



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS-UEA
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO AMAZONAS-FHHEMOAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA**



**ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS EM CRIANÇAS PORTADORAS DE
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA B NO AMAZONAS.**

RENATA DE ALMEIDA LEMOS AGUIAR

Manaus

2015

RENATA DE ALMEIDA LEMOS AGUIAR

**ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS EM CRIANÇAS PORTADORAS DE
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA B NO AMAZONAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Hematologia Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do Título de *Mestre em Ciências aplicadas à Hematologia*.

Orientadora: **Profª Dra. Cristina Motta Ferreira**

Co-Orientadora: **Profª Dra. Leny Nascimento da Motta Passos**

Manaus

2015

APRESENTAÇÃO:

Aguiar, Renata de Almeida Lemos

Alterações citogenéticas em crianças portadoras de leucemia linfóide aguda B no Amazonas. Renata de Almeida Lemos Aguiar. - Manaus, 2015. xvii. 85f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Amazonas-UEA. Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-FHHEMOAM. Programa de Pós-graduação em Hematologia.

Título em inglês: Cytogenetic abnormalities in children with acute lymphoid leukemia B in Amazonas.

1.Acute lymphoblastic leukemia. 2.Cytogenetic abnormalities. 3. FISH.

FOLHA DE JULGAMENTO**ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS EM CRIANÇAS PORTADORAS
DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA B NO AMAZONAS.****RENATA DE ALMEIDA LEMOS AGUIAR**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências aplicadas à Hematologia, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas”.

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro

DEDICATÓRIA

Dedico à minha filha, que impulsiona e transforma minha vida, faz com que eu enfrente os medos e vem me ensinando a ser uma nova pessoa a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que tornaram este trabalho possível. Em primeiro lugar a Deus pelo dom da vida, pela saúde e por me dar a vontade de aprender.

À Universidade do Estado do Amazonas-UEA pela oportunidade de ingressar no Programa de Pós-Graduação.

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-FHHEMOAM por ser uma segunda casa para mim, desde a Residência Médica, onde aprendo diariamente e tenho a oportunidade de ampliar meus horizontes e conhecimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas-FAPEAM, por ser a agência financiadora do projeto.

À minha orientadora, Dra Cristina Motta Ferreira, que esteve ao meu lado para compartilhar as ideias, sempre me guiando, e me recebeu carinhosamente como sua orientanda.

À minha co-orientadora, Dra Leny Passos, que sempre me acolheu calorosamente e me ofereceu ajuda em vários momentos que precisei.

A todos os Professores do Programa Visitante-Sênior, em especial ao Dr Albert Schriefer por todo acompanhamento, orientações e paciência no período do curso.

Ao Departamento de Ensino e Pesquisa da FHHEMOAM, em especial à Alessandra e Myiuki, sempre carinhosas e dispostas a me dar auxílio e foram fundamentais neste processo.

Ao Laboratório de citogenética, À Ângela, Francimary, Ernanda e toda a equipe que realiza a análise citogenética convencional, sempre atenciosas e solícitas e estiveram ao meu lado orientando a técnica da citogenética convencional.

Ao Laboratório de Marcadores Celulares, especial agradecimento à Dra Eliana Brasil e à Dra Yvelise Sardinha, incentivadoras ferrenhas do crescimento de nossa Instituição, além do João Paulo Pimentel, todos responsáveis pela imunofenotipagem.

À toda equipe do Laboratório de Citogenômica Animal-LACA da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, chefiados pelo Dr Carlos Schneider e Dra Cláudia Gross, em especial a uma pessoa que se tornou um anjo, Júlia do Carmo, além da Natália por terem tornado realidade a técnica de FISH.

Ao Instituto de Oncologia Pediátrica-IOP de São Paulo, equipe de genética, Dra Sílvia, Dra Michele e também à hematopediatra Dra Maria Lucia Lee, sempre muito afetuosas e pacientes, por todos os ensinamentos enquanto estive na cidade.

Ao Centro Infantil Boldrini, em especial à Dra Silvia Brandalise que me permitiu estagiar na Instituição e também a Lilian do laboratório de Genética por todas as orientações.

À toda a equipe de hematologistas da FHHEMOAM, os quais me ensinam todos os dias com suas experiências. Agradecimento em especial ao Dr Nelson Fraiji, que trabalha incansavelmente para que projetos se tornem uma realidade, como aconteceu com este estudo.

A todos da equipe GBTLI que dão o seu melhor em prol das nossas crianças. Sem a união de todos não somos capazes de continuar.

Agradeço também aos muitos amigos sempre incentivadores. À turma de Mestrandos, em especial à Thais Salina, por me engajar no curso e por ser a pessoa que divide comigo as dores e as delícias de ser hematopediatra.

A todos da minha família que são o meu alicerce, em especial ao meu esposo Raphael por ser a pessoa que me inspira a ser um alguém melhor e me apoia incondicionalmente. À minha querida mãe Janete pelo carinho e amor sem medidas, à minha avó, Maria Zuila, exemplo de vida, minha Tia Zuleide que sempre esteve ao meu lado e ao meu irmão Felipe, meu melhor amigo. A minha desejada e já tão amada filha, Alice. Vocês são a razão do meu viver.

Por fim, não posso esquecer de agradecer a todos os meus pacientes e às suas famílias, no desejo de que os nossos conhecimentos possam ser aplicados à cura da doença, à melhoria na qualidade de vida e, quando isso não for possível, que possamos ser instrumento de consolo e alívio à dor. Vocês são nosso maior incentivo.

EPÍGRAFE

“E de repente, num dia qualquer, acordamos e percebemos que já podemos lidar com aquilo que julgávamos maior que nós mesmos. Não foram os abismos que diminuíram, mas nós que crescemos.”

Fabíola Simões.

RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma neoplasia caracterizada pelo acúmulo de linfoblastos na medula óssea, suprimindo o desenvolvimento de linhagens celulares normais. A LLA é a forma de câncer mais comum na pediatria e 85% dos casos compreendem linfócitos da linhagem B (LLA-B). Alterações genéticas estão relacionadas à patogênese da doença e sua identificação é útil para um diagnóstico mais refinado e permite otimização do tratamento por estratificar os pacientes em grupos de risco. Este estudo teve como objetivo estimar a frequência das alterações genéticas de importância prognóstica em pacientes pediátricos com LLA-B *de novo* atendidos na FHHEMOAM. Com este propósito, foram realizadas avaliações citogenéticas de células obtidas da medula óssea e/ou sangue periférico, empregando-se as técnicas de bandeamento G e hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Foram incluídos 35 pacientes pediátricos diagnosticados com LLA-B *de novo* recrutados no período de 1 ano. Dentre as amostras analisadas, 40% eram do gênero feminino e 60% do masculino, 20% da raça branca e 80% pardos. As idades variaram de 1 a 17 anos, com a mediana de 3. A maioria dos pacientes (57,1%) foi proveniente da capital, e os 42,9% restantes, do interior do estado. Observou-se que predominam mães de pacientes que têm ensino fundamental completo (42,9%) e recebem entre 1 e 3 salários mínimos. Em relação à análise citogenética, foram identificados 6 casos de hiperdiploidia, 3 casos de deleção do cromossomo 11 (11q23) e 2 casos de translocação t(9;22). Não foi constatada diferença estatística da citogenética em relação ao gênero, mediana da idade, raça e procedência. A avaliação pela técnica de FISH, evidenciou alteração em apenas uma amostra de um paciente com a t(9;22), resultando em uma fusão *BCR/ABL*. De forma geral, a frequência das alterações citogenéticas foram semelhantes às já descritas em literatura e a análise do cariótipo se mantém como o método para melhor avaliação de alterações numéricas e para avaliar o cariótipo de maneira geral. A técnica de FISH deve fazer parte da complementação diagnóstica como metodologia molecular para identificação de rearranjos crípticos que escapam à análise citogenética convencional.

PALAVRAS-CHAVE: leucemia linfóide aguda, alterações citogenéticas, FISH.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a neoplasia characterized by lymphoblasts accumulated in bone marrow, suppressing the development of normal cells. The LLA is the most common cancer in pediatrics and 85% of cases include lymphocyte lineage B (LLA-B). Genetic alterations are related to the pathogenesis of the disease and its identification is useful for a more refined diagnosis and allows the treatment optimization through patient's stratification into the risk groups. The aim of this study is to estimate the frequency of the genetic alterations of prognostic importance in pediatric patients with ALL-B *de novo* at the FHHEMOAM. Cytogenetic evaluations of the cells obtained from bone marrow and / or peripheral blood were performed, using techniques such as G banding and in situ hybridization by fluorescence (FISH). Thirty-five pediatric patients diagnosed with ALL-B recruited were included in the period of one year. Among samples analyzed 40% were female and 60% male, 20% caucasians and 80% brown. Their ages ranged from 1 to 17 years, with a median of 3. Most patients (57.1%) were from the Capital, and the remaining 42.9%, were from other cities. It was observed that the most of the patient's mothers had elementary school, and receive between 1 and 3 minimum salaries. Cytogenetic analysis identified 6 hyperdiploidy cases, 3 chromosome deletion cases (11q23) and 2 translocation cases t (9; 22). No statistical difference was found between cytogenetics in relation to gender, median age, race and origin. Evaluation of the FISH technique, showed changes in only one sample with (9;22) resulting in a fusion *BCR / ABL*. The frequency of cytogenetic changes were similar to those already described in the literature and karyotype analysis remains the best method for assessment of numerical changes and to assess the general karyotype. The FISH technique should be part of the diagnostic testing as molecular methodology for cryptic rearrangements of identification that escape conventional cytogenetic analysis.

KEYWORDS: acute lymphoblastic leukemia, cytogenetic abnormalities, FISH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hematopoiese e suas respectivas linhagens celulares.	19
Figura 2. Mapa indicando as incidências a cada 100.000 habitantes no Canadá, Estados Unidos, Índia e Brasil.....	24
Figura 3. Cariótipo normal 46,XX.	28
Figura 4. Cariótipo triploide (3n). Ao invés de aparecer em pares, os cromossomos estão em trios.....	29
Figura 5. Cariótipo demonstrando aneuploidia (trissomia do cromossomo 21, correspondendo à Síndrome de Down).....	30
Figura 6. Translocação entre o cromossomo 9 e o 22, resultando no cromossomo Filadélfia.	31
Figura 7. Translocação entre os cromossomos 9 e 22	33
Figura 8. Translocação entre os cromossomos 4 e 11 à esquerda e à direita deleção do cromossomo 11 na região do braço longo, banda 23 (q23).....	33
Figura 9. Translocação entre os cromossomos 1 e 19	34
Figura 10. Fluxograma indicando os procedimentos realizados durante o estudo.	42
Figura 11. Representação esquemática da marcação da sonda pela técnica de FISH.....	52
Figura 12. Visualização através de microscópio fluorescente da fusão gênica BCR/ABL.....	52
Figura 13. Total de amostras obtidas no estudo no período de jan/2014 a jan/2015	55
Figura 14. Distribuição das frequências de sujeitos do estudo de acordo com a obtenção de amostras com metáfase para a avaliação por citogenética convencional	57
Figura 15. Proporção de alterações citogenéticas encontradas nas 35 amostras avaliadas no estudo, resultando em 31% do total.....	59
Figura 16. Proporção de alterações identificadas pela citogenética convencional nas 26 amostras onde foi obtido crescimento de metáfases.....	60
Figura 17. Imagem representativa de avaliação citogenética de material coletado através do mielograma revelando a translocação 9;22 em um paciente da amostra.....	60

Figura 18. Imagem representativa de avaliação citogenética de material coletado através do mielograma revelando a deleção de braço longo do cromossomo 11 (11q) em um paciente da amostra. 61

Figura 19. Imagem representativa de avaliação citogenética de material coletado através do mielograma revelando hiperdiploidia em um paciente da amostra. 61

Figura 20. Avaliação de fusão BCR/ABL em amostras representativas do estudo pela técnica de FISH 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das Leucemias segundo grupos de estudo.....	22
Tabela 2. Distribuição das crianças portadoras de leucemia linfóide aguda B no Amazonas, segundo a frequência dos seus dados demográficos e socioeconômicos.....	56
Tabela 3. Distribuição dos achados citogenéticos nas crianças portadoras de leucemia linfóide aguda B incluídas no estudo, estratificadas segundo a frequência do gênero, idade, raça e procedência.	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação das leucemias de precursor linfoide segundo critérios da Organização Mundial de Saúde, revisados em 2008 (WHO 2008)	23
Quadro 2. Estratificação de Risco de Recaída da LLA segundo o GBTLI 2009	26
Quadro 3. Alterações cromossômicas numéricas recorrentes descritas para LLA-B na infância.	32
Quadro 4. Alterações cromossômicas estruturais recorrentes descritas para LLA-B na infância.	32
Quadro 5. “n” amostral estimado para o estudo.	41
Quadro 6. Painel de Triagem das leucemias ao diagnóstico.	83

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMo	Anticorpo monoclonal
AT	Adenina e timina
AM	Amazonas
a	Nível de significância
Bandas GTG	Bandas G por tripsina utilizando giemsa
<i>BCR/ABL</i>	Fusão entre os genes BCR e ABL
BFM	Berlim-Frankfurt-Munique
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CD	Antígenos celulares
CFC	Células formadoras de colônia
GC	Guanina e citosina
CMF	Citometria de fluxo
d	Erro estimado
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DCOG	Dutchy Child Oncology Group
DRM	Doença Residual Mínima
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
<i>E2A/PBX1</i>	Fusão entre os genes E2A e PBX1
EGIL	European Group for the Immunological Classification of Leukemias
FAB	Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico
FHHEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
FISH	Hibridização in situ por fluorescência
FITC	Isotiocianeto de fluorceína
FSC	Forward scatter
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Infantis
Ig	Imunoglobulina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISCN	Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Convencional
LLA	Leucemia linfóide aguda
LLA-B	Leucemia Linfóide Aguda B
LLA-B comum	Leucemia Linfóide Aguda B comum
LLA pré-B	Leucemia Linfóide Aguda pré-B
LLA pró-B	Leucemia Linfóide Aguda pró-B
LLA-T	Leucemia Linfóide Aguda T
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
MGG	May-Grünwald-Giemsa

MIC	Morfológica, Imunológica e Citogenética
<i>MLL/AF4</i>	Fusão entre os genes MLL e AF4
MO	Medula Óssea
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Prevalência
<i>p (petit)</i>	Braço curto do cromossomo
PBS	Tampão fosfato-salino
PBS-W	PBS com azida sódica
PE	Ficoeritrina
PerCep	Proteína Clorofila Peridina
PHA	Fitoemaglutinina
Ph	Cromossomo Filadélfia
<i>q</i>	Braço longo do cromossomo
RCBP	Registro de Câncer na Base Populacional
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI 1640	Meio de cultura de tecido animal desidratado desenvolvido pelo Instituto Rosewall Park Memorial
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
SBF	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Sangue Periférico
SSC	Side scatter
t(12;21)	Translocação entre os cromossomos 12 e 21
t(1;19)	Translocação entre os cromossomos 1 e 19
t(9;22)	Translocação entre os cromossomos 9 e 22
t(4;11)	Translocação entre os cromossomos 4 e 11
<i>TEL/AML1</i>	Fusão entre os genes TEL e AML 1
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. Introdução	18
1.1 A leucemia linfóide aguda	18
1.1.1 Breve Histórico	18
1.1.2 Definição, quadro clínico e diagnóstico	18
1.1.3 Classificação	20
1.2 Leucemia linfóide aguda na criança	23
1.2.1 Aspectos epidemiológicos	23
1.2.2 Protocolos terapêuticos e fatores prognósticos.....	25
1.3 Citogenética.....	27
1.3.1 Alterações citogenéticas na LLA-B na criança	31
1.3.2 Análise citogenética convencional.....	34
1.3.3 Análise citogenética molecular através da técnica de FISH	35
2. Objetivos	38
2.1 Geral	38
2.2 Específicos	38
3. Material e Métodos.....	39
3.1 Modelo de Estudo.....	39
3.2 Universo de Estudo	39
3.2.1 População de Referência	39
3.2.2 População de Estudo	39
3.2.3 Critérios de Inclusão.....	39
3.2.4 Critérios de exclusão.....	40
3.2.5 Comitê de ética em Pesquisa.....	40
3.2.6 Cálculo da amostra	40
3.3 Procedimentos.....	41
3.3.1 Coleta de informações e classificação de risco dos pacientes.....	42
3.3.2 Coleta do material biológico	43
3.4 Análise morfológica do esfregaço	45
3.5 Imunofenotipagem para subclassificação das leucemias	45
3.6 Análise Citogenética das alterações cromossômicas do estudo.....	46
3.6.1 Citogenética convencional	46

3.6.2 Citogenética molecular pela técnica de FISH.....	49
3.7 Análise estatística	52
4. Fonte de Financiamento.....	54
5. Resultados	55
6. Discussão.....	63
7. Conclusões.....	68
8. Referências Bibliográficas	69
9. Anexos.....	77
9.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	77
9.2 Ficha de acompanhamento do paciente	78
9.3 Protocolos laboratoriais	79
9.3.1 Coloração pela técnica do May Grunwald Giemsa (MGG).....	79
9.3.2 Mielograma	80
9.3.3 Técnica de imunofenotipagem	80
9.3.4 Protocolos para citogenética convencional	83
9.3.5 Técnica de FISH.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1 A leucemia linfóide aguda

1.1.1 Breve Histórico

O histórico da leucemia (termo que deriva do grego e significa “sangue branco”) remonta 200 anos atrás. Em 1811 na Inglaterra, o cirurgião Peter Cullen descreveu um caso de “esplenite aguda” em que o plasma sanguíneo do paciente tinha aparência leitosa. O médico francês Alfred Velpeau, em 1825, definiu os sintomas associados à leucemia, após realizar a necropsia de um paciente e observar a presença do que ele denominou como “pus” nos vasos sanguíneos⁽⁴⁴⁾.

Em Edimburgo no ano de 1845, o patologista John Bennett introduziu o termo “leucocitemia” como doença e no mesmo ano, o patologista alemão Rudolf Virchow afirmou mais claramente que a aparência alterada do sangue (semelhante a “pus” ou “soro lácteo”) era devido a um desequilíbrio entre a quantidade de hemácias e leucócitos. As células brancas pareciam suprimir o desenvolvimento das células vermelhas⁽⁴⁹⁾.

