalhos) faz com que a faixa etária entre 3 e 6 meses tenha um percentual menor quando comparado aos trabalhos que consideram a idade limite de 12 meses. A Tabela 21 mostra esta comparação.

Tabela 21 – Número e porcentagem das faixas etárias em lactentes ≤ 14 meses.

Faixa etária	Presente trabalho 2009 (BCSGIAL) n (%)	Reaman et al. 1999 (CCG-1883) n (%)	Hilden et al. 2006 (CCG-1953) n (%)	Tomizawa et al. 2007 (JILSG) n (%)	Pieters et al. 2007 (Interfant-99) n (%)
≤ 3 meses	37 (26)	21 (16)	24 (21)	19 (19)	112 (23)
3 a 6 meses	25 (17)	30 (26)	37 (32)	31 (30)	121 (25)
≥ 6 meses	81(57)	78 (58)	54 (47)	52 (51)	249 (52)

Ainda sobre a faixa etária ≤ 14 meses, as média e mediana de idades nos pacientes com e sem *MLL* rearranjado foram de 6,4 meses e 6,2 meses vs. 8,5 meses e 8,7 meses, respectivamente. Embora esta não seja uma diferença estatisticamente significativa, estes números vão de encontro aos da literatura, que mostram que pacientes com rearranjo do *MLL* são mais jovens em relação aos que não apresentam rearranjo deste gene.

Os dados clínicos mostraram, de forma geral, que a maioria dos pacientes apresentavam considerável doença extra-medular (aqui mensurada por hepatoesplenomegalia e linfonodos palpáveis), sendo estas taxas de 56%, 61% e 60%, respectivamente. Esta constatação encontra semelhança em outras séries publicadas (LAUER et al. 1998; REAMAN et al. 1999; HILDEN et al. 2006).

Pode-se dizer que repousam nos dados laboratoriais os aspectos mais importantes da LLA do lactente. Quando foram analisados todos os pacientes (menores que 24 meses), encontramos 45% apresentando contagem de leucócitos ao diagnóstico maior que $50 \times 10^9/l$. Esta

porcentagem aumenta para 52% ao analisarmos os pacientes até 14 meses (vs. 34% nos maiores de 14 meses, $p=NS$). Na faixa etária menor que 14 meses, estes dados se assemelham aos da literatura, que também indica contagem leucocitária $> 50 \times 10^9/l$ na maioria dos pacientes (REAMAN et al. 1999; CHESSELLS et al. 2002b; HILDEN et al. 2006; TOMIZAWA et al. 2007; PIETERS et al. 2007). Interessantemente, a contagem de leucócitos $> 50 \times 10^9/l$ ao diagnóstico, um forte preditor prognóstico em crianças maiores com LLA na maioria dos dados da literatura, só o é marginalmente na LLA dos lactentes (PUI et al. 1996; HILDEN et al. 2006; PIETERS et al. 2007). A porcentagem de blastos na medula óssea ao diagnóstico não tem sido relatada nos trabalhos publicados que analisaram pacientes lactentes com LLA. Aqui, encontramos 51% dos pacientes com mais de 82% de blastos na medula óssea, com diferença estatisticamente significante nos pacientes ≤ 14 meses (57% vs. 43%, $p=0,029$). Em relação ao subtipo FAB, encontramos 83% dos pacientes com subtipo L1, não havendo diferença entre as faixas etárias. CABRERA et al. (2001) numa pequena série de pacientes, relataram 73% de lactentes com subtipo L1. Já REAMAN et al. (1999), analisando um total de 234 pacientes menores de 12 meses, observaram subtipo FAB L1 em 76% dos casos. Este também não é um aspecto muito discutido na literatura nos dias de hoje, visto esta classificação ter caído em desuso frente às armas diagnósticas atualmente utilizadas, como a imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular. São estes três aspectos que passaremos a discutir a seguir.

A maioria dos trabalhos relata a negatividade do antígeno CD10 nos pacientes lactentes com LLA. Em nossa casuística total, quando analisamos todos os pacientes menores que 24 meses, observa-se que 46% apresentou CD10 negativo, porém tal proporção muda significativamente ao analisarmos esta variável de acordo com as faixas etárias: nos pacientes ≤ 14 meses, 58% apresentou CD negativo, contra 30% nos > 14 meses ($p < 0,001$). Esta constatação vai de encontro a todos os trabalhos da literatura, sendo uma característica biológica importante nestes pacientes. Em séries descritas por grupos cooperativos, a porcentagem de pacientes menores de 12 meses com CD10 negativo chegou a 76% (MÖRICKÉ et al. 2005; HILDEN et al. 2006; TOMIZAWA et al. 2007). A negatividade do CD10, junto com outros aspectos fenotípicos (CD34+, CD19+, co-expressão de CD33/13/15) sugerem que a leucemia do lactente se origine progenitores de células B muito imaturos, tanto com características linfóides quanto mielóides (AUSTIN et al. 1998).

A análise da biologia da leucemia em lactentes em nosso trabalho continua ao analisarmos a classificação EGIL: em todo o grupo, 42% dos pacientes foram classificados com LLA pró-B, enquanto que 50% foram LLA comum, o que pode ser explicado pelo grupo de pacientes com idade superior a 14 meses. Ou seja, esta proporção ganha importância quando analisamos EGIL de acordo com as faixas etárias: nos ≤ 14 meses, 55% eram LLA pró-B e 65% eram LLA comum nos > 14 meses ($p < 0,001$). CHESSELLS et al. (2002b) relataram 62% de LLA pró-B em menores de 12 meses. Como já exposto acima, a associação dos achados biológicos indica

uma leucemia de células B bastante imaturas, e este fator pode ser a explicação do fato desta leucemia ser tão resistente ao tratamento quimioterápico (PIETERS et al. 1998). Finalizando a discussão sobre os resultados dos aspectos biológicos desta casuística, observamos que 58% dos pacientes até 24 meses apresentavam ausência de rearranjo no gene *MLL*. Mais uma vez, quando este dado foi analisado em relação às faixas etárias estudadas, o *MLL* estava rearranjado em 59% dos pacientes ≤ 14 meses e não rearranjado em 77% dos pacientes > 14 meses ($p < 0,001$). PUI et al. (1996) relataram 62% de pacientes com rearranjos do gene *MLL*, mas relatos da frequência do rearranjo do gene *MLL* em lactentes portadores de LLA menores que 12 meses variam entre 42% e 80% (CHESSELLS et al. 2002b; HARRISON et al. 2005; HILDEN et al. 2006; TOMIZAWA et al. 2007). Quando os rearranjos do *MLL* (com *AF4* e *AF9*) são avaliados em pacientes com LLA de 1 a 10 anos, sua frequência é de apenas 2% - 8%. (SILVERMAN et al. 2007; PUI et al. 2008).

