

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Fernanda Oliveira Marcelino da Silva

IMPLICAÇÕES DA ANÁLISE CITOGENÉTICA NAS LEUCEMIAS
LINFOIDES AGUDAS

São Paulo

2017

Fernanda Oliveira Marcelino da Silva

**IMPLICAÇÕES DA ANÁLISE CITOGENÉTICA NAS LEUCEMIAS
LINFOIDES AGUDAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Profa. Dra. Juliana Vieira dos Santos Bianchi e coorientado pela Profa. Leila Jaldim Borracha Gonçalves, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2017

Fernanda Oliveira Marcelino da Silva

**IMPLICAÇÕES DA ANÁLISE CITOGENÉTICA NAS LEUCEMIAS
LINFOIDES AGUDAS**

São Paulo, 2017

Profa. Dra. Juliana Vieira dos Santos Bianchi

Prof. Dr. Michelangelo Juvenale

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, razão de tudo e o maior responsável por cada conquista. Sem ele eu não teria chegado até aqui.

A meus pais por todo apoio, carinho e incentivo, por se alegrarem e chorarem comigo em cada momento desses 4 anos.

As minhas orientadoras Juliana e Leila por todo empenho, atenção e por me guiarem da melhor forma possível na elaboração deste trabalho.

A minha tia Iracema e minhas amigas do coração Toninha, Lucianere e Genilce por todo apoio e orações.

E por fim, minha gratidão à Mônica, Rafael, Viviane e Pedro por me apresentarem o mundo das Análises Clínicas e por tornarem os meus dias de estágio tão leves e divertidos.

SILVA, Fernanda Oliveira Marcelino da. **Implicações no Prognóstico da Análise Citogenética das Leucemias Linfoides Agudas**. 2017. 58 f. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

A Leucemia Linfóide Aguda é uma doença clonal, na qual os precursores linfóides se proliferam de forma descontrolada, impedindo o funcionamento normal da medula óssea e resultando em uma produção deficiente de células brancas, hemácias e plaquetas. É o câncer mais comum na infância, representando cerca de 70% dos casos, sendo que nos adultos a incidência é de apenas 20%. Para iniciar o diagnóstico o paciente é submetido a um fluxo de exames que se inicia pelo hemograma, no qual pode ser observada a presença de anemia e na extensão sanguínea, a presença de blastos. Caso seja observada uma quantidade de células imaturas superior a 20%, o paciente deve ser submetido ao procedimento de mielograma e dependendo da gravidade do caso à biópsia de medula. Alguns testes complementares podem ser realizados para a confirmação da doença, como as provas citoquímicas, no entanto, atualmente essa técnica é pouco utilizada e tem sido substituída pela citometria de fluxo, baseada na classificação EGIL (Grupo Europeu de Classificação Imunológica das Leucemias), a qual permite a identificação da linhagem linfóide envolvida na doença, por meio da análise dos marcadores específicos de células B como o CD19, CD22 e o CD79a e os marcadores específicos de células T como CD3 e o CD7. A etiologia da LLA ainda permanece desconhecida, mas muitos estudos têm demonstrado que um fator importante para o início da doença é a presença de alterações citogenéticas, observadas no cariótipo dos pacientes. Quando há a presença de uma translocação cromossômica são ativados oncogenes, que levam a produção de proteínas mutadas que alteram a diferenciação e o crescimento celular. Essas alterações estão diretamente relacionadas com o prognóstico da doença, sendo necessário o seu entendimento para que os pacientes possam ser tratados de forma adequada. Entre as anormalidades presentes na LLA de células B estão as alterações numéricas como a hiperdiploidia e a hipodiploidia e as estruturais, decorrentes de translocações que levam a rearranjos do gene MLL como a t(4;11)(q21;q23) (MLL/AF4), fusões como o BCR/ABL, TEL/AML1, E2A/PBX1 e rearranjos do gene MYC como a t(8;14) (q24;q32), observada com mais frequência e as translocações t(2;8) (q24;q11) e t(8;22) (q24;q11). Já na LLA tipo T podem ser observadas as t(1;14)(p32;q11), t(10;14)(q24;q11) e a t(11;14)(p13;q11), que levam a uma expressão elevada dos oncogenes TAL1, HOX11 e RHOM2, respectivamente. A presença desses genes pode ser confirmada por meio de testes mais específicos como o FISH e o RT-PCR, quando a análise apenas do cariótipo não é suficiente. Cada alteração citogenética apresenta um prognóstico específico, podendo ser este bom ou ruim, o que justifica a necessidade da estratificação destes pacientes em linhas de tratamento definida por protocolos como o GBTLI (Grupo cooperativo brasileiro de tratamento de leucemia linfóide aguda na infância), sendo que os pacientes com pior prognóstico são direcionados para uma terapia mais intensiva e

dependendo da gravidade e necessidade do caso podem ser submetidos ao Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH), com o objetivo de garantir a sobrevida e melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

Palavras-chave: Citogenética. Leucemia- linfoma linfoblástico de células precursoras. Prognósticos. Translocação genética. Tratamento.

SILVA, Fernanda Oliveira Marcelino da. **Implications in the Prognosis of Cytogenetic Analysis of Acute Lymphoid Leukemia**. 2017. 58 f. CCW (Graduation) – Biomedicine Course, Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

Acute Lymphoid Leukemia is a clonal disease in which lymphoid precursors proliferate in an uncontrolled manner, impeding the normal functioning of the bone marrow and resulting in poor production of white blood cells, red blood cells, and platelets. It is the most common cancer in childhood, accounting for about 70% of cases, and in adults they are incidents of only 20%. To start the diagnosis or patient undergoing a flow of exams which starts with the blood count, no condition can be observed a presence of anemia and in the blood extension, a presence of blasts. If a quantity of immature cells greater than 20% is observed, the patient should undergo the myelogram procedure and depending on the severity of the case to the marrow biopsy. Some complementary tests may be performed to confirm the disease, such as cytochemical tests; however, this technique is currently poorly used and has been replaced by flow cytometry, based on the European Group for Immunological Classification of Leukemia (EGIL) which allows the identification of the lymphoid line involved in the disease, by analyzing specific B cell markers such as CD19, CD22 and CD79a and specific T cell markers such as CD3 and CD7. The etiology of ALL is still unknown, but many studies have shown that an important factor for the onset of the disease is the presence of cytogenetic changes, observed in patients' karyotype. When chromosomal translocation is present, oncogenes are activated, which lead to the production of mutated proteins that alter cell differentiation and growth. These changes are directly related to the prognosis of the disease, and its understanding is necessary so that the patients can be treated appropriately. Among the abnormalities present in B-cell ALL are the numerical alterations such as hyperdiploidy and hypodiploidy and the structural ones resulting from translocations that lead to MLL gene rearrangements such as at (4; 11) (q21; q23) (MLL / AF4) , fusions such as BCR / ABL, TEL / AML1, E2A / PBX1, and MYC gene rearrangements such as at (8;14) (q24;q32), most frequently observed, and translocations t(2,8) (q24;11) and t(8;22) (q24; q11). In the T-type ALL, the t(1;14) (p32;q11), t(10;14) (q24;q11) and t(11;14) (p13; q11) can be observed, which led to a high expression of the TAL1, HOX11 and RHOM2 oncogenes, respectively. The presence of these genes can be confirmed by more specific tests such as FISH and RT-PCR, when analysis of the karyotype alone is not sufficient. Each cytogenetic change has a specific prognosis, which may be good or bad, which justifies the need for stratification of these patients in treatment lines defined by protocols such as GBTLI (Brazilian Cooperative Group for the Treatment of Acute Lymphoid Leukemia in Childhood). The patients with worse prognosis are directed to a more intensive therapy and depending on the severity and necessity of the case can be submitted to Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT), in order to guarantee the survival and improvement of patients' quality of life.

Keywords: Cytogenetic. Leukemia- precursor cell lymphoblastic lymphoma.
Prognostics. Genetic translocations. Treatment.

Lista de Figuras

- Figura 1- Linfoblastos pequenos com cromatina pouco frouxa e homogênea na medula óssea de um paciente com LLA tipo L1, podendo estar associado as anormalidades citogenéticas t(9;22), t(4;11) e t(1;19)..... 21
- Figura 2- Linfoblastos grandes e heterogêneos, com a presença de fendas e nucléolos na medula óssea de um paciente com LLA tipo L2, podendo estar relacionado com as anormalidades citogenéticas t(4;11) e hiperdiploidia..... 21
- Figura 3- Linfoblastos grandes, intensamente basofílicos, com a presença de vacuolização citoplasmática na medula óssea de um paciente com LLA tipo L3, podendo estar relacionado com as anormalidades citogenéticas t(8;14), t(8;22) e t(2;8)..... 22
- Figura 4 - Fluxograma da sequência de exames utilizados para diagnóstico da LLA, seguido pela divisão dos casos por meio do prognóstico e escolha dos tratamentos adequados..... 25
- Figura 5 - Esfregaço sanguíneo de um paciente com LLA, com a presença de linfoblastos, caracterizados pela presença de nucléolos, citoplasma basofílico e alta relação núcleo/citoplasma, destacado pela seta..... 26
- Figura 6 - Peroxidase negativa em todos os blastos de um paciente com LLA (setas azuis). É importante a visualização da positividade em células mieloides maduras para garantir que a reação enzimática funcionou (seta vermelha)..... 29
- Figura 7 - Blastos linfoides com grãos positivos delicados da reação de PAS em um paciente com LLA tipo T..... 30
- Figura 8 - Fosfatase ácida com padrão unipolar em blastos de LLA-T demonstrados pelas setas..... 30
- Figura 9 - Processo de diferenciação da linhagem dos linfócitos B com seus respectivos marcadores..... 34

- Figura 10 - Esquematização da translocação entre os cromossomos 12 e 21, levando a formação do gene de fusão TEL/AML1..... 36
- Figura 11 - Representação da translocação (9;22) resultando na formação do gene de fusão BCR/ABL..... 37
- Figura 12 - Técnica de FISH demonstrando a presença da quebra cromossômica do cromossomo 11 na translocação MLL, com o uso da sonda *dual color break apart*..... 41
- Figura 13 - FISH de um paciente com LLA de precursor B demonstrando a presença da translocação entre os genes TEL e AML1, que ocorre em cerca de 25% dos casos de LLA infantil, com prognóstico favorável..... 41
- Figura 14 - Resultado da amplificação por RT-PCR multiplex, em um gel de agarose corado com brometo de etídeo, para a detecção dos rearranjos MLL. A coluna 1 mostra o controle positivo (seta rosa) e a 14 o negativo (seta amarela). As colunas 2, 4 e 13 mostram pacientes com resultado negativo para as fusões procuradas (seta azul). A coluna 3 e as colunas de 5-12 mostram pacientes positivos para alguma das fusões envolvendo o gene MLL (seta vermelha)..... 43

Lista de Siglas

LLA	Leucemia linfoide aguda
PAS	Periódica ácida de schiff
SBB	Sudan black B
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
CICI	Classificação internacional do câncer na infância
HLA	Antígenos leucocitários humanos
FISH	Hibridização in situ por fluorescência
PCR	Reação em cadeia da polimerase
GBTLI	Grupo cooperativo brasileiro de tratamento de leucemia linfoide aguda na infância
OMS	Organização mundial da saúde
CMF	Imunofenotipagem por citometria de fluxo
EGIL	Grupo europeu de classificação imunológica das leucemias
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
RNA	Ácido ribonucleico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVO.....	15
3 MÉTODOS.....	16
4 DESENVOLVIMENTO.....	17
4.1 Breve histórico.....	17
4.2 Leucemias.....	18
4.3 LLA.....	19
4.3.1 Etiologia.....	22
4.3.2 Fisiopatologia.....	23
4.4 Diagnóstico.....	24
4.4.1 Sinais e sintomas.....	24
4.4.2 Diagnóstico Laboratorial.....	25
4.4.2.1 Hemograma.....	26
4.4.2.2 Mielograma e biópsia de medula.....	27
4.4.2.3 Provas citoquímicas.....	28
4.4.2.4 Citometria de fluxo.....	31
4.5 Citogenética.....	35
4.6 Biologia Molecular.....	42
4.7 Implicações no prognóstico.....	43
4.8 Tratamento.....	45
4.8.1 Quimioterapia.....	46
4.8.2 TCTH.....	49
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA), também chamada de Leucemia Linfoblástica Aguda, é uma doença maligna da medula óssea, em que os precursores linfóides proliferam de forma anormal, substituindo as células hematopoiéticas normais da medula. Dessa forma, é possível observar no diagnóstico uma deficiência do sistema imune, devido ao comprometimento das células progenitoras linfóides (RAJAGOPALA, 2016).

A produção descontrolada de blastos com características linfóides e o bloqueio da produção normal de glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas resulta nos sinais e sintomas característicos da doença que são cansaço, falta de ar, sangramentos e o aparecimento de infecções. Além do aumento de gânglios, inflamação dos testículos, vômitos e dor de cabeça, que podem estar relacionados com o envolvimento do sistema nervoso, que é confirmado com o estudo do líquido cefalorraquidiano (líquor) (HAMERSCHLAK, 2008).

A LLA é o câncer mais comum na infância, representando 70% dos casos, sendo que nos adultos a incidência é de apenas 20%. O diagnóstico se baseia no estudo citomorfológico do sangue periférico e da medula óssea, por meio dos exames de hemograma e mielograma, respectivamente, além do estudo imunofenotípico, que permite que 99% dos casos sejam corretamente classificados, por meio da classificação EGIL, de acordo com a linhagem envolvida e o estágio de maturação da célula. Aproximadamente 20% dos casos são de origem de célula T, 75% de precursores de célula B e 5% de célula B madura (FARIAS; CASTRO, 2004).