Na Inglaterra, mais precisamente em Londres, Henry Fuller realizou o primeiro diagnóstico da doença em 1846 com base no exame histológico do sangue de um paciente em combinação com os sintomas associados. Fuller destaca-se por ter sido o primeiro médico a diagnosticar um paciente com leucemia^(44,82).

1.1.2 Definição, quadro clínico e diagnóstico

As leucemias agudas são neoplasias malignas caracterizadas pelo acúmulo clonal de células imaturas (blastos) na medula óssea (MO), suprimindo o crescimento de linhagens celulares normais. Compreendem um grupo heterogêneo de doenças que diferem entre si quanto à incidência, evolução e

prognóstico, como também, quanto às características morfológicas, citogenéticas e imunológicas da célula leucêmica envolvida^(10,24,25).

Nas leucemias agudas, dois estágios do desenvolvimento hematopoiético são prováveis alvos para a transformação maligna: a célula tronco multipotente e as células precursoras mieloides e linfoides (Figura 1). Alterações nesses dois últimos alvos celulares resultam na leucemia mieloide aguda (LMA) e na leucemia linfóide aguda (LLA), respectivamente⁽⁹²⁾.

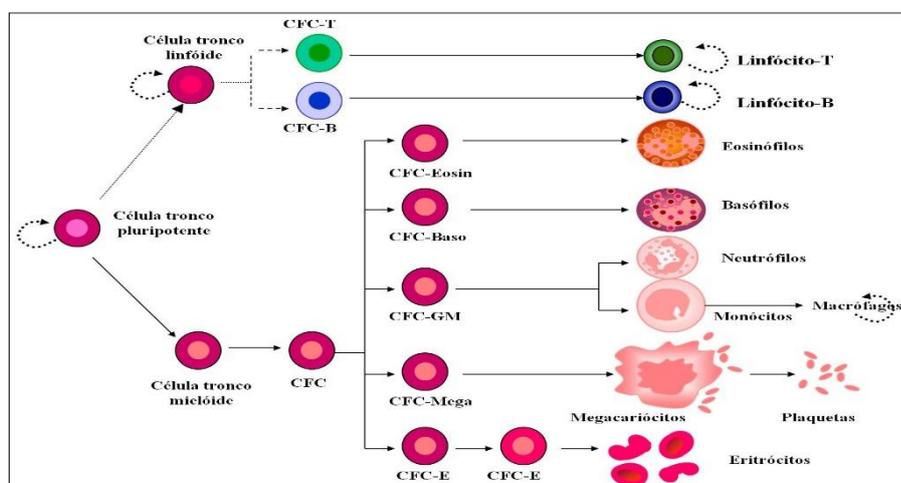


Figura 2. Hematopoiese e suas respectivas linhagens celulares.

Imagem: Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia⁽³⁸⁾.

Com a progressão da doença os blastos vão se acumulando na MO e, desta forma, ocasionam as manifestações clínicas, tais como anemia, hemorragias e infecções, resultantes da escassez de hemácias, plaquetas e leucócitos funcionais respectivamente^(34,73).

O quadro clínico está relacionado com a infiltração da MO e consequente substituição das linhagens celulares normais. Os sintomas mais frequentemente encontrados são: anemia, adinamia, manifestações hemorrágicas e infecções, além da presença de artralgia^(53,73).

Ao exame físico podem ser evidenciadas linfadenomegalias e aumento das vísceras como o baço (esplenomegalia) e/ou fígado (hepatomegalia). Podem ainda ser observadas alterações neurológicas em pacientes com

infiltração leucêmica no sistema nervoso central (SNC)⁽⁵³⁾.

A etiologia da doença ainda permanece obscura, mas sabe-se que envolve fatores genéticos, ambientais e imunológicos. O processo tumoral está relacionado à alteração do ciclo celular: ativação de proto-oncogenes e mutação de genes que estão interligados com a patogênese da doença^(43,83).

O diagnóstico laboratorial da LLA inicia-se com a coleta de hemograma, que na maioria das vezes evidencia anemia e trombocitopenia, justificada pelo bloqueio maturativo que ocorre na MO. O número de leucócitos é variável, podendo estar normal ou diminuído (leucopenia), mas também aumentado (leucocitose) devido à presença de blastos da linhagem linfóide^(7,24,25).

A seguir, realiza-se um mielograma a fim de que seja pesquisado, na medula óssea, a infiltração dos blastos. O diagnóstico da LLA, segundo Organização Mundial de Saúde é baseado na contagem de linfoblastos >25% no esfregaço medular⁽⁹³⁾.

1.1.3 Classificação

Inicialmente, a classificação da doença baseava-se nos aspectos clínicos apresentados pelo paciente e características morfológicas e citoquímicas dos blastos. Com essa finalidade, foi publicada em 1976, pela primeira vez, uma proposta de classificação pelos pesquisadores que compõem o Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) que foi adotada internacionalmente, devido a fácil aplicabilidade⁽⁵²⁾.

Avanços na imunologia e genética, juntamente com as exigências terapêuticas, levaram à percepção da limitação da classificação FAB, culminando com a publicação em 1986 - 1988 de uma nova classificação denominada MIC (Morfologia, Imunologia e Citogenética) que ressaltava as correlações entre alterações citogenéticas, marcadores imunológicos e

morfologia definindo novas categorias com importante interesse clínico-prognóstico⁽⁵⁷⁾.

Em 1995, foi proposta outra classificação pelo European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL), considerando a técnica da imunofenotipagem. Esta metodologia utiliza anticorpos monoclonais (AcMos) para a análise de antígenos leucocitários por citometria de fluxo (CMF), e caracterizou-se como padrão-ouro para o estabelecimento da linhagem e grau de diferenciação dos blastos^(62,71).

A CMF pode ser utilizada não somente para o diagnóstico e classificação da leucemia, como também para o prognóstico e, mais recentemente, na monitorização do tratamento dos pacientes através da detecção da doença residual mínima (DRM), ou seja, presença de blastos residuais indetectáveis através da análise morfológica da MO^(14,60).

No decorrer dos anos, foram evidenciadas alterações genéticas recorrentes nas leucemias agudas, que ocorriam de forma consistente e repetitiva. Inúmeros estudos revelaram forte associação entre as alterações genéticas e a resposta ao tratamento, conferindo a essas anormalidades valor prognóstico para a seleção da terapêutica⁽³¹⁾.

Na busca de uma uniformidade no diagnóstico e devido à grande relevância da identificação de alterações genéticas no curso da doença, a OMS propôs uma nova classificação que foi publicada em 1997^(41,93). A tabela 1 resume as classificações propostas ao longo dos anos para as leucemias agudas.

Tabela 1. Classificação das Leucemias segundo grupos de estudo^(24,25).

Grupos	FAB*	MIC**	EGIL***	WHO****
Ano de proposição	1976	1986	1995	1997
Crêterios de classifica�o	Morfológico, citoquímico	Morfológico, imunológico, citogenético	Imunológico	Clínico, morfológico, imunológico e citogenético recorrente

*French-American-British

**Morphological-Immunological-Cytogenetic

***European Group for the Immunological Characterization of Leukemias

****World Health Organization

Em 2008 a classifica o da OMS passou por uma revisão e atualmente é a mais completa por relacionar características morfológicas e citoquímicas aos achados imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares, identificando subgrupos com prognóstico distinto (Quadro 1). Desde então, os testes diagnósticos por imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular são aplicados rotineiramente na identifica o das células leuc micas⁽⁸⁾.

Quadro 1. Classificação das leucemias de precursor linfoide segundo critérios da Organização Mundial de saúde, revisados em 2008 (WHO 2008)⁽⁹³⁾.

Leucemia/Linfoma linfoblástico B
Leucemia/Linfoma linfoblástico B, não especificada
Leucemia/Linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes
Leucemia/Linfoma linfoblástico B com t(9;22)(q34;q11.2); fusão <i>BCR-ABL</i>
Leucemia/Linfoma linfoblástico B com t(v;11q23); rearranjo <i>MLL</i>
Leucemia/Linfoma linfoblástico B com t(12;21)(p13;q22); fusão <i>TEL-AML 1 (ETV6-RUNX1)</i>
Leucemia/Linfoma linfoblástico B com hiperploidia
Leucemia/Linfoma linfoblástico B com hipoploidia
Leucemia/Linfoma linfoblástico B t(5;14)(q31;q32); <i>IL3-IGH</i>
Leucemia/Linfoma linfoblástico B t(1;19)(q23;p13.3); fusão <i>E2A-PBX1(TCF3-PBX1)</i>
Leucemia/Linfoma linfoblástico T

Nas crianças, as leucemias agudas são a forma mais comum de câncer, correspondendo a 30% de todas as doenças malignas em menores de 15 anos. A LLA é a mais prevalente, compreendendo 70% dos casos. Nos adultos este subtipo é responsável por apenas 20% dos casos. A grande maioria é de linfócitos da linhagem B (85%)^(30,64).

1.2 Leucemia linfoide aguda na criança

1.2.1 Aspectos epidemiológicos

Embora a LLA possa ocorrer em qualquer idade, sua incidência é maior em crianças entre 2 a 5 anos e é mais comum em crianças brancas do que negras (1,8:1) e em meninos do que em meninas (1,2:1)⁽⁵³⁾.

Nos países industrializados, em uma população com mais recursos financeiros, encontra-se maior incidência da doença como no Canadá e Estados Unidos, em contraste com países subdesenvolvidos como a Índia (Figura 2). Curiosamente o Brasil concentra altos índices da doença⁽⁶⁾.

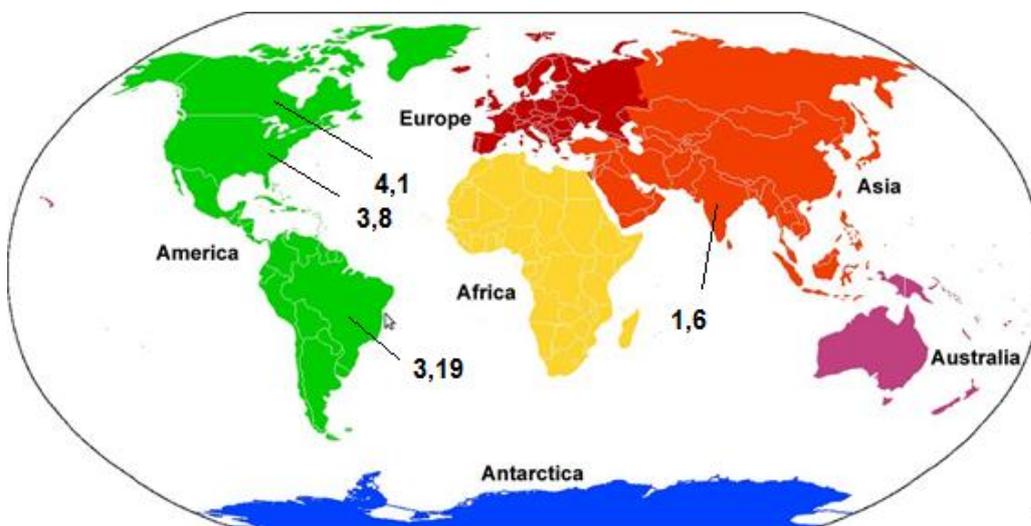


Figura 3. Mapa indicando as incidências a cada 100.000 habitantes no Canadá, Estados Unidos, Índia e Brasil⁽⁶⁾.

Fonte: <http://www.geografia.seed.pr.gov.br/modules/galeria/detalhe.php?foto=408&evento=5>⁽⁵⁸⁾.

Segundo registros do Instituto Nacional do Câncer (INCA) e com informações do Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP), a leucemia na criança se destaca no Brasil como a neoplasia mais comum, com frequência entre 25% a 35% de todos os cânceres pediátricos e com incidência de até 3,19 por 100.000 habitantes. Em São Paulo a incidência registrada foi de 2,99 a cada 100.000 e em Salvador foi encontrado baixo índice de 1,34 a cada 100.000. O percentual mais elevado está registrado na região norte do país, na cidade de Manaus, Estado do Amazonas (AM)^(37,6).

Segundo registros da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHHEMOAM), no período 2007 a 2011, foram diagnosticados 242 casos de leucemia na infância sendo 198 casos (82%) de LLA. A faixa etária de maior incidência para LLA foi entre 2 e 6 anos, com 49% dos casos acometendo o gênero masculino e 51% no feminino⁽⁷²⁾.

1.2.2 Protocolos terapêuticos e fatores prognósticos

Um dos primeiros relatos de cura da leucemia ocorreu em 1948 com a publicação no *New England Journal of Medicine* de Sidney Farber e colaboradores, que descreveram uma sobrevida de mais de cinco anos em 50 crianças diagnosticadas com LLA tratadas com aminopterina⁽¹⁶⁾.

Nos anos seguintes, duas novas drogas, os corticoesteroides e as antipurinas, mostraram-se efetivas no tratamento. Em 1961, destaca-se o pioneiro trabalho desenvolvido pelo *St. Jude Children's Research Hospital*, em Memphis, nos Estados Unidos, com protocolos terapêuticos evidenciando cura de 50% e seguimento dos pacientes por mais de 30 anos⁽⁶³⁾.

Os avanços na remissão e sobrevida dos pacientes estão associados a constantes aperfeiçoamentos nos protocolos terapêuticos utilizados mundialmente. Ressalta-se que o sucesso do tratamento depende do protocolo utilizado, mas alguns fatores prognósticos que estratificam os pacientes em grupos de risco já estão mundialmente estabelecidos⁽¹⁶⁾.

O protocolo desenvolvido pelos pesquisadores componentes do grupo alemão *Berlin-Frankfurt-Munich* (BFM), teve destaque internacional, assim como o protocolo holandês *Dutchy Child Oncology Group* (DCOG). Ambos são exemplos de esquemas terapêuticos ajustados a grupos de risco⁽¹³⁾.

No Brasil, na década de 80, Brandalise e colaboradores⁽¹¹⁾ deram início ao primeiro protocolo brasileiro para o tratamento da LLA infantil, formando-se assim o Grupo Cooperativo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda na Infância (GBTLI-LLA 80).

Desde então, quatro estudos multicêntricos foram realizados e concluídos (GBTLI 82, 85, 93 e 99), e um está em andamento (GBTLI-LLA 2009), observando-se uma crescente probabilidade de cura para a criança portadora de LLA no Brasil, com curvas de sobrevida livre de eventos para todos os grupos

de risco que saíram de 50% no GBTLI-LLA 80 para índices de cerca de 80% no GBTLI-LLA 99⁽¹¹⁾.

O protocolo recomendado pelo GBTLI para crianças portadoras de LLA também utiliza uma classificação de pacientes baseada no risco de recidiva da doença, de acordo com parâmetros hematológicos e fatores genéticos, e o tratamento é diferenciado para cada grupo de risco⁽¹¹⁾. Os fatores prognósticos que estratificam os pacientes em relação aos grupos estão expostos no quadro 2⁽⁵⁴⁾.

Quadro 2. Estratificação de Risco de Recaída da LLA segundo o GBTLI 2009⁽¹¹⁾.

Parâmetros para estratificação de risco	Alto risco de recaída	Baixo risco de recaída
Citogenética (alterações numéricas e/ou estruturais)	Alterações de mau prognóstico	Sem alterações ou com alterações de bom prognóstico
Leucometria ao diagnóstico	>50.000 leucócitos/mm ³	<50.000 leucócitos/mm ³
Idade	≤1 ano ou ≥ 9 anos	≥1ano e ≤9 anos
Envolvimento extramedular (Ex: SNC)	Presente	Ausente
Linhagem celular	Linhagem T	Linhagem B
Doença Residual Mínima (DRM)	Presente	Ausente

As alterações citogenéticas são consideradas fatores de impacto prognóstico na maioria dos protocolos terapêuticos utilizados internacionalmente. Um dos principais exemplos, a presença da translocação entre os cromossomos 9 e 22, t(9;22), que gera o cromossomo Filadélfia e a fusão *BCR/ABL* indicadora de mau prognóstico, estratifica os pacientes em um grupo de alto risco de recaída da doença⁽⁷⁷⁾.

Diversos estudos comparam os resultados terapêuticos da LLA na presença da fusão gênica *BCR/ABL* com as obtidas sem esta alteração e, em todos os testes, a sobrevida global foi estatisticamente inferior nos pacientes positivos. Portanto, a identificação de alterações citogenéticas indicadoras de prognóstico, é essencial para o tratamento destes pacientes^(78,80).

1.3 Citogenética

Pesquisas envolvendo a citogenética humana foram relatadas pelo citologista alemão Arnold e pelo inglês Fleming, que examinaram cromossomos humanos em mitose. Em 1921, Painter descreveu que o número de cromossomos humanos em ambos os sexos era de 48. Esta afirmação baseou-se em vários relatos e todos os manuais de Genética Humana estavam de acordo com esta ideia⁽⁹¹⁾.

Nas décadas de 1950 e 1960, as técnicas de cultura de células puderam ser aperfeiçoadas, quando Tjio e Levan, em 1956, definiram que o número de cromossomos humanos eram, na realidade, 46. Essa evidência foi suplementada por Ford e Hamerton em 1956 que examinaram tecido testicular de três homens e as contagens confirmaram que o número cromossômico humano era 46^(9,91).

A primeira anomalia cromossômica específica observada em um tumor humano foi descoberta na Filadélfia, em 1960, por Nowell e Hungerford: foi identificado um cromossomo muito pequeno em células de pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC), decorrente de uma translocação entre os cromossomos 9 e 22. Este cromossomo foi chamado de "Filadélfia" (Ph)⁽⁹⁾.

A citogenética é a parte da genética que estuda os cromossomos, sua estrutura e sua herança. Os cromossomos são constituídos por agregados de genes, formados por ácido desoxirribonucleico (DNA) e proteínas (histonas) responsáveis pela compactação e descompactação do DNA e fundamentais na regulação de genes. Podem ser visualizados ao microscópio em uma fase da divisão celular denominada metáfase⁽⁸³⁾.

Os cromossomos metafásicos humanos são constituídos por duas cromátides unidas pelo centrômero, também chamado de cinetócoro ou constrição primária. Esta estrutura divide as cromátides em “braços”, sendo denominados de *p* (*petit*) os braços curtos e superiores, e *q* (por ser a letra que vem após o p) os braços longos e inferiores ao centrômero. As extremidades dos braços são chamadas de telômeros⁽²⁷⁾.

O cariótipo é o conjunto cromossômico típico em termos de número e morfologia de cada espécie. Os 46 cromossomos humanos constituem 23 pares, nos quais 22 pares são semelhantes em ambos os sexos, denominados autossomos, e o par restante representa os cromossomos sexuais: XX no sexo feminino e XY no sexo masculino (Figura 3)⁽⁵¹⁾.