Oitenta e um por cento ($n = 114$) dos pacientes analisados receberam tratamento quimioterápico de acordo com os protocolos estabelecidos pelo GBTLI, estratificados no grupo de alto risco (Anexo 3). Quando analisado de acordo com as faixas etárias, também a maioria dos pacientes receberam protocolos do GBTLI tanto nos ≤ 14 meses (87%) quanto nos > 14 meses (74%). Posto que cada paciente foi tratado em seu hospital de origem e sem supervisão quanto aos critérios de inclusão e exclusão, bem como sem monitoria em relação às adversidades ocorridas durante a execução dos protocolos, não é possível avaliar se todos os pacientes foram tratados de

maneira homogênea nas diferentes unidades do Brasil. Outro ponto a ser ressaltado é o de que nesta casuística, a informação sobre o protocolo terapêutico utilizado nos pacientes foi uma informação obtida de forma retrospectiva, com busca ativa por meio de contato com o médico que havia inscrito o paciente no projeto epidemiológico do BCSGIAL. A obtenção desta informação em apenas 140 pacientes pode ter prejudicado a avaliação da variável protocolo nesta análise.

A avaliação original dos genótipos *MTHFR677* e *MTHFR1298* foi realizada com um estudo caso-controle para avaliar as frequências dos genótipos associados ao risco do desenvolvimento de leucemias (ZANROSSO et al. 2006). Estas duas variáveis também foram analisadas em relação a suas frequências nesta coorte, com o objetivo de incluí-las na montagem do escore prognóstico para os lactentes. Posto isto, relatamos a frequência de 52% de polimorfismo *MTHFR677* (C→T) e 41% do *MTHFR1298* (A→C) nos pacientes até 24 meses. Os genes do ciclo do folato e em particular os polimorfismos do *MTHFR* são importantes marcadores, relatados como fatores protetores para o desenvolvimento de leucemias agudas, tanto em adultos quanto em crianças (SKIBOLA et al. 1999; FRANCO et al. 2001; KRAJINOVIC et al. 2004; PEREIRA et al. 2006). Ambos os genótipos não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando analisados de acordo com as faixas etárias.

A associação entre as faixas etárias e demais variáveis estudadas mostrou diferença estatisticamente significativa com esplenomegalia, blastos, CD10, classificação EGIL, gene *MLL* e protocolo de tratamento

utilizado. Os pacientes ≤ 14 meses de idade mostraram maior proporção de CD10 negativo, classificação EGIL pró-B e presença de rearranjo do gene *MLL*. Também demonstramos associações significativas entre o gene *MLL* e CD10 negativo (maior proporção de pacientes com rearranjo do *MLL* e CD10 negativo) e a classificação EGIL (gene *MLL* presente em 84% dos pacientes com leucemia de natureza imunológica pró-B) neste trabalho. Ainda, 93% dos pacientes pró-B apresentavam negatividade do antígeno CD10. Já foi provado que a negatividade do CD10, a presença de rearranjo do *MLL* e leucemias pró-B são fatores inter-relacionados, sendo que suas presenças estão inversamente relacionadas à idade (HILDEN et al. 2006; EMERENCIANO et al. 2007; PIETERS et al. 2007). A literatura aponta que rearranjos do *MLL* estão associados a 90% de casos CD10 negativo; também, lactentes mais jovens têm uma maior frequência de rearranjos do *MLL* (GREAVES 1996; EMERENCIANO et al. 2006). Já mencionado anteriormente, o BCSGIAL relatou que em lactentes com até 14 meses de idade, o subtipo pró-B e o rearranjo do *MLL* foram predominantes, enquanto que em lactentes mais velhos a maioria dos pacientes eram LLA comum e não apresentavam rearranjo do *MLL* (EMERENCIANO et al. 2006).

A ação precisa dos produtos da fusão envolvendo o *MLL* ainda é desconhecida, porém estão associados com expressão anormal dos genes *HOX*, podendo levar a um crescimento anormal de células tronco hematopoiéticas (PIETERS e CARROLL 2008). Tanto a associação entre as faixas etárias e esplenomegalia quanto com blastos (em pacientes ≤ 14 meses, maior proporção de esplenomegalia e porcentagem de blastos na

medula óssea > 82%) não foram relatadas na literatura, não havendo motivo aparente para tal, a não ser pelo perfil agressivo que esta leucemia apresenta. Em relação ao protocolo utilizado, a explicação sobre a associação existente com as faixas etárias parece repousar no fato de que um pequeno número de pacientes recebeu outros protocolos que não os do GBTLI. Já é conhecido que as células jovens pró-B, das quais, em nossa casuística, se originam a maioria das leucemias em menores de 14 meses, são altamente resistentes a glicocorticóides (*in vitro* e *in vivo*), assim como à l-asparaginase (DORDELMANN et al. 1999; PIETERS et al. 2007), porém esta não poderá ser uma explicação para tal fato, visto termos, mesmo entre os protocolos GBTLI, diferentes esquemas terapêuticos, que envolviam ambas as drogas.

Encontramos também associação estatisticamente significativa entre o gene *MLL* e a contagem de leucócitos ao diagnóstico (mais pacientes ≤ 14 meses apresentavam *MLL* rearranjado e contagem de leucócitos $> 50 \times 10^9/l$), fato já bem descrito na literatura (CHESSELLS et al. 2002b; MÖRICKE et al. 2005). Se a agressividade desta doença explicaria tal associação, assim como com esplenomegalia e blastos (≤ 14 meses e *MLL* rearranjado com grande proporção de baço $> 4\text{cm}$ e blastos $> 85\%$ ao diagnóstico) é questão ainda sem resposta. Em nossa casuística, a presença do rearranjo do *MLL* em ≤ 14 meses também apresentou associação estatisticamente significativa com o sexo feminino.

As taxas de SG em 5 anos para os pacientes lactentes portadores de LLA variam entre 32% a 60% (CHESSELLS et al. 2002b; PIETERS et al.

2007; TOMIZAWA et al. 2007). Em nossa casuística, a SG em 5 anos foi de 45% nos pacientes menores que 24 meses, sendo notada melhora importante nesta taxa com o decorrer dos períodos avaliados: de 29% no período 1 (1990-1994) a 52% no período 3 (2000-2003). As melhores taxas de sobrevida foram encontradas em pacientes com faixa etária > 14 meses, pacientes com contagem leucocitária < $50 \times 10^9/l$, CD10 positivo, pacientes com imunofenótipo LLA B comum e pacientes tratados com protocolos do GBTLI. Como um grupo separado, não há meios de comparar estas taxas de sobrevida a dados da literatura, visto que os pacientes entre 12 e 24 meses não têm suas taxas de sobrevidas descritas nos trabalhos que estudaram pacientes lactentes com LLA.