O procedimento diagnóstico de excelência para avaliação dos casos suspeitos é o aspirado de medula óssea (mielograma), em que é possível a observação de uma medula hipercelular, com a presença de 25% de linfoblastos. Além disso, devem ser feitas também as reações citoquímicas para a diferenciação da LLA com a LMA (Leucemia Mieloide Aguda), por meio das reações de mieloperoxidase e pela Periódica ácida de Schiff (PAS). E também é muito importante que seja feita a análise citogenética das alterações cromossômicas

juntamente com a realização de testes moleculares e de citometria de fluxo, que permitem a diferenciação entre os tipos de LLA (FARIAS; CASTRO, 2004).

A classificação do tipo de LLA é imprescindível para avaliação da significância clínica e prognóstica da doença, permitindo assim, a sua divisão em subgrupos genéticos distintos, que incluem aneuploidias, alterações no número de cópias, mutações e rearranjos cromossômicos, que levam a alterações no gene e a formação de proteínas quiméricas. O estudo genômico dessas mutações levou a descobertas importantes que permitem melhores intervenções terapêuticas (TRAN; LOH, 2016).

Uma das características citogenéticas que pode ser observada é a presença do cromossomo Philadelphia (Ph+), que é formado a partir da translocação entre os cromossomos 9 e 22 t(9;22) e resulta na justaposição de dois genes, o BCR e o ABL, formando o neogene BCR-ABL, que é a anormalidade citogenética mais comum nos adultos com Leucemia Linfóide Aguda e está presente em 25% dos casos de LLA de linhagem B. A presença do Ph+ pode ser detectada em 2 a 5% dos casos em crianças e de 20 a 40% em adultos mais jovens (THOMAS; HEIBLIG, 2016).

A análise morfológica de acordo com a FAB (*French- American- British*) (*Francês-Americano-Britânico*), que atualmente é realizada pela OMS (Organização Mundial da Saúde), permitiu a divisão da LLA em três subtipos que são o LLA-L1 típico, presente em 75% dos casos de célula B e com as anomalias citogenéticas t(9;22), t(4;11) e t(1;19). O LLA-L2 atípico presente em 20% dos casos e a LLA-L3 presente em 95% dos casos de células B e com células semelhantes às presentes no Linfoma de Burkitt, sendo que neste caso as anormalidades citogenéticas presentes são as translocações t(8;14), t(8;22) e t(2;8) (SÁNCHEZ; ORTEGA; BARRIENTOS, 2007).

O tratamento de escolha para a LLA é a quimioterapia e ela pode ser utilizada em conjunto com outras terapias, sendo observada uma melhora contínua nas crianças tratadas. No entanto, como consequências ao tratamento podem surgir algumas complicações, que envolvem desde uma leucemia secundária até um comprometimento nervoso (MACÊDO et al., 2014). Nos casos de alto risco, o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas é a melhor escolha para o

tratamento, podendo curar de 50 a 60% dos receptores que não alcançaram este resultado com a quimioterapia (MORANDO et al., 2010).

2 OBJETIVO

Compreender o perfil citogenético observado na LLA e correlacionar com o diagnóstico, prognóstico e tratamento da doença.

3 MÉTODOS

Para a realização da revisão bibliográfica sobre a Leucemia Linfóide Aguda, com foco na análise citogenética, foram utilizadas as bases de dados PubMed, Lilacs, Google Acadêmico e a biblioteca eletrônica Scielo. Além disso, foram selecionados artigos pertinentes na bibliografia dos trabalhos de mestrado e doutorado utilizados no desenvolvimento deste trabalho. Sendo considerados apenas os artigos com ano de publicação superior a 2004.

Foram utilizados ao todo 45 artigos considerados pertinentes ao tema abordado, sendo excluídos todos aqueles que apresentavam ano de publicação inferior a 2004 ou estudos muito específicos. Além disso, foram selecionados 6 trabalhos de mestrado e 1 de doutorado, que abordavam de forma ampla a citogenética da LLA e com ano de publicação superior a 2004. Além de 2 protocolos do Ministério da Saúde e 1 trabalho acadêmico atual.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Breve histórico

A história da Leucemia surgiu há aproximadamente 200 anos e os nomes de alguns médicos são citados devido ao seu importante papel em seu descobrimento (KAMPEN, 2011).

Em 1825 foi publicado um relatório de autópsia feito por Alfred Velpeau sobre o caso de um paciente que apresentava fígado e baço extremamente aumentados, além de uma alteração na composição sanguínea. Os estudos de Velpeau o tornaram conhecido por relatar os sintomas da leucemia, que hoje em dia levam a um diagnóstico precoce. Anos depois, Alfred Donné foi o primeiro médico a realizar o exame microscópico, descrevendo e ilustrando a composição do sangue de pacientes leucêmicos. E em 1845, John Bennet, após observar um aumento de leucócitos no sangue de um paciente, descrito como leucocitose, deu o nome de leucocitemia à doença (KAMPEN, 2011).

Poucos anos depois, Henry Fuller descreveu, em Londres, o primeiro caso de leucemia infantil, além de ter sido o primeiro a utilizar o microscópio para diagnosticar a leucemia em um paciente vivo (THOMAS, 2013).

Muitos anos depois, foi documentado que a exposição à radiação ionizante e a certos produtos tóxicos podem facilitar o desenvolvimento da leucemia, já que foi observada uma grande quantidade de casos nos sobreviventes da explosão das bombas atômicas durante a Segunda Guerra Mundial (SOUZA, 2013).

Neste período, aproximadamente no ano de 1950, foi elaborado pela Comissão para as vítimas da Bomba Atômica um relatório que descrevia os efeitos da radiação, nos sobreviventes da explosão em Hiroshima e Nagasaki, sobre a gênese da leucemia, o que o tornou um documento clássico sobre a epidemiologia do câncer (BETANCUR, 2010).

4.2 Leucemias

As leucemias são um grupo de doenças neoplásicas, caracterizadas pela proliferação clonal de células hematopoiéticas mielóides ou linfóides, que podem ser decorrentes de uma anormalidade genética anterior ou de outras alterações, como por exemplo, a exposição à radiação. São doenças bastante heterogêneas quanto à etiologia, prognóstico e tratamento e por isso são divididas em entidades biológicas distintas (OLIVEIRA; NETO, 2004).

Elas podem ser divididas em agudas e crônicas, sendo que as que são caracterizadas como agudas são consideradas doenças mais agressivas, embora a cura seja alcançada mais facilmente, nas quais a transformação maligna resulta em um acúmulo de células progenitoras na medula óssea, chamadas de blastos. Já as leucemias crônicas possuem uma progressão mais lenta e são consideradas mais difíceis de curar (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2006).

Apresentam uma taxa de incidência elevada entre os tumores infanto-juvenis no Brasil e no mundo, sendo a principal causa de morte dentre as neoplasias em crianças e adolescentes (1 a 18 anos). Nas crianças, as neoplasias são categorizadas em 12 grupos especiais de acordo com a Classificação Internacional do Câncer na Infância (CICI). As leucemias constituem o grupo I, em que estão presentes os subgrupos: leucemias linfóides agudas, leucemias mielóides agudas, doenças mieloproliferativas crônicas, incluindo a leucemia mielóide crônica (Quadro 1) (SILVA; ZANDONADE; ZOUAIN-FIGUEIREDO, 2014).

Quadro 1 – Características das diferentes doenças malignas e clonais, dos leucócitos, caracterizadas como leucemias.

LEUCEMIAS			
AGUDA		CRÔNICA	
Presença de blastos Bom prognóstico Rápida entrada em remissão		Ausência de blastos Mau prognóstico Lenta entrada em remissão	
LLA	LMA	LLC	LMC
Presença de diferentes anomalias cromossômicas Proliferação anormal dos precursores da linhagem linfóide Dividida em: L1, L2 e L3 (classificação FAB)	Presença de diferentes anomalias cromossômicas Proliferação anormal dos precursores da linhagem mieloide Dividida em: M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7 (classificação FAB)	Presença de diferentes anomalias cromossômicas Acúmulo progressivo de linfócitos pequenos imunologicamente incompetentes	Presença do cromossomo Philadelphia t(9,22) Proliferação clonal da célula tronco Excesso de produção de células mieloídes

Fonte: Modificado de (SANTOS; SILVA; NETO, 2013).

4.3 Leucemia Linfóide Aguda

A Leucemia Linfóide Aguda é uma neoplasia hematopoiética maligna, em que os precursores linfóides se proliferam de forma anormal, substituindo os elementos normais da medula. Estes precursores são conhecidos como linfoblastos e é possível observar a sua proliferação também em outros órgãos como fígado, linfonodos e baço (VIEIRA et al., 2014).

A LLA ocorre frequentemente na infância, em crianças menores de 15 anos de idade, com um pico entre o 3º e o 4º ano de vida. Segundo estudos morfológicos e imunofenotípicos, este pico se deve principalmente a LLA de células B precursoras, a qual é responsável por aproximadamente 80 a 85% dos casos de LLA infantil. Já nos adultos, a incidência de LLA é de apenas 20% (LORENZI, 2006).

Os pacientes com LLA geralmente apresentam febre e outros sintomas relacionados à falta da atividade normal da medula óssea, como anemia, neutropenia e trombocitopenia (VIEIRA et al., 2014).

Em 1976, a FAB classificou a leucemia baseando-se na morfologia dos blastos e nas reações enzimático-citoquímicas, classificando a LLA nos subtipos morfológicos L1, L2 e L3. Na década de 90 surgiu uma classificação subsidiada pela OMS, atualizada em 2008, que definiu as leucemias de acordo com a morfologia, o imunofenótipo, os aspectos genético-moleculares e as síndromes clínicas. Nessa classificação, as LLAs são classificadas junto com os linfomas linfoblásticos na categoria de neoplasias de linhagem B ou T, com a denominação de leucemia linfoblástica/linfoma linfoblástico B ou T (Quadro 2) (ZAGO et al., 2013) (FARIAS; CASTRO, 2004).

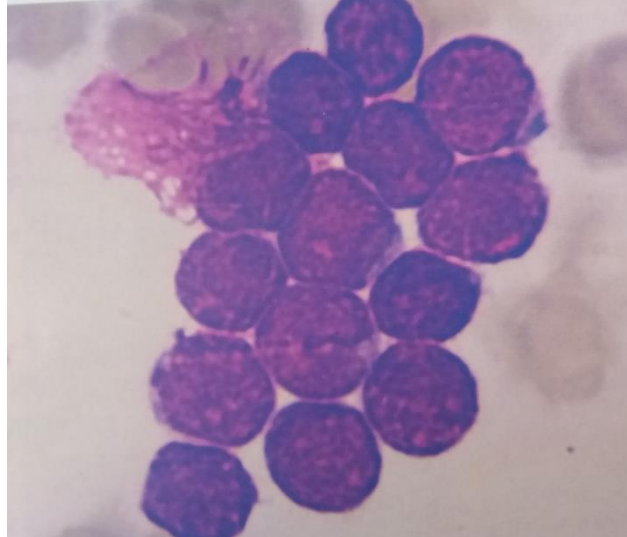
Quadro 2 - Classificação da OMS para as leucemias agudas

Leucemia/linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL 1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(v;11q23); rearranjo <i>MLL</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(12;21)(p13;q22) <i>TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com hiperdiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástico B com hipodiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
Leucemia/Linfoma Linfoblástico T

Fonte: Modificado de (LORENZI, 2006).

No subtipo L1 de LLA, classificado pela FAB, as células encontradas são pequenas, possuem uma alta relação núcleo-citoplasmática e um citoplasma discretamente basofílico. Seu núcleo é regular, com cromatina homogênea e os nucléolos geralmente são pequenos ou não visíveis (Figura 1) (LORENZI, 2006).

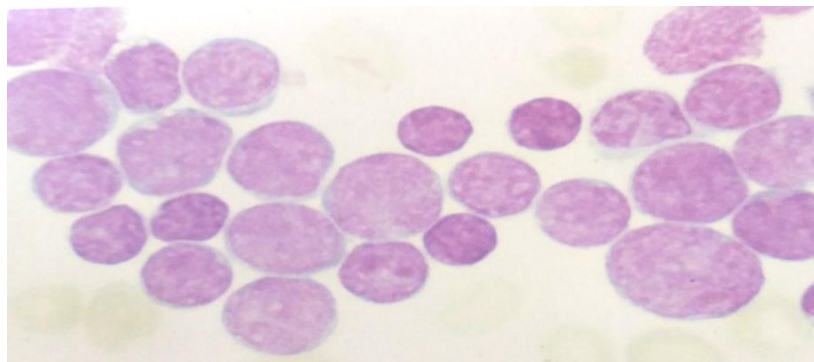
Figura 1 - Linfoblastos pequenos com cromatina pouco frouxa e homogênea na medula óssea de um paciente com LLA tipo L1, podendo estar associado as anormalidades citogenéticas t(9;22), t(4;11) e t(1;19).



Fonte: (OLIVEIRA; NETO, 2004).

O subtipo L2 é caracterizado pela presença de células grandes, heterogêneas e seu citoplasma é abundante e apresenta basofilia variável. Seu núcleo é irregular e é comum a presença de fendas, a cromatina nuclear é heterogênea e os nucléolos são visíveis e grandes (Figura 2) (LORENZI, 2006).