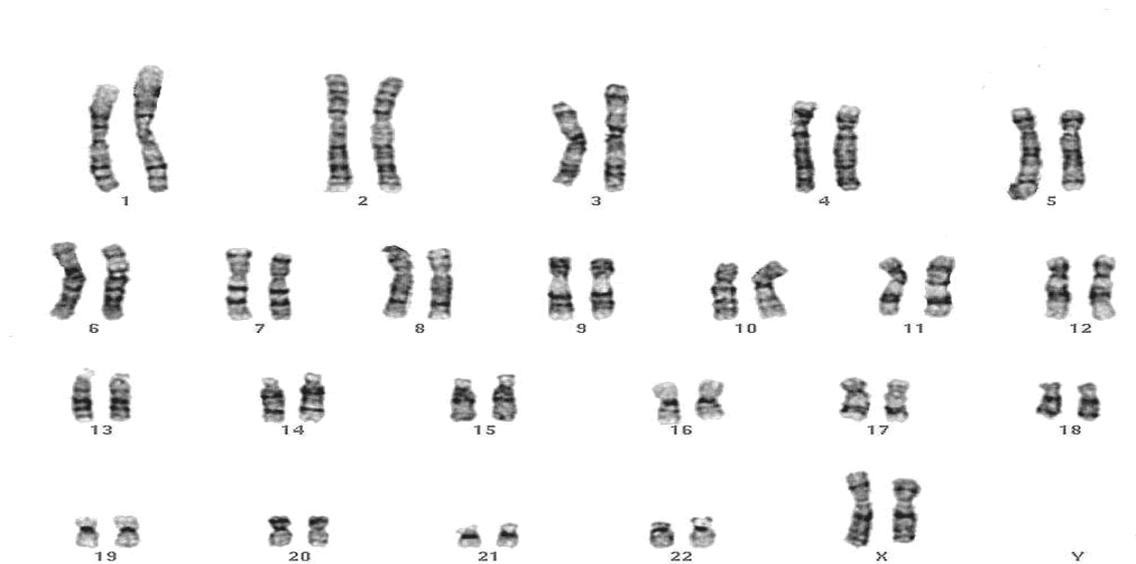


Figura 4. Cariótipo normal 46,XX.

Fonte: www.poligene.com.br⁽⁶⁶⁾

A estabilidade da morfologia e do número dos cromossomos é fundamental para um desenvolvimento harmonioso, resultando em um indivíduo físico e psicologicamente normal. Qualquer mudança estrutural ou numérica pode alterar a expressão de genes, produzindo um indivíduo fenotipicamente inviável ou anormal⁽⁹⁾.

As alterações no número ou na estrutura do cromossomo constituem mutações que consistem em uma fonte de variação importante para a evolução

das espécies. As alterações cromossômicas podem ser adquiridas ou constitucionais. As adquiridas ocorrem durante o desenvolvimento do indivíduo, como por exemplo, nos tumores sólidos e nas leucemias. As constitucionais fazem parte da constituição do indivíduo e estão presentes desde as células fetais⁽⁵¹⁾.

Alterações numéricas são as relacionadas com a mudança no número de cromossomos e são resultantes de erros na divisão celular. Podem ser classificadas em euploidias e aneuploidias. As euploidias constituem uma alteração que envolve todo o genoma, originando células em que o número de cromossomos é um múltiplo exato do número haploide da espécie, ou seja, todos os cromossomos serão duplicados (diploidia), triplicados (triploidia) e assim por diante. Na espécie humana, a ocorrência de euploidias é incompatível com a vida (Figura 4)⁽⁸⁹⁾.

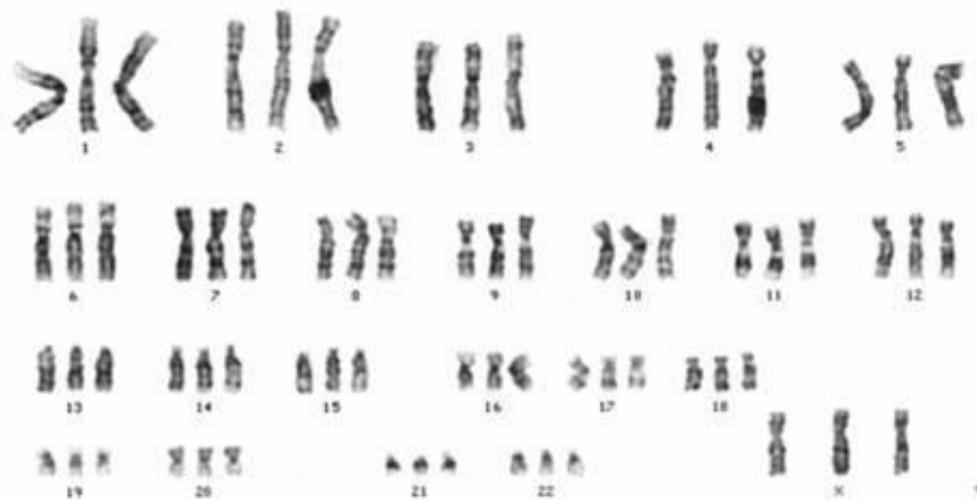


Figura 5. Cariótipo triploide (3n). Ao invés de aparecer em pares, os cromossomos estão em trios.

Fonte: <http://vegarcez.com.br/aberracao.htm>⁽²⁾.

Nas aneuploidias o número de cromossomos a mais não é um múltiplo exato do número haploide, em decorrência da não disjunção ou não separação adequada de um ou mais cromossomos durante a divisão celular. A aneuploidia é a anomalia cromossômica mais comum em humanos e caracteriza grande

quantidade de síndromes como a síndrome de Down e a síndrome de Turner (Figura 5)⁽⁵¹⁾.

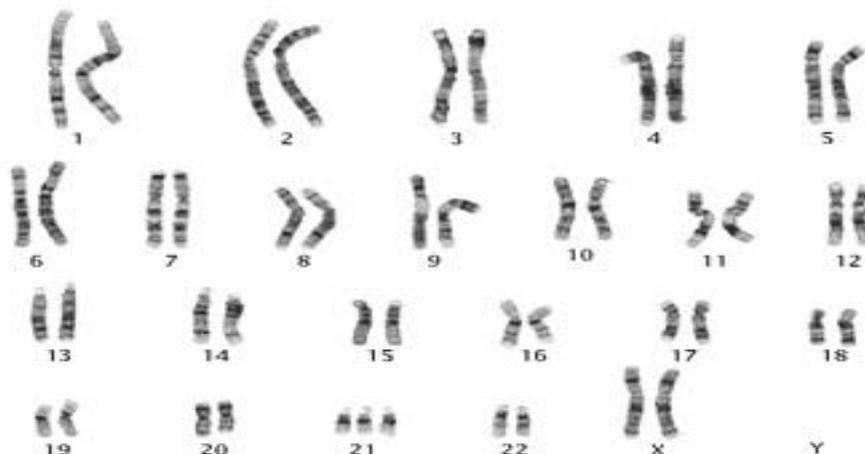


Figura 6. Cariótipo demonstrando aneuploidia (trissomia do cromossomo 21, correspondendo à Síndrome de Down).

Fonte: <http://hmsportugal.wordpress.com/2012/03/21/sindrome-de-down-trissomia-21/>⁽⁶⁸⁾.

As alterações estruturais são classificadas em dois tipos: rearranjos balanceados e não balanceados. Nos rearranjos não balanceados há alterações no número de genes (deleções, duplicações, cromossomos em anel, isocromossomos e cromossomos dicêntricos)⁽⁸⁹⁾.

Nos rearranjos balanceados há mudança na localização dos genes sem haver perda de material genético, ou seja, todas as informações genéticas estão presentes, mas de modo diferente do original (inversões, translocações, inserções e cromossomos marcadores)⁽⁸⁹⁾. Um exemplo clássico de translocação cromossômica em doenças onco-hematológicas é entre os cromossomos 9 e 22, $t(9;22)$, gerando o cromossomo Filadélfia (Figura 6).

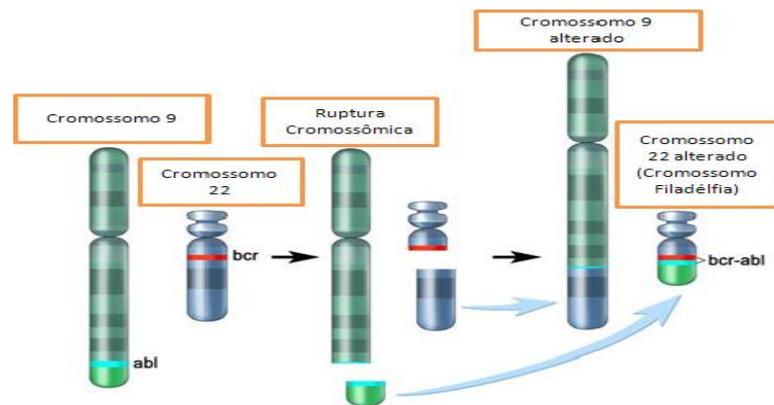


Figura 7. Translocação entre o cromossomo 9 e o 22, resultando no cromossomo Filadélfia.

Fonte: <http://acgt.blogs.sapo.pt/tag/cromossoma+filad%C3%A9lfia>⁽⁵⁹⁾.

1.3.1 Alterações citogenéticas na LLA-B na criança

Anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais nas leucemias agudas podem ser detectadas por estudos citogenéticos e moleculares. O cariótipo é o único exame que avalia todos os cromossomos e ainda é considerado como padrão ouro para avaliar as alterações genéticas, particularmente ao diagnóstico^(18,19,47).

As anormalidades cromossômicas são confinadas aos blastos, desaparecem durante a remissão hematológica e reaparecem na recidiva da doença, conferindo um parâmetro importante no prognóstico. Há relatos que as anomalias cromossômicas estão presentes na maioria dos pacientes cariotipados (79-85% dos casos de LLA na infância)⁽³⁵⁾.

Os quadros 3 e 4 descrevem um resumo das alterações cromossômicas numéricas e estruturais, respectivamente, que são recorrentes na LLA B. Outras translocações menos comuns são observadas, sendo que crianças mais velhas e adolescentes constituem os maiores grupos com anormalidades cromossômicas não especificadas, indicando potencial para a descoberta de novas alterações citogenéticas^(33,81).

Quadro 3. Alterações cromossômicas numéricas recorrentes descritas para LLA-B na infância⁽⁵⁴⁾.

Anormalidades cromossômicas numéricas	Prognóstico	Frequência
Hiperdiploidia	Bom	25-30%
Hipodiploidia	Ruim	Raro

Quadro 4. Alterações cromossômicas estruturais recorrentes descritas para LLA-B na infância⁽⁵⁴⁾.

Anormalidades cromossômicas estruturais	Genes envolvidos	Prognóstico	Frequência
t(4;11)	<i>MLL/AF4</i>	Ruim	5-10%
t(1;19)	<i>E2A/PBX1</i>	Intermediário	5-6%
t(12;21)	<i>TEL/AML1</i>	Bom	25%
t(9;22)	<i>BCR/ABL</i>	Ruim	3-5%

Dentre as alterações numéricas, a hiperdiploidia na LLA da criança é um fator de bom prognóstico pois os estudos mostram boa resposta à quimioterapia quando comparados aos pacientes que não possuem essa alteração. A explicação para este fato ainda não é clara, mas uma das hipóteses é a de que casos hiperdiploides possuem maior quantidade de células na fase S, o que resultaria em maior sensibilidade ao uso de drogas quimioterápicas que atuam nesta fase do ciclo celular⁽⁴⁰⁾.

Mais raramente observa-se a hipodiploidia (n entre 24 e 36 cromossomos), que estaria relacionada a um pior prognóstico na dependência de associação com características clínicas e biológicas dos pacientes. A explicação seria devido à perda de cromossomos que levariam à alteração na expressão de genes supressores tumorais e de proto-oncogenes⁽⁷⁰⁾.

Em relação às alterações estruturais, a t(12;21)(p12;q22), i.e. translocação entre os cromossomos 12 e 21, no braço curto do 12 (p12) e no braço longo do 21 (q22), gera a fusão entre o gene *TEL* do cromossomo 12 e o gene *AML1* do cromossomo 21 (*TEL/AML1*) e é a mais prevalente na LLA infantil (25% dos casos). Vale ressaltar que as mesmas não são visíveis através da técnica de citogenética convencional, sendo necessária avaliação molecular como a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e/ou a reação em cadeia da

polimerase (PCR) para sua identificação. Esse tipo de alteração genética é considerada fator de bom prognóstico^(24,25,12,85).

A $t(9;22)(q34;q11)$ justapõe o proto-oncogene *ABL* ao gene *BCR* gerando a fusão *BCR/ABL*. É considerada um dos marcadores moleculares associados com um alto risco para a recaída da LLA e também para o insucesso da terapêutica (Figura 7)⁽⁷⁷⁾.

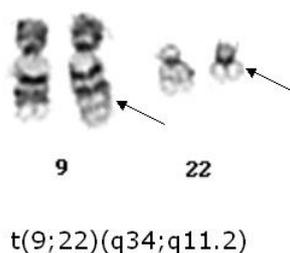


Figura 8. Translocação entre os cromossomos 9 e 22. Nota-se a troca de material genético entre o braço longo do cromossomo 9, banda 34 (q34) e o braço longo do cromossomo 22, banda 11 e sub-banda 2 (q11.2).

Fonte: <http://www.fleury.com.br/medicos/educacao-medica/manuais/manual-hematologia/pages/a-citogenetica-classica-e-molecular.aspx>⁽²⁶⁾.

O gene *MLL* ocupa uma grande extensão do cromossomo 11, na região 11q23, e rearranjos cromossômicos envolvendo este gene (translocações e deleções) estão associados a LLA B em lactentes. A $t(4;11)$ gera um transcrito de fusão *MLL-AF4* e está associado ao mau prognóstico quando diagnosticada na LLA em crianças com menos de 1 ano de idade. A chance de recaída é alta, sendo mais frequente nos primeiros dois anos após o início da quimioterapia (Figura 8)^(22,28,32).



Figura 9. Translocação entre os cromossomos 4 e 11 à esquerda. À direita deleção do cromossomo 11 na região do braço longo, banda 23 (q23).

Fonte: www.slh.wisc.edu/cytogenetics/cancer⁽²⁰⁾.

A translocação entre o cromossomo 1 e o 19, $t(1;19)$, gera a fusão entre os genes *E2A* do cromossomo 19 e *PBX1* do cromossomo 1. Estudos apontam que há potencial oncogênico para esta fusão, em parte devido à redução dos níveis de *E2A* tipo selvagem. Aproximadamente 25 a 30% das crianças com fenótipo de LLA pré-B apresentam esta fusão, e ela está geralmente associada a baixa resposta ao tratamento quimioterápico (Figura 9) ⁽⁸¹⁾.



Figura 10. Translocação entre os cromossomos 1 e 19. Note que o braço longo do cromossomo 1 está translocado para o braço curto do cromossomo 19.

Fonte: www.slh.wisc.edu/cytogenetics/cancer⁽²⁰⁾.

1.3.2 Análise citogenética convencional

A identificação de uma alteração cromossômica é útil não só para um diagnóstico mais específico, mas também para a compreensão dos mecanismos envolvidos na malignidade e para detectar genes de importância biológica. Com base nos resultados, é possível otimizar o tratamento⁽⁶⁴⁾.

Pacientes com evidência de citogenética de mau prognóstico receberão tratamento quimioterápico mais agressivo, diminuindo o risco de recaída e os portadores de citogenética de bom prognóstico farão esquemas terapêuticos mais brandos com a finalidade de minimizar a toxicidade das drogas^(65,76).

A citogenética convencional, realizada pela análise do cariótipo, fornece informações sobre as anomalias microscopicamente visíveis. O bandeamento G é o método de diferenciação longitudinal dos cromossomos mais utilizado rotineiramente nos laboratórios de citogenética para a realização do cariótipo. O

protocolo mais difundido é o que utiliza a tripsina na preparação das lâminas e a coloração com Giemsa (Bandas GTG: bandas G por tripsina utilizando giemsa) ^(51,61).

Este bandeamento produz bandas escuras e claras, permitindo a identificação de cada par cromossômico e as respectivas anomalias numéricas e estruturais. As bandas claras apresentam replicação precoce e muitos genes ativos, sendo a região onde mais se encontram as alterações⁽⁵¹⁾.

1.3.3 Análise citogenética molecular através da técnica de FISH

O uso de abordagens moleculares, que são técnicas mais sensíveis, vem demonstrando que a citogenética convencional é limitada para detectar determinadas alterações genéticas. Vários testes moleculares estão disponíveis para identificação de alterações cromossômicas, sendo os métodos mais utilizados: a reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR), que utiliza ácido ribonucleico (RNA) de cadeia simples para sintetizar uma cadeia de DNA complementar (cDNA) e a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) ^(85,29).

A técnica de FISH identifica alterações além da resolução visual ou quando um rearranjo cromossômico envolve uma região camuflada na leitura pelo bandeamento. Fundamenta-se na preparação de sondas específicas de DNA, marcadas pela incorporação de nucleotídeos quimicamente modificados que são fluorescentes ou podem ser detectados pela ligação a uma molécula fluorescente, visualizados sob luz ultravioleta^(88,84).

Classificações com base no diagnóstico citogenético e molecular das anormalidades cromossômicas têm por objetivo definir estratégias terapêuticas na LLA infantil, conforme cada grupo de risco. Atualmente são considerados os maiores indicadores de prognóstico na definição de grupos de tratamento, melhorando os índices de cura e sobrevida dos pacientes⁽⁵⁴⁾.

Os grupos de maior risco são tratados com esquemas quimioterápicos mais intensos, seguidos ou não, de transplante de MO, enquanto os grupos de baixo risco, com bom prognóstico, podem ser poupados dos efeitos deletérios da terapia⁽⁴⁾.

O mesilato de imatinibe (*Gleevec*®) é uma droga com ação inibitória da atividade tirosina quinase da fusão *BCR/ABL*, mas nem todos os pacientes evoluem com boa resposta e sabe-se que o transplante de MO é uma opção terapêutica que induz remissão morfológica e citogenética, sendo necessário nestes casos⁽⁴⁾.