Analisando-se a sobrevida global no grupo ≤ 14 meses de idade, observamos as maiores taxas nos pacientes com contagem leucocitária menor que $50 \times 10^9/l$, CD10 positivo, imunofenótipo LLA B comum e genótipo *MTHFRC677C*. Mais uma vez, também nesta faixa etária, no que se refere às sobrevidas em relação à contagem leucocitária, CD10 positivo e imunofenótipo, os dados encontrados estão de acordo com o que é relatado na literatura (PUI et al. 1996; REAMAN et al. 1999; CHESSELLS et al. 2002b; MÖRICKE et al. 2005; HILDEN et al. 2006; TOMIZAWA et al. 2007; PIETERS et al. 2007). As taxas de sobrevida obtidas neste grupo não encontra embasamento na literatura no que se refere à falta de significância estatística em relação à presença do rearranjo do *MLL* e o genótipo *MTHFRC677C*. Como visto em todos os estudos em que o *MLL* foi avaliado, a sobrevida quando este gene apresenta rearranjo foi significativamente

menor (PUI et al. 1996; REAMAN et al. 1999; CHESSELLS et al. 2002b; MÖRICKE et al. 2005; HILDEN et al. 2006; TOMIZAWA et al. 2007; PIETERS et al. 2007; ZWEIDLER-MCKAY e HILDEN 2008). Em relação à sobrevida dos pacientes que apresentavam genótipo *MTHFR677C*, não há trabalhos na literatura que apresentem as taxas de sobrevida de acordo com cada variante deste genótipo. Tendo-se em consideração que o genótipo 677C foi considerado por poucos trabalhos que avaliaram seu risco em relação à LLA da infância como sendo responsável pelo aumento do risco e que os genótipos C677T e 677T apresentam-se como fatores protetores (FRANCO et al. 2001; KRAJINOVIC et al. 2004; ZANROSSO et al. 2006), seria possível esperar que a sobrevida dos pacientes com genótipo C677C fosse menor em relação aos pacientes C677T e T677T.

Em nossa casuística, as variáveis que se mostraram fatores preditivos independentes para a faixa etária ≤ 14 meses foram a contagem elevada de leucócitos $\geq 100 \times 10^9/l$, CD10 negativo, imunofenótipo pró-B e genótipo *MTHFR677T* ou *MTHFR677T*. Já na faixa etária > 14 meses, apenas o sexo masculino e o protocolo (outro que não o GBTLI) se mostraram fatores preditivos independentes. Todos estes aspectos apresentam-se também como fatores preditivos independentes em vários trabalhos encontrados na literatura, sendo apenas o genótipo do *MTHFR* o fator mais “novo” a ser estudado neste contexto, não havendo, ainda, muitos dados a respeito (REAMAN et al. 1999; PUI et al. 2003; KRAJINOVIC et al. 2004; MÖRICKE et al. 2005; HILDEN et al. 2006; ZANROSSO et al. 2006; STANULLA et al. 2007). PUI et al. (1996) em um dos primeiros trabalhos que apontaram

fatores prognósticos em lactentes portadores de LLA, mostraram que a presença de translocação envolvendo o gene *MLL* era fator independente, sendo associado, nesta publicação, a 3,4 vezes maior risco de evento adverso. O grupo do CCG já mostrou que a idade < 3 meses, a contagem elevada de leucócitos ao diagnóstico ($> 50 \times 10^9/l$), CD10 negativo e a presença de translocações envolvendo o cromossomo 11 são fatores preditivos independentes de pior sobrevida livre de eventos (REAMAN et al. 1999; HILDEN et al. 2006). Também CHESSELLS et al. (2002b), estudando um grupo de 86 pacientes, relataram que a idade (< 6 meses), elevada contagem de leucócitos e a presença de doença em SNC se mostraram como fatores prognósticos independentes. Neste trabalho, a presença de alterações relacionadas ao gene *MLL* não foi capaz de alterar a sobrevida de forma estatisticamente significativa. Mais recentemente, PIETERS et al. (2007) também identificaram fatores prognósticos independentes no estudo de 482 lactentes portadores de LLA, sendo a idade jovem (< 6 meses), CD10 negativo, rearranjos do gene *MLL* os aspectos clínicos importantes para o prognóstico. Já TOMIZAWA et al. (2007) identificaram, em uma série de 102 pacientes, apenas a idade e a presença de doença em SNC como aspectos independentes. A discussão sobre a ausência do rearranjo do gene *MLL* como fator prognóstico independente neste grupo de pacientes se torna importante à medida que trabalhos com um número cada vez maior de pacientes indicam que o prognóstico pobre da LLA nesta faixa etária pode não ser atribuído unicamente a um aspecto genético desfavorável.

Ao contrário do que vem sendo indicado pela literatura, que mostra evidências de que crianças portadoras de LLA (em coortes não exclusivamente de lactentes) com atividade normal da enzima MTHFR são mais susceptíveis à LLA do que as crianças que apresentam atividade reduzida da enzima (associada à presença dos alelos T677T e C1298C), nesta casuística, os pacientes na faixa etária ≤ 14 meses que apresentavam genótipo *MTHFRC677C* mostraram melhor SG em 60 meses (53% vs. 22%, $p=0,039$) em comparação aos genótipos C677T ou T677T, enquanto a literatura tem apontado que este genótipo pode estar relacionado a um risco maior de leucemia em estudos caso-controle (KRAJINOVIC et al. 2004), podendo ser o alelo T, possivelmente, o responsável por um efeito protetor em relação a este risco. Esta mesma autora levanta a questão de que o efeito do polimorfismo do *MTHFR* pode ser menos aparente quando níveis sanguíneos de folato na mãe dos pacientes estão adequados. Em outras palavras, a relevância deste fator pode se mostrar menos importante na susceptibilidade à leucemia quando há história de dieta suplementada com folato (KRAJINOVIC et al. 2004).

Finalizando esta discussão, para os pacientes ≤ 14 meses, o modelo de análise múltipla proporcionou um escore preditivo de óbito levando-se em consideração os fatores: leucócitos ao diagnóstico, CD10, classificação EGIL e genótipo *MTHFR*. Assim, um paciente ≤ 14 meses, portador de LLA e apresentando elevada contagem de leucócitos ao diagnóstico, CD10 negativo, classificação EGIL pró-B e genótipo *MTHFRC677T* ou *MTHFRT677T* apresentou probabilidade de estar vivo aos 5 anos de 0%.

Embora não haja diferença estatisticamente significativa com o grupo de mesma idade que não apresenta estes fatores, este é um dado que deve ser melhor explorado por meio de estudos cooperativos e prospectivos em nosso país. Para os pacientes > 14 meses de idade, o escore pode ser montado com os fatores sexo e protocolo utilizado.

Os principais resultados obtidos demonstraram que, também em nossa casuística, a LLA em lactentes é originada de células mais imaturas e pode ser preditora de doença mais agressiva. A construção de um escore prognóstico para este grupo de pacientes foi possível, ainda que se utilizando dados retrospectivos. A continuação do estudo das características biológicas dos pacientes lactentes portadores de LLA, de forma contínua e ativa, se faz necessária em nosso país, assim como o estabelecimento de tratamentos cooperativos padronizados.