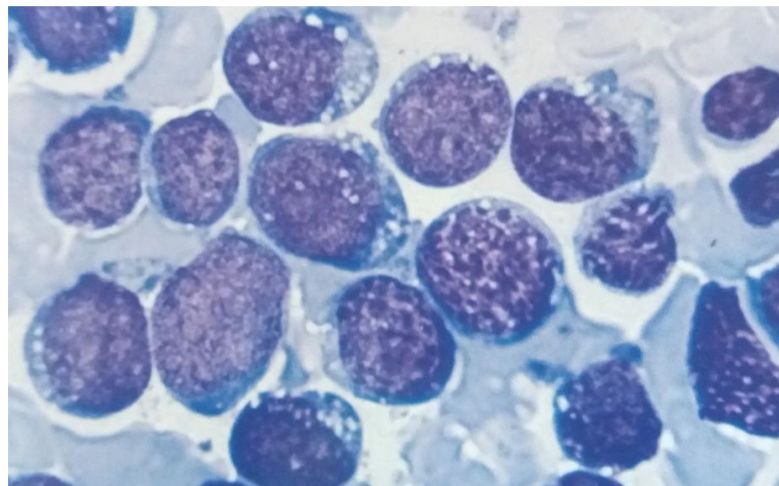
Figura 2 - Linfoblastos grandes e heterogêneos, com a presença de fendas e nucléolos na medula óssea de um paciente com LLA tipo L2, podendo estar relacionado com as anormalidades citogenéticas t(4;11) e hiperdiploidia.



Fonte: (LORENZI, 2006).

E no subtipo L3, classificado pela OMS como leucemia de células de Burkitt, as células são grandes e homogêneas, com quantidade moderada de citoplasma que é intensamente basofílico. Apresentam vacuolização citoplasmática proeminente e seu núcleo é regular, oval ou redondo e a cromatina é pontilhada e homogênea, com nucléolos proeminentes (Figura 3) (LORENZI, 2006).

Figura 3 - Linfoblastos grandes, intensamente basofílicos, com a presença de vacuolização citoplasmática na medula óssea de um paciente com LLA tipo L3, podendo estar relacionado com as anormalidades citogenéticas t(8;14), t(8;22) e t(2;8).



Fonte: (LORENZI, 2006).

4.3.1 Etiologia

As causas que levam ao início da doença ainda permanecem desconhecidas, no entanto, há relatos de que a exposição à radiação ionizante é considerada como um dos fatores de risco para o desenvolvimento da leucemia, principalmente nos casos em que o contato ocorre durante a vida intra-uterina ou durante a infância. Além disso, podem ser considerados também, como fatores leucemogênicos, os produtos químicos, as imunodeficiências e em grande parte dos casos as anomalias cromossômicas (SILVA, 2009).

Nas Leucemias Linfoides Agudas, a célula-tronco e as células precursoras linfoides (B e T) são os alvos prováveis para a transformação maligna. Os mecanismos que levam ao início da leucemogênese ainda não são bem conhecidos,

mas é possível que a ativação de proto-oncogenes e as mutações nos genes supressores de tumor, importantes no reparo do DNA, podem estar relacionadas com o descontrole na proliferação celular e conseqüente início do processo tumoral (GIL, 2011).

Os genes normais chamados proto-oncogenes estão envolvidos em vários processos importantes dentro da célula, principalmente na via em que os sinais externos são transmitidos para o núcleo celular a fim de ativar outros genes (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2006).

Quando há uma translocação cromossômica, esses proto-oncogenes são ativados e se tornam oncogenes, que se fusionam a outro gene celular, levando a produção de fatores de transcrição, responsáveis pela produção de proteínas mutadas que alteram a diferenciação e o crescimento celular. Dessa forma, a presença desse gene híbrido leva ao início da tumorigênese (GIL, 2011).

4.3.2 Fisiopatologia

As células hematológicas derivam de uma célula mãe conhecida como “*stem cell*” (célula-tronco), que possui como características, a autorrenovação e a pluripotencialidade. Elas recebem um estímulo e dão origem as células conhecidas como progenitoras que darão origem as células precursoras, responsáveis pelo surgimento da linhagem de células que darão origem as células maduras (SILVEIRA, 2000).

Na LLA, a presença de alterações genéticas, gera um descontrole do poder proliferativo normal e uma perda total ou parcial da capacidade de amadurecimento das células. Dessa forma, as células descendentes do clone maligno se multiplicam rapidamente, mas não amadurecem, resultando em um aumento de células blásticas (imaturas) na medula óssea (OLIVEIRA; NETO, 2004).

Esse aumento de células blásticas na medula óssea leva a sua insuficiência, interferindo assim, no crescimento e na funcionabilidade normal dos precursores eritróides, granulocíticos e megacariocíticos, levando conseqüentemente a manifestações clínicas como a presença de anemia, neutropenia e trombocitopenia (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2006; OLIVEIRA; NETO, 2004).

4.4 Diagnóstico

4.4.1 Sinais e sintomas

A LLA possui como característica a infiltração de órgãos pelas células leucêmicas, que leva o paciente a apresentar dor óssea, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e uma síndrome meníngea que leva a presença de cefaleia, vômito e visão turva. Além dessas manifestações, os pacientes podem apresentar papiloedema, confirmado pelo exame de fundo de olho e em alguns casos pode ser observada uma tumefação testicular, considerada mais rara (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2006).

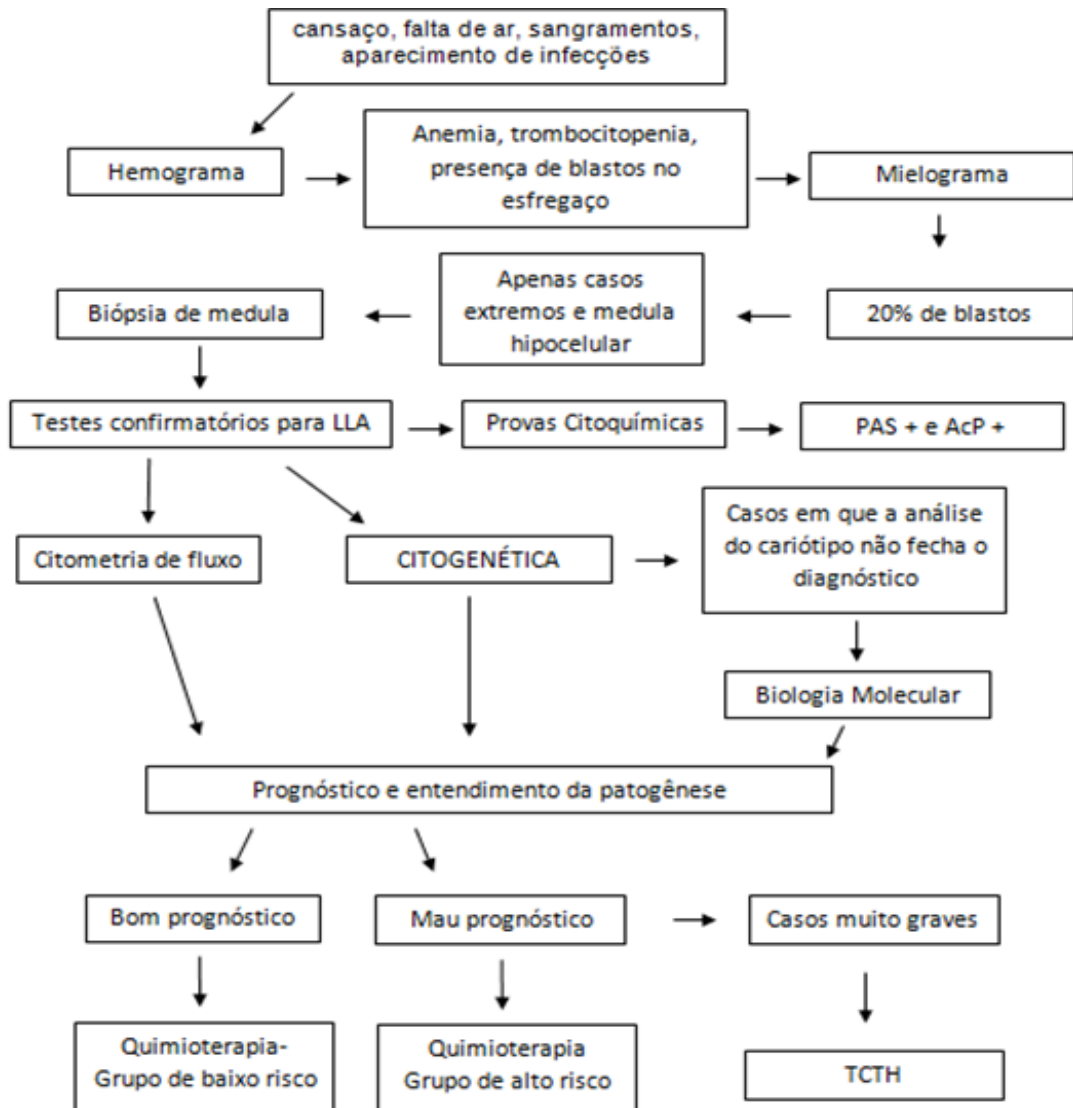
A presença da anemia, comum nos quadros de LLA, pode levar o paciente a apresentar palidez, cansaço, letargia e dispneia, a neutropenia deixa o paciente suscetível a quadros de infecção da boca, garganta, pele, vias aéreas e região perianal, com conseqüente presença de febre e mal estar e a trombocitopenia, também característica da doença, pode resultar no aparecimento de equimoses espontâneas, sangramentos gengivais, petéquias, púrpuras e menorragia (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2006).

Existem casos em que os pacientes podem apresentar no exame de hemograma, uma anemia leve, uma leucopenia com linfocitose e a presença de 5% de blastos em sangue periférico. No exame de mielograma, pode ser obtido um resultado de hiperplasia da série branca com a presença de 90% de blastos e uma baixa quantidade da série eritróide, caracterizando, portanto, um caso de Leucemia Linfóide Aguda. Posteriormente, para confirmação, são realizados os exames de imunofenotipagem, que geralmente a caracterizam como um caso de LLA do tipo B, que é o tipo mais comum. O tratamento é iniciado logo após o diagnóstico, mas em alguns casos, a doença pode voltar depois de algum tempo com a presença de uma alteração citogenética, como por exemplo, uma hiperdiploidia (> 46 cromossomos), observada na análise do cariótipo e a presença de uma recidiva testicular, o que é incomum e caracteriza um quadro de mau prognóstico, necessitando do encaminhamento para o transplante de medula óssea a fim de possibilitar uma melhora para o paciente (ZOROVICH; SOUZA; FERREIRA, 2014).

4.4.2 Diagnóstico Laboratorial

Para o diagnóstico laboratorial da LLA, é importante que sejam realizados exames citomorfológicos do sangue periférico, da medula óssea, citoquímicos e de citometria de fluxo a fim de melhorar a acurácia diagnóstica. Segundo a nova classificação da OMS, a citogenética é considerada obrigatória para a definição dos subgrupos específicos, por meio do estudo do cariótipo convencional ou por meio da biologia molecular (Figura 4) (BRASIL, 2014).

Figura 4 - Fluxograma da sequência de exames utilizados para diagnóstico da LLA, seguido pela divisão dos casos por meio do prognóstico e escolha dos tratamentos adequados.

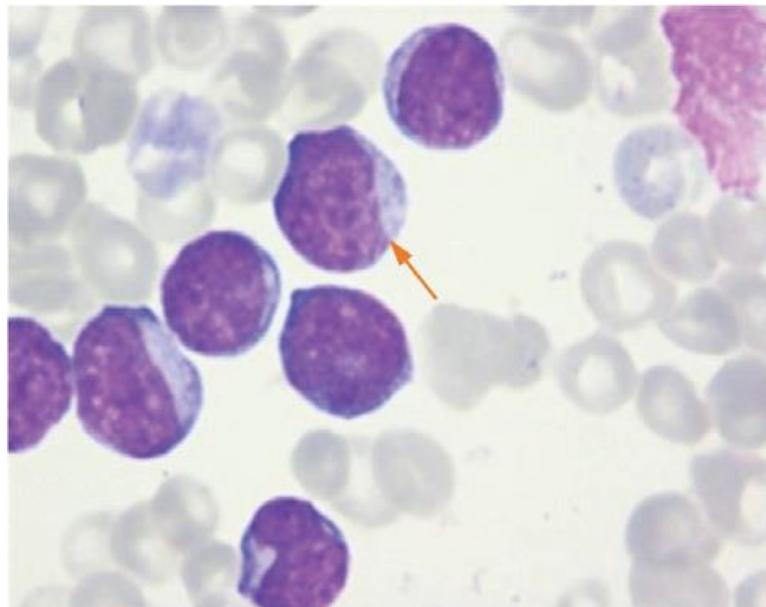


4.4.2.1 Hemograma

Ao apresentar os sintomas clínicos característicos da LLA, o paciente deve ser conduzido para uma investigação laboratorial que deve ser iniciada pelo hemograma, feito em conjunto com a análise diferencial das células, de forma manual, por um profissional capacitado que libere o resultado rapidamente (BRASIL, 2011).

No hemograma do paciente com suspeita de LLA pode ser observada uma anemia normocítica normocrômica e na maioria dos casos a presença de trombocitopenia. A contagem de leucócitos pode ser normal, baixa ou elevada em até 200x e o exame manual de distensão do sangue geralmente mostra uma quantidade variável de blastos (Figura 5) (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2006).

Figura 5 - Esfregaço sanguíneo de um paciente com LLA, com a presença de linfoblastos, caracterizados pela presença de nucléolos, citoplasma basofílico e alta relação núcleo/citoplasma, destacado pela seta.



Fonte: (VIEIRA et al., 2015).

Os pacientes podem apresentar contagem de plaquetas menor do que 20.000/mm³, leucócitos em quantidade maior que 50.000/mm³ e hemoglobina menor do que 6,0 g/dL, indicando uma anemia grave (BRASIL, 2011).

O hemograma é um dos exames mais solicitados na rotina laboratorial, isso porque as diversas informações fornecidas por ele, por meio da análise do sangue periférico, informam ao médico se a medula óssea do paciente está produzindo um número suficiente de células maduras de diferentes linhagens e se essas células estão apresentando um padrão normal de proliferação e diferenciação. Nos casos de leucemia, em que a medula óssea não está funcionando normalmente, podem ser vistos blastos no sangue periférico, que justificam em alguns casos a leucocitose observada no hemograma (GROTTO, 2009; AGUIAR, 2015).