A região Norte ainda enfrenta dificuldades para a realização do diagnóstico completo das leucemias, o que reflete na terapêutica da doença. A FHHEMOAM é centro de referência de diagnóstico e tratamento de doenças hematológicas no Amazonas, sempre incorporando novas tecnologias com esse fim, entretanto, apesar de estar realizando de forma sistemática o tratamento das leucemias, ainda carecia de técnicas laboratoriais mais eficientes para estratificação de risco.

A implementação do diagnóstico das alterações citogenéticas em pacientes pediátricos com LLA-B motivou a elaboração deste estudo e se justifica por ter sido o primeiro realizado no Estado do Amazonas, devendo contribuir para uma melhor compreensão da doença nesta região. O conhecimento das principais alterações cromossômicas dos pacientes poderá favorecer o entendimento da etiologia genética da doença.

Esta pesquisa contribuiu para uma melhor opção terapêutica que influenciou positivamente no prognóstico e na sobrevida dos pacientes atendidos nesta Instituição, já que os mesmos são estratificados em grupos de risco, seguindo o protocolo GBTLI 2009. Espera-se diminuir as taxas de recaída da doença e, como consequência os custos relacionados ao tratamento quimioterápico, já que os pacientes eram estratificados por métodos laboratoriais menos sensíveis.

Considerando-se o caráter de referência da FHHEMOAM e o valor prognóstico das alterações cromossômicas, implantou-se na Instituição um novo protocolo laboratorial para a realização da citogenética molecular, possibilitando um diagnóstico laboratorial complementar e mais sensível. Nesse contexto houve grande benefício à população da região Norte, permitindo avaliação mais fidedigna da resposta ao tratamento e manejo terapêutico baseado na estratificação de risco por um método mais acurado (técnica de FISH).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estimar a frequência das alterações genéticas em pacientes pediátricos com LLA-B *de novo* atendidos na FHHEMOAM.

2.2 Específicos

- Estimar a frequência das alterações genéticas em pacientes pediátricos através de análise citogenética convencional e pela técnica molecular de FISH (hibridização *in situ* por imunofluorescência).
- Avaliar a associação dos dados sócio-econômicos e demográficos dos pacientes com as alterações genéticas encontradas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo de Estudo

Estudo descritivo do tipo inquérito.

3.2 Universo de Estudo

3.2.1 População de Referência

O estudo teve como alvo a população de crianças com leucemia da Região Norte e que habitam o Estado do Amazonas, sendo a segunda unidade federativa mais populosa desta macrorregião, com seus 3,6 milhões de habitantes, superado apenas pelo Pará. Somente dois de seus municípios possuem população acima de 100 mil habitantes: Manaus, a capital e maior cidade com 1,8 milhão de habitantes, que concentra cerca de 60% da população do estado, e Parintins, com quase 104 mil habitantes⁽¹⁷⁾.

3.2.2 População de Estudo

Crianças com LLA *de novo* atendidas na FHHEMOAM.

3.2.3 Critérios de Inclusão

- Crianças de 0-18 anos;
- Casos de LLA-B *de novo*;
- Não ter utilizado qualquer dose de corticoide antes do tratamento. Esta medicação interfere na avaliação, visto que por ser um imunossupressor poderia modificar as alterações citogenéticas pesquisadas .

3.2.4 Critérios de exclusão

- Materiais biológicos coagulados, mal conservados ou com contaminação.

3.2.5 Comitê de ética em Pesquisa

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de ética da FHHEMOAM (CEP/FHHEMOAM), sob número do CAAE: 9189013.7.0000.0009.

3.2.6 Cálculo da amostra

A prevalência de alterações genéticas identificadas em pacientes com LLA B varia de acordo com o tipo específico de translocação encontrada. Para estimar o “n” amostral utiliza-se a prevalência da fusão gênica e a seguinte fórmula em estudos descritivos do tipo inquérito⁽³⁶⁾:

$$n=Z\alpha^2.P.Q/d^2$$

- **P=Prevalência do que pretende ser estudado**
- **Q=100-P**
- **d=precisão**
- **α = Nível de significância (fixado em 5%)**
- **n=número amostral**

A prevalência das alterações pesquisadas utilizada para o cálculo encontra-se no quadro 4. O quadro 5 mostra o “n” amostral estimado para cada fusão gênica. Na FHHEMOAM, são diagnosticados por ano aproximadamente 40 pacientes com LLA. Como o período para a coleta dos dados foi restrito a um ano, ocorrendo no período de janeiro de 2014 a janeiro de 2015, foi obtida amostra por conveniência, resultando em 35 amostras.

Quadro 5. “n” amostral estimado para o estudo.

Fusão gênica	“n” amostral estimado
<i>MLL/AF4</i>	73 pacientes
<i>TEL/AML1</i>	49 pacientes
<i>BCR/ABL</i>	73 pacientes
<i>E2A/PBX1</i>	73 pacientes

3.3 Procedimentos

A figura 10 ilustra os procedimentos realizados durante o estudo. A coleta das amostras foi realizada mediante assinatura do TCLE e em seguida encaminhadas para análise morfológica do esfregaço. Ao ser confirmada leucemia aguda, foi realizada a imunofenotipagem e os casos de LLA B utilizados para detecção das alterações citogenéticas.

A análise citogenética convencional e a técnica de FISH foram realizadas em todos os casos de LLA B, exceto para detectar a fusão gênica *MLL/AF4* que é encontrada em pacientes menores de 1 ano (lactentes). Sendo assim, neste último caso o uso da técnica de FISH foi restrito aos sujeitos da pesquisa que encontravam-se nesta faixa etária (menores de 1 ano de idade).

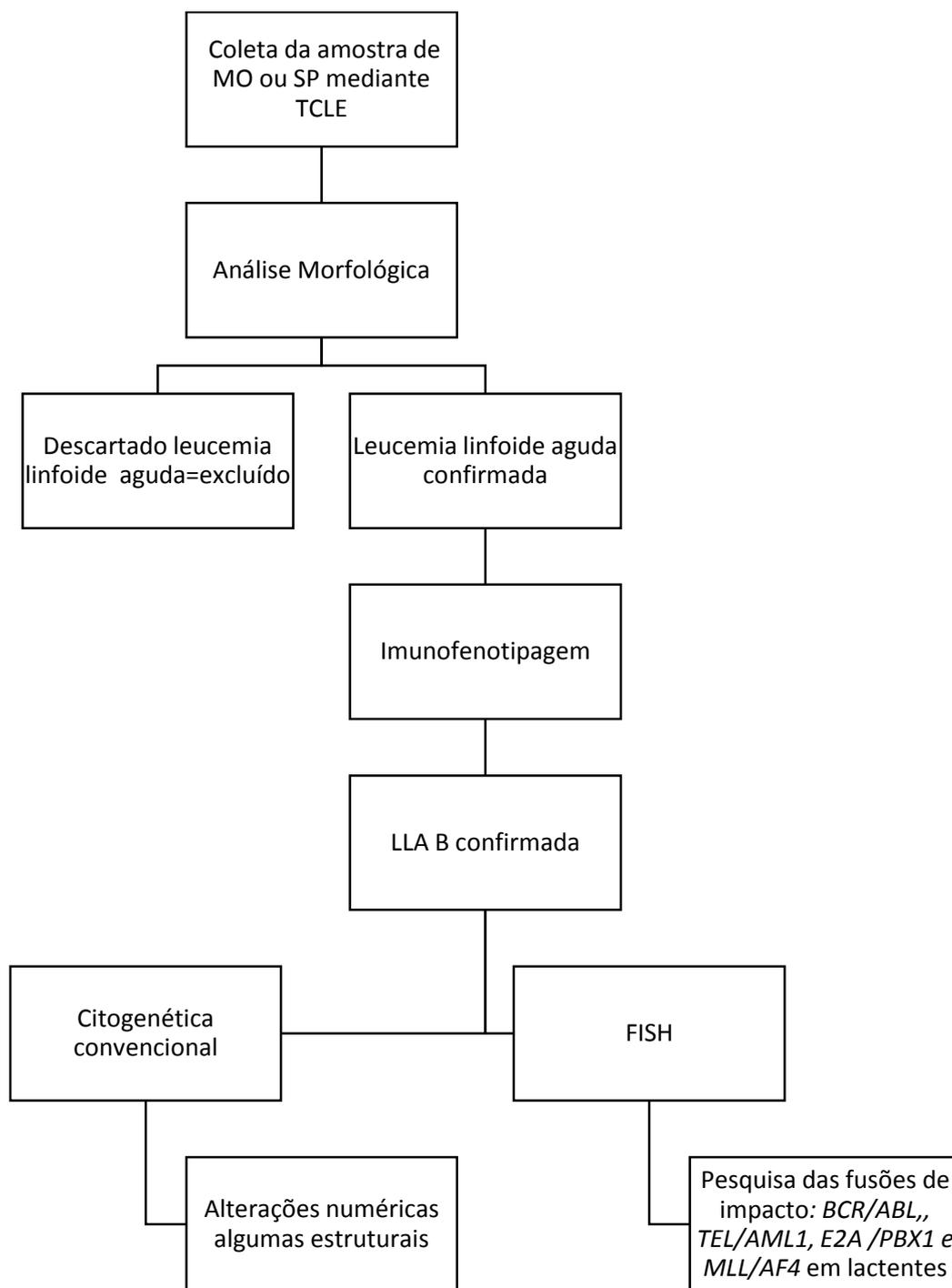


Figura 11. Fluxograma indicando os procedimentos realizados durante o estudo.

3.3.1 Coleta de informações e classificação de risco dos pacientes

Os dados clínicos foram coletados através do preenchimento de ficha

clínica (Anexo 9.2) composta por identificação, idade, gênero, raça, naturalidade, procedência, renda familiar mensal, escolaridade da mãe e características citomorfológicas, classificação da leucemia por imunofenotipagem, resultado da citogenética convencional e da técnica de FISH (descrito nos protocolos laboratoriais anexo 9.3).

As informações foram armazenadas em fichas individuais com acesso controlado e restrito aos profissionais da pesquisa. Os pacientes foram classificados em baixo ou alto risco com base nas normas do GBTLI-LLA 2009 (Quadro 2).

3.3.2 Coleta do material biológico

A coleta dos materiais biológicos foi realizada após aprovação do CEP/FHHEMOAM. Os responsáveis legais dos pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (Anexo 9.1) após receberem instruções quanto ao objetivo da pesquisa, fornecidas pela profissional coordenadora do estudo.

3.3.2.1 Aspirado medular

Foram coletados aspirados de MO para o estudo citogenético por profissional médico capacitado. A MO é o local de escolha para a avaliação das células de interesse (blastos). Na dependência das condições clínicas dos pacientes e da idade (<10anos) os mesmos puderam receber sedação sob supervisão de um profissional médico anestesista de plantão conforme escala de serviço da FHHEMOAM⁽¹⁾.

O local de escolha para a obtenção de MO em crianças é a crista ilíaca posterior por conter a maior quantidade de medula celular e não existir órgãos vitais em estreita proximidade, mas também pode ser utilizada, em segunda escolha, a região do platô tibial. Aspirados medulares foram coletados do platô tibial em crianças com <12 meses e acima dessa idade as coletas foram da crista ilíaca posterior⁽¹⁾.

Foram aspirados inicialmente de 0,5ml destinados a confecção de seis esfregaços para análise morfológica. Os esfregaços foram devidamente identificados com as iniciais do paciente e data da coleta e acondicionados em cartela própria em temperatura ambiente⁽⁶⁷⁾.

A seguir, foram aspirados mais 2mL de MO em seringa sem anticoagulante e colocados em tubos com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) para imunofenotipagem e 3ml em heparina para análise citogenética convencional e molecular. Os tubos foram devidamente identificados com nome completo do paciente e mantidos em temperatura ambiente⁽⁶⁷⁾.

Todo o material coletado foi acondicionado em caixa de isopor em temperatura ambiente e transportado, imediatamente após a coleta, sob responsabilidade do técnico de enfermagem, aos laboratórios de marcadores celulares e de citogenética da FHHEMOAM⁽⁶⁷⁾.

3.3.2.2 Sangue periférico

Nos casos onde houve dificuldade para a coleta do aspirado medular e mediante a quantidade de blastos no sangue periférico (SP) ser suficiente para a análise, foram coletadas amostras de SP como segunda escolha, por profissional enfermeiro capacitado. Após antisepsia, foram coletados 5mL de SP, sendo realizados três esfregaços para análise morfológica, e os 4mL restantes, acondicionados em tubos com EDTA, identificados com o nome do paciente, data da coleta e acondicionados em isopor em temperatura ambiente⁽⁶⁷⁾.

Os esfregaços foram identificados com as iniciais do paciente, data da coleta e acondicionados em cartela própria em temperatura ambiente e transportados, juntamente com os tubos, imediatamente após a coleta, sob responsabilidade do técnico de enfermagem, ao laboratório de marcadores celulares e de citogenética da FHHEMOAM⁽⁶⁷⁾.

3.4 Análise morfológica do esfregaço

A análise morfológica inicial foi realizada pela coloração convencional dos esfregaços de MO ou SP por May-Grünwald-Giemsa (anexo 9.3.1). Este corante tem por finalidade a coloração das estruturas nucleares e citoplasmáticas das células sanguíneas. A avaliação microscópica foi realizada por médico hematologista e o diagnóstico de leucemia, ao se observar mais de 25% de blastos da linhagem linfóide das 300 células nucleadas contadas⁽⁹³⁾.

Embora a análise morfológica continue sendo o padrão-ouro para o diagnóstico, técnicas adicionais, incluindo imunofenotipagem, avaliação citogenética e estudos de genética molecular, foram ferramentas complementares obrigatórias em termos de classificação da doença⁽⁸⁹⁾.

3.5 Imunofenotipagem para subclassificação das leucemias

O estudo dos marcadores celulares foi realizado em MO ou sangue periférico (SP), utilizando um amplo painel de anticorpos monoclonais (AcMos-flow cytometry kits BD) conforme protocolos laboratoriais no anexo 9.3.3. A imunofenotipagem foi realizada por meio de AcMos marcados, que reconhecem epítopos específicos de antígenos celulares (CDs) e teve como instrumento o citômetro de fluxo do tipo FACS-Calibur, da Becton-Dickinson⁽⁶⁵⁾.

A CMF é uma metodologia realizada com maior frequência para distinção entre as leucemias mielóide e linfóide, e é utilizada para contar e analisar estruturas microscópicas como células, organelas e cromossomos, determinando de forma simultânea seus componentes e propriedades^(86,62).

Os AcMos conjugados a um fluorocromo conhecido, se ligam ao antígeno presente na superfície, citoplasma ou núcleo da célula, formando um complexo antígeno-anticorpo identificado pela excitação de um feixe luminoso sobre o fluorocromo e medida a quantidade de luz emitida por um conjunto de filtros.

Essa luz refratada ou fluorescência é captada por receptores e estes dados são processados em eventos via software *cell quest* (anexo 9.3.3) ⁽⁷¹⁾.

A subclassificação das leucemias de linhagem B foi realizada de acordo com os estágios maturativos fisiológicos dos progenitores B na MO: pró-B, B comum, pré-B e B-maduro^(24,25). Os resultados dos testes foram armazenados na ficha do paciente (Anexo 9.2).

3.6 Análise citogenética das alterações cromossômicas do estudo

A citogenética convencional fundamenta-se na análise dos cromossomos da célula em divisão, em particular, na metáfase da mitose, que é a fase em que os cromossomos estão mais condensados⁽¹⁸⁾. É realizada através da análise do cariótipo com a coloração das bandas cromossômicas, onde se identificam as alterações numéricas e estruturais. Uma banda é definida como uma parte do cromossomo que é claramente distinguida do segmento adjacente, apresentando-se mais escura ou mais clara. Os cromossomos são visualizados como uma série contínua de bandas claras e escuras⁽³⁶⁾.

O SP é o tecido mais utilizado para o diagnóstico citogenético pela simplicidade de seu cultivo. Entretanto, com o estabelecimento da relação entre doenças onco-hematológicas e alterações cromossômicas, a MO é o tecido de escolha com a finalidade diagnóstica destas anomalias, reservando-se o SP para os casos de impossibilidade de realização do mielograma, desde que a quantidade de blastos nesta amostra seja suficiente para análise⁽⁵⁶⁾.

3.6.1 Citogenética convencional

3.6.1.1 Cultura das células do sangue periférico

Os tecidos utilizados para o diagnóstico citogenético não possuem um número significativo de mitoses espontâneas, sendo necessária uma cultura de células. O meio de cultura utilizado para análise citogenética em SP foi o meio

de cultura de tecido animal desidratado desenvolvido pelo Instituto Rosewall Park Memorial (RPMI 1640) enriquecido com fitohemaglutinina (PHA), com a finalidade de estimular uma maior e mais rápida proliferação celular, para obtenção de maior quantidade de células mitóticas e melhor morfologia dos cromossomos⁽⁷⁴⁾. O meio sólido foi diluído com água destilada estéril e sua metodologia de preparo está descrita nos protocolos laboratoriais (anexo 9.3.4).

3.6.1.2 Cultura das células (curta duração) da medula óssea

Embora este tecido possa oferecer uma cultura de curta duração (24h), uma vez que as células estão em contínua proliferação, ele possui algumas desvantagens: baixo índice mitótico e uma morfologia de baixa qualidade dos cromossomos, pois eles tendem a ser mais condensados e curtos, o que dificulta a análise. Entretanto a análise é feita, preferencialmente, em amostra da MO, pelas células hematopoiéticas estarem em completo processo de divisão celular e conter uma quantidade mais elevada de material para análise^(56,74).

O meio de cultura utilizado para amostra de MO foi o Marrow Max (GIBCO) e a metodologia está descrita no anexo 9.3.4.

3.6.1.3 Coleta das células provenientes da cultura

Após 72h de cultivo de SP e/ou 24h de cultivo da MO, adicionou-se 0,1ml de colchicina (ou Colcemid GIBCO) por 35 a 40 minutos, em cada cultura, com a finalidade de impedir a formação do fuso acromático, estagnando as divisões celulares na metáfase, etapa na qual os cromossomos estão mais individualizados e condensados, sendo mais apropriada para a análise do cariótipo. Após os 40 minutos da colchicina, toda a cultura foi transferida para um tubo cônico, quando então foi iniciado o processo de coleta e fixação das células, conforme descrito nos protocolos laboratoriais (anexo 9.3.4)^(51,56).

Finalmente, foi realizado um choque hipotônico com solução salina com a finalidade de causar inchaço e separação dos cromossomos e, ainda, eliminar restos citoplasmáticos que pudessem prejudicar a análise^(51,56).