*Há aquilo que se sabe e aquilo que se ignora.
Entre uma coisa e outra está aquilo que se supõe.*
André Gide (1869 – 1951)

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

O grupo de 249 pacientes menores que 24 meses de idade portadores de LLA apresentou as seguintes características:

- Sócio-demográficas:
 - houve predominância discreta (não significativa) do sexo feminino;
 - a maioria dos pacientes (74%) era da raça branca;
 - a mediana de idade para todo o grupo foi de 14,1 meses, sendo 57% eram lactentes \leq 14 meses de idade;
 - para os \leq 14 meses, 57% tinha entre 6 e 14 meses e 26% era \leq 3 meses.
- Clínico-laboratoriais:
 - 55% dos pacientes com contagem leucocitária menor que $50 \times 10^9/l$;
 - 54% apresentava CD10 negativo;
 - 50% dos casos classificados como imunofenótipo B comum e 42% pró-B;
 - os genótipos *MTHFRC677T* ou *MTHFRT677T* foram discretamente mais freqüentes que *MTHFRC677C*;
 - o genótipo *MTHFRA1298A* foi mais freqüente que o genótipo envolvendo o alelo C
- Tratamento:

- 81% dos pacientes receberam tratamento segundo protocolo do GBTLI.
- Associações:
 - A idade teve associação estatisticamente significativa com esplenomegalia, blastos, CD10 negativo, classificação EGIL pró-B, presença de rearranjo do gene *MLL* e protocolo;
 - O rearranjo do *MLL* apresentou-se associado ao sexo, esplenomegalia, número de leucócitos, blastos, CD10 negativo e imunofenótipo EGIL pró-B;
 - 93% dos pacientes pró-B apresentavam CD10 negativo.
- Sobrevidas:
 - A SG em 5 anos para todo o grupo foi de 45%;
 - As piores taxas de sobrevida estatisticamente significativas foram observadas nos pacientes ≤ 14 meses, com contagem leucocitária ao diagnóstico $> 100 \times 10^9/l$; CD10 negativo; imunofenótipo pró-B e que receberam tratamento outro que não do GBTLI;
 - Para a faixa etária ≤ 14 meses, a SG foi estatisticamente pior nos pacientes com contagem leucocitária ao diagnóstico $> 100 \times 10^9/l$; CD10 negativo; imunofenótipo pró-B e que apresentavam genótipo *MTHFR*677T ou *MTHFR*C677T.
- Fatores prognósticos:
 - Os fatores preditivos independentes para a faixa etária ≤ 14 meses foram: contagem de leucócitos, CD10, classificação EGIL e genótipo *MTHFR*677;

- Para a faixa etária > 14 meses, apenas o sexo e o protocolo utilizado foram fatores preditivos;
- Foi criado um modelo preditivo para o óbito, utilizando-se apenas os fatores preditivos independentes, para os pacientes ≤ 14 meses:

VARIÁVEL	CATEGORIA	PONTOS
Contagem de leucócitos ao diagnóstico	<50.00	0
	50 a 100 mil	1,0
	> 100000	1,5
Classificação EGIL	B comum	0
	pro – B	4,5
CD10	Positivo	0
	Negativo	4,5
Genótipo <i>MTHFR677</i>	CC	0
	TT/CT	1,0

- Foi criado um modelo preditivo para o óbito, utilizando-se apenas os fatores preditivos independentes, para os pacientes > 14 meses:

VARIÁVEL	CATEGORIA	PONTOS
Sexo	Masculino	0
	Feminino	1,5
Protocolo	GBTLI	0
	outros	1,0

*Há uma circulação comum, uma respiração comum.
Todas as coisas estão relacionadas.
Hipócrates (460 – 377 a.C.)*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarado CS, Austin GE, Borowitz MJ, et al. Myeloperoxidase gene expression in infant leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. **Leuk Lymphoma** 1998; 29:145-60.

Andersson A, Höglund M, Johansson B, et al. Paired multiplex reverse-transcriptase polymerase chain reaction (PMRT-PCR) analysis as a rapid and accurate diagnostic tool for the detection of MLL fusion genes in hematologic malignancies. **Leukemia** 2001; 15:1293-300.

Austin GE, Alvarado CS, Austin ED, et al. Prevalence of myeloperoxidase gene expression in infant acute lymphocytic leukemia. **Am J Clin Pathol** 1998; 110:575-81.

Balta G, Yuksek N, Ozyurek E, et al. Characterization of MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes in childhood acute leukemia. **Am J Hematol** 2003; 73:154-60.

Barry E, DeAngelo DJ, Neuberg D, et al. Favorable outcome for adolescents with acute lymphoblastic leukemia treated on Dana-Farber Cancer Institute Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium Protocols. **J Clin Oncol** 2007; 25:813-9.

Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classifications of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). **Leukemia** 1995; 9:1783-86.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. **Br J Haematol** 1976; 33:451-8.

Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui CH. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. **Blood** 2000; 96:24-33.

Biondi A, Rizzari C, Valsecchi MG, et al. Role of treatment intensification in infants with acute lymphoblastic leukemia: results of two consecutive AIEOP studies. **Haematologica** 2006; 91:534-7.

Bolufer P, Barragan E, Collado M, Cervera J, López JA, Sanz MA. Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression. **Leuk Res** 2006; 30:1471-91.

Borkhardt A, Wuchter C, Viehmann S, et al. Infant acute lymphoblastic leukemia - combined cytogenetic, immunophenotypical and molecular analysis of 77 cases. **Leukemia** 2002; 16:1685-90.

Braga GW, Chauffaille ML, Moncau JE, Souto EX, Silva MR, Kerbauy J. Chronic myeloid leukemia (CML): prognostic factors and survival analysis **Sao Paulo Med J** 1996; 114:1083-90.

Brandalise S, Odone V, Pereira W, Andrea M, Zanichelli M, Aranega V. Treatment results of three consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols: GBTLI-80, GBTLI-82 and -85. ALL Brazilian Group. **Leukemia** 1993; 7 Suppl 2:S142-5.

Cabrera ME, Campbell M, Quintana J, Undurraga MS, Ford AA, Greaves MF. Clinical significance and frequency of the 11q23/MLL genetic molecular alteration in Chilean infants with acute leukemia. **Rev Med Chil** 2001; 129:634-42.

Chessells JM, Harrison CJ, Kempinski H, et al. Clinical features, cytogenetics and outcome in acute lymphoblastic and myeloid leukaemia of infancy: report from the MRC Childhood Leukaemia working party. **Leukemia** 2002a; 16:776-84.

Chessells JM, Harrison CJ, Watson SL, Vora AJ, Richards SM; Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. Treatment of infants with lymphoblastic leukaemia: results of the UK Infant Protocols 1987-1999. **Br J Haematol** 2002b; 117:306-14.

Coebergh JW, Reedijk AM, de Vries E, et al. Leukaemia incidence and survival in children and adolescents in Europe during 1978-1997: report from the Automated Childhood Cancer Information System Project. **Eur J Cancer** 2006; 42:2019-36.