4.4.2.2 Mielograma e biópsia de medula

Ao serem observadas no hemograma alterações em duas ou mais séries, como por exemplo, anemia, plaquetopenia, leucopenia ou leucocitose, o paciente deve ser encaminhado para um serviço especializado em onco-hematologia pediátrica para realizar em caráter de urgência exames diagnósticos como o mielograma, e outros complementares, como radiografia de tórax e ultrassonografia de abdômen (BRASIL, 2011).

O procedimento do mielograma é iniciado com o posicionamento do paciente, deixando exposta, nas crianças menores de 12 meses, a região tibial e nas maiores que 12 meses a região posterior da crista ilíaca, na qual é feita uma antisepsia e posteriormente uma anestesia local com 5mL de lidocaína 1 a 2% sem adrenalina e o local é puncionado com uma agulha conectada a uma seringa de 20mL, em que são aspirados inicialmente 0,5mL para a realização de oito esfregaços que serão utilizados para a análise morfológica (AGUIAR, 2015).

O estudo da medula óssea fornece informações quantitativas e qualitativas das células, possibilitando a análise morfológica de cada linhagem. Na LLA, é possível observar um aumento de células imaturas na medula óssea. Muitas vezes, nos pacientes com LLA em que há uma superabundância de células, a interpretação das lâminas preparadas para o mielograma se torna difícil devido à espessura do aspirado. Além disso, existem casos em que a lâmina do mielograma é feita com um excesso de pressão, causando o esmagamento das células, impedindo assim, que elas sejam analisadas morfológicamente (RILEY et al., 2009).

Quando a análise da medula é comprometida, como por exemplo, nos casos de pancitopenia, em que é vista uma medula óssea fibrótica ou liposubstituída e tanto o mielograma quanto a citometria de fluxo não permitem uma avaliação adequada, a biópsia de medula óssea se torna o único procedimento diagnóstico adequado (REGO; SANTOS, 2009).

O exame da medula óssea deve ser feito levando em consideração o histórico do paciente, os dados laboratoriais recentes e passados e os resultados morfológicos obtidos no esfregaço do sangue periférico. A biópsia de medula, realizada apenas em casos extremos identificados pelo mielograma, avalia a celularidade, a proporção relativa de cada tipo de célula, a presença de fibrose, inflamação, agregados linfoides, tumores metastáticos e outras lesões (RILEY et al., 2009).

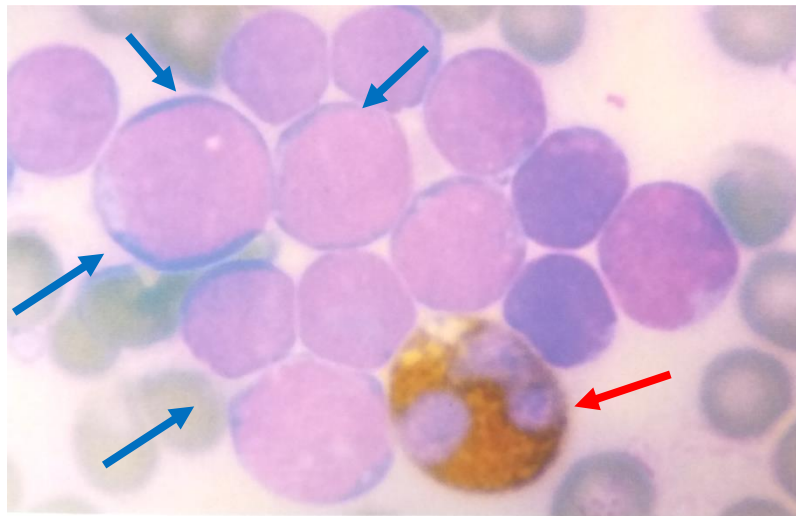
4.4.2.3 Provas citoquímicas

As provas citoquímicas, eram consideradas essenciais no passado para a determinação da linhagem da leucemia, mas recentemente foram substituídas pela citometria de fluxo e pela coloração imuno-histoquímica. Elas atuam identificando enzimas e outras substâncias intracelulares (RILEY et al., 2009). Uma de suas utilidades é o seu auxílio na diferenciação entre Leucemia Linfóide Aguda e Leucemia Mieloide Aguda (FARIAS; MELO, 2004).

Entre as provas utilizadas para o diagnóstico da LLA, se encontra a mieloperoxidase, que é uma enzima lisossomal presente nos grânulos dos neutrófilos, monócitos e eosinófilos. Esta enzima é capaz de realizar a reação de oxidação de substâncias pelo peróxido de hidrogênio, produzindo ao final uma coloração (OLIVEIRA; NETO, 2004). Os grânulos dos neutrófilos apresentam uma coloração castanha escura que aumenta com a maturidade da célula, nos eosinófilos os grânulos são amarelos e nos monócitos é possível observar uma reação citoplasmática difusa com a presença de alguns grânulos citoplasmáticos. A reação enzimática depende da quantidade de peróxido de hidrogênio e a coloração observada é perdida conforme o envelhecimento do esfregaço. O uso primário desta enzima na citoquímica é a diferenciação entre mieloblastos e linfoblastos (RILEY et

al., 2009). Nas doenças hematológicas, os granulócitos podem ser deficientes ou sem atividade de mieloperoxidase, que é uma característica da LLA, pois os linfoblastos encontrados são negativos para essa coloração (Figura 6) (OLIVEIRA; NETO, 2004).

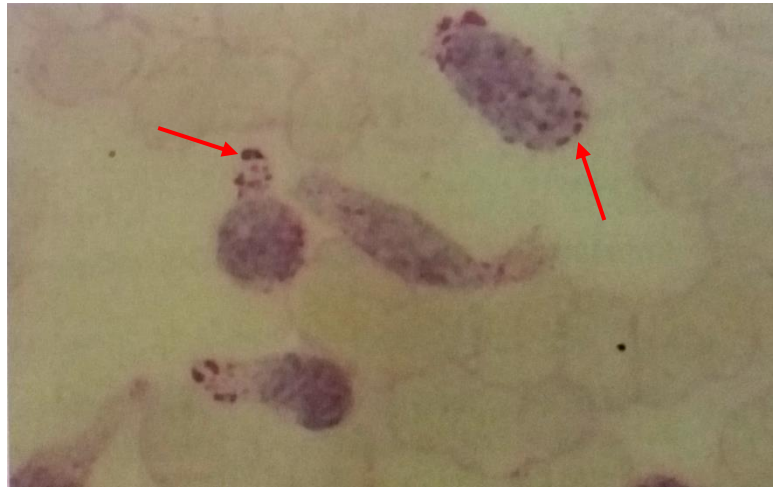
Figura 6 - Peroxidase negativa em todos os blastos de um paciente com LLA (setas azuis). É importante a visualização da positividade em células mieloides maduras para garantir que a reação enzimática funcionou (seta vermelha).



Fonte: Modificado de (OLIVEIRA; NETO, 2004)

A coloração pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS) consiste na oxidação do álcool aldeído pelo ácido periódico, que depois é evidenciado pelo reagente de Schiff. Esta técnica é utilizada com a finalidade de pesquisar a presença de polissacarídeo, especificamente o glicogênio, no citoplasma das células. Nas células com PAS positiva é possível observar a presença de grãos com uma cor entre o róseo e o vermelho. Na LLA, o PAS é positivo na maioria dos blastos e é possível observar grãos dispersos (Figura 7) ou em bloco único, no entanto aproximadamente 30% dos casos de LLA podem apresentar PAS negativo em todos os blastos e na LLA tipo L3 a reação PAS é sempre negativa (OLIVEIRA; NETO, 2004).

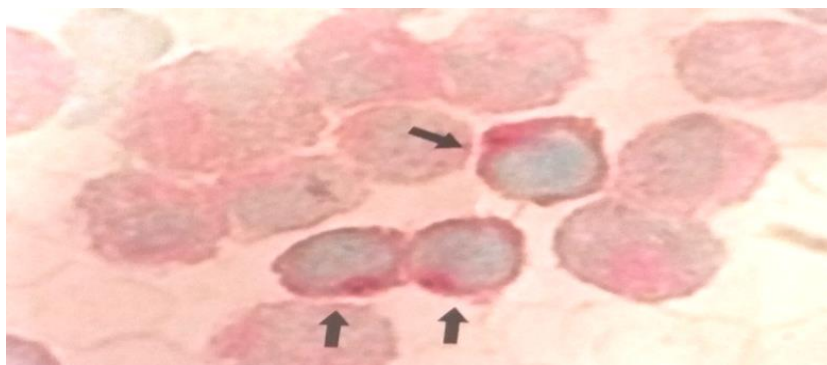
Figura 7 - Blastos linfoides com grãos positivos delicados da reação de PAS em um paciente com LLA tipo T.



Fonte: Modificado de (LORENZI, 2006).

E a fosfatase ácida (AcP), utilizada também na citoquímica, é uma enzima lisossomal presente nos grânulos primários dos granulócitos, sendo mais frequente em promielócitos e mielócitos que possuem grande quantidade desses grânulos. Sua atividade é útil na diferenciação entre os subtipos de linfoblastos e nos blastos de LLA-T a atividade da AcP apresenta uma localização única unipolar (Figura 8) (OLIVEIRA; NETO, 2004).

Figura 8 - Fosfatase ácida com padrão unipolar em blastos de LLA-T demonstrados pelas setas.



Fonte: (OLIVEIRA; NETO, 2004).

4.4.2.4 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica quantitativa, na qual a análise é realizada de célula em célula, uma de cada vez. O citômetro de fluxo foi desenvolvido em 1970 devido à pandemia de HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) que ocorria na época, se tornando então, um grande avanço para a ciência. Para que a análise seja feita, as células são preparadas e marcadas com anticorpos com corantes fluorescentes e posteriormente colocadas no equipamento, que possui um fluxo fluido e estreito, em que as células são transportadas uma a uma e é emitido sobre elas um feixe luminoso de alta intensidade. Após a interação do feixe de luz com a célula, os vários detectores óptico-eletrônicos presentes no equipamento capturam e amplificam o sinal obtido, liberando posteriormente no computador a informação quantitativa sobre cada célula analisada (RILEY et al., 2009).

O uso da imunofenotipagem por citometria de fluxo (CMF) é uma ferramenta indispensável para o diagnóstico de doenças como a LLA, visto que por meio dessa técnica é possível a quantificação dos blastos, já observados no exame mielograma, que estão geralmente presentes em grande quantidade e o uso da CMF permite uma análise mais precisa (REGO; SANTOS, 2009).

Os blastos diferem das células mais maduras, pois expressam marcadores de imaturidade, sendo observada, portanto, uma ausência dos marcadores associados à maturação celular. Para análise desse tipo de célula geralmente é utilizado o diagrama SSC (desvio lateral da luz) x CD45, já que os blastos apresentam uma baixa intensidade de CD45 e um SSC baixo (REGO; SANTOS, 2009).

A citometria de fluxo também se tornou muito útil na diferenciação entre a Leucemia Mieloide Aguda e a LLA, visto que cada uma é caracterizada por marcadores celulares diferentes. No caso da LLA, os marcadores encontrados também são diferentes em cada caso, na LLA do tipo T, é possível observar nos linfócitos o marcador CD3 e o CD7 e na LLA tipo B, é possível observar nas células B os marcadores CD19, CD22 e CD79a (REGO; SANTOS, 2009).

Na maioria dos casos, a LLA encontrada é de linhagem B, tanto em crianças quanto adultos, e é estratificada em quatro subtipos pelo Grupo Europeu de

Classificação Imunológica das Leucemias (EGIL), que são: subtipo B-I, em que estão envolvidos os linfócitos pró-B, B-II, em que são encontrados linfócitos B comuns, BIII, conhecida também como LLA pré-B e por fim o subtipo BIV, que é a LLA B madura. Cada subtipo foi dividido de acordo com os marcadores presentes nas células envolvidas, que é possível por meio do uso de um painel sofisticado de marcadores monoclonais (Quadro 3) (ZAGO et al., 2013).

A classificação EGIL também dividiu imunofenotipicamente a LLA tipo T, presente em 25% dos adultos e em 11-16% das crianças com LLA, em quatro subtipos, T-I, T-II, T-III e T-IV, cada um com seus marcadores específicos (Quadro 4) (BÉNÉ et al., 2011).

Quadro 3 - Classificação Imunofenotípica das LLAs tipo B segundo a Classificação EGIL, correlacionada com as translocações presentes em cada caso e seus respectivos prognósticos.

Classificação LLA de linhagem B	Imunofenótipo CD19+ e/ou CD79a+ e/ou CD22+	Citogenética	Prognóstico	Frequência Adultos* Crianças**
BI (Pró-B)	Sem expressão de outros antígenos	MLL subtipo MLL/AF4 t(4;11)(q21;q23)	Mau	11%* 5-9%**
BII (B comum)	CD10+	TEL/AML1 t(12;21) (p12;q22)	Bom	49%* 53-65%**
BIII (pré-B)	IgM+ citoplasmático	BCR/ABL (9;22) (q34;q11) E2A/PBX1 t(1;19)(q23;p13) MYC-IGH t(8;14) (q24;q32)	Mau	12%* 14-20%**
BIV (B madura)	Cadeia κ+ ou λ+ (citoplasma ou superfície)	Ausência de alterações citogenéticas	-	2-4%* 2-3%**

Fonte: Modificado de (ZAGO et al., 2013).

Quadro 4 - Classificação Imunofenotípica das LLAs tipo T segundo a Classificação EGIL.