3.6.1.4 Preparação das lâminas para análise microscópica

A preparação das lâminas de citogenética foi realizada dentro da capela de fluxo laminar, em temperatura de 35°C e umidade de 22 a 25%. Após a última lavagem do material com solução salina, foi retirado o sobrenadante, deixando um *pellet* suficiente para pingar 2 a 3 gotas em, no mínimo, duas lâminas e deixado secar a temperatura ambiente.

As lâminas foram identificadas com as iniciais dos pacientes e a data da coleta, e colocadas em uma cubeta de vidro para que passassem 12 horas à noite em estufa de 60° C, objetivando-se o “envelhecimento”, tornando melhor a resolução das bandas dos cromossomos. Após esse período, as mesmas foram coradas^(51,56).

3.6.1.5 Coloração e bandeamento

Foi preparada previamente uma solução de tripsina EDTA aquecida a 37°C. As lâminas foram submergidas em três soluções diferentes: a primeira de tripsina aquecida (de 15 a 20 segundos), que teve por objetivo desnaturar as proteínas cromossômicas; a segunda de tampão fosfato-salino (PBS) com soro fetal bovino (SBF); e a terceira solução de PBS, para lavagem das lâminas e retirada de restos celulares^(51,56).

Após este processo, as lâminas foram coradas com corante Giemsa (de onde deriva o nome de bandas G), diluído com água destilada a 20%, de 3 a 5 minutos. Foi corada uma lâmina de cada paciente e observada ao microscópio para verificação do padrão de coloração e o bandeamento, e adequar o tempo do corante e da tripsina, conforme necessário, para a coloração das demais lâminas⁽⁴⁵⁾.

3.6.1.6 Análise microscópica e interpretação dos resultados

A lâmina com os cromossomos corados foi analisada por microscopia óptica convencional e capturadas pelo software *Cytovision*, sendo a etapa final e mais minuciosa. Os cromossomos foram organizados em pares de homólogos em ordem decrescente de acordo com seu tamanho, posição de seus centrômeros e padrão de bandeamento.

As imagens deste tipo de protocolo revelam que os cromossomos mostram um padrão de bandas claras e escuras, no qual as faixas escuras contêm DNA rico em bases AT (adenina e timina) e poucos genes ativos; as bandas G claras têm DNA rico em bases GC (guanina e citosina) e apresentam muitos genes ativos. Tal padrão é único para cada cromossomo humano e possibilita a definição inequívoca dos cromossomos normais e o pareamento dos mesmos. A maioria das alterações estruturais dos pontos de quebra e dos rearranjos cromossômicos ocorre nas bandas claras^(51,89).

Os resultados foram liberados conforme as recomendações do ISCN,2013 (Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Convencional) em que é utilizada a seguinte ordem para a descrição: primeiro o número do cromossomo em que há a alteração, após o braço do cromossomo (*p* se for o curto e *q* se for o braço longo) seguido da região, banda e sub-banda⁽³⁹⁾.

Foram capturadas, no mínimo, 15 a 20 metáfases, sendo identificadas as alterações numéricas e/ou estruturais pela pesquisadora acompanhada por profissional capacitado. O diagnóstico laboratorial realizado dependeu exclusivamente da experiência do examinador^(51,56).

3.6.2 Citogenética molecular pela técnica de FISH

3.6.2.1 Fundamento da técnica

A técnica de FISH foi realizada com sondas para detectar as fusões *TEL/AML1*, *BCR/ABL* e *E2A/PBX1* em todos os pacientes acima de 1 ano para

o comparativo com a citogenética convencional, principalmente por haver casos em que o cariótipo não pôde ser realizado, por ausência de células em metáfase e também pelo fato de que a fusão *TEL/AML* não é visualizada através da citogenética convencional. A sonda para detectar a fusão *MLL/AF4* foi realizada nos pacientes com idade ≤ 1 ano já que esta translocação é prevalente em crianças com essa faixa etária^(75,89).

A FISH é um procedimento citoquímico que envolve a formação de um híbrido entre sequências de DNA ou regiões específicas dos cromossomos e sondas de DNA. As sondas podem ser diretamente detectadas quando são marcadas pela incorporação de nucleotídeos quimicamente modificados, que são fluorescentes, ou podem ser detectadas pela ligação a uma molécula fluorescente complementar. A detecção se faz por visualização sob luz ultravioleta. A estratégia de detecção deste estudo consistiu no uso da molécula fluorescente complementar à sonda usada. A FISH substitui as bandas G para identificar alterações além da resolução visual, ou quando um rearranjo cromossômico envolve uma região camuflada na leitura pela banda ou de difícil interpretação⁽¹⁵⁾. Foi utilizada a sonda Dual Color Translocation Probe (Vysis, Inc) seguindo as recomendações do fabricante.

Foram utilizadas amostras de sangue periférico de pacientes sem doença hematológica para estabelecer o ponto de corte para considerar a amostra de FISH positiva. Foi encontrada uma média de positividade em 1% das amostras normais, com desvio padrão de 1%. Empregando-se a estratégia de somar a média com três desvios-padrões calculamos um ponto de corte de 4%. Como esse ponto de corte é próximo ao utilizado pelo Centro Infantil Boldrini, que é de 5%, optamos por empregar em nosso estudo este último valor.

3.6.2.2 Preparação dos cromossomos, produção das lâminas e hibridização

A preparação dos cromossomos segue a mesma metodologia utilizada na citogenética convencional. Após pingar 2 a 3 gotas da amostra em, no mínimo 2 lâminas e deixar secar à temperatura ambiente, as mesmas foram submetidas a

um pré-tratamento e desidratadas em uma bateria de álcoois a temperatura ambiente (anexo 9.3.5).

O DNA foi desnaturado em 65 a 85°C, em solução de formamida a 70%. A sonda pré-aquecida foi acrescentada sobre a lâmina para cobrir as áreas onde a suspensão celular foi dividida, e uma lamínula colocada sobre ela. A sonda permaneceu em contato com o material cromossômico desnaturado, e foi assim deixado por uma noite, em uma caixa úmida, a 37°C (+- 1°C), ao abrigo da luz^(51,75,89).

Foi realizada uma lavagem das lâminas após a hibridização. Essa etapa tem por objetivo remover toda a sonda em excesso e perdida. Após a lavagem, as lâminas foram coradas com 10µl de DAPI II (Vysis, Inc.) e cobertas com lamínula⁽⁷⁵⁾.

3.6.2.3 Interpretação e análise dos resultados

A análise foi realizada no microscópio de fluorescência Leica DM 2000 equipado com filtros Texas Red, FITC E DAPI , sendo realizada a contagem de no mínimo 200 núcleos interfásicos e utilizando o ponto de corte do Centro Infantil Boldrini fixado em 5% para positividade das fusões gênicas pesquisadas⁽⁷⁵⁾.

A fusão de dois genes produziu uma fluorescência com sinais coincidentes (verde/vermelho sobrepostos, parecendo a cor amarela). O controle negativo obtido através da hibridização das sondas gênicas, em amostra de indivíduos normais, indica que uma célula normal apresenta dois sinais verdes e dois vermelhos distintos; uma célula com translocação deverá mostrar um sinal verde, um sinal vermelho e um sinal verde/vermelho coincidentes^(19,75). A figura 11 ilustra didaticamente um exemplo da marcação fluorescente identificada pela técnica de FISH e a figura 12 mostra a visualização à microscopia.

Os resultados obtidos foram liberados conforme as recomendações do ISCN,2013⁽³⁹⁾, que indica a sonda utilizada, o cromossomo e a banda

correspondentes a ela, bem como o número de cópias de marcação observada com a sonda.

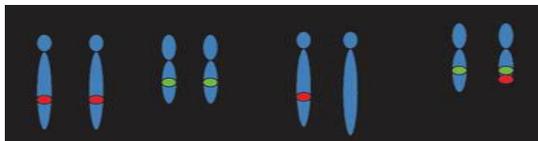


Figura 12. Representação esquemática da marcação da sonda pela técnica de FISH. (A) À esquerda observa-se dois sinais vermelhos e dois verdes, e à direita a sobreposição do sinal verde e vermelho indicando a fusão gênica⁽⁷⁵⁾.

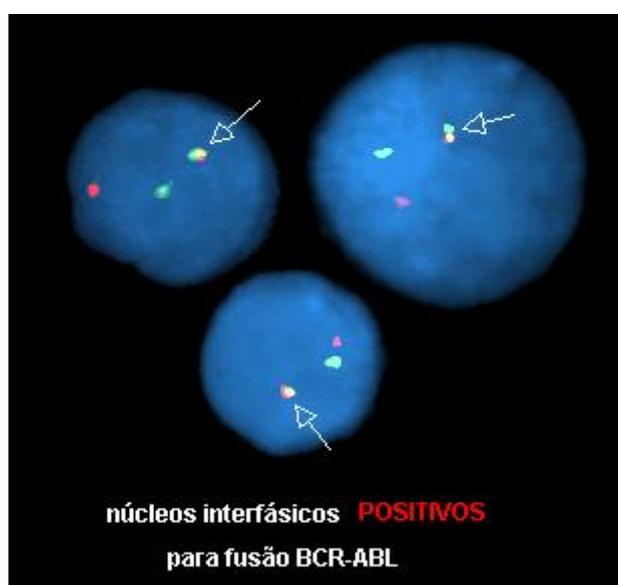


Figura 13. Visualização através de microscópio fluorescente da fusão gênica BCR/ABL. Verifica-se a cor amarela no local indicativo da fusão, onde há sobreposição do sinal verde e do sinal vermelho.

Fonte: Centro Infantil Boldrini

3.7 Análise estatística

Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas de frequência, onde se calculou as frequências absolutas simples e relativas para os dados categóricos. Na análise da idade, foi calculada a mediana e os quartis (Q_i), pois foi rejeitada a hipótese de normalidade ao nível de 5% de significância por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. Na análise dos dados categóricos foi aplicado o teste exato de *Fisher* e na comparação das medianas o teste não paramétrico

de *Mann-Whitney*⁽⁹⁰⁾.

O software utilizado na análise foi o programa Epi-Info versão 7.4 para Windows, que é desenvolvido e distribuído gratuitamente pelo CDC (www.cdc.org/epiinfo)⁽²³⁾.

4. FONTE DE FINANCIAMENTO

O projeto foi submetido e aprovado pelo Programa de Apoio à Consolidação das Instituições Estaduais de Ensino e/ou Pesquisa- Resolução n. 002/2008-Pró- Estado da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Amazonas-FAPEAM.

5. RESULTADOS

Foram atendidos no ambulatório da FHHEMOAM, no período de 12 meses (janeiro/ 2014 a janeiro/ 2015), por demanda espontânea, 45 pacientes, que submetidos ao estudo imunofenotípico por citometria de fluxo, foram classificados como LLA B. No presente estudo foram incluídas 35 amostras, representado 77,7% dos pacientes, pois as 10 amostras restantes não foram utilizadas por se enquadrarem nos critérios de exclusão previamente definidos. (Figura 13).

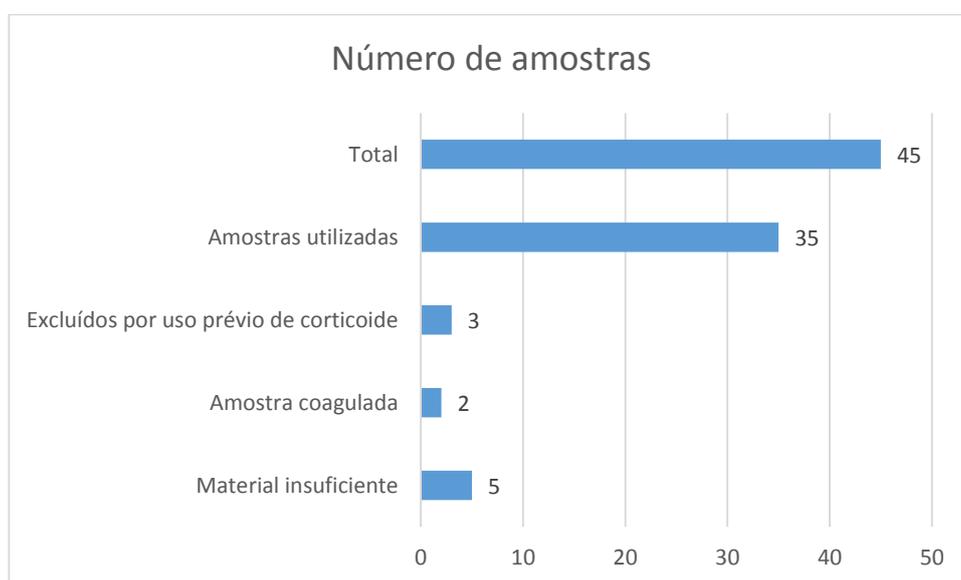


Figura 14. Total de amostras obtidas no estudo no período de jan/2014 a jan/2015. As Barras correspondem ao total de amostras incluídas no estudo e à distribuição das amostras excluídas de acordo com a causa da exclusão: (1) uso prévio de corticóide; (2) coagulação da amostra; e (3) material insuficiente.

Conforme os dados expostos na tabela 2, das 35 amostras analisadas, 14 eram de pacientes do gênero feminino e 21 do masculino. As idades dos pacientes variaram de 1 a 17 anos, com a mediana de 3. Com relação à raça, 7 foram da raça branca e 28 pacientes se autodenominaram como pardos. Em relação ao local de procedência dos pacientes, a maioria (20 pacientes) foi proveniente da capital, e os 15 pacientes restantes, do interior do estado do Amazonas. Quanto à escolaridade e à renda familiar mensal, observou-se que

predominam mães de pacientes (42,9%) que têm ensino fundamental completo e recebem entre 1 e 3 salários mínimos.

Tabela 2. Distribuição das crianças portadoras de leucemia linfóide aguda B no Amazonas, segundo a frequência dos seus dados demográficos e socioeconômicos.

Variáveis (n = 35)	f_i	%
Gênero		
Feminino	14	40,0
Masculino	21	60,0
Idade (anos)		
≤ 1	3	8,5
≥1 ≤9	24	68,5
≥ 9	8	22,8
Mediana	3,0	
Q ₁ – Q ₃	2 - 7	
Raça		
Branca	7	20,0
Parda	28	80,0
Escolaridade da mãe		
Fundamental incompleto	5	14,3
Fundamental completo	15	42,9
Médio incompleto	1	2,9
Médio completo	10	28,6
Superior incompleto	2	5,7
Superior completo	2	5,7
Renda Familiar (salários mínimos)		
≤ 1	15	42,9
1 --- 3	15	42,9
> 3	5	14,2
Procedência		
Manaus	20	57,1
Demais municípios do Amazonas	15	42,9

f_i = frequência absoluta simples.

A figura 14 evidencia que nove amostras não apresentaram metáfase para a análise do cariótipo convencional. Tal fato ocorre devido ao não crescimento da cultura, não sendo possível portanto, estabelecer o resultado pela citogenética convencional (resultados tidos como indefinidos). Essas amostras foram avaliadas através da técnica de FISH.

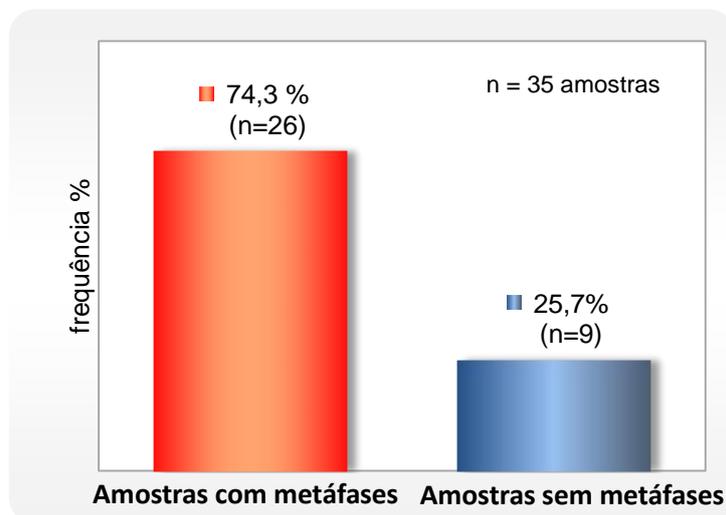


Figura 15. Distribuição das frequências de sujeitos do estudo de acordo com a obtenção de amostras com metáfase para a avaliação por citogenética convencional. Coluna vermelha corresponde a sujeitos em que foram obtidas amostras com células apresentando cromossomos em metáfase. Coluna azul corresponde a sujeitos em que não foram obtidas amostras apresentando células com cromossomos em metáfase.

A figura 15 ilustra a avaliação das 35 amostras avaliadas, resultando em 31% de alterações citogenéticas. Entretanto, 26% dos casos foram classificados como indefinidos por não haver crescimento de metáfases, não permitindo a avaliação pela citogenética convencional. Observa-se então na figura 16 a proporção de alterações identificadas pela citogenética convencional nas 26 amostras onde foi obtido crescimento de metáfases, aumentando a porcentagem para 38,3% de alterações.

Dentre as 26 amostras que apresentaram crescimento de metáfases para análise do cariótipo foram identificados 6 casos de hiperdiploidia, 3 casos de deleção do cromossomo 11 (11q23) e 2 casos de translocação t(9;22), conforme ilustram as figuras 17,18 e 19. A figura 20 ilustra a única amostra positiva para alteração citogenética, sendo a fusão gênica *BCR/ABL* resultante da t(9;22).

Conforme mostrado na tabela 3, foi possível observar que não foi constatada diferença estatística entre os achados da citogenética em relação ao gênero ($p = 0,109$), mediana da idade ($p = 0,645$), raça ($p = 0,197$) e procedência ($p = 0,428$) dos pacientes LLA B.

Tabela 3. Distribuição dos achados citogenéticos nas crianças portadoras de leucemia linfóide aguda B incluídas no estudo, estratificadas segundo a frequência do gênero, idade, raça e procedência.

Variáveis (n = 26)	Citogenética				Total	P
	Alterada		Normal			
	f _i	%	f _i	%		
Gênero						0,109*
Feminino	7	63,6	4	36,4	11	
Masculino	4	26,7	11	73,3	15	
Idade (anos)						0,645**
≤ 1	-	-	1	100,0	1	
2 a 8	9	47,4	10	52,6	19	
≥ 9	2	33,3	4	66,7	6	
Mediana	5,0		3,0			
Raça						0,197*
Branca	1	16,7	5	83,3	6	
Parda	10	50,0	10	50,0	20	
Procedência						0,428*
Manaus	7	53,8	6	46,2	13	
Demais municípios do Amazonas	4	30,8	9	69,2	13	

f_i = frequência absoluta simples; * Teste exato de Fisher; ** Teste de Mann-Whitney para mediana.