Concato J, Feinstein AR, Holford TR. The risk of determining risk with multivariable models. **Ann Intern Med** 1993; 118:201-10.

Cox DR. Regression models and life tables. **J R Stat Soc** 1972; 34:187-202.

Davies SM, Bhatia S, Ross JA, et al. Glutathione S-transferase genotypes, genetic susceptibility, and outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood** 2002; 100:67-71.

Dordelmann M, Reiter A, Borkhardt A, et al. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. **Blood** 1999; 94:1209-17.

Dreyer Z, Dinndorf P, Sather H, et al. Shortened, intensified therapy in infant ALL: a Pediatric Oncology Group study. American Society of Pediatric Hematology/Oncology. Toronto, Canada, 2007 [abstract]. **Pediatr Blood Cancer** 2007; 48:605, P9407. [Presented at 39th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, 2007 Nov 1-3; Mumbai: India]

Emerenciano M, Agudelo Arias DP, Coser VM, et al. Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia. **Pediatr Blood Cancer** 2006; 47:549-54.

Emerenciano M, Agudelo Arias DP, Coser VM, et al. Acute leukemia in early childhood. **Braz J Med Biol Res** 2007; 40:749-60.

Emerenciano M, Menezes J, Vasquez ML, et al. Clinical relevance of FLT3 gene abnormalities in Brazilian patients with infant leukemia. **Leuk Lymphoma** 2008; 49:2291-7.

Ferster A, Bertrand Y, Benoit Y, et al. Improved survival for acute lymphoblastic leukaemia in infancy: the experience of EORTC-Childhood Leukaemia Cooperative Group. **Br J Haematol** 1994; 86:284-90.

Fielding LP, Henson DE. Multiple prognostic factors and outcome analysis in patients with cancer. **Cancer** 1993; 71:2426-9.

Ford AM, Ridge SA, Cabrera ME, et al. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. **Nature** 1993; 363:358-60.

Forestier E, Schmiegelow K, Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology NOPHO. The incidence peaks of the childhood acute leukemias reflect specific cytogenetic aberrations. **J Pediatr Hematol Oncol** 2006; 28:486-95.

Franco RF, Simões BP, Tone LG, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol** 2001; 115:616-8.

Frankel LS, Ochs J, Shuster JJ, et al. Therapeutic trial for infant acute lymphoblastic leukemia: the Pediatric Oncology Group experience (POG 8493). **J Pediatr Hematol Oncol** 1997; 19:35-42.

Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:13950-4.

Greaves MF. Infant leukaemia biology, aetiology and treatment. **Leukemia** 1996; 10:372-7.

Greaves MF. Biological models for leukaemia and lymphoma. **IARC Sci Publ** 2004; (157):351-72.

Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in Mielodysplastic Syndromes. **Blood** 1997; 89:2079-88.

Gurney JG, Ross JA, Wall DA, Bleyer WA, Severson RK, Robison LL. Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992. **J Pediatr Hematol Oncol** 1997; 19:428-32.

Gurney JG, Severson RK, Davis S, Robison LL. Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. **Cancer** 1995; 75:2186-95.

Haas AO, Gardner H. Pathogenesis, biology, and management of myelodysplastic syndromes in children. **Semin Hematol** 1996; 33:225-35.

Harrison CJ, Moorman AV, Barber KE, et al. Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a UK Cancer Cytogenetics Group Study. **Br J Haematol** 2005; 129:520-30.

Heerema NA, Sather HN, Ge J, et al. Cytogenetic studies of infant acute lymphoblastic leukemia: poor prognosis of infants with t(4;11) - a report of the Children's Cancer Group. **Leukemia** 1999; 13:679-86.

Hilden JM, Dinndorf PA, Meerbaum SO, et al. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. **Blood** 2006; 108:441-51.

Hitzler JK, Zipursky A. Origins of leukaemia in children with down syndrome. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:11-20.

Hopman AH, Voorter CE, Ramaekers FC. Detection of genomic changes in cancer by in situ hybridization. **Mol Biol Rep** 1994; 19:31-44.

Ishii E, Oda M, Kinugawa N, et al. Features and outcome of neonatal leukemia in Japan: experience of the Japan infant leukemia study group. **Pediatr Blood Cancer** 2006; 47:268-72.

Isoyama K, Okawa H, Hayashi Y, et al. Clinical and biological aspects of acute lymphoblastic leukemia in 62 infants: retrospective analysis of the Tokyo Children's Cancer Study Group. **Pediatr Int** 1999; 41:477-83.

Izraeli S, Rainis L, Hertzberg L, Smooha G, Birger Y. Trisomy of chromosome 21 in leukemogenesis. **Blood Cells Mol Dis** 2007; 39:156-9.

Kaplan EL, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observation. **J Am Stat Assoc** 1958; 53:457-81.

Kim YI. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. **Nutr Rev** 2000; 58:205-9.

Koifman S, Pombo-de-Oliveira MS; Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia. High birth weight as an important risk factor for infant leukemia. **Br J Cancer** 2008; 98:664-7.

Krajinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnott D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. **Blood** 1999; 93:1496-501.

Krajinovic M, Lamothe S, Labuda D, et al. Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood** 2004; 103:252-7.

Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:823-33.

Kurashima AY, Ribeiro KCB, Latorre MRD, et al. Prognostic factors in pediatric palliative care: development of a survival predicting score. **Appl Cancer research** 2005; 25: 65-70.

Lauer SJ, Camitta BM, Leventhal BG, et al. Intensive alternating drug pairs after remission induction for treatment of infants with acute lymphoblastic leukemia: A Pediatric Oncology Group Pilot Study. **J Pediatr Hematol Oncol** 1998; 20:229-33.

Linnet MS, Hatch EE, Kleinerman RA, et al. Residential exposure to magnetic fields and acute lymphoblastic leukemia in children. **N Engl J Med** 1997; 337:1-7.

Linnet MS, Ries LA, Smith MA, Tarone RE, Devesa SS. Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:1051-8.

Lubin JH, Linnet MS, Boice JD Jr, et al. Case-control study of childhood acute lymphoblastic leukemia and residential radon exposure. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90:294-300.

Luciani M, Rana I, Pansini V, et al. Infant leukaemia: clinical, biological and therapeutic advances. **Acta Paediatr Suppl** 2006; 95:47-51.

Macrini CM, Pombo-de-Oliveira MS, Ford AM, Alves G. MLL AT-hook sequence is strongly conserved in infant acute leukemia with or without MLL gene rearrangement. **Leukemia** 2003; 17:1432-3.

Magalhães IQ, Splendore A, Emerenciano M, Figueiredo A, Ferrari I, Pombo-de-Oliveira MS. GATA1 mutations in acute leukemia in children with Down syndrome. **Cancer Genet Cytogenet** 2006; 166:112-6.