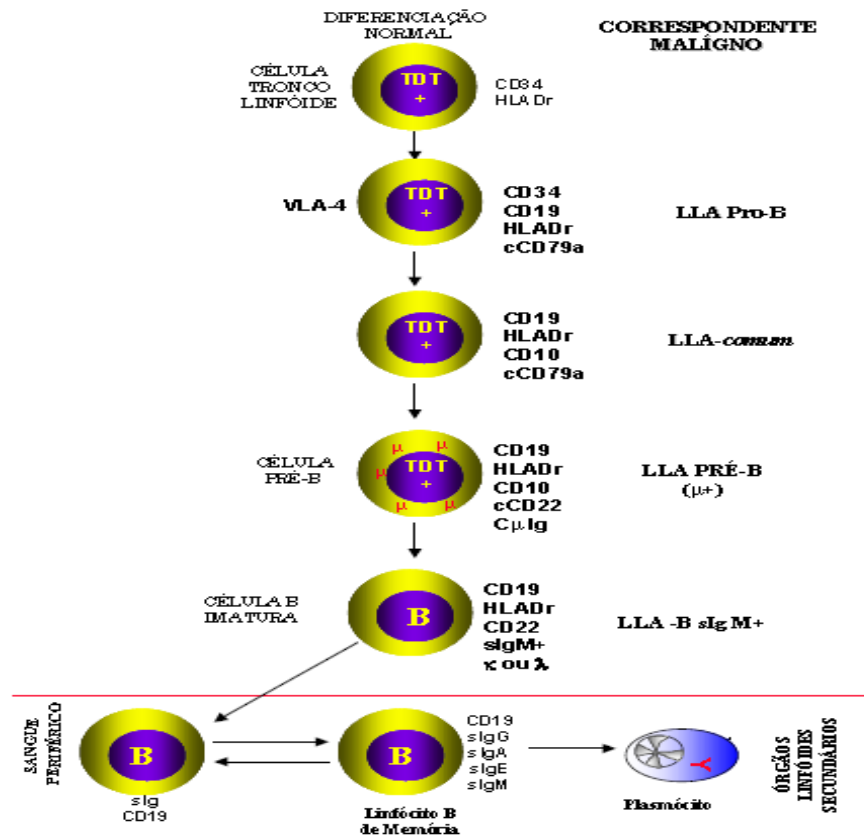
Classificação	Imunofenótipo
LLA de linhagem T	CD3+ citoplasma/membrana
TI (Pró-T)	CD7 +
TII (pré-T)	CD2+ e/ou CD5+ e/ou CD8+
TIII (T cortical)	CD1a +
TIV (T madura)	CD3+ superfície, CD1a(-)
- α/β (grupo a)	Anti-TCR $\alpha\beta$ +
- γ/δ (grupo b)	Anti-TCR $\gamma\delta$ +

Fonte: Modificado de (ZAGO et al., 2013).

Para compreensão da classificação EGIL, é necessário o entendimento da ontogenia dos linfócitos T e B, ou seja, como ocorre o seu desenvolvimento até que sejam obtidas células maduras. Na medula óssea, as células-tronco pluripotentes dão origem aos progenitores linfoides, que por sua vez, dão origem aos linfócitos T, B e NK. Durante o processo de diferenciação, as células B permanecem na medula óssea, enquanto as células T migram para o timo. Os linfócitos T possuem como característica a dependência da apresentação de peptídeos pelo MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade), já os linfócitos B possuem a capacidade de reconhecer antígenos solúveis em sua forma nativa, que é possível por meio de suas imunoglobulinas de membrana IgM e IgD. Além disso, as células B possuem duas cadeias peptídicas denominadas Iga (CD79a) e Igb (CD79b), que iniciam a sinalização intracelular (CATELAN et al., 2009).

No desenvolvimento das células B, após a célula progenitora, as primeiras células encontradas são as pro-B, caracterizadas pelo fenótipo CD34+CD19+CD10. Logo após são desenvolvidas as células B comuns, que apresentam os marcadores CD19+CD10+CD79a, seguida pelas células pré-B, caracterizadas pelo fenótipo CD19+CD10+CD22+IgM e por fim as células B maduras caracterizadas pela presença dos marcadores CD19+CD22+IgM+k+ λ + (Figura 9) (EMERENCIANO, 2006).

Figura 9 - Processo de diferenciação da linhagem dos linfócitos B com seus respectivos marcadores.



Fonte: (EMERENCIANO, 2006).

Nas células T, a identificação imunofenotípica é realizada por meio do uso dos anticorpos monoclonais CD1, CD2, CD3, CD7, CD4 e CD8. Essas células possuem como característica marcante a presença do receptor de antígenos TCR, que é dividido em dois tipos, os linfócitos T do tipo TCR $\alpha\beta$ (90-95%) predominante nos tecidos linfóides e no sangue periférico e os linfócitos T do tipo TCR $\gamma\delta$ presentes, preferencialmente, na pele e nas mucosas, mas podendo ser encontrados também na circulação, constituindo 5-10% dos linfócitos do sangue (LORENZI, 2006; MAESTRE; CASTAÑO, 2010).

4.5 Citogenética

A citogenética, no estudo das alterações cromossômicas presentes nas alterações neoplásicas, é considerada essencial e indispensável, pois por meio dela é possível o estudo do cariótipo, o qual facilitou de maneira expressiva a compreensão dos mecanismos biológicos das leucemias agudas, identificando os cromossomos alterados decorrentes de translocações, inversões, deleções e outras anomalias cromossômicas. Possuindo, portanto, grande importância na estratificação dos pacientes em diferentes linhas de tratamento (FONT, 2007).

A análise do cariótipo na citogenética é realizada por meio da observação direta ao microscópio dos cromossomos de células tumorais, mas para que isso seja possível, estas devem estar em metáfase, o que justifica a necessidade de um cultivo antes da análise para estimular a divisão celular (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2006).

Para o desenvolvimento normal de qualquer indivíduo é imprescindível que exista uma estabilidade no número e na forma dos cromossomos já que eles estão diretamente relacionados com a expressão gênica. Sendo assim, a presença de uma alteração numérica ou estrutural pode levar a fenótipos inviáveis ou anormais (GIL, 2011).

Essas alterações derivam de mutações, que podem ser constitucionais, ou seja, já presentes nas células fetais, ou adquiridas que ocorrem durante o desenvolvimento do indivíduo, como nos casos das leucemias, podendo atingir cromossomos autossômicos ou sexuais (GIL, 2011).

Na LLA, essas alterações estão presentes e podem ser observadas mudanças no número de cromossomos dos pacientes afetados, as quais são chamadas de anomalias numéricas, que ocorrem devido a presença de erros na divisão celular, que dão origem a cromossomos duplicados ou triplicados, que quando presentes em duas ou mais células podem ser consideradas como alterações clonais (GIL, 2011).

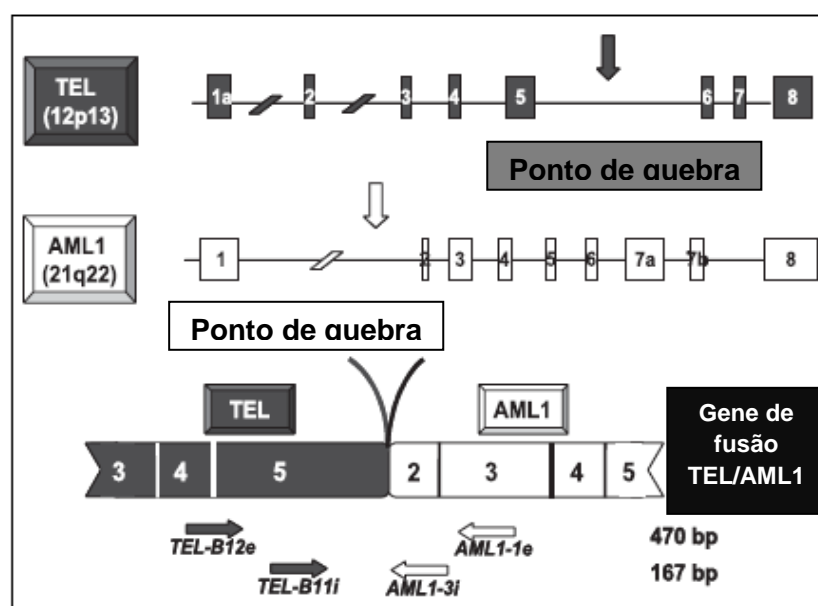
Entre essas alterações encontram-se a hiperdiploidia em que é observado um número de 47-50 cromossomos, a alta hiperdiploidia em que o paciente apresenta

de 51-67 cromossomos, a hipodiploidia, em que é encontrado um número de cromossomos menor do que 46 cromossomos, que é considerado o valor normal. Existem também as baixas hipodiploidias, em que há um número de cromossomos de 31-39 e as haploidias que são caracterizadas por um número de cromossomos de 24-29 (GALLEGO, 2012).

A alta hiperdiploidia é a anomalia cromossômica mais comum na LLA de precursor B e representa 25% dos casos, sendo que os pacientes respondem bem a terapia. Os cromossomos mais envolvidos nesse caso são 4, 6, 10, 14, 17, 18 e 21, podendo ser observada a trissomia de alguns deles. Já as hipodiploidias representam apenas 5% dos casos de LLA e apenas 1% dos pacientes apresentam um número menor do que 45 cromossomos (GALLEGO, 2012).

Outra anomalia comum na LLA é a $t(12;21)(p12;q22)$, resultante da translocação entre o gene TEL, também conhecido como ETV6, do cromossomo 12 e o gene AML1, também conhecido como RUNX1, do cromossomo 21, originando o gene de fusão TEL/AML1 (Figura 10). Esta anomalia genética se inicia normalmente na vida intrauterina e provavelmente é a responsável pelo início da LLA tipo B comum em crianças (ALLAIRE, et al., 2006).

Figura 10 - Esquemática da translocação entre os cromossomos 12 e 21, levando a formação do gene de fusão TEL/AML1.

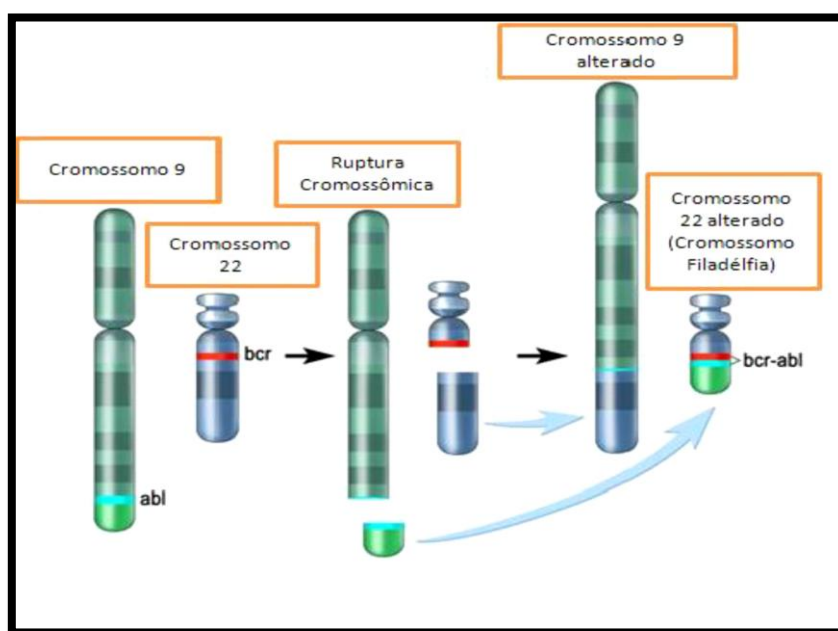


O gene TEL do cromossomo 12, normal, presente na família de fatores de transcrição ETS, é responsável pela codificação de uma fosfoproteína nuclear. E o gene AML1 do cromossomo 21 é um fator de transcrição importante, pois está envolvido na proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas. A fusão TEL/AML1, provavelmente, inibe a transcrição normal do gene AML1, levando assim, a formação das células leucêmicas (PIETERS; CARROLL, 2008).

Cerca de 10% das crianças com LLA do tipo pré B apresentam como alteração citogenética, a presença do cromossomo Philadelphia (Ph) decorrente da $t(9;22)$. A frequência desta alteração aumenta com a idade, subindo para 21% em adolescentes e 27% em adultos jovens (TRAN; LOH, 2016).

Na translocação (9;22) (q34;q11), uma parte do gene ABL, presente no cromossomo 9 é transferida e se insere dentro do gene BCR, localizado no cromossomo 22. Essa translocação leva a formação do gene de fusão BCR/ABL e a consequente produção da proteína p190 (Figura 11) (ALLAIRE et al, 2006). Esta proteína produzida a partir do oncogene BCR/ABL promove o início da leucemogênese, pois leva a uma atividade tirosino-quinase, responsável pelo crescimento e diferenciação celular, muito elevada (CUNHA et al., 2014).

Figura 11 - Representação da translocação (9;22) resultando na formação do gene de fusão BCR/ABL.



O gene MLL é um dos mais envolvidos em doenças hematológicas, ele está presente na banda 23 do braço longo do cromossomo 11 (11q23) e desempenha um papel muito importante na regulação da expressão gênica e na hematopoese. Várias aberrações cromossômicas podem ocorrer envolvendo este gene, como por exemplo, as translocações recíprocas t(11;19) (q23;p13) e t(9;11) (p21;q23) que levam a formação de proteínas quiméricas que alteram a proliferação e diferenciação normal, favorecendo assim, a leucemogênese (MARCHESI; GIRARDI; AVVISATI, 2011).

Dentre os casos infantis de LLA, os rearranjos do gene MLL (11q23), estão associados a 90% dos casos CD10 negativos e são muito comuns em crianças menores de 12 meses. Este gene possui aproximadamente 36 éxons e codifica uma proteína nuclear de 3969 aminoácidos com peso molecular de 450 kDa que atua como regulador positivo da expressão do gene no desenvolvimento embrionário precoce. Seu papel ainda não está bem elucidado, mas foi observado no rearranjo MLL, a alta expressão do receptor tirosino quinase FLT3, que é responsável pela leucemogênese e desenvolvimento da leucemia na infância, mas especificamente na vida intrauterina (EMERENCIANO; KOIFMAN; POMBO-DE-OLIVEIRA, 2007).