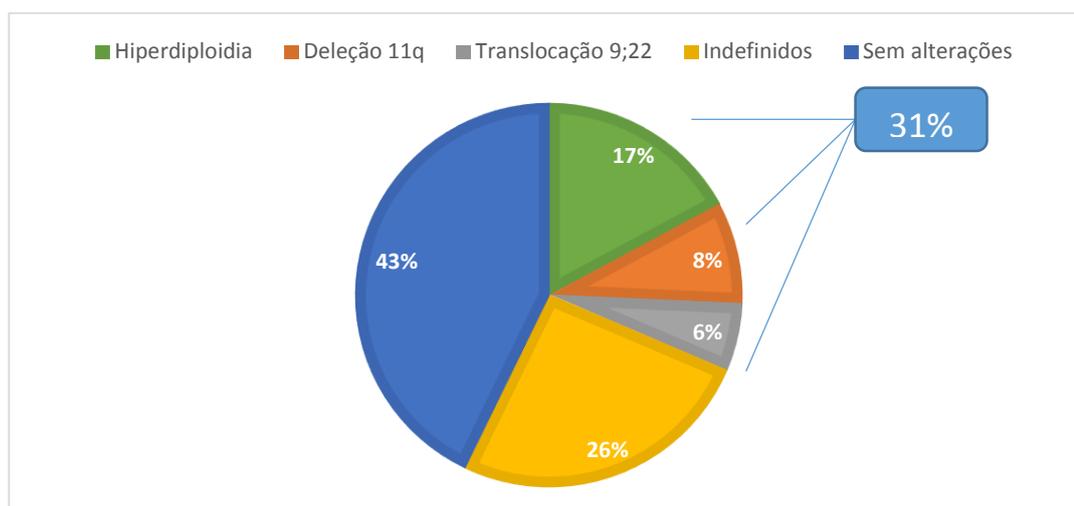


Figura 16. Proporção de alterações citogenéticas encontradas nas 35 amostras avaliadas no estudo, resultando em 31% do total.

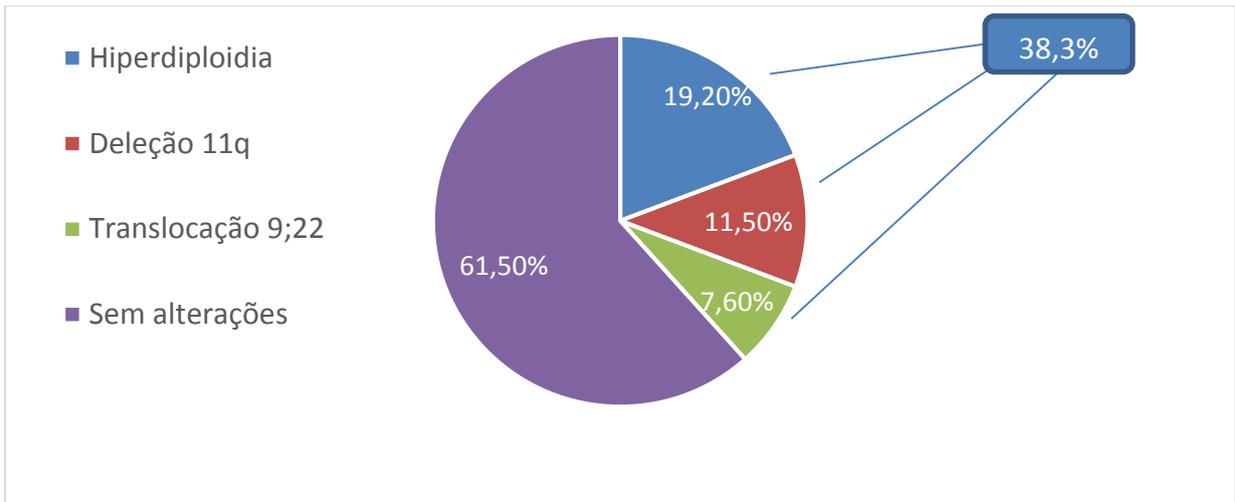


Figura 16. Proporção de alterações identificadas pela citogenética convencional nas 26 amostras onde foi obtido crescimento de metáfases.

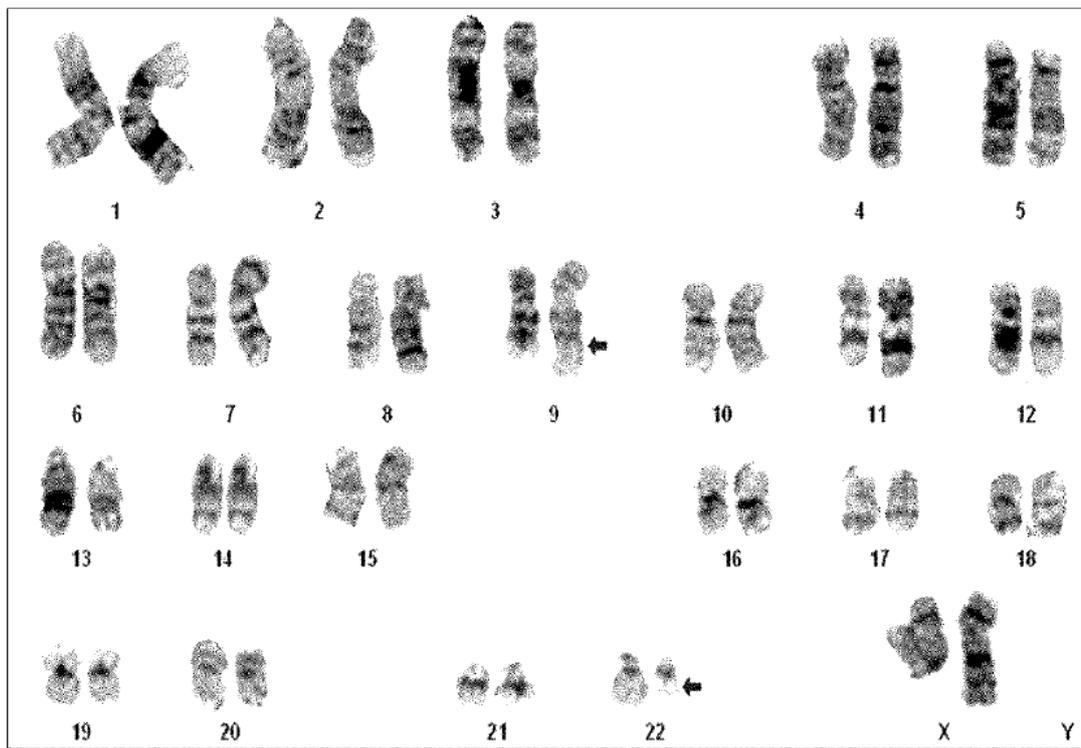


Figura 17. Imagem representativa de avaliação citogenética de material coletado através do mielograma revelando a translocação 9;22 em um paciente da amostra.

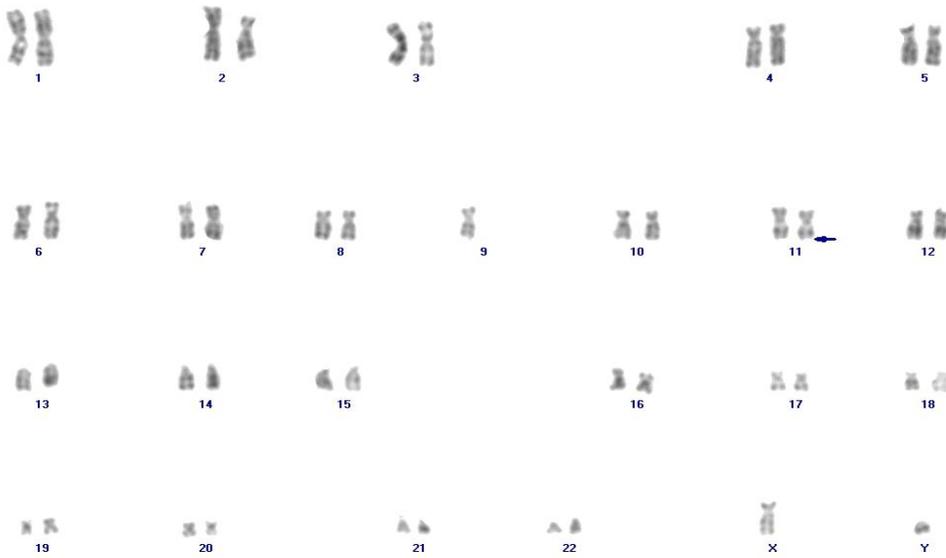


Figura 18. Imagem representativa de avaliação citogenética de material coletado através do mielograma revelando a deleção de braço longo do cromossomo 11 (11q) em um paciente da amostra.

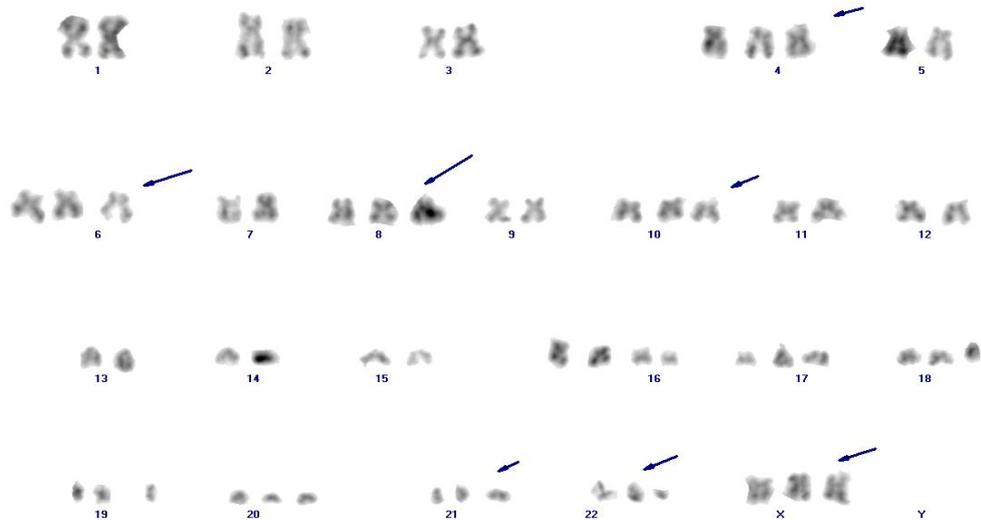


Figura 179. Imagem representativa de avaliação citogenética de material coletado através do mielograma revelando hiperdiploidia em um paciente da amostra.

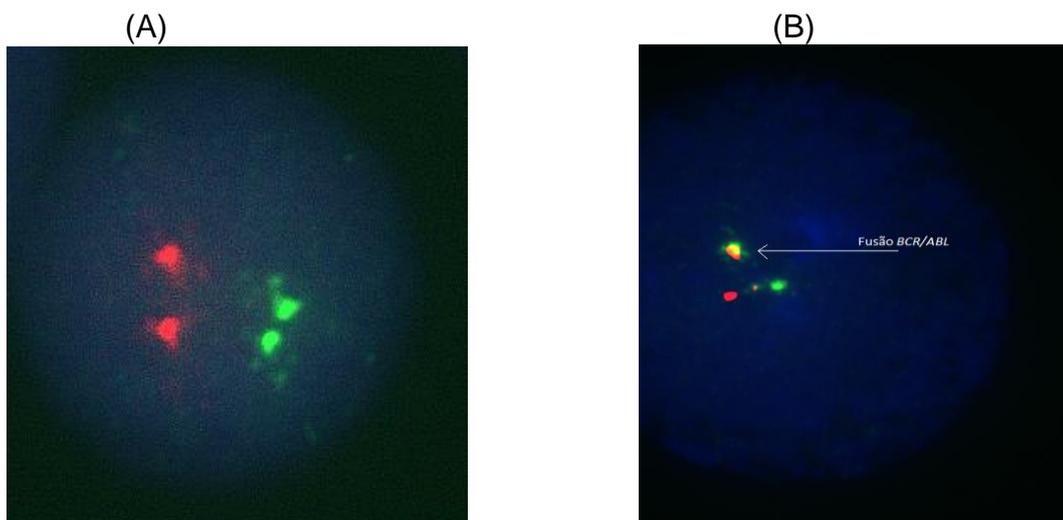


Figura 20. Avaliação de fusão *BCR/ABL* em amostras representativas do estudo pela técnica de FISH. Sonda com fluorescência vermelha corresponde ao gene *BCR*. Sonda com fluorescência verde corresponde ao gene *ABL*. (A) Núcleo interfásico negativo para fusão, mostrando dois sinais verdes e dois sinais vermelhos. (B) Sinal verde e sinal vermelho isolados e a junção de ambos produzindo o sinal amarelo representando a fusão *BCR/ABL*.

6. DISCUSSÃO

A LLA-B na infância é uma neoplasia com índice de cura alcançando 80% dos casos com o tratamento quimioterápico adequado⁽¹¹⁾. O avanço na sobrevivência da LLA nos últimos anos, está relacionado com a adequação dos agentes quimioterápicos aplicados aos grupos de risco.

Diversos fatores já foram estabelecidos como preditores de prognóstico e as pesquisas vem mostrando cada vez mais a importância das alterações citogenéticas como variáveis de grande relevância clínica. Por essa razão é recomendável a investigação através de métodos convencionais e também moleculares, os quais se complementam, para identificar as alterações recorrentes e instituir a terapêutica mais adequada.

A FHHEMOAM é o centro de referência para acompanhamento de doenças hematológicas no Amazonas, concentrando o diagnóstico de todos os casos de LLA B infantil. Nessa fundação, a busca da implementação de novas tecnologias que melhorem o manejo clínico e diagnóstico dos pacientes hematológicos é contínua. A FHHEMOAM também utiliza o protocolo brasileiro de tratamento das leucemias GBTLI 2009, que baseia-se na estratificação dos pacientes em grupos de risco de recaída e consequente abordagem terapêutica diferenciada.

A Fundação, apesar de realizar de forma sistemática o tratamento da LLA, ainda carecia de protocolos laboratoriais mais eficientes para estratificação de risco, necessitando de envio das amostras para outros laboratórios a fim de realizar a metodologia da citogenética molecular.

As taxas de prevalência de LLA infantil são muito variáveis entre os países de acordo com o nível de desenvolvimento humano. Estudos revelam que países mais industrializados, com populações com melhores níveis sócio-econômicos, apresentam taxas mais altas de LLA. Baixa incidência é identificada em Israel, China e Índia⁽⁶⁾.

No Brasil, as taxas de incidência são estimadas a partir dos registros de câncer de base populacional (RCBP) estabelecidos para algumas cidades com o menor índice sendo verificado em Salvador (1,34/100.000 habitantes) e o maior índice registrado em Manaus (4,69/100.000)⁽³⁷⁾. No presente estudo, a incidência da LLA B na criança calculada no período de 2014 a 2015 é semelhante ao que foi mostrado no estudo de Azevedo-Silva e colaboradores em 2010, ficando em 4,1/100.000 habitantes⁽⁶⁾.

A amostra deste estudo foi composta por pacientes de baixa renda e também com baixa escolaridade, e revela discrepância entre dados da literatura, que sugerem que a LLA na infância apresenta maior prevalência em locais com melhor nível socioeconômico. Uma hipótese é a de que a incidência de LLA infantil no Brasil possa ser maior do que a registrada até o momento devido à subnotificação dos registros de câncer de base populacional⁽⁶⁾.

As teorias levantadas a cerca da etiologia da LLA na criança, levam em consideração que não há um único fator causal, mas que alterações genéticas estariam diretamente ligadas à patogênese da doença e que algumas são recorrentes. Em relação à frequência destas alterações, a literatura mostra grande variação, indicando números entre 55-94% nos pacientes pediátricos portadores de LLA B⁽²⁸⁾.

No presente estudo o número de resultados indefinidos devido ao não crescimento de metáfases foi de 25,7% das amostras. Um estudo publicado por Kowalczyk e colaboradores em 2010 encontrou 13,5% de pacientes com índice mitótico nulo e no estudo de Minasi e colaboradores, em 2009, o sucesso foi obtido em apenas 55% das amostras^(46,55).

Não se sabe o agente que impede o crescimento das metáfases e há grande variação entre os estudos. Contudo há a hipótese de falta de algum nutriente ou fator que mantenha as condições da cultura o mais parecido com o organismo humano, além da presença de gordura na MO, que poderia inibir o crescimento celular⁽⁵⁵⁾.

A implementação do diagnóstico completo das alterações citogenéticas em pacientes pediátricos com LLA B motivou a elaboração deste estudo, sendo o primeiro realizado no Estado do Amazonas, onde há grande incidência de casos. Este estudo contribuiu para o melhor conhecimento do perfil dos pacientes LLA B no estado do Amazonas. Contudo sua continuação é bastante desejável a fim de se alcançar uma amostra maior, que permita o detalhamento mais preciso dessa população de pacientes.

Em se tratando de frequência das alterações citogenéticas, a literatura mostra que as mais frequentes são as numéricas (hiperdiploidia e mais raramente a hipodiploidia)⁽⁸¹⁾. O presente estudo não identificou nenhum caso de hipodiploidia, mas identificou a hiperdiploidia como a alteração mais frequente, sendo representada por 17% de casos, o que se mostrou semelhante ao estudo de Gil e colaboradores em 2010, sendo também a hiperdiploidia a alteração mais frequente e foram identificadas 53% de alterações numéricas⁽²⁸⁾.

Outros estudos também se mostraram semelhantes em relação à predominância de alterações numéricas, como o de Perez-Saldivar e colaboradores, em 2011, onde foram encontradas 40% de alterações numéricas em uma amostra de 131 pacientes e no de Silva e colaboradores (2002) onde foram analisadas amostras de 91 pacientes e em 45% foram encontradas tais alterações^(65,79).

Em relação às alterações estruturais, a análise por FISH da fusão *TEL/AML*, que é considerada de prognóstico favorável, não revelou positividade em nenhuma das amostras avaliadas. No Brasil e em outros países há grandes variações em relação à frequência, como 20% encontrado no Distrito Federal e 40% no Paraná^(50,87). Já o estudo realizado por Pui et al 2008 revelou frequência de 25% e o estudo mexicano de Jimenez-Morales e colaboradores, também em 2008, mostrou positividade em 9,6% dos casos⁽⁴²⁾.

