UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VIRGÍNIA MARIA CÓSER

CARACTERIZAÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NOS REARRANJOS DO GENE *MLL* EM LEUCEMIA AGUDA *DE NOVO* DE LACTENTES

CURITIBA

2009

VIRGÍNIA MARIA CÓSER

CARACTERIZAÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NOS REARRANJOS DO GENE *MLL* EM LEUCEMIA AGUDA *DE NOVO* DE LACTENTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Genética.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro
Co-orientadora: Prof.ª Dr.ª Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira

CURITIBA
2009

*Para **Arthur e***
Jorge

filhos da filha,
e filhos do genro,
netos da avó e dos avôs,
bisnetos das bisavós,
e bisnetos dos bisavôs,
sobrinhos do tio e da tia,
primos irmãos da prima irmã,
sobrinhos netos de várias tias avós e tios avôs,
primos segundos de muitos primos segundos
e muitas primas segundas,
irmãos de quem ainda não chegou,
descendentes de tantos que já foram,
primeiro e segundo representantes da nova geração e

meus netos

AGRADECIMENTOS

Aos meus mestres, colegas e amigos

Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro
Iglenir João Cavalli

Maria do Socorro Pombo de Oliveira
Mariana Emerenciano
Juliane Menezes
Mariana Sant'ana de Oliveira
Synara Nô Seara Cordeiro
Marcela Braga Mansur

Waldir Veiga Pereira
Thereza Christina Sampaio Lafayette
Jacqueline Nunes Rodrigues
Liliane Zimmermann
Loraine Beatriz Acosta Veiga
Janine Kanheski
Laura Hannel
Roselaine Zanini
Turma do Ique
- Pacientes
- Funcionarios
- Voluntários

Colegas do Serviço de Hematologia Oncologia

Aos pacientes que nunca vi mas que me são tão próximos e seus pais que não conheço mas com os quais compartilho de suas tristezas e alegrias

A minha família

Patricia, Denis, Arthur
Ophélia Carmen Cóser
Pedro Luis, Maria José, Reinaldo Neto, Luis Henrique
Francisco Jose, Regina Marcia, Nicole, Rafael, Nathalia
Marcelo Salvador, Vera Lucia, Marcelo, Eduardo
Paulo, Vania Maria, Gabriel, Marina, Francisco
Reinaldo Fernando, Cristiane, Sophia, Helena
Mariseti, Clarici, Carine da Silva Lorensi

As outras famílias, do coração

Maria Célia, Jair Ribeiro
André, Pedro Ribeiro Gianberardino, Lurdes e Rosalina
Daniel Lima de Oliveira, Clarissa, Marina, Pedro Pombo de Oliveira, Josi

Aos amigos que não desistiram de mim

Ana Maria Zimmermann
Judith Zimmermann
Ana Maria Molina
Nádia Schneider
Miriam Seligman

Aos amados que desistiram tão cedo

Reinaldo Fernando Cóser
Flávia Cóser

Ando devagar porque já tive pressa
Levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Eu nada sei

Conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs,
É preciso amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir

Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada
Eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou
Estrada eu sou

Todo mundo ama um dia, todo mundo chora,
Um dia a gente chega, no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz

Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Cada um de nós compõe a sua história,
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz

Tocando em Frente - Almir Sater e Renato Teixeira

RESUMO

A leucemia de lactentes difere das demais por apresentar diversas características epidemiológicas e biológicas particulares, com destaque à alta freqüência do envolvimento do gene *MLL* que é rearranjado com uma variedade de outros genes (cerca de 50 já descritos), gerando produtos de fusão comprovadamente leucemogênicos, apesar de o mecanismo exato ser ainda desconhecido. A identificação do envolvimento do *MLL* é por si só de grande importância prognóstica e terapêutica, porém a identificação das seqüências parceiras assume importância desde que traz informações sobre os mecanismos básicos de leucemogênese, de possíveis alvos para terapias e pesquisa de doença residual mínima. Com o objetivo de estimar a freqüência e caracterizar os diferentes rearranjos do gene *MLL* em uma amostra brasileira de lactentes portadores de leucemia aguda *de novo*, foram analisados 112 pacientes provenientes do "Grupo Brasileiro de Estudos Colaborativos sobre Leucemia Aguda em Lactentes". Vários métodos laboratoriais foram utilizados de forma complementar (citogenética convencional e molecular, RT-PCR, *Southern Blotting*, LDI-PCR e seqüenciamento), de acordo com um fluxograma previamente estabelecido. Vinte pacientes (17,85%) eram portadores de alterações recorrentes e bem caracterizadas nas leucemias e foram excluídos da análise do gene *MLL*. Dentre os 92 restantes, 56 pacientes eram portadores de rearranjos no gene *MLL* (61%) e 36 não (39%). A alteração mais freqüentemente observada foi o rearranjo *MLL/AFF1*, observado em nove dentre os 56 pacientes positivos para o rearranjo considerando os diversos métodos (16,1%). O estudo corrobora a importância da utilização de diversas metodologias complementares na identificação do rearranjo do gene *MLL* e de seus parceiros, destacando a alta sensibilidade do método de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), que foi capaz de identificar 49 pacientes positivos em 82 (59,8%) em que a hibridização foi possível incluindo 38 casos que, sem esta análise, seriam dados como normais. Considerando que a limitação deste método é a não identificação do gene parceiro, a análise por LDI mostrou-se extremamente eficaz na complementação, identificando 9 de 13 casos analisados (69,2%), sendo que um destes rearranjado ao gene Nebulette, caracterizando um novo gene de fusão.

ABSTRACT

Infant leukemia differs from the other leukemias because it presents many unique epidemiological and biological characteristics, being the high frequency of the *MLL* gene the highlight. This gene is rearranged with a variety of other genes (at least 50 described), generating fusion products demonstrably leukemogenic, despite the exact mechanism which is yet unknown. The *MLL* enrollment identification is, by its own, of great prognostical and therapeutical importance, but the identification of the partner sequences assumes importance since it brings information on basic leukemogenesis mechanisms, possible targets for therapies and minimal residual disease researches. Aiming to estimate the incidence and characterize the different *MLL* gene rearrangements in a Brazilian sample of infants with acute *de novo* leukemia, 112 patients from the "Grupo Brasileiro de Estudos Colaborativos sobre Leucemia Aguda em Lactentes" were studied. Many laboratorial methods were used in a complementary way (conventional cytogenetic, molecular, RT-PCR, *Southern Blotting, LDI-PCR* and sequencing), according to a previously established flowchart. Twenty patients (17,85%) presented applicant changes and well characterized in the leukemias and have been excluded from the *MLL* gene analysis. From the 92 remaining patients, 56 presented *MLL* gene rearrangements (61%) and 36 didn't (39%). The most frequent change observed was the *MLL*/AFF1 rearrangement, observed in 9 of the 56 patients positive for the rearrangement, considering many methods (16,1%). The study corroborates the importance of the use of different methodologies that add to the identification of the *MLL* gene and it's partners, highlighting the high sensitivity of the fluorescence *in situ* hybridization (FISH), which was capable of identifying 49 positive patients in 82 (59,8%) in which the hybridization was possible, including 38 cases which, without this analysis, would have been considered normal. Considering that this method's limitation is the non identification of the partner gene, the LDI analysis has showed itself extremely effective in complementing, having identified 9 out of 13 cases studied (69,2%), one of these being rearranged to the Nebulette gene, characterizing a new fusion gene.

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura do gene *MLL* e da proteína MLL 47
Figura 2 – Cromossomos e Genes envolvidos em Rearranjos com o gene *MLL*.....48
FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS REALIZADOS NESTE ESTUDO.....74
Figura 5 - LSI® *MLL* Dupla Coloração 78
Figura 6 - Método de Hibridização *in situ* por fluorescência 79
Figura 7 - Reação de RT-PCR.....83
Figura 8 - Método de *Southern Blotting*.....84
Figura 9 - Método de LDI-PCR.....86
Figura 10 - Método de seqüenciamento automatizado do DNA 88
Figura 11- Metáfase observada no paciente 25: 46,XY,inv(16)(p13q22).....95
Figura 12 - Metáfase observada no paciente 76: 46,XX,t(4;11)(q21;q23).....97
Figura 13 - Metáfase observada na paciente 83: 46,XY,add(14)(p13) 100
Figura 14 - FISH de metáfase observada no paciente 83 100
Figura 15 - Metáfase observada no paciente 97: 44,XX,add(3)(p13),del(11)(p12) .101
Figura 16 - FISH - Metáfase observada por FISH no paciente 97 101
Figura 17 - FISH - Núcleos interfásicos observados por FISH no paciente 47 103
Figura 18 - Fluxograma dos procedimentos com resumo de resultados.....105