Meyer C, Schneider B, Jakob S et al. The MLL recombinome of acute leukemias. **Leukemia** 2006; 20:777-84.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Câncer na criança e no adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade**. Rio de Janeiro: INCA; 2008. Resultados e Comentários – Incidência por RCBP; p.47-145.

Mitelman F. **An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature.** Basel: S. Karger; 1995.

Moghrabi A, Levy DE, Asselin BL, et al. Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood** 2007; 109:896-904.

Mori H, Colman SM, Xiao Z, et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:8242-7.

Möricke A, Zimmermann M, Reiter A, et al. Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia: data from the trials ALL-BFM 86, 90, and 95. **Klin Padiatr** 2005; 217:310-20.

Nagayama J, Tomizawa D, Koh K, et al. Infants with acute lymphoblastic leukemia and a germline MLL gene are highly curable with use of chemotherapy alone: results from the Japan Infant Leukemia Study Group. **Blood** 2006; 107:4663-5.

Ng SM, Lin HP, Ariffin WA, Zainab AK, Lam SK, Chan LL. Age, sex, haemoglobin level, and white cell count at diagnosis are important prognostic factors in children with acute lymphoblastic leukemia treated with BFM-type protocol. **J Trop Pediatr** 2000; 46:338-43.

Norppa H. Cytogenetic markers of susceptibility: influence of polymorphic carcinogen-metabolizing enzymes. **Environ Health Perspect** 1997; 105 Suppl 4:829-35.

Oudot C, Auclerc MF, Levy V, et al. Prognostic factors for leukemic induction failure in children with acute lymphoblastic leukemia and outcome after salvage therapy: the FRALLE 93 study. **J Clin Oncol** 2008; 26:1496-503.

Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, Bieber CA. The International Incidence of Childhood Cancer. **Int J Cancer** 1988; 42:511-20.

Passmore SJ, Hann IM, Stiller CA, et al. Pediatric myelodysplasia: a study of 68 children and a new prognostic scoring system. **Blood** 1995, 85:1742-50.

Pereira TV, Rudnicki M, Pereira AC, Pombo-de-Oliveira MS, Franco RF. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia risk: a meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2006;15:1956-63.

Pieters R, den Boer ML, Durian M, et al. Relation between age, immunophenotype and in vitro drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia--implications for treatment of infants. **Leukemia** 1998;12:1344-8.

Pieters R, den Boer ML, Durian M, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. **Lancet** 2007; 370:198-200.

Pieters R, Carroll WL. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Clin North Am** 2008; 55:1-20.

Pombo-de-Oliveira MS, Koifman S, Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia. Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2006; 15:2336-41.

Pombo-de-Oliveira MS, Koifman S, Vasconcelos GM, Emerenciano M, de Oliveira Novaes C, Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia. Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. **Blood Cells Mol Dis** 2008 Dec 7. [Epub ahead of print].

Pui CH, Crist WM. High risk lymphoblastic leukemia in children: prognostic factors and management. **Blood Rev** 1987; 1:25-33.

Pui CH, Ribeiro RC, Campana D, et al. Prognostic factors in the acute lymphoid and myeloid leukemias of infants. **Leukemia** 1996; 10:952-6.

Pui CH, Chessells JM, Camitta B, et al. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. **Leukemia** 2003; 17:700-6.

Pui CH, Sandlund JT, Pei D, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. **Blood** 2004; 104:2690-6.

Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet** 2008; 371:1030-43.

Reaman GH, Spoto R, Sensel MG, et al. Treatment outcome and prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukemia treated on two consecutive trials of the Children's Cancer Group. **J Clin Oncol** 1999; 17:445-55.

Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al. **SEER Cancer statistics review, 1975-2005**. November 2007. Available from: <URL:http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005> [2008 dez 20].

Ross JA, Spector LG, Robison LL, Olshan AF. Epidemiology of leukemia in children with Down syndrome. **Pediatr Blood Cancer** 2005; 44: 8-12.

Rossig C, Juergens H. Aetiology of childhood acute leukaemias: current status of knowledge. **Radiat Prot Dosimetry** 2008; 132:114-8.

Rubnitz JE, Behm FG, Curcio-Brint AM, et al. Molecular analysis of t(11;19) breakpoints in childhood acute leukemias. **Blood** 1996; 87:4804-8.

Silva ML, de Brito GD, Simões F, et al. A new case of t(5;15)(p15;q11-q13) in infant acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet** 2001; 130:87-8.

Silverman LB. Acute lymphoblastic leukemia in infancy. **Pediatr Blood Cancer** 2007; 49:1070-3.

Sinnott D, Krajcinovic M, Labuda D. Genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma** 2000; 38:447-62.

Sinnott D, Labuda D, Krajcinovic M. Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers the childhood leukemia experience. **Fam Cancer** 2006; 5:35-47.

Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:12810-5.

Souto EX, Chauffaile Mde L, Moncau JE, et al. Myelodysplastic syndromes (MDS): prognostic factors and scoring systems. **São Paulo Med J** 1997; 115:1537-41.

Stanulla M, Cario G, Meissner B, et al. Integrating molecular information into treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia--a perspective from the BFM Study Group. **Blood Cells Mol Dis** 2007; 39: 160-3.

Stiller CA. Epidemiology and genetics of childhood cancer. **Oncogene** 2004; 23:6429-44.

Taylor GM, Birch JM. The hereditary basis of human leukemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, editores. **Leukemia**. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1996. p.210-45.

Tomizawa D, Koh K, Sato T, et al. Outcome of risk-based therapy for infant acute lymphoblastic leukemia with or without an MLL gene rearrangement, with emphasis on late effects: a final report of two consecutive studies, MLL96 and MLL98, of the Japan Infant Leukemia Study Group. **Leukemia** 2007; 21:2258-63.

van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease: report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. **Leukemia** 1999; 13:1901-28.

Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. **Mol Genet Metab** 1998; 64:169-72.

Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. **Lancet** 1999; 354:1499-503.

Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:4004-9.

Zanrosso CW, Hatagima A, Emerenciano M, et al. The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population. **Leuk Res** 2006; 30:477-81.

Zweidler-McKay PA, Hilden JM. The ABCs of infant leukemia. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care** 2008; 38:78-94.

ANEXOS

Anexo 1 - Ficha preenchida ao encaminhamento para diagnóstico do estudo
“leucemias agudas em lactentes”.