A fusão com prognóstico intermediário *E2A/PBX1* tem baixa frequência relatada na literatura internacional com valores de 5% relatado por Van Dongen e colaboradores em 1999 e 6% identificado por Armstrong e Look em 2005^(5,85).

Entretanto estudo brasileiro realizado no Distrito Federal por Mesquita e colaboradores em 2009 encontrou maior frequência, sendo 8,7% em 2005 e 9,68% em 2006⁽⁵⁴⁾. No presente estudo não houve positividade em nenhuma das amostras analisadas, sendo este um resultado esperado devido à raridade desta alteração.

Para a fusão de mau prognóstico *BCR/ABL*, a literatura mostra índices que variam entre 3 a 5%. Na Argentina, Alonso e colaboradores (2006) encontraram 1,6% de casos positivos. No Brasil, o estudo de Mesquita e colaboradores em 2009 revelou 3,03% de casos positivos. Em nosso estudo, a análise citogenética convencional revelou 6% de positividade para a translocação entre os cromossomos 9 e 22, gerando o cromossomo Filadélfia^(3,54).

A análise realizada pela técnica de FISH identifica o transcrito *BCR/ABL* e revelou somente 1 caso positivo, mostrando discrepância com a análise do cariótipo. Em ambos os casos, as técnicas foram repetidas e os resultados revisados, sendo possível sugerir que a t(9;22) tenha resultado em um gene híbrido diferente de *BCR* e *ABL*, não sendo possível identificar através da técnica de FISH por ser a sonda específica. Existem estudos que mostram o rearranjo do gene *BCR* com outros genes como o *JAK2*⁽²¹⁾.

A presença de alterações envolvendo 11q23 estão ligadas ao gene *MLL*. A alteração estrutural com maior impacto prognóstico na LLA B em lactentes é a t(4;11), que gera a fusão *MLL/AF4*. Essa fusão não foi detectada pela técnica de FISH e a literatura identifica uma baixa frequência deste transcrito. Por exemplo, o estudo de Mesquita e colaboradores (2009), em Brasília, não evidenciou nenhuma amostra positiva⁽⁵⁴⁾.

Foram identificadas amostras evidenciando deleção do braço longo do cromossomo 11 (deleção 11q), mas a literatura não indica um valor prognóstico definido para esta alteração em pacientes maiores de 1 ano, necessitando de um tempo maior de seguimento dos pacientes para avaliar possível relação.

Considerando-se o caráter de referência da FHHEMOAM e o valor prognóstico das alterações cromossômicas, este estudo contribuiu com dados relacionados a frequência das alterações citogenéticas recorrentes em crianças com LLA B. Até o momento não há estudos semelhantes publicados, o que permite dar seguimento a novas pesquisas relacionadas às alterações identificadas, aperfeiçoando técnicas laboratoriais e conseqüentemente melhorando o seguimento dos pacientes.

O presente estudo também contribuiu com a implantação de um novo protocolo laboratorial para a realização da citogenética molecular através da técnica de FISH. Em conjunto à metodologia de citogenética convencional possibilita um diagnóstico laboratorial complementar e mais sensível.

Um diagnóstico mais completo influencia positivamente no prognóstico e na sobrevida dos pacientes atendidos nesta Instituição, já que os mesmos são estratificados em grupos de risco, seguindo o protocolo GBTLI 2009. Espera-se diminuir as taxas de recaída da doença e, como conseqüência, os custos relacionados ao tratamento quimioterápico.

Nesse contexto, o diagnóstico molecular oferecerá benefícios à população da região Norte que terá acesso a mais moderna e completa caracterização das leucemias, permitindo avaliação mais fidedigna da resposta ao tratamento oferecido na FHHEMOAM.

7. CONCLUSÕES

- A maior frequência de alterações citogenéticas encontrada na amostra estudada foi a numérica, em particular a hiperdiploidia o que se mostra semelhante ao encontrado na literatura.

-A frequência das fusões gênicas *BCR/ABL*, *MLL/A4* e *E2A/PBX1* identificadas no presente estudo foram semelhantes às já descritas em literatura.

-Não foi encontrado nenhum caso de *TEL/AML1*, sendo um dado discrepante do que é relatado pela maioria dos estudos nacionais e internacionais, visto que é a alteração de maior frequência.

- A análise do cariótipo se mantém como o método para melhor avaliação de alterações citogenéticas numéricas e também para avaliar o cariótipo de maneira geral, identificando outras alterações com potencial para influência no prognóstico dos pacientes.

- A implantação da técnica de FISH na FHHEMOAM é factível, e este método deve fazer parte da complementação diagnóstica para a identificação de rearranjos crípticos que escapem à análise citogenética convencional.

- Não foi encontrada diferença estatística significativa dos achados à citogenética em relação ao gênero, mediana da idade, raça e procedência dos pacientes LLA B infantis atendidos na FHHEMOAM.

- Foi observada deleção do 11q ainda sem relatos na literatura que indiquem valor prognóstico definido, necessitando de um tempo maior de seguimento dos pacientes para avaliar possível relação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abla O, Friedman J, Doyle J. Performing bone marrow aspiration and biopsy in children: Recommended guidelines. *Paediatr Child Health* July/August 2008; 13: 6.
2. Aberrações Cromossômicas. [Homepage na internet]. Acesso em 27 de maio de 2015. Disponível em: <http://vegarcez.com.br/aberracao.htm>.
3. Alonso CN, Gallego MS, Alfaro EM, Rossi JG, Maria S. Caracterización molecular em leucemia linfoblástica aguda pediátrica em uma instituição hospitalaria. *Hematologia*. (B. aires). 2006; 10(1):8-12.
4. Andrieu V, Radford-Weiss I, Troussard X, Chane C, Valensi F, Guesnu M. et al. Molecular detection of T(8;21)/aml1-eto in aml m1/m2: correlation with Cytogenetics, morphology and immunophenotype. *Br j Haematol* 1996; 92: 855-865.
5. Armstrong SA & Look T. Molecular Genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23: 6306-6315.
6. Azevedo-Silva F., Camargo B.de, Pombo-de-Oliveira M.S.. Implications of infectious diseases and the adrenal hypothesis for the etiology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Braz J Med Biol Res* . 2010 Mar ; 43(3): 226-229.
7. Barreto J, Mendonça N. Diagnóstico precoce do câncer na criança e no adolescente. *Clínica Onco*. Salvador, Bahia. 2001.
8. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, Dworzak MN, Ratei R, Silvestri D, et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 2009; 27(31): 5168-74.
9. Benasayag SJ, Gallino MI. Bases citogenéticas para la práctica hematológica: De lo supuesto a lo expuesto em nomenclatura citogenética. *Hematologia* 2010; 14 (2): 58-68.
10. Bené MC, Bernier M, Castoldi G, Faure GC, Knapp W, Ludwig WD. et al. Impact of imunophenotyping on manegement of acute leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). *Haematologica* 1999; 84:1024-34.
11. Brandalise SR, Pinheiro VR, Lee, MLM. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda da Criança e do Adolescente GBTLI LLA-2009. ALL Brazilian Group. *Leukemia* 2009.
12. Braoudaki M, Tzortzatou-Stathopoulou F. Clinical cytogenetics in pediatric acute leukemia: an update. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2012 Aug;12(4):230-7.

13. Busato M, Cereser KMM, Onsten TGH, Feijó CS, Schostack N. Protocolo mais utilizado no tratamento da leucemia linfocítica aguda na infância em hospitais de Porto Alegre. *Pediatric nov/dez 2003*. 39(11); 432-445.
14. Campana D, Coustan-Smith E. Measurements of treatment response in childhood acute leukemia. *The Korean Journal of hematology 2012*; 47: 245-54.
15. Campbell LJ, Oei P, Brookwell R, Shortt, J, Eaddy N, NG Ashley. et al. FISH Detection of *PML-RARA* fusion in ins(15;17) acute promyelocytic leukaemia depends on probe size. *Biomed research international 2013*; 4: 2314-6141.
16. Cazé MO, Bueno D, Ferreira dos Santos ME. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para Leucemia linfocítica aguda infantil. *Rev HCPA 2010*; 30(1).
17. Censo demográfico. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE. 2010.
18. Chauffaille Maria de Lourdes L. F.. Alterações cromossômicas em síndrome mielodisplásica. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter. Set 2006*; 28(3): 182-187.
19. Chauffaille MLLF. Análise citogenética e FISH no monitoramento da LMC em tratamento com inibidores da tirosina quinase. *Rev. bras. hematol hemoter 2008*; 30(1):13-19.
20. Chromosomal Abnormalities in Cancer.[Homepage na internet]. Acesso em 02 de junho de 2015. Disponível em: www.slh.wisc.edu/cytogenetics/cancer.
21. Cirmena G et al. A BCR-JAK 2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11) in a patient with acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics 2008*; 183:105-108.
22. Emerenciano M. As características moleculares das leucemias agudas de lactentes em coorte brasileira. Rio de Janeiro. Dissertação. [Mestrado em Ciências Morfológicas]. Universidade do Rio de Janeiro-UFRJ. 2006.
23. EPI-INFO, Versão 7.4 para *windows*, produzido e distribuído gratuitamente pelo Centro de Controle de Doenças - CDC, acessado em www.cdc.gov/epiinfo, em 30 de janeiro de 2015.
24. Farias MG, Castro SM. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial 2004*; (40): 91-98.
25. Farias MG. Caracterização molecular e imunofenotípica de 35 casos de leucemia linfóide aguda pediátrica. Dissertação. [Mestrado em Ciências Médicas]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

26. Fleury Medicina e Saúde. [Homepage na internet]. Acesso em 02 de junho de 2015. Disponível em: <http://www.fleury.com.br/medicos/educacao-medica/manuais/manual-hematologia/pages/a-citogenetica-classica-e-molecular.aspx>
27. Gardner RJM, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. 3ed. New York; Oxford: 2004.
28. Gil EA. Investigação das alterações citogenéticas em pacientes pediátricos com leucemia linfóide aguda no Rio Grande do Norte. Natal. Dissertação. [Mestrado em Ciências Farmacêuticas.]. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2011.
29. Gordon WD, et al. Highly Sensitive Fluorescence In Situ Hybridization Method to Detect Double BCR/ABL Fusion and Monitor Response to Therapy in Chronic Myeloid Leukemia. *Blood*. April 4, 2015.
30. Greaves MF. Molecular Genetics. Natural History and the Demise of Childhood Leukemia. *European Journal Of Cancer* 1999; 35(2): 173-185.
31. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ. et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analyses of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML 1 Trial. *Blood* 2001; 98: 1312-1320.
32. Harbott J, Mancini M, Verellen-Dumoulin C, Moorman AV, Secker-Walker LM. Hematological malignancies with a deletion of 11q23: cytogenetic and clinical aspects. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia*. Mai 1998; 12(5):823-7.
33. Harrison CJ. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *BR J Haematol* Jan 2009; 144 (2):147-56.
34. Hoffbrand AV & Petit J. Atlas colorido de Hematologia Clínica. São Paulo. Manole. 2001.
35. Hrusak O, Porwit-Macdonald A. Antigen expression Patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002; 16: 1233-1258.
36. Hulley SB, Cummings SR, Browner SW, Grady DG, Newman TB. Delineando a Pesquisa Clínica. Uma abordagem Epidemiológica. 3 ed. São Paulo. Artmed. 2008.
37. INCA (Instituto Nacional de Câncer). Câncer na criança e adolescente no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): Instituto Nacional de Câncer; 1996-2008. Disponível em: http://www.inca.gov.br/tumores_infantis/
38. Instituto Goiânia de Oncologia e Hematologia –ingoh- [Homepage na internet]. Acesso em 27 de maio de 2015. Disponível em: www.ingoh.com.br.

39. ISCN. Sistema de Nomenclatura Citogenética Convencional. Karger. 2013.
40. Ito C, Kumagai M, Manabe A, Coustain-Smith E, Raimondi SC, Behm FG, et al. Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 to 65 chromosomes: A distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. *Blood* 1999; 93 (1): 215-320.
41. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press 2001; 352.
42. Jiménez-Morales S, et al. BCR/ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: prevalence of the most common acute lymphoblastic leucemia fusion genes in Mexican Patients. *Leukemia Research* 2008; 32: 1518-1522.
43. Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, & White RL. Genética Médica. Rio de Janeiro. Elsevier LTDA. 2004.
44. Kampen KR. The discovery and early understanding of leukemia. *Leukemia Research* 2012; 36:6-13.
45. Keagle MB, Gersen SL. The principle of clinical cytogenetics. 2 ed. Totowa, NJ. 2005.
46. Kowalczyk JR, et al. Structural and numerical abnormalities resolved in one step analysis: the most common chromosomal rearrangements detected by comparative genomic hybridization in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2010; 200; 161-166.
47. Leal AM. Avaliação da citogenética convencional e molecular em portadores de leucemia promielocítica aguda no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. São Paulo. Tese. [Doutorado em Ciências Médicas]. 2008.
48. Lewis SM, Bain BJ, Bates I. Hematologia Prática de Dacie e Lewis. 9 ed. Porto Alegre. Artmed. 2006.
49. Lichtman MA. Battling the hematological malignancies: the 200 years war. *The Oncologist* 2008; 13:126-38.
50. Magalhaes Iq, Pombo-De-Oliveira Ms, Bennett Ca, Cordoba Jc, Dobbin J, Ford Am & Greaves Mf (). Tel-Aml1 Fusion Gene Frequency In Paediatric Acute Lymphoblastic Leukaemia In Brazil. *Br J Haematol*, 2000.111: 204-207.
51. Maluf SW, Riegel M. Citogenética Humana. São Paulo. Artmed. 2011.
52. Mckenna RW. Multifaced approach to the diagnosis and classification of acute leukemias. *Clin Chem* 2000; 48(8-B):1252-59.

53. Melo JHL. Leucemia linfóide aguda. Monografia [Especialização em Hematologia e Hemoterapia laboratorial]. São Paulo (SP):Universidade Paulista-UNIP; 2011.
54. Mesquita DR. Diagnóstico Citogenético e Molecular das alterações genéticas recorrentes em leucemias da infância no Distrito Federal. Tese. [Doutorado em Ciências Médicas]. Brasília Universidade de Brasília. 2009.
55. Minasi LB. Leucemia linfóide aguda na infância: importância do diagnóstico citogenético convencional como fator prognóstico. Goiânia. Dissertação. [Mestrado em Genética]. Pontifícia Universidade Católica de Goiás. 2009.
56. Montenegro VS, Santos VMVO, Veith M. Análise citogenética na leucemia mielóide crônica. Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba 2008; 10(3): 5-12.
57. Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute lymphoblastic leukemias. Cancer Genet Cytogenet 1986; 23:189-97.
58. Mundo Continentes. [Homepage na internet]. Acesso em 20 de Agosto de 2015. Disponível em: <http://www.geografia.seed.pr.gov.br/modules/galeria/detalhe.php?foto=408&evento=5>
59. National Cancer Institute. [Homepage na internet]. Acesso em 02 de agosto de 2013. Disponível em: <http://acgt.blogs.sapo.pt/tag/cromossoma+filad%C3%A9fia>.
60. Obro N, Ryder L, Madsen, H, Andersen MK, Lausen B, Hasle H, et al. : Identification of residual leukemic cells by flow cytometry in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: verification of leukemic state by flow-sorting and molecular/cytogenetic methods. Haematologica 2012; 97(1): 137-41.
61. Oliveira MJV. Citogenética convencional e citogenética molecular na caracterização genética das síndromes mielodisplásicas – técnicas complementares ou alternativas?. Porto. Dissertação. [Mestrado em Oncologia]. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto. 2009.
62. Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Arguelles A, Basso G, Braylan R. et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. Clinical Chemistry 1999; 45(10): 1708-17.
63. Pedrosa Francisco, Lins Mecneide. Leucemia linfóide aguda: uma doença curável. Rev. Bras. Saude Mater. Infant. [Internet]. 2002 Apr [cited 2015 July 22]; 2(1): 63-68.

64. Pelloso LAF, Chauffaille MLLF, Ghaname FS, Yamamoto M, Bahia DMM, Kerbaut J. Cariótipo em Leucemia Mielóide Aguda: Importância e tipo de alteração em 30 pacientes ao diagnóstico. *Rev Assoc Med Bras* 2003; 49(2):150-5.
65. Pérez-Saldivar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R, Martínez-Avalos A, Medina-Sanson A, Espinosa-Hernández L. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer* Aug 2011; 17: 11:355.
66. Poligene. Laboratório de Pesquisa. [Homepage na Internet]. Acesso em 06 dezembro de 2014. Disponível em: www.poligene.com.br.
67. Procedimento operacional padrão-POP/FHHEMOAM 2012.
68. Programa Harvard Medschool Portugal. [Homepage na internet]. Acesso em 08 de agosto de 2013. Disponível em: <http://hmsportugal.wordpress.com/2012/03/21/sindrome-de-down-trissomia-21/>
69. Pui C-H, Robinsn L, Look AT. Acute Lymphoblastic Leukaemia. *The Lancet* 2008; 371; 1030-1043.
70. Pui CH, Williams DL, Raimondi SC, Rivera GK, Look AT, Dodge RK, et al. Hypodiploidy is associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1987; 70 (1): 247-253.
71. Quixabeira V, Saddi V. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. *RBAC* Jun 2008; (40): 199-202.
72. Registro de Base Hospitalar (RBH). Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. 2012.
73. Reichmann R. Acute Lymphoblastic Leukaemia: A Review. *Trinity Student Medical Journal (TSMJ)* 2000; (1): 26-28.
74. Rooney DE, Czepulkowski BH. *Human Chromosome Preparation-Essential Diagnoses*. Reino Unido. Wiley. 1997.
75. Sagrillo MR, Cardoso SH, Silva LRJ, Graça CHN, Ferreira E, Hamerschlak N. et al. Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH) *Rev. bras. hematol. hemoter* 2005; 27(2):94-101.
76. Santos JHT, Torres DCBA, Neves MAB, Brito AE, Araújo RCP, Machado CGF. Frequência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas: análise de 213 casos diagnosticados na Fundação Hemope. *RBAC* 2011; 43 (2): 135-137.
77. Schaffel R, Simões BP. Leucemia linfoblástica aguda filadélfia positiva. *Rev. bras. hematol. hemoter*. 2008; 30(1):52-58.

78. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG) *Blood* 2007; 109(3): 926-35.
79. Silva MLM et al. Cytogenetic analysis of 100 consecutives newly diagnosed cases of acute lymphoblastic leucemia in Rio de Janeiro. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2002; 137. 85-90
80. Silverman L. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Currently Applied Prognostic Factors. In: Siop education book International Society of Paediatric Oncology. 2 ed. Boston, USA. 2010
81. Soszynska K et al. The application of conventional cytogenetics, FISH, and RT PCR to detect genetic changes in 70 children with ALL. *Ann Hematol*. Dez 2008. 87(12):991-1002.
82. Thomas X. First contributors in the history of leukemia. *World J Hematol* August 2013; 2(3): 62-70.
83. Thompson & Thompson. *Genética Médica*. 6 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2002.
84. Van der Burg M, et al. Split-signal FISH for detection of chromosome aberrations in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* (2004) 18, 895–908.
85. Van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease *Leukemia* 1999; 13: 1901-1928.
86. Vasconcelos RC. Avaliação dos marcadores celulares por citometria de fluxo em pacientes com leucemia mieloide aguda *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 2010; 32(3):275-276.
87. Veiga LBA, et al. High frequency of t(12;21)(p13;122) in children with acute lymphoblastic leucemia and known clinical outcome in Southern Brazil. *Leukemia Research* 2004; 28: 1033-1038.
88. Vendrame-Goloni CB, Carvalho-Salles AB, Júnior OR, Miguel CE, Fett-Conte AC. Análise do rearranjo BCR/ABL por bandamento GTG e FISH: comparação das frequências ao diagnóstico da LMC Arq Ciênc Saúde jan-mar 2006; 13(1): 07-11.
89. Verma RS, Babu A. *Human chromossomes: principles and techniques*. 2 ed. New York. Mcgraw Hill. 1995.
90. VIEIRA, Sonia. *Bioestatística, Tópicos Avançados*. Rio de Janeiro. 2.ed. Elsevier. 2004.

91. Vogel WH et al. Advanced practice oncology and palliative care guidelines. Philadelphia. Lippincott, 378p.2003.
92. Zago MA, Falcao RP, Pasquini R. HEMATOLOGIA: Fundamentos e Prática. São Paulo. Atheneu. 2001.
93. Zerbini MCN, Soares FA, Velloso EDRP, Chauffaille MLLF, Paes RP. Classificação da Organização Mundial da Saúde para os tumores dos tecidos hematopoético e linfóide, 4ª edição, 2008. Rev Assoc Med Bras 2011; 57(1):66-73.

9. ANEXOS

9.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



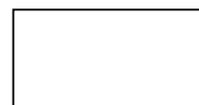
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS-FHHEMOAM

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa: **Alterações citogenéticas em crianças portadoras de leucemia linfóide aguda B no Amazonas**, sob a responsabilidade da pesquisadora Renata de Almeida Lemos Aguiar, que pretende detectar a presença de alterações genéticas recorrentes que indicam prognóstico em crianças com leucemia linfóide aguda B. O benefício dessa pesquisa será o de obter melhorias no tratamento desta doença, pois identifica quem são os pacientes com alto risco de recaída. Sua participação é voluntária e ocorrerá através da coleta de sangue das suas veias e aspiração da medula óssea, ou seja, mielograma. Não se preocupe, pois isto será realizado em sala de procedimento, limpa e sem contaminação por profissional de saúde capacitado, utilizando instrumentos estéreis, **sem prejuízo a sua integridade física**. O incômodo que você irá sentir será o da picada de uma agulha estéril **no local da punção**, ou após o procedimento, **poderá ocorrer ou não um** sangramento excessivo, dor e/ou infecção no local da punção. Se houver tais complicações, você será imediatamente **tratado(a) e acompanhado (a)** na FHHEMOAM, por profissional médico capacitado e pela coordenadora deste projeto. Após o estudo o seu sangue será **armazenado para realização de futuros testes necessários a esta pesquisa. A sua identidade e os resultados dos exames serão guardados em absoluto sigilo pela coordenadora do projeto. Os resultados desta pesquisa serão publicados em revistas científicas** a fim de contribuir para o entendimento da doença e consequente melhoria no tratamento. Se for detectada alteração genética, o (a) Sr (a) será comunicado sobre o resultado dos exames e receberá o acompanhamento na FHHEMOAM. O (A) Sr (a) tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento de participação em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo **a sua integridade**, pois continuará recebendo o acompanhamento e tratamento para a doença. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com a pesquisadora no endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Chapada - 69050-002 - Manaus, AM , pelo telefone (92) (3655-0100). Em menores de idade, o estudo só será realizado mediante autorização de seu responsável legal. Consentimento Pós-Informação :

Eu, _____, fui informado sobre o que a pesquisadora quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto (ou permitir que o (a) menor _____ participe), sabendo que não vou receber remuneração e que posso **DESISTIR A QUALQUER MOMENTO**. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

_____ Data: ____/____/_____
Assinatura do participante



Impressão dactiloscópica

Assinatura do Pesquisador Responsável

9.2 Ficha de acompanhamento do paciente

 <p>Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas HEMOAM</p>	<p>DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA</p> <p>ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS EM CRIANÇAS PORTADORAS DE LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA B NO AMAZONAS.</p>
--	--

REG LAB: _____	DATA: _____
NOME: _____	Idade: _____ Sexo: _____
DN: _____	Local Nasc.: _____ Proc.: _____
HD: _____	Médico.: _____

1. AO DIAGNÓSTICO:

Estratificação de Risco: _____

Grupo Etário : () ≥ 1 e < 9 () < 1 e ≥ 9 ; **Infiltração SNC:** () Presente () Ausente ;

Leucometria ao diagnóstico () < 50.000 () > 50.000 ;

Citogenética de risco: () Presente _____ () Ausente

Descrição do cariótipo: _____

Resultado FISH: _____

MORFOLOGIA

SP: Hb: _____ Ht: _____ PLT: _____ / μ L

LEUCO: _____ / μ L

(_____)

MO: LEUCO: _____ / μ L

DIFERENCIAL DA MEDULA ÓSSEA (%)	
Série Granulocítica _____ %	Série Eritrocítica (Eritroblastos) _____ %
Neutrófilos:	Série Linfomonoplasmocítica _____ %
Mieloblastos _____ %	Linfócitos _____ %
Promielócitos _____ %	Monócitos _____ %
Mielócitos _____ %	Plamócitos _____ %
Metamielócitos _____ %	Série Megacariocítica (Megacariócito) _____ %
Bastões _____ %	Blastos _____ %
Segmentados _____ %	Outras células _____ %
Eosinófilos: _____ %	_____ %
Basófilos: _____ %	_____ %

IMUNOFENOTIPAGEM AO DIAGNÓSTICO:

9.3 Protocolos laboratoriais

9.3.1 Coloração pela técnica do May Grunwald Giemsa (MGG)

Preparação dos reagentes e procedimento técnico⁽⁴⁸⁾.

Materiais:

- . Solução corante Giemsa (estoque) – 1 gota
- . Água tamponada pH 6,8 – 1 ml
- . OBS. Preparar a quantidade necessária de acordo com o número de lâminas a serem coradas. Cada lâmina consome cerca de 3 ml.

1-Confeccionar esfregaço sangüíneo com material medular ou sangue periférico de preferência fina e sem anticoagulante;

2-Cobrir a lâmina com solução corante May Grunwald durante 1 minuto;

3-Sobre a solução anterior, acrescentar 20 gotas de água tamponada (pH 6.8) e homogenizar de modo a aparecer um espelho na superfície da mistura, aguardar durante 3 minutos;

4-Desprezar a mistura acima e cobrir a lâmina com a solução corante Giemsa de uso (preparada no momento de uso). Aguardar 15 minutos. Nos casos de hiper celularidades deixar este corante durante 20 minutos;

5-Lavar em água corrente e secar a temperatura ambiente.

Resultados esperados (validação dos reagentes)

- Hemácias: cor róseo
- Plaquetas: cor azul
- Leucócitos:
 - a) Linfócitos :núcleo azul violeta e citoplasma azul
 - b) Monócitos: núcleo (lobulado) azul violeta e citoplasma azul claro
 - c) Granulócitos: neutrófilos polimorfonucleares com núcleo em azul escuro, citoplasma rosa pálido e granações de tons róseos a azul claro; basófilos com núcleo púrpura a azul escuro, granações volumosas cobrindo todo o citoplasma que é azul escuro; eosinófilos com núcleo azul, citoplasma rosa pálido e grânulos volumosos na cor vermelho a vermelho laranja.

9.3.2 Mielograma

O paciente é posicionado na mesa de procedimento, expondo, na dependência da faixa etária, a crista ilíaca ou platô tibial, para antissepsia e anestesia local (5ml de lidocaína 1% a 2% sem adrenalina, Hypolabor, Brasil), sendo o local puncionado com agulha própria para mielograma (18x04cm para lactentes e pré-escolares e 16x7,5cm para escolares/adolescentes) conectada à seringa de 20ml para aspiração inicial de 0,5ml destinados a confecção de oito esfregaços para análise morfológica. Os esfregaços devem ser devidamente identificados com as iniciais do paciente e data da coleta e acondicionados em cartela própria em temperatura ambiente⁽¹⁾.

Aspirados medulares são coletados do platô tibial em crianças com <12 meses e acima dessa idade as coletas serão da crista ilíaca posterior.

9.3.3 Técnica de imunofenotipagem

O processamento das amostras para marcação celular por imunofenotipagem dos antígenos de superfície celular segue o seguinte procedimento técnico:

Marcação dos antígenos de superfície

O processamento das amostras para marcação celular por imunofenotipagem dos antígenos de superfície celular segue o seguinte procedimento técnico⁽⁴⁸⁾.

1-Contar células em plataforma Advia® 2120i, para avaliar a celularidade do material. A leucometria deverá ser ajustada para 10.000 células a fim de utilizar 100 µL.

2-Lavar a amostra com PBS contendo 5% de soro fetal bovino, três vezes, para reduzir a ocorrência de reações inespecíficas. Na última lavagem, ressuspender o pellet de células com PBS ou PBS-W (PBS com azida sódica).

- 3-Identificar os tubos de hemólise (Falcon®) apropriados para o uso no citômetro de fluxo com os AcMo a serem utilizados no painel de triagem para definição do subtipo celular.
- 4- Adicionar 100 µL da amostra.
- 5-Adicionar o volume adequado para os AcMo (Quadro 6).
- 6-Homogenizar no vortex e incubar por 15 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz.
- 7-Proceder a lise das hemácias seguindo protocolo do fabricante do kit para lise celular.
- 8-Homogenizar no vortex e incubar por 10 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz.
- 9-Centrifugar por 5 minutos a 1700rpm.
- 10-Desprezar o sobrenadante por inversão.
- 11-Ressuspender o pellet no vortex e acrescentar 2mL de PBS-W.
- 12-Centrifugar por 5 minutos a 1700rpm. Repetir os passos 10 e 11.
- 13-Desprezar o sobrenadante por inversão, ressuspender em 500 µL de PBS-W.
- 14-Fazer aquisição no citômetro de fluxo FACSCalibur utilizando uma máscara elaborada no software *cell quest* e os Instruments Settings para garantia da qualidade.

Marcação dos antígenos intracitoplasmáticos e nucleares

O processamento das amostras para marcação celular por imunofenotipagem dos antígenos citoplasmáticos e nucleares segue o seguinte procedimento técnico (protocolo de fixação e permeabilização da FIX & PERM®):

- 1-Para cada amostra que é analisada, adicionar o volume apropriado do anticorpo conjugado direcionado para os marcadores de superfície celular de interesse, e/ou o isotipo controle para um tubo apropriado de 5 mL com 12 x 75 mm.
- 2-Pipetar 100 µL da amostra ou ajustar células equivalente a 1×10^6 células, em cada tubo.

- 3-Homogenizar no vórtex, incubar por 15 minutos no escuro e temperatura ambiente.
- 4-Adicionar 100 µL do reagente A (Fixação) e incubar por 15 minutos no escuro e em temperatura ambiente.
- 5-Lavar uma vez com 3 mL de PBS-W (PBS + 0.1% NaN₃ + 5% SBF).
- 6-Centrifugar por 5 minutos a 1.500 ou 1.700 rpm , aspirar sobrenadante e colocar no vortex para resuspender totalmente o pellet celular.
- 7-Adicionar 100mL do reagente B (Permeabilização) e o volume recomendado dos anticorpos intranucleares ou do correspondente isotipo controle.
- 8-Colocar no vórtex por 1–2 segundos e incubar por 20 minutos no escuro e temperatura ambiente.
- 9-Lavar uma vez com 3 mL de PBS-W (PBS + 0.1% NaN₃ + 5% SBF).
- 10-Centrifugar por 5 minutos a 1.500 ou 1.700 rpm e aspirar o sobrenadante.
- 11-Ressuspender as células em solução salina para análise imediata.

Os AcMo conjugados a um fluorocromo conhecido se ligam ao antígeno presente na superfície, citoplasma ou núcleo da célula, formando um complexo antígeno/ anticorpo identificado pela excitação de um feixe luminoso sobre o fluorocromo e medido a quantidade de luz emitida por um conjunto de filtros. Os fluorocromos mais utilizados são o isotiocianeto de fluorceína (FITC), ficoeritrina (PE), alofocianina (APC) e proteína Clorofila Peridina (PerCP) que emitem luz com diferentes comprimentos de onda. Essa luz refratada é captada por receptores e estes dados serão processados em gráficos e histogramas, divididos em parâmetros de fluorescência denominadas FL1, FL2, FL3 e FL4 e parâmetros de dispersão da luz que refletem o tamanho celular e complexidade interna (FSC- *forward scatter* e SSC- *side scatter* respectivamente), possibilitando a análise de populações via *software cell quest*⁽⁷¹⁾. Uma relação dos anticorpos contra os que são utilizados para LLA-B bem como dos fluorocromos associados, está apresentada abaixo:

Quadro 6. Painel de Triagem das leucemias ao diagnóstico.

FITC	PE	Percp	APC
IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Controle negativo	-----	CD45	-----
MPO	CD79a	CD45	ClgM
cCD3	CD7	CD45	CD19
CD38	CD13	CD45	CD34
Obs. Substituir pelo sCD3* se intensa leucocitose e massas			

A LLA pró-B expressa os antígenos CD79a, TdT, CD34, CD19 e CD22 de citoplasma (CD22c). A LLA B comum (Calla) expressa CD10, CD22c, CD19 e/ou CD20. A leucemia pré-B expressa cadeia μ citoplasmática, em adição a CD19, CD20 e CD10. A LLA do tipo B maduro apresenta um fenótipo incomum, caracterizando-se pela expressão de cadeias leves de imunoglobulina na superfície de membrana (smlg)⁽⁹²⁾.

Os AcMos CD79a, cCD3, CD7, CD13 e sCD3 (nos casos de intensa leucocitose e massas tumorais), foram utilizados para o controle da reação do estudo, já que fazem parte do painel de triagem ao diagnóstico para diferenciar LLA-B, LLA-T e LMA⁽⁹²⁾.

9.3.4 Protocolos para citogenética convencional⁽⁸³⁾.

Preparação de meio de cultura RPMI

Depois de diluído com água purificada, deve ser filtrado com um papel de filtro de 0,22 μ , para esterilidade. Para cada 100ml de meio de cultura, devemos adicionar:

- 20 ml de soro fetal bovino (SBF);

- 1,5ml de penicilina e estreptomicina (10.000 u/ml e 10mg/ml respectivamente);
- 1,5ml de L-glutamina;
- 2,0ml de fitoemaglutinina (PHA);

O meio descrito é aliquoteado em frascos de 5ml, onde as gotas de SP são pingadas diretamente e permanecem durante todo seu cultivo.

Coleta das células da cultura

- 1-Centrifugar a amostra por 8 minutos a 1.500 rpm;
- 2-Retirar o sobrenadante;
- 3-Adicionar 7ml de solução hipotônica (KCl 0,075M, pH 6,8) pré-aquecida a 37° C. Adicionar aos poucos e deixar em banho-maria, a 37° C, por 15 a 20 minutos;
- 4-Interromper o choque hipotônico com 0,5ml de fixador Carnoy (metanol:ácido acético, 3:1);
- 5- Centrifugar novamente por 8 minutos a 1.500 rpm;
- 6-Retirar o sobrenadante;
- 7-Repetir os passos 5 e 6;
- 8-Depois de retirar o último sobrenadante, adicionar 5ml de fixador Carnoy e colocar no freezer por no mínimo 2h ou *overnight*.

Cultura das células de sangue periférico

A cultura deve ser realizada dentro da capela de fluxo laminar (devidamente asséptica) onde pingam-se de 8 a 10 gotas de SP em 5ml de meio de cultura RPMI. Deverá ser deixada em estufa a 37° C em cultura fechada ou aberta por 72h.

Cultura das células de medula óssea

A cultura é realizada como descrito:

- 1-Meio de cultura específico para MO (Marrow-Max-GIBCO);
- 2-Pingar aproximadamente 1 a 2 ml de MO em tubo cônico com o meio para medula previamente aquecido;

- 3-Suspender as células e colocar na estufa por 24 ou 48h (fazer os dois tempos para ampliar a possibilidade de acerto na resolução dos cromossomos);
- 4-Acrescentar 0,1ml de colchicina por 40 a 50 minutos;
- 5-Centrifugar a 800 rpm por 8 minutos;
- 6-Retirar o sobrenadante, seguindo a hipotonia, fixação e coloração.

9.3.5 Técnica de FISH

Produção das lâminas e hibridização⁽⁷⁵⁾.

As lâminas são submetidas a um pré-tratamento com solução de 2XSSC (NaCl / citrato de sódio) e desidratadas em uma bateria de álcoois 70%, 80% e 100% à temperatura ambiente. Para denaturação, as lâminas são colocadas em uma solução de 70% formamida/ 30% 2XSSC (pH 7.0) aquecida a 73° C por cinco minutos. A sonda denaturada simultaneamente será aplicada sobre as lâminas, cobertas com lamínula e colocadas, em seqüência câmara úmida e no escuro, em estufa a 37°C por, no mínimo, seis horas ou, preferencialmente, a noite toda. Após esse período, as lâminas serão lavadas em uma de três banhos de formamida e 2XSSC a 45° C por dez minutos, e por cinco minutos na solução de 2XSSC e NP 40%. No momento da análise, as lâminas serão coradas com 10uL de DAPI II (Vysis, Inc.) e cobertas com lamínula.