Outra translocação do gene MLL é a t(4;11)(q21;q23), que está presente em aproximadamente 60% dos lactentes menores de 1 ano e em 2% das crianças com LLA. Ela resulta na formação do gene de fusão MLL/AF4, que é observada geralmente em leucemias bifenótípicas, ou seja, ela é caracterizada pela presença do marcador C10 negativo, caracterizando um fenótipo de LLA pró-B juntamente com a expressão de antígenos mielóides como o CD15 e o CD65. Esta translocação está associada a uma alta contagem de leucócitos e a um envolvimento do sistema nervoso central, que a caracteriza como um caso de alto risco (FARIAS; CASTRO, 2004; CARULLI et al., 2012).

Em 3-4% das crianças brancas e em aproximadamente 10-14% das crianças negras com LLA pré-B pode ser encontrada a t(1;19)(q23;p13) que resulta na formação do gene de fusão E2A/PBX1, também conhecido como TCF3-PBX1. O gene E2A normal codifica fatores de transcrição que são muito importantes para a linfopoese e para o desenvolvimento das células B. O gene PBX1 é um fator transcricional expresso em vários tecidos, mas ausente nos linfócitos normais.

Sendo assim, a translocação envolvendo esses dois genes interfere na formação normal dos linfócitos B, levando à LLA (YEN et al., 2017; FARIAS; CASTRO, 2004; LORENZI, 2006).

Cerca de 2-5% da LLA pré B morfologicamente classificada como L3 e conhecida como Linfoma de Burkitt, possui como característica citogenética a t(8;14) (q24;q32), a qual resulta na translocação do proto-oncogene MYC, presente no cromossomo 8, que fica sobreposto ao locus IGH no cromossomo 14. Essa translocação leva a formação do MYC-IGH, com consequente superexpressão do gene MYC, que é um fator de transcrição presente em muitas funções celulares, como a proliferação, crescimento e apoptose. A sua desregulação, decorrente do rearranjo ou de outros mecanismos, fez com que ele ficasse conhecido como um potente oncogene associado a quadros clínicos agressivos (CAI et al., 2015).

Dentre os rearranjos envolvendo o gene MYC o mais frequente é o t(8;14) (q24;q32), mas podem ser observados também nos casos de LLA, em menor frequência a t(2;8) (q24;q11) e a t(8;22) (q24;q11), as quais também levam a uma superexpressão do gene MYC e consequentemente à desregulação dos processos normais de crescimento e proliferação (LORENZI, 2006).

Aproximadamente 12 a 15% das crianças com LLA apresentam como perfil citogenético a presença de translocações envolvendo a linhagem T, sendo que as mais comuns são as translocações t(1;14)(p32;q11), t(10;14)(q24;q11), e t(11;14)(p13;q11), que levam a uma expressão elevada dos oncogenes TAL1, HOX11 e RBTN1, respectivamente (MINASI, 2009).

Na LLA tipo T a anormalidade citogenética observada com mais frequência, em aproximadamente 7% dos casos, é a t(11;14)(p13;q11) que se baseia na quebra entre o locus TCR α/δ no cromossomo 14 e na quebra do cromossomo 11, no gene RBTN1 também conhecido como LMO1. Outro gene que pode estar envolvido nessa translocação, com uma maior frequência, é o LMO2 presente na região (p15; q11). Esses genes pertencem a classe *rhomotin* e são conhecidos como fatores de transcrição de relevância no desenvolvimento de neoplasias de células T (MINASI, 2009; SIMON et al., 2015).

A t(1;14)(p32;q11) pode ser observada em aproximadamente 3% dos casos de LLA tipo T infantil. A consequência desta translocação é a justaposição do gene TAL1 ao locus da cadeia TCR α/δ no cromossomo 14, levando a uma

superexpressão do gene TAL1, que é um regulador muito importante no desenvolvimento das células-tronco hematopoiéticas (VLIERBERGHE; FERRANDO, 2012).

Aproximadamente 5-10% dos pacientes com LLA T possuem como anormalidade citogenética a presença da t(10;14)(q24;q11), que ocorre no locus TCR δ do cromossomo 14 e na região de agrupamento do cromossomo 10, resultando em uma desregulação do gene homeobox, conhecido como HOX11, que codifica proteínas de ligação ao DNA. Sendo assim, quando há a presença de uma alteração e esse gene é expresso de forma anormal, isto pode dar início a leucemogênese (Quadro 5) (MINASI, 2009).

Quadro 5: Resumo das translocações observadas nos pacientes com LLA.

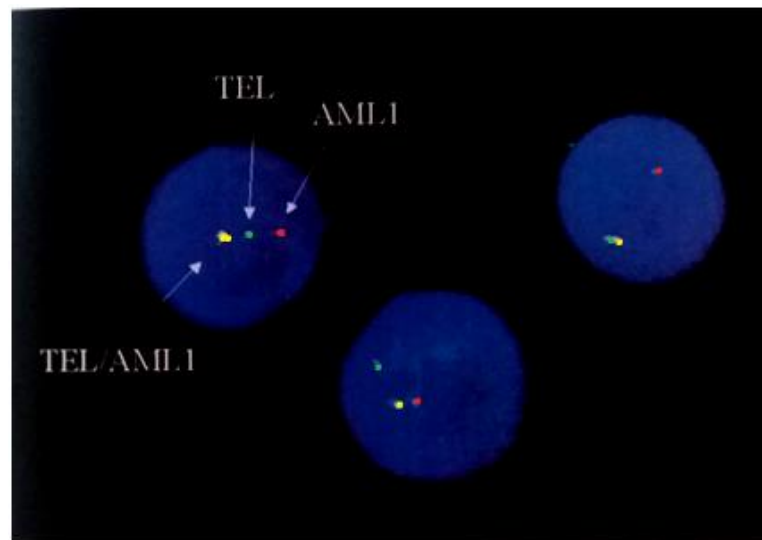
Genes envolvidos	Translocações
BCR/ABL	(9;22) (q34;q11)
Rearranjos MLL	t(4;11)(q21;q23) t(11;19) (q23;p13) t(9;11) (p21;q23)
TEL/AML1	t(12;21) (p12;q22)
E2A/PBX1	t(1;19)(q23;p13)
MYC	t(8;14) (q24;q32) t(8;22) (q24;q11) t(2;8) (q24;q11)
TAL1	t(1;14)(p32;q11)
HOX11	t(10;14)(q24;q11)
RBTN1	t(11;14)(p13;q11)

Para aprimorar e auxiliar o estudo citogenético, existe a técnica de FISH (Hibridização *In Situ* por Fluorescência), que é útil nos casos em que não é obtido um resultado claro apenas com a análise do cariótipo. Ela se baseia no uso de uma sonda marcada com fluorocromo, que se liga por complementaridade ao DNA que está sendo estudado (Figura 12). Este método é considerado vantajoso devido a sua rapidez, sensibilidade e especificidade (ZAGO et al., 2013).

A técnica FISH é utilizada muitas vezes para a confirmação da presença de translocações, como por exemplo, o caso do gene MLL localizado na região 11q23. Para isso a sonda é marcada com fluorocromos de cores diferentes (Figura 13), chamada de “*dual color break apart*” que flanqueiam o ponto de ruptura e produzem um único sinal amarelo no cromossomo 11 normal e sinalizam a separação de sinal

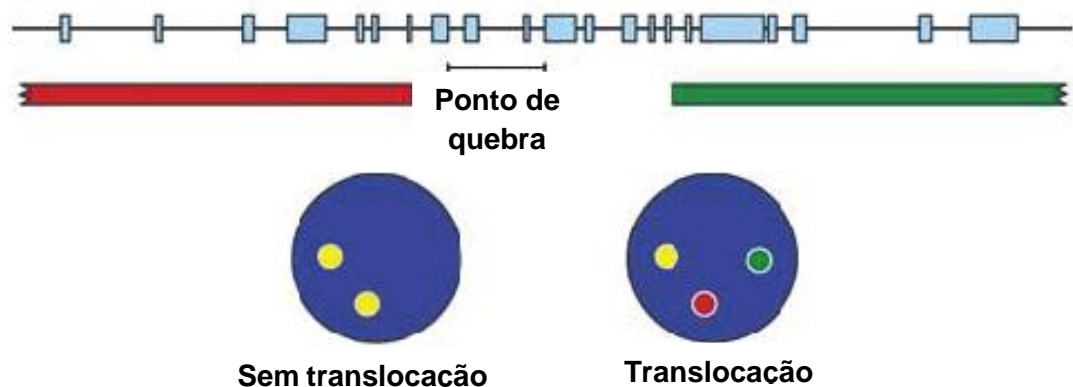
quando há a presença da translocação em que é possível observar um sinal verde e um vermelho (Figura 13) (GALLEGO, 2012).

Figura 12 – FISH de um paciente com LLA de precursor B demonstrando a presença da translocação entre os genes TEL e AML1, que ocorre em cerca de 25% dos casos de LLA infantil, com prognóstico favorável.



Fonte: Modificado de (LORENZI, 2006).

Figura 13: Técnica de FISH demonstrando a presença da quebra cromossômica do cromossomo 11 na translocação MLL, com o uso da sonda *dual color break apart*.



Fonte: Modificado de (GALLEGO, 2012).

4.6 Biologia Molecular

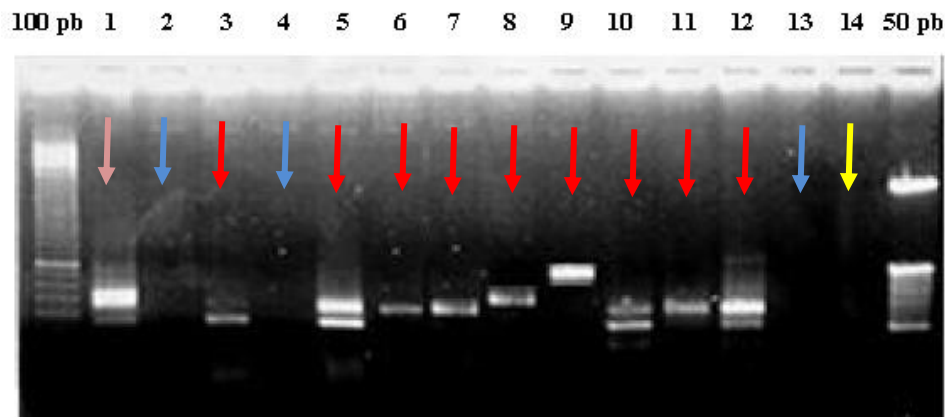
A partir da década de 1990 foram introduzidas na rotina de diagnóstico da leucemia, as técnicas de biologia molecular como o PCR (Reação em cadeia da polimerase), que permitiu um avanço na determinação dos rearranjos gênicos não observados na citogenética convencional, possibilitando a caracterização de tipos específicos de leucemia (OLIVEIRA; NETO, 2004).

Os estudos citogenéticos da LLA, embora sejam considerados como padrão-ouro para o diagnóstico, apresentam algumas desvantagens como a necessidade de um trabalho intensivo, demorado e pessoas altamente qualificadas, além da possibilidade de contaminação e falha na cultura, impedindo em alguns casos a visualização das alterações genéticas. Em meio a esses problemas na identificação das anormalidades cromossômicas, surgiu a técnica de RT-PCR (reação da transcriptase reversa seguida pela ação em cadeia da polimerase), que se mostrou um teste sensível, específico e rápido para a identificação das translocações presentes na LLA (LIMSUWANACHOT et al., 2016).

Para realização da técnica o RNA (ácido ribonucleico) é extraído do sangue periférico ou da amostra de medula óssea do paciente por meio de reagentes específicos e, posteriormente, essa fita de RNA é submetida ao processo de transcrição reversa, sendo obtido o DNA complementar (cDNA). O processo segue e a fita de DNA é submetida a uma amplificação por meio da reação de PCR multiplex específica para a detecção das quatro translocações mais comuns na LLA que são: TEL-AML1, MLL-AF4, E2A-PBX1 e BCR-ABL (LIMSUWANACHOT et al., 2016).

A amplificação das alterações é possível devido ao uso de oligonucleotídeos específicos dos genes envolvidos. Se há a presença da fusão no paciente, este resultado será observado na eletroforese em gel de agarose (Figura 14) (EMERENCIANO, 2006).

Figura 14 - Resultado da amplificação por RT-PCR multiplex, em um gel de agarose corado com brometo de etídeo, para a detecção dos rearranjos MLL. A coluna 1 mostra o controle positivo (seta rosa) e a 14 o negativo (seta amarela). As colunas 2, 4 e 13 mostram pacientes com resultado negativo para as fusões procuradas (seta azul). A coluna 3 e as colunas de 5-12 mostram pacientes positivos para alguma das fusões envolvendo o gene MLL (seta vermelha).



Fonte: Modificado de (EMERENCIANO, 2006).

4.7 Implicações no prognóstico

As características apresentadas pelo paciente com LLA definem qual o seu prognóstico. Os casos que podem ser considerados como prognósticos ruins segundo a FAB são de pacientes com número de leucócitos acima de $100.000/\text{mm}^3$, hepatoesplenomegalia acentuada, idade menor que 1 ano ou acima de 10 anos, infiltração blástica no sistema nervoso central e quando a leucemia é do tipo L2 ou L3. Já a classificação da OMS define o prognóstico dos pacientes de acordo com a anormalidade citogenética observada em cada caso (OLIVEIRA; NETO, 2004; LIMSUWANACHOT et al., 2016).