Nome do bebê: _____ **Ano:** _____

Número do laboratório: _____ **Número no banco:** _____

Data do nascimento: _____ **Local do nascimento:** _____

Idade: _____ **Sexo:** _____ **Cor:** _____

Local do diagnóstico: _____ **Data do diagnóstico:** _____

Nome da mãe: _____

Endereço: _____

_____ **Telefone:** (____) _____

Referência: _____ **Médico:** _____

Dados clínicos

Leuco: _____ **Blastos:** _____% **Fígado:** _____cm **Baço:** _____cm

Linfonodos: () sim () não

FAB: _____ **Diagnóstico:** _____

CD34: ___ **HLADr:** ___ **CD7:** ___ **CD33:** ___ **CD13:** ___ **cCD13:** _

CD14: ___ **CD41]61:** ___ **CD19:** ___ **CD10:** ___ **CD22:** ___ **cCD22:** _

CD3: ___ **cCD3:** ___ **CD4:** ___ **CD8:** ___ **aMPO:** ___ **TdT:** ___

CD79: ___

MLL: _____ **Citogenética:** _____

Material: _____ **Controles:** _____

Data última informação: _____

Observação: _____

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

NOME DO ESTUDO:

INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOLÓGICAS NO PROGNÓSTICO DE LACTENTES COM LEUCEMIAS AGUDAS. PROPOSTA DE UM ESCORE PREDITIVO COM INCLUSÃO DE POLIMORFISMO GENÉTICO.

Investigadores principais:

Maria S. Pombo-de-Oliveira¹, Wellington Mendes², Luiz Fernando Lopes².

Endereços:

1. Instituto Nacional do Câncer – Rio de Janeiro

Rua André Cavalcante, 37/5º andar, Rio de Janeiro CEP: 20231-050 – RJ

Tel: (21) 3233-1324

e-mail: mpombo@inca.gov.br

2. Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer – São Paulo

Rua Prof. Antonio Prudente, 211, Liberdade, São Paulo CEP: 01509-900 – SP

Tel: (11) 3272-5166

Email: lf.lopes@sti.com.br

wellmendes@uol.com.br

Declaração

Este é um formulário importante. Por favor, leia cuidadosamente, pois ele informa o que você necessita saber sobre os objetivos deste estudo. Se você concordar em tomar parte nesta pesquisa, você deve assinar e datar este formulário. A sua assinatura significa que você (e seu filho/sua filha) recebeu as informações necessárias a respeito do estudo. Sua assinatura neste formulário também indica que você (seu filho/sua filha) deseja participar deste estudo.

Propósito do Estudo:

Você (seu filho/filha) foi convidado a participar desta pesquisa que visa investigar as alterações presentes nas células do sangue que podem ser responsáveis por

doenças malignas. Uma pesquisa anterior mostrou que o contacto com algumas substâncias [por exemplo: medicamentos] podem afetar o desenvolvimento das crianças, e eventualmente favorecer o aparecimento de uma leucemia. Esta pesquisa utilizou vários testes. Entre estes testes, se inclui as análises de genética-molecular.

Nosso objetivo principal nesta investigação é analisar as características clínicas e biológicas de crianças com leucemias agudas na faixa de 0-24 meses de vida e identificar fatores prognósticos clínicos e biológicos. Entre os fatores que podem estar relacionados com a sobrevida da criança se destaca o perfil genotípico. Portanto, como objetivo adicional pretende-se determinar as frequências genotípicas dos polimorfismos de enzimas potencialmente envolvidas no metabolismo de xenobióticos, como as CYP's (CYP1A1), GST's (GSTM1) e metileno tetrahydro folato redutase (MTHFR).

O conhecimento do que causa a doença, nos permitirá melhorar o atendimento e o tratamento de crianças com câncer. Em longo prazo, este tipo de estudo pode vir a contribuir não só para o diagnóstico e o acompanhamento, como também para esclarecer as causas desta doença.

Procedimentos e Informações do Estudo:

Seu filho(a) não será submetido a nenhum procedimento adicional para que possa participar deste estudo. Será necessária somente uma pequena amostra do sangue ou de aspirado de medula óssea, os quais já serão coletados normalmente para as análises que estabelecem o diagnóstico. A autorização para fazer a análise genético-molecular não afetará em nada os procedimentos normais de diagnóstico que serão feitas e sua identidade serão mantidos sob sigilo quando da divulgação dos resultados finais da pesquisa.

Riscos:

Este estudo não oferece nenhum risco a você (seu filho/sua filha).

Benefícios:

Este estudo não traz melhora imediata para a saúde de seu filho(a), entretanto, as informações obtidas neste estudo podem contribuir para um melhor conhecimento do tipo de doença, e em longo prazo ajudar no tratamento do seu filho(a).

Custos:

Este estudo não apresenta nenhum custo adicional uma vez que nenhum procedimento extra será executado além do tratamento já previsto.

Compensação:

Você (seu filho/sua filha) não receberá remuneração pela participação neste estudo.

Questões sobre a pesquisa e seus direitos:

Você (seu filho/sua filha) pode conversar com a Dra Maria Socorro Pombo de Oliveira a qualquer hora de trabalho no INCA (9-18hrs), Dr Wellington Mendes e Dr Luiz Fernando Lopes no Hospital do Câncer para esclarecer qualquer dúvida que tiver neste estudo, pelo telefone (21)3233-1324 ou 3233-1368, (11) 3272-5166 ou com o responsável pelo estudo no seu Hospital para esclarecimentos sobre seus direitos.

Participação Voluntária:

A participação neste estudo de pesquisa é voluntária e depende de sua decisão. O atendimento médico que seu filho(a) recebe na sua Unidade de tratamento, não será afetado agora ou futuramente, quer seu filho(a) participe ou não deste estudo. Se você (seu filho/sua filha) não quiser participar deste estudo, seu filho(a) não sofrerá qualquer penalidade ou perda de benefícios aos quais tem direito.

Confidencialidade:

Os dados deste estudo podem ser publicados. Entretanto, o seu nome (nome do seu filho/da sua filha) e outras informações de identificação não serão divulgadas.

Os seus registos médicos (os registos médicos de seu filho/sua filha) serão utilizados pelos investigadores deste estudo somente para consulta confidencial.

Consentimento:

O estudo foi completamente explicado a mim e todas as minhas perguntas foram respondidas. Uma cópia desse formulário está sendo entregue para mim neste momento e outra cópia será arquivada pela(o) pesquisador(a). Eu concordo em participar deste estudo.

Nome do Participante ou Guardiã

Assinatura do Participante ou guardião

Data: ___/___/___

Nome da Pessoa que obteve o consentimento

Assinatura da Pessoa que obteve o consentimento

Data: ___/___/___

Nome do Investigador

Assinatura do Investigador

Data: ___/___/___

Nome da Testemunha

Assinatura da Testemunha

Data: ___/___/___

Anexo 3 - Esquemas de tratamentos quimioterápicos (Protocolos GBTLI -80, -82, -85, -93).