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação FAB para as Leucemias Linfóides Agudas 18
Tabela 2 - Classificação das LLA(s) baseada em alguns marcadores diferenciais...18
Tabela 3 - Classificação EGIL para as LLA(s) de linhagem B 19
Tabela 4 - Classificação EGIL para as LLA(s) de linhagem T 19
Tabela 5 - Classificação FAB das LMA(s).....20
Tabela 6 - Classificação EGIL para as LMA(s).....20
Tabela 7 - Classificação da OMS PARA AS LMA(s) 21
Tabela 8 - Doenças genéticas que facilitam a predisposição a LMA na infância.....23
Tabela 9 - Classificação dos Parceiros de fusão (FPG) do *MLL* 50
Tabela 10 - Número cromossômico modal.....52
Tabela 11 - Principais anomalias cromossômicas nas LLAs. 55
Tabela 12 - Principais anomalias cromossômicas nas LMAs. 59
Tabela 13 - Distribuição dos pacientes conforme sexo e etnia.....71
Tabela 14 - Grupo Brasileiro de Estudos Colaborativos sobre Leucemia Aguda em Lactentes 71
Tabela 15 - Distribuição dos pacientes conforme faixa etária e subtipo de LA 90
Tabela 16 - Contagens hematológicas.....92
Tabela 17 - Dados dos pacientes analisados por indice de DNA e citogenética 93
Tabela 18 - Resultados da ploidia identificada por citogenética nos 50 pacientes....94
Tabela 19 - Pacientes portadores de Alterações recorrentes não envolvendo o 11q23 identificadas por Citogenética e RT-PCR.....95
Tabela 20 - Alterações Citogenéticas recorrentes envolvendo o 11q23 e analises moleculares complementares 96
Tabela 21 - Pacientes com Citogenética sem alterações clonais e análises moleculares complementares 97
Tabela 22 - Resultados da analise por FISH para o gene *MLL* de acordo com a faixa etária.....99
Tabela 23 - Resultados da análise por RT-PCR.....99
Tabela 24 – resutados das análises por LDI-PCR, RT-PCR e FISH 102
Tabela 25 - Números absolutos e freqüências observadas das alterações cromossômicas, cariótipos normais e avaliações incompletas 104

Lista de abreviaturas

ABL	-	Gene *Abelson Leukemia Vírus*
AF9 ou *MLLT3*	-	Gene *myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3*
AFF1/AF4	-	Gene *AF4/FMR2 family, member 1*
AML1 ou *RUNX1*	-	Gene *Runt-Related Transcription Factor 2*
Ara-C		Citosina arabinoside
BCR	-	Gene *breakpoint cluster region*
CBF	-	*Core Binding Factor*
CCG	-	*Children´s Cancer Group*
CD	-	*Cluster Differentiation*
CREB	-	Proteína de ligação
del	-	Deleção
der	-	Cromossomo derivativo
de novo	-	Primária
DRM	-	Doença Residual Mínima
E12 e E47	-	Proteínas ativadoras de imunoglobulinas
E2A	-	Gene *Transcription Factor 3*
EGIL	-	*European Group for the Immunological Classification of Leukemias*
ENL ou MLLT1	-	Gene *myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 1*
ETO ou *RUNX1T1*	-	Gene *Eight Twenty One Factor ou runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)*
ETV6 ou *TEL*	-	Gene *Ets variant 6*
FAB	-	Classificação Franco-Americano-Britânica
FISH	-	Hibridização *in situ* por Fluorescencia
FLT3	-	Gene *fms-related tyrosine kinase 3*
GTG	-	Bandeamento G com Tripsina e Giemsa
HDA C	-	Histona desacetilase
HLA-DR	-	*Human leukocyte antigen de classe II – DR*
HOX	-	Gene *Homeobox*
HRX ou HTRX1	-	Gene *myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)*
IG	-	Imunoglobulina
IGF1	-	Gene *Insulin like growth factor*
INCA	-	Instituto Nacional do Câncer
inv	-	Inversão
LA	-	Leucemia Aguda
LDI-PCR	-	*Long-distance inverse* PCR
LLA	-	Leucemia Linfocítica Aguda
LLA-T	-	Leucemia Linfocítica Aguda de linhagem T
LMA	-	Leucemia Mielocítica Aguda
LMC	-	Leucemia Mielocítica Crônica
LMMCJ	-	Leucemia Mielomonocítica Crônica Juvenil
LPMA	-	Leucemia Promielocítica Aguda
MLL	-	Gene *Mixed Lineage Leukemia*
MLLT1 ou *ENL*	-	Gene *myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax*