A análise das alterações citogenéticas presentes nos pacientes contribuem de maneira expressiva no diagnóstico e prognóstico da LLA, permitindo o entendimento de sua clínica e a detecção dos genes que estão levando a gênese da doença. Entre as anomalias cromossômicas numéricas, nas quais se incluem as hiperdiploidias e as hipodiploidias, é possível observar que apenas a segunda apresenta um mau prognóstico, necessitando de um cuidado maior (Quadro 6) (GALLEGO, 2012).

Quadro 6 - Anomalias frequentes na LLA e seus respectivos prognósticos

Anomalias cromossômicas	Genes	Prognóstico
t(11;21) p(13;q22)	TEL/AML1	Favorável
Hiperdiploidia	>50 cromossomos	Favorável
Hipodiploidia	<45 cromossomos	Desfavorável

Fonte: Modificado de (GALLEGO, 2012).

A presença do cromossomo Philadelphia (Ph+), decorrente da translocação t(9;22), está relacionada com altas taxas de falha indutória, sendo considerada como um fator de risco para o sucesso terapêutico. Vários estudos internacionais demonstraram que entre os casos de pacientes com LLA maus respondedores à terapia de indução, aproximadamente 20% apresentavam o cromossomo Philadelphia. A presença dessa alteração é considerada como um mau prognóstico e necessita, portanto, de uma terapia mais intensiva (HAMERSCHLAK, 2008; BRASIL, 2014).

Assim como o oncogene BCR/ABL, a presença de rearranjos envolvendo o gene MLL (11q23), muito comuns em crianças, como o AF4/MLL t(4;11) devem ser levados em consideração por também estarem relacionados a um quadro com mau prognóstico (SOUSA et al., 2015).

A presença da t(1;19) que leva a formação da fusão TCF3-PBX1 (E2A/PBX1), comum nos casos infantis de LLA, historicamente tem sido considerada como um caso de prognóstico ruim, no entanto em alguns casos pode ser considerada como risco intermediário. Estudos demonstram que o uso da terapia mais intensiva traz bons resultados neste caso (YEN et al., 2017).

Os rearranjos envolvendo o gene myc como as t(8;14) e (8;22) estão relacionadas com um quadro clínico agressivo, necessitando de uma terapia mais intensiva, se enquadrando portanto, assim como as outras translocações de mau prognóstico no grupo de alto risco (CAI et al., 2015).

Os casos de LLA tipo T, embora observados com uma menor frequência nas crianças, também apresentam características prognósticas, que tem sido estudadas e esclarecidas ao longo dos anos. A t(1;14)(p32;q11) é considerada uma

anormalidade com prognóstico favorável, ao contrário da t(11;14)(p13;q11), que apresenta um prognóstico ruim, necessitando de uma terapia mais intensiva, sendo inserida no grupo de tratamento de alto risco (SIMON et al., 2015; VLIERBERGHE; FERRANDO, 2012).

Já no caso da t(10;14)(q24;q11), também característica da LLA T, estudos demonstraram que os pacientes possuem uma maior chance de sobrevida por apresentar um prognóstico favorável, se encaixando, assim como as outras anormalidades com bom prognóstico, no grupo de tratamento de baixo risco (MISASI, 2009).

Quadro 7- Resumo das translocações observadas na LLA, juntamente com o prognóstico e o grupo de tratamento específico para cada caso

Translocações	Genes envolvidos	Prognóstico	Tratamento
(9;22) (q34;q11)	BCR/ABL	Mau	Grupo de alto risco
t(4;11)(q21;q23) t(11;19) (q23;p13) t(9;11) (p21;q23)	MLL	Mau	Grupo de alto risco
t(12;21) (p12;q22)	TEL/AML1	Bom	Grupo de baixo risco
t(1;19)(q23;p13)	E2A/PBX1	Mau	Grupo de alto risco
t(8;14) (q24;q32) t(8;22) (q24;q11) t(2;8) (q24;q11)	MYC	Mau	Grupo de alto risco
t(1;14)(p32;q11)	TAL1	Bom	Grupo de baixo risco
t(10;14)(q24;q11)	HOX11	Bom	Grupo de baixo risco
t(11;14)(p13;q11)	RBTN1	Mau	Grupo alto risco

4.8 Tratamento

A compreensão das anormalidades genéticas e suas consequências na leucemogênese e no prognóstico dos pacientes, estabelecendo os casos com alto e baixo risco, têm auxiliado no desenvolvimento de terapias mais específicas e com menor toxicidade, visto que muitas crianças têm sido curadas da leucemia, mas com o uso de tratamentos com uma elevada toxicidade, que muitas vezes trazem prejuízos em longo prazo. Os estudos atuais, levando em consideração as

características genômicas de cada paciente, buscam adaptar a intensidade do tratamento, melhorando os resultados para os pacientes pediátricos com LLA (THOMAS, 2015).

4.8.1 Quimioterapia

O tratamento da LLA pode levar de 2 a 3 anos dependendo do caso, os protocolos modernos o dividem em cinco fases que são: indução de remissão, intensificação-consolidação, reindução, prevenção da leucemia no sistema nervoso central e continuação ou manutenção de remissão (ELMAN; SILVA, 2006).

O primeiro protocolo multicêntrico para tratamento da LLA infantil surgiu na década de 80, dando surgimento ao Grupo Cooperativo Brasileiro de Tratamento de Leucemia Linfóide Aguda na Infância (GBTLI-LLA-80). Os estudos multicêntricos continuaram, chegando até o GBTLI-99 e os medicamentos utilizados neste protocolo produzem efeitos variados no organismo como, por exemplo, transtornos gastrointestinais, sensação de gosto metálico na boca e diminuição do apetite, mas mesmo diante dos sintomas colaterais apresentados, 70 a 75% das crianças têm sido curadas com o uso dos protocolos de tratamento (ELMAN; SILVA, 2006).

O desenvolvimento de novos medicamentos e o aperfeiçoamento dos protocolos terapêuticos têm sido o responsável pela sobrevivência de até 80% dos pacientes afetados pela LLA. Isto se deve a estratificação dos pacientes em diferentes grupos de risco, adequando cada um a tratamentos específicos (CAZÉ; BUENO; SANTOS, 2010). A classificação de grupos de risco é uma estratégia utilizada universalmente com o objetivo de reduzir a toxicidade em pacientes com prognóstico favorável e de intensificar a terapia em pacientes em que o prognóstico é considerado como desfavorável (OTERO et al., 2016).

No protocolo GBTLI-99, atualizado em 12 de dezembro de 2001, os pacientes são divididos em dois grupos, o de baixo e o de alto risco, de acordo com os achados diagnósticos e prognósticos, cada um com seus medicamentos específicos. No grupo de baixo risco de recaída estão os pacientes entre 1 e 9 anos, com a presença de alterações citogenéticas como a hiperdiploidia, t(11;21) p(13;q22), t(1;14)(p32;q11) e t(10;14)(q24;q11), com ausência de blastos em sangue

periférico, com baixa contagem de células leucêmicas na medula óssea até o 28º dia de indução e se houver comprometimento do SNC, o paciente deve apresentar, até o 14º dia de tratamento, ausência de blastos no exame do líquido cefalorraquidiano. E no grupo de alto risco de recaída se encontram os pacientes menores de 1 ano e maiores que 9 anos, com a presença de alterações citogenéticas como a hipodiploidia, a t(9;22), t(4;11), t(1;19), t(8;14), t(8;22) e a t(11;14), classificados como respondedores lentos ao tratamento, com presença de blastos em sangue periférico, comprometimento extenso da medula até o 14º dia de tratamento e evidências de acometimento leucêmico extramedular até o final da indução (CAZÉ; BUENO; SANTOS, 2010).

O tratamento dos pacientes com LLA é iniciado pela fase de indução, que possui como objetivo induzir a remissão morfológica completa em até 4 ou 6 semanas, restaurando assim, a hematopoiese normal. Nessa fase geralmente são utilizadas pelo menos três drogas sistêmicas, um glicocorticoide como a prednisona, por exemplo, vincristina e a L-asparaginase. Logo após, se inicia a fase de consolidação, na qual o objetivo é reduzir ainda mais a carga tumoral sistêmica (PIETERS; CARROLL, 2008).

Quando há a presença de comprometimento extramedular, como por exemplo, no Sistema Nervoso Central (SNC), que é o sítio mais acometido, principalmente em casos de recidivas (30 a 40% dos pacientes), a quimioterapia é realizada por via intratecal (diretamente no líquido cefalorraquidiano) (CANCELA, 2010). Nesses casos e também durante todas as fases de tratamento da LLA, segundo o protocolo GBTLI-99, é utilizada a combinação de medicamentos MADIT (metotrexato, citarabina e dexametasona) de acordo com a idade dos pacientes (Tabela 1) (CAZÉ; BUENO; SANTOS, 2010).

Tabela 1 – Quimioterapia baseada na combinação MADIT com administração intratecal

	IDADES			
	< 1 ano	1-3 anos	3-8 anos	> 9 anos
Metotrexato (mg)	8	10	12	15
Citarabina (mg)	16	20	24	30
Dexametasona	Máximo de 2 mg			

MADIT= metotrexato, citarabina e dexametasona administrados intratecalmente

Fonte: Modificado de (CAZÉ; BUENO; SANTOS, 2010).

Após a fase de consolidação, geralmente é realizada a fase de intensificação da terapia, em que, segundo o protocolo GBTLI-99, são administrados no grupo de alto risco de recaída os medicamentos Dexametasona (6 mg/m²/dia), Vincristina (1,5 mg/m²/dose), Doxorubicina (30 mg/m²/dose), L-asparaginase (5000 UI/m²/dose), Ciclofosfamida (1g/m²/dose), Citarabina (75 mg/m²/dose), Tioguanina (60 mg/m²/dia) e a combinação MADIT. Já no grupo de baixo risco, são administrados nessa fase apenas os medicamentos Metotrexato (2 g/m²/dose), 6-Mercaptopurina (50 mg/m²/dia) e a combinação MADIT (CAZÉ; BUENO; SANTOS, 2010).

Existe também no protocolo GBTLI-99 a fase de consolidação tardia que é realizada durante 8 semanas, tanto no grupo de alto quanto o de baixo risco, e são utilizados os medicamentos Dexametasona (6 mg/m²/dia), Vincristina (1,5 mg/m²/dose), Doxorubicina (30 mg/m²/dose), L-asparaginase (5000 UI/m²/dose), Ciclofosfamida (1 g/m²/dose) Citarabina (75 mg/m²/dose), usada exclusivamente no grupo de alto risco, Tioguanina (60 mg/m²/dia) e a combinação MADIT (CAZÉ; BUENO; SANTOS, 2010).

A última fase de tratamento é a de manutenção prolongada que pode durar de 1 ano e meio a 2 anos de acordo com cada protocolo. O tratamento consiste no uso de 6-mercaptopurina e metotrexato semanal e em alguns protocolos a administração de vincristina, glicocorticoide e da terapia intratecal (PIETERS; CARROLL, 2008).

Os pacientes que apresentam a t(9;22) são classificados em todos os protocolos como grupo de alto risco, necessitando por isso de uma terapia mais intensiva. A estratégia que tem sido utilizada nesses casos é a administração do medicamento mesilato de imatinibe juntamente com a terapia de indução. No entanto, para que seja obtida uma remissão completa e uma maior taxa de sobrevida, o ideal é que seja realizado o transplante alogênico de medula óssea (BRASIL, 2014; SCHAFFEL; SIMÕES, 2008).

Outro protocolo de tratamento que tem sido utilizado no tratamento da LLA infantil em vários países é o do grupo alemão Berlim-Frankfurt-Munster (BFM), que introduziu em 1981 uma nova combinação de medicamentos dividida em dois blocos diferentes de quimioterapia, baseada principalmente no uso do metotrexato. O uso deste protocolo tem trazido benefícios para os pacientes por diminuir o tempo de tratamento e aumentar a expectativa de vida, principalmente em pacientes de alto risco (PEÑA et al., 2014).

Recentemente, estudos nos EUA levaram a descoberta de uma terapia gênica contra o câncer, que tem sido utilizada em pacientes com LLA. Essa terapia se baseia na transferência de células T geneticamente modificadas, com a expressão do receptor de antígeno quimérico (CAR), no organismo do paciente. Essas células CAR-T reconhecem antígenos de superfície independente do MHC. Quando presentes no organismo, elas reconhecem os antígenos presentes nas células tumorais e as destrói (HARTMANN et al., 2017).

4.8.2 Transplante de células-tronco hematopoiéticas

Em alguns casos, a quimioterapia, considerada como base no tratamento contra a leucemia é incapaz de controlar a doença em longo prazo, sendo indicado nesses casos o transplante de células tronco hematopoiéticas. O TCTH é considerado eficaz na remissão das leucemias agudas, no entanto o índice de mortalidade e de complicações, como a doença do enxerto contra o hospedeiro, ainda é alto (LAMEGO et al., 2009).

A fonte de células-tronco hematopoiéticas mais utilizada em crianças é a medula óssea, utilizada em cerca de 54% dos casos, seguido pelo sangue periférico (27%) e pelo sangue de cordão umbilical (19%), que não é muito recomendado em crianças porque muitas vezes o dano genético é adquirido na vida intrauterina, razão para não ser utilizado o sangue de cordão que tenha sido criopreservado para uso familiar. O TCTH deve ser feito após a análise da compatibilidade HLA entre doador e receptor, no entanto, apenas 30% dos pacientes possuem um doador considerado compatível, o que leva a busca de doadores alternativos, aumentando o risco de incompatibilidade e consequentes complicações e rejeições do transplante (MORANDO et al., 2010; SEBER, 2009).