A) PROTOCOLO GBTLI-80

Fase de INDUÇÃO

	<u>Baixo Risco (BR)</u>	<u>Alto Risco (AR)</u>
Vincristina (VCR)	5mg/m ² /semana- 4 sem	5mg/m ² /semana-4 sem
Daunorrubicina (DN)	25mg/m ² /semana- 4 sem	25mg/m ² /semana-4 sem
Prednisona (PDN)	40mg/m ² /d – D1 a D28	40mg/m ² /d – D1 a D28
Ciclofosfamida (CTX)		1,2g/m ² – D1

RADIOTERAPIA SNC*

<u>Baixo Risco (BR)</u>	<u>Alto Risco (AR)</u>
18Gy ou 24Gy- sem 72	24Gy- sem 72

Fase de MANUTENÇÃO

	<u>Baixo Risco (BR)</u>	<u>Alto Risco (AR)</u>
6-Mercaptopurina (6-MP)	50 mg/m ² /day	50 mg/m ² /day
Metotrexate (MTX)	25 mg/m ² /sem – até sem 120	25 mg/m ² /sem – até sem 120
CTX - 4 pulsos		150mg/m ² /d – 7 dias
Adiamicina (ADR) - 4 pulsos		35mg/m ² – D8

*SNC = Sistema Nervoso Central

PROTOCOLO GBTLI-82

Fase de INDUÇÃO/CONSOLIDAÇÃO

	<u>Baixo Risco (BR)</u>	<u>Alto Risco (AR)</u>
VCR	5mg/m ² /semana- 4 sem	5mg/m ² /semana-4 sem
DN	25mg/m ² /semana- 4 sem	25mg/m ² /semana-4 sem
PDN	40mg/m ² /d – D1 a D28	40mg/m ² /d – D1 a D28
I-Asparaginase (I-ASP)	10.000 UI/m ² /d x 10	10.000 UI/m ² /d x 10
Citarabina (AraC)		300mg/m ² / - 2x sem (4 doses)
CTX		1,2g/m ² – D1

TRATAMENTO SNC*

	<u>Baixo Risco (BR)</u>	<u>Alto Risco (AR)</u>
Radioterapia	18Gy	24Gy
MADIT**	Sim	Sim

Fase de MANUTENÇÃO

	<u>Baixo Risco (BR)</u>	<u>Alto Risco (AR)</u>
<u>BR – recebeu apenas manutenção seqüencial</u>		
<u>AR – recebeu (randomizado) manutenção seqüencial ou pulsos</u>		
<u>Duração de 120 semanas</u>		
6-MP	50 mg/m ² /day	50 mg/m ² /day
MTX	25 mg/m ² /sem – até sem 120	25 mg/m ² /sem – até sem 120
CTX	150mg/m ² /d – 7 dias	150mg/m ² /d – 7 dias
ADR	35mg/m ² – D8	35mg/m ² – D8
VM26	165mg/m ² – D1,D6,D10	165mg/m ² – D1,D6,D10
AraC	300mg/m ² – D1,D6,D10	300mg/m ² – D1,D6,D10

*SNC = Sistema Nervoso Central

**MADIT = Metotrexate + AraC+ Dexa intra-tecal

PROTOCOLO GBTLI-85

Fase de INDUÇÃO/CONSOLIDAÇÃO

	<u>Risco Básico (RBV)</u>	<u>Baixo Risco (BR)</u>	<u>Alto Risco (AR)</u>
PDN	40 mg/m ² /d - D1 a D28	40 mg/m ² /d - D1 a D28	40 mg/m ² /d - D1 a D28
VCR	5 mg/m ² /sem	5 mg/m ² /sem	5 mg/m ² /sem
DN	25 mg/m ² /sem	25 mg/m ²	25 mg/m ²
CTX		1,2g/m ² – D1	1,2g/m ² – D1
AraC		300mg/m ² / D1	1,5mg/m ² – 12/12h (6 doses)
I-ASP			6.000 UI/m ²

TRATAMENTO SNC* Risco Básico (RBV) Baixo Risco (BR) Alto Risco (AR)

Radioterapia	não recebe	18Gy	24Gy
--------------	------------	------	------

Fase de MANUTENÇÃO (RBV, BR, AR) – duração de 120 semanas

	RBV	RB	AR
6 MP	75 mg/m ² /dia	75 mg/m ² /dia	75 mg/m ² /dia
MTX	40 mg/m ² /semana	40 mg/m ² /semana	40 mg/m ² /semana
Dexa	6 mg/m ² x 7 dias	6 mg/m ² x 7 dias	6 mg/m ² x 28 dias
VCR	2 mg/m ² D1	2 mg/m ² D1	2 mg/m ² D1 x 4
VP16			250mg/m ² /sem x 4
VM26		250mg/m ² /sem x 4	250mg/m ² /sem x 4
AraC		300mg/m ² /sem x 4	300mg/m ² /sem x 4

*SNC = Sistema Nervoso Central

PROTOCOLO GBTLI-93

Fase de INDUÇÃO

Risco Básico (RB) / Baixo risco (BR) Alto Risco (AR)

Fase 1

Dexa	6 mg/m ² - D1 a D28	6 mg/m ² - D1 a D28
VCR	1,5 mg/m ² D1,8,15,28	1,5 mg/m ² - D1,8,15,28
DN	25 mg/m ² - D1,8,15,28	25 mg/m ² - D1,8,15,28
MADIT*	D1 e D29	D1 e D29

Fase 2

I-ASP	10.000 IU/m ² D29,31,33,35,37,39,41,43	6.000 IU/m ² 6h após último AraC
AraC	75 mg/m ² D29 até D32, 36 até 39, D43	750 mg/m ² /dose 12/12h D36,37,38
MADIT	D43	D43

Fase de INTENSIFICAÇÃO (RB, BR e AR)

6-MP	50 mg/m ² /day - D50 até D95
MTX	2 g/m ² /dose – infusão contínua de 24h - D50,65,80,95
Leucovorin	15 mg/m ² /dose cada 6h – total de 4 doses – Início 36h após o começo do MTX
MADIT	D50,65,80,95

Fase de REINDUÇÃO

RB e BR

AR + Radioterapia

Fase 1

Dexa	6 mg/m ² - D106 até 127	6 mg/m ² - D106 até 127
VCR	1,5 mg/m ² - D106,113,120,127	1,5 mg/m ² - D106,113,120,127
I-ASP	10.000 IU/m ² D106,109,113,116	10.000 IU/m ² D106,109,113,116
MADIT	D106,127	D106,127

Fase 2

6-MP	50 mg/m ² - D134 até 148	50 mg/m ² - D134 até 148
AraC	75 mg/m ² D134 to 137,141 até 144	75 mg/m ² D134 to 137,141 até 144
MADIT	D148	D134,141,148

Fase de MANUTENÇÃO (RB, BR, AR)**

	Bloco A	Bloco B	Bloco C
AraC	750 mg/m ² every 12 hs total 6 doses D23,32,41,50,59,68		
I-ASP	6.000 IU/m ² 1 dose após 6h do final do AraC - D26,35,44,53,62,71		
6 MP		75 mg/m ² D1 até 21	
MTX		40 mg/m ² /semana D1,8,15	
PDN			40 mg/m ² D1 até 14
VCR			1 mg/m ² D1,8,15

*MADIT(Metotrexate + AraC+ Dexametasona intra-tecal)

(**1ª fase da Manutenção para AR – intercalar blocos B, A, C - 6 ciclos cada bloco – total de 12 meses)