homolog, Drosophila); translocated to, 1

MLLT3 ou AF9 - Gene *myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3*

MO - Medula óssea

MRC - Medical Research Council

MTX - Methotrexate

MYC - Gene *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*

N-COR - Co-repressor Nuclear

NEBL - Gene *Nebullete*

PBX1 - Gene *PBX/knotted 1 homeobox 1*

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

Ph - Cromossomo Philadelphia

PML - Gene *Promyelocytic Leukemia*

RARA - Gene *Retinoic Acid Receptor, Alpha*

RT-PCR - Transcrição Reversa e Reação em cadeia da polimerase

RUNX1 ou *AML1* - Gene *Runt-Related Transcription Factor 2*

SG - Sobrevida Global

SJCRH - *Saint Jude Children´s Research Hospital*

SLE - Sobrevida Livre de Eventos

SMD Síndrome Mielodisplásica

SNC - Sistema Nervoso Central

SP - Sangue periférico

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS....4
RESUMO....7
ABSTRACT....8
Lista de Figuras....9
Lista de Tabelas....10
Lista de abreviaturas....11
1 INTRODUÇÃO....15
2 REVISÃO DE LITERATURA....17
2.1 Conceito e classificação das Leucemias Agudas....17
2.2 Aspectos epidemiológicos das leucemias agudas da infância e adolescência e das leucemias agudas dos lactentes....22
2.3 Leucemia Linfocítica Aguda em Lactentes....24
2.4 Leucemia Mielocítica Aguda em Lactentes....27
2.5 Leucemias Secundárias....28
2.6 Leucemia no Período Fetal e Neonatal....32
2.7 Tratamento das leucemias agudas da infância e adolescência e das leucemias agudas dos lactentes....33
2.7.1 Tratamento das Leucemias Linfocíticas Agudas....33
2.7.2 Tratamento das Leucemias Linfocíticas Agudas dos lactentes....38
2.7.3 Tratamento das Leucemias Mielocíticas Agudas....40
2.7.4 Tratamento das Leucemias Mielocíticas Agudas dos lactentes....44
2.8 Gene *Mixed Lineage Leukemia* (*MLL*)....46
2.9 Citogenética das Leucemias Agudas....51
2.10 Citogenética das Leucemias Linfocíticas Agudas....52
2.10.1 Alterações Cromossômicas da LLA de Linhagem B....54
2.10.1.1 Translocação t(4;11)....54
2.10.1.2 Translocação t(12;21)....56
2.10.1.3 Translocação t(1;19)....57
2.10.2 Alterações Cromossômicas da LLA de Linhagem T....58
2.10.3 Citogenética das Leucemias Mielocíticas Agudas....59
2.10.3.1 Translocação t(1;22)....59
2.10.3.3 Translocações t(8;21)....60
2.10.3.4 Inversão do cromossomo 16 e t(16;16)....61
2.10.3.5 Translocação envolvendo a banda 11q23....62
2.10.3.6 Translocação t(15;17)....62
2.10.3.7 Anomalias numéricas....63
2.11 Avanços nos métodos moleculares....64
3 OBJETIVOS....69
3.1 Objetivo Geral....69
3.2 Objetivos Específicos....69
3.2.1 Estimar a freqüência do rearranjo do gene *MLL* em leucemias agudas *de novo* em lactentes da população brasileira,....69
3.2.2 Caracterizar os rearranjos mais freqüentes,....69
3.2.3 Avaliar a sensibilidade dos diferentes métodos de identificação do rearranjo do gene *MLL*.....69
4 MATERIAL E MÉTODOS....70
4.1 Caracterização da amostra....70

4.1.1 Desenho do estudo....72
4.2 Procedimentos técnicos....75
4.2.1 Citogenética de células da medula óssea....75
4.2.1.1 Obtenção das amostras....75
4.2.1.2 Cultura e Preparação Citológica....75
4.2.1.3 Bandeamento cromossômico GTG....76
4.2.1.4 Análise e cariotipagem....77
4.2.2 Hibridização *in situ* por fluorescência....77
4.2.3 Transcrição Reversa e Reação em cadeia da polimerase....80
4.2.3.1 Métodos de extração de DNA e RNA....80
4.2.3.1.1 Separação de linfócitos por Ficoll-Hipaque....80
4.2.3.1.2 Extração de DNA....80
4.2.3.1.3 Extração de RNA por TRIZOL®....81
4.2.3.2 RT-PCR....82
4.2.4 Southern Blotting....84
4.2.5 PCR Invertida de Longa de Distância....85
4.2.6 Seqüenciamento automatizado do DNA....87
4.3 Análise estatística....89
5 RESULTADOS....90
5.1 Caracterização da amostra....90
5.2 Dados Clínicos....91
5.3 Análise citogenética....92
5.4 Análise molecular....98
O fluxograma a seguir resume os resultados estratificados de acordo com as técnicas (FIGURA 18).....105
6 DISCUSSÃO....106
6.1 Dados clínicos e classificação....107
6.2 Ploidia....108
6.3 Alterações citogenéticas recorrentes que não envolveram a região 11q23....109
6.4 Alterações citogenéticas recorrentes que envolveram a região 11q23....111
7 CONCLUSÃO....115
8 REFERÊNCIAS....116
ANEXOS....130

1 INTRODUÇÃO

A leucemia dos lactentes tem características epidemiológicas, biológicas e clínicas bastante específicas. A maioria dos casos de leucemia linfocítica aguda (LLA) e de leucemia mielocítica aguda (LMA) nos lactentes é caracterizada pela contagem elevada de glóbulos brancos, doença extra medular volumosa, propensão a expressar marcadores fenotípicos linfóides e mielóides e translocações citogenéticas ou rearranjos moleculares do gene *Mixed Lineage Leukemia* (*MLL*), localizado no cromossomo 11, na região q23 (Yu, Honoki *et al.*, 1996). Quadro clínico semelhante é observado nas leucemias pós-terapia com epipodofilotoxinas e outros inibidores da topoisomerase II (Gurney, Severson *et al.*, 1995; Felix e Lange, 1999).

A incidência da leucemia aguda no primeiro ano de vida nos Estados Unidos é de 30 casos/milhão de nascidos vivos, sendo 20 casos/milhão para LLA e 10 casos/milhão para LMA (Gurney, Severson *et al.*, 1995; Felix e Lange, 1999).

Leucemias diagnosticadas nos primeiros 12 meses de vida são caracterizadas por uma distribuição igualitária de linfóide e mielóide e quanto aos subtipos compreendem de 2,5% a 5% de leucemias linfocíticas agudas e de 6% a 14% das leucemias mielocíticas agudas da infância (Pui, Kane *et al.*, 1995; Greaves, 1996). Em contraste com um excesso de meninos entre as crianças mais velhas com leucemia, há um ligeiro predomínio feminino entre as crianças menores de um ano com esta doença (Gurney, Severson *et al.*, 1995).

As translocações cromossômicas envolvendo o gene *MLL* estão relacionadas a subtipos específicos das Leucemias Mielocítica Agudas e Leucemias Linfocítica Agudas, caracterizando uma expressão diferenciada do gene de relevância prognóstica (Mrozek, Heinonen *et al.*, 1997).

Aproximadamente 50 diferentes genes que participam de translocações com o *MLL* já foram identificados, sugerindo que o mesmo se caracterize como uma região genômica favorável para eventos de recombinações ilegítimas. Nelas, um alelo *MLL* é fusionado reciprocamente com um dos muitos genes parceiros de translocação. Estes, por sua vez, codificam proteínas nucleares ou citosólicas que compartilham somente uma pequena seqüência de homologia; no entanto, as seqüências proteicas do parceiro do gene *MLL* na porção fusionada são necessárias para

conferir potencial oncogênico (Meyer, Schneider *et al.*, 2005).

A exata identificação das regiões do gene *MLL* e dos outros genes envolvidos nas translocações é necessária para apoiar decisões clínicas rápidas e regimes terapêuticos específicos. Procedimentos atuais para diagnosticar rearranjos de *MLL* incluem análise citogenética convencional e molecular, e métodos específicos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA), órgão governamental que atua na prevenção e controle do câncer em todo o Brasil, possui um importante papel ao agregar e qualificar profissionais na busca desta realização. No decorrer das últimas duas décadas, formou-se uma rede de estudos epidemiológicos das leucemias agudas da infância, que se consolidou no Grupo