As características da doença, principalmente a citogenética, observada na medula óssea, no momento do diagnóstico definem se o paciente deve ser submetido à TCTH. Dessa forma, os pacientes com alto risco de recidiva possuem uma maior chance de cura. Estudos demonstraram que a sobrevida de pacientes com LLA submetidos ao TCTH alogênico foi de 25% em 15 anos. (LAMEGO et al., 2009).

Dentre as translocações observadas na LLA, a t(9;22) (q34;q11) está associada a um mau prognóstico, apresenta baixa resposta ao tratamento e se enquadra no grupo de alto risco de recaída, sendo um dos casos em que o transplante é a escolha para uma melhor resposta do paciente. Outro caso é a t(4;11) (q21;q23), que também apresenta prognóstico ruim com recaídas precoces, em menos de 2 anos, sendo neste caso o TCTH o tratamento recomendado (MINASI, 2009).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Leucemia Linfóide Aguda é uma doença com maior incidência entre as crianças, levando tanto a quadros mais severos quanto mais amenos. Por isso o diagnóstico precoce é muito importante, sendo necessário todo o fluxo de exames, que se inicia pelo hemograma, no qual é possível a observação dos blastos, seguido pelas provas citoquímicas, mielograma, biópsia e citometria de fluxo.

Atualmente a OMS classifica a LLA por meio das alterações citogenéticas observadas, presentes na maioria dos casos e diretamente relacionadas com o prognóstico dos pacientes. A identificação dessas anormalidades por meio da análise do cariótipo e por meio das técnicas moleculares como o FISH e o RT-PCR é imprescindível para o tratamento adequado dos pacientes, sendo assim possível a estratificação dos casos de acordo com o prognóstico apresentado.

Diversas anormalidades citogenéticas são observadas entre os pacientes com LLA, dentre elas as consideradas com prognóstico favorável são as hiperdiploidias, a t(11;21), a t(1;14) e a t(10;14), que se encaixam no grupo de tratamento de baixo risco e as anormalidades com mau prognóstico como a hipodiploidia, a t(9;22), t(4;11), t(1;19), t(8;14), t(8;22) e a t(11;14), que se encaixam no grupo de tratamento de alto risco. Essa estratificação tem possibilitado uma melhor qualidade de vida e uma maior chance de sobrevivência para os pacientes, por se adequar ao perfil de cada caso, intensificando a terapia nos quadros com maior risco e diminuindo a toxicidade nos quadros com prognóstico mais favorável.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, Renata de Almeida Lemos. **Alterações Citogenéticas em crianças portadoras de Leucemia Linfóide Aguda B no Amazonas**. 2015. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2015.

ALLAIRE, Carmen Gloria Artigas et al. Frecuencia de los genes de fusión TEL/AML1 y BCR/ABL en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. **Revista Médica de Chile**, Santiago, p.1367-1376, abr. 2006.

BALANDRÁN, Juan Carlos; PELAYO, Rosana. Ontogenia de los linfocitos B. **Revista Alergia México**, Cidade do México, v. 63, n. 1, p.71-79, enero. 2016.

BÉNÉ, Mc et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. **Nature**, Vandoeuvre Les Nancy, p.567-574, Jan. 2011.

BETANCUR, Octavio Martínez. Leucemias y radiación: juicio causal según los criterios de Sir Austin Bradford Hill. **Revista de La Facultad de Medicina**. p. 236-249. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas em Oncologia**. Brasília: Editora MS, 2014.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. . **Diagnóstico precoce do câncer na criança e no adolescente**: Principais grupos de neoplasias e suas recomendações. 2. ed. Rio de Janeiro: Inca, 2011.

BRITO, José Correia de Farias et al. Mielopatia transversa em adulto portador de Leucemia Aguda Linfoblástica. **Arquivo Neuropsiquiátrico**, João Pessoa, p.272-275, nov. 2001.

CAI, Qingqing et al. MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: biology, entity, differential diagnosis and clinical management. **Impact Journals**. Houston, p. 38591-38615. Sept. 2015.

CANCELA, Camila Silva Peres. **Incidência e fatores de risco para recidiva no sistema nervoso central em crianças e adolescentes com leucemia linfóide aguda: um estudo retrospectivo (março/2001 a agosto/2009) no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG**. 2010. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

CARULLI, Giovanni et al. B-cell acute lymphoblastic leukemia with t(4;11)(q21;q23) in a young woman: evolution into mixed phenotype acute leukemia with additional chromosomal aberrations in the course of therapy. **Hematology Reports**, Pisa, v. 4, n. 15, p.44-48, Jul. 2012.

CATELAN, Tânia Tiek Takao et al. Linfócitos B: da imunobiologia aos imunobiológicos. **Revista Brasileira de Medicina**, p.37-57, ago. 2009.

CAZÉ, Marcelino Oliveira; BUENO, Denise; SANTOS, Maria Elisa Ferreira dos. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para Leucemia Linfocítica Aguda Infantil. **Hcpa**, Porto Alegre, v. 30, n. 1, p.5-12, 18 mar. 2010.

CUNHA, Eduardo Mateus Tosta da et al. Incorporation of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of acute philadelphia chromosome-positive lymph. **Grupo Editorial Moreira Jr**, Uberaba, v. 72, n. 11, p.474-479, Jun. 2014.

ELMAN, Ilana; SILVA, Maria Elisabeth Machado Pinto e. Crianças Portadoras de Leucemia Linfóide Aguda: Análise dos Limiares de Detecção dos Gostos Básicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, São Paulo, v. 3, n. 53, p.297-303, out. 2006.

EMERENCIANO, Mariana. **As características moleculares das leucemias agudas de lactentes em coorte brasileira**. 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de

Pós-graduação em Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

EMERENCIANO, M.; KOIFMAN, S.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S. Acute leukemia in early childhood. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**. Rio de Janeiro, p. 749-760. Mar. 2007.

FARIAS, Mariela Granero; CASTRO, Simone Martins de. Diagnóstico Laboratorial das Leucemias Linfoides Agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Porto Alegre, p. 91-98. abr. 2004.

FONT, Isabel Granada. Citogenética de la leucemia linfoblástica aguda del adulto. **Med Clin**. Badalona, p. 23-28. 2007.

GALLEGO, Marta. Citogenética y su implicancia en Leucemias Agudas em Pediatria. **Medicina Infantil**, v. 19, n. 2, jun. 2012.

GIL, Erica Aires. **Investigação das alterações citogenéticas em pacientes pediátricos com Leucemia Linfoide Aguda do Rio Grande do Norte**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

GROTTO, Helena Z. W.. O hemograma: importância para a interpretação da biópsia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Campinas, v. 31, n. 3, p.178-182, fev. 2009.

HAMERSCHLAK, Nelson. Leukemia: genetics and prognostic factors. **Jornal de Pediatria**. São Paulo. 2008.

HARTMANN, Jessica et al. Clinical development of CAR T cells—challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. **Embo Molecular Medicine**, Langen, p.1-15, Aug. 2017.

HOFFBRAND, A. V.; PETTIT, J. E.; MOSS, P. A. H.. **Fundamentos em Hematologia**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

KAMPEN, Kim R.. The discovery and early understanding of leukemia. **Leukemia Research**. Groningen, p. 6-13. Oct. 2011.

LAMEGO, Rosana M. et al. Transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas em leucemias agudas: a experiência de dez anos do Hospital das Clínicas da UFMG. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Belo Horizonte, v. 2, n. 32, p.108-115, ago. 2009.

LIMSUWANACHOT, Nittaya et al. Multiplex RT-PCR Assay for Detection of Common Fusion Transcripts in Acute Lymphoblastic Leukemia and Chronic Myeloid Leukemia Cases. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**. Bangkok, p. 677-684. 2016.

LORENZI, Therezinha Ferreira (Org.). **Atlas de Hematologia: Clínica Hematológica Ilustrada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

MACÊDO, Thalita Medeiros Fernandes et al. Função pulmonar de crianças com leucemia aguda na fase de manutenção da quimioterapia. **Revista Paulista de Pediatria**, Natal, v. 32, n. 4, p.320-325, jun. 2014.

MAESTRE, Amanda; CASTAÑO, María Fabiola Toro. **Genética y ontogenia de células T**. Universidad de Antioquia Medellín: Fondo Editorial Biogénesis, 2010.

MINASI, Lysa Bernades. **Leucemia Linfóide Aguda na Infância: Importância do Diagnóstico Citogenético Convencional como Fator Prognóstico**. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Mestrado em Genética, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2009.

MORANDO, Juliane et al. Transplante de células-tronco hematopoiéticas em crianças e adolescentes com leucemia aguda. Experiência de duas instituições brasileiras. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Curitiba, p.350-357, 2010.

OLIVEIRA, Raimundo Antônio Gomes; NETO, Adelino Poli. **Anemias e leucemias: conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais**. São Paulo: Roca, 2004.

OTERO, Alejandro González et al. Protocolo ALLIC-BFM 2002 en el Instituto de Hematología e Inmunología: experiencia de 10 años December 21, 2015. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, La Habana, v. 32, n. 1, p.70-85, 2016.

PEÑA, Julio Alejandro et al. Complicaciones asociadas y análisis de supervivencia de niños con leucemias agudas tratados con el protocolo BFM-95. **Revista Universidad y Salud**, Pasto, v. 16, n. 1, p.9-21, mayo. 2014.

PIETERS, Rob; CARROLL, William L.. Biology and Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatric Clinics Of North America**. New York, p. 1-20. 2008.

RAJAGOPALA, Seesandra V. et al. **Gastrointestinal microbial populations can distinguish pediatric and adolescent Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) at the time of disease diagnosis**. **Bmc Genomics**. Rockville, p. 1-10. 2016.

REGO, Eduardo M.; SANTOS, Guilherme A. S.. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Ribeirão Preto. jul. 2009.

RILEY, Roger et al. Bone Marrow Aspirate and Biopsy: A Pathologist's Perspective. II. Interpretation of the Bone Marrow Aspirate and Biopsy. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**. Virginia, p. 259-307. Jan. 2009.

SÁNCHEZ, Manuel Alfredo Ortega; ORTEGA, María Luisa Osnaya; BARRIENTOS, José Vicente Rosas. Leucemia Linfoblástica Aguda. **Medicina Interna de México**. Pachuca, p. 26-33. fev. 2007.

SANTOS, Paulo Caleb Júnior de Lima; SILVA, Aleksandro Macedo; NETO, Luciane Maria Ribeiro (Org). **Hematologia: Métodos e interpretação**. São Paulo: Roca, 2013.

SCHAFFEL, Rony; SIMÕES, Belinda P.. Leucemia Linfoblástica Aguda Filadélfia positiva. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p.52-58, fev. 2008.

SEBER, Adriana. O transplante de células-tronco hematopoiéticas na infância: situação atual e perspectivas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 31, n. 1, p.59-67, 2009.

SILVA, Denise Bousfield; POVALUK, Patrícia. Epidemiologia das Leucemias em crianças de um Centro de Referência Estadual. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, Santa Catarina, v. 29, n. 1-4. 2000.

SILVA, Fernanda Azevedo. **Avaliação epidemiológica das leucemias linfoblásticas em crianças brasileiras e implicação de infecções na sua patogênese**. 2009. 123f. Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 2009. Disponível em:<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/Avaliacao_epidemiologica_das_leucemias_linfoblasticas_em_pa.pdf>. Acesso em: 21 out. 2016.

SILVA, Franciane F.; ZANDONADE, Eliana; ZOUAIN-FIGUEIREDO, Glaucia P.. Analysis of childhood leukemia mortality trends in Brazil, from 1980 to 2010. **Jornal de Pediatria**. Vitória, p. 587-592. Mar. 2014.

SILVEIRA, Paulo Augusto A. Hematopoese: alguns aspectos. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. Brasil, p. 5-6. 2000.

SIMON, Pauline et al. Different outcome of T cell acute lymphoblastic leukemia with translocation t(11;14) treated in two consecutive children leukemia group EORTC trials. **Annals Of Hematology**. Berlin, Sept. 2015.

SOUSA, Daniel Willian Lustosa de et al. Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Fortaleza, v. 37, n. 4, p.223-229, Apr. 2015.

SOUZA, Marcelo dos Santos. **Estudo Epidemiológico dos casos de Leucemia Linfóide Aguda nas crianças e adolescentes tratados no Centro de Tratamento Onco Hematológico Infantil – CETOHI, do Hospital Regional de Mato Grosso do**

Sul. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.

THOMAS, Angela. How can we improve on the already impressive results in pediatric ALL. **American Society Of Hematology**, Edinburgh, p.414-419. 2015.

THOMAS, Xavier; HEIBLIG, Mael. **The development of agents targeting the BCRABL Tyrosine Kinase as Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia treatment. Expert Opinion On Drug Discovery.** França. Aug. 2016.

THOMAS, Xavier. First contributors in the history of leukemia. **World Journal Of Hematology.** Lyon, p. 62-70. Aug. 2013.

TRAN, Thai Hoa; LOH, Mignon L.. Ph-like acute lymphoblastic leukemia. **American Society Of Hematology.** São Francisco, p. 561-566. 2016.

VIEIRA, Luisa et al. Acute lymphoblastic leukemia presenting with bilateral serous macular detachment. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, Lisboa, v. 6, n. 76, p.382-384, Feb. 2014.

VLIERBERGHE, Pieter Van; FERRANDO, Adolfo. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. **The Journal Of Clinical Investigation.** New York, p. 3398-3406. Oct. 2012.

ZAGO, Marco Antonio et al. **Tratado de Hematologia.** São Paulo: Atheneu, 2013.

ZOROVICH, Maria Eduarda Sanseverino; SOUZA, Thiago Arruda; FERREIRA, Eliana Perroud. Recaída testicular combinada de Leucemia Linfóide Aguda Pediátrica: Relato de caso. In: MOSTRA DE TRABALHOS ACADÊMICOS DO UNILUS, 8., 2014, Santos. **Anais...** Santos: UNILUS, 2015. p. 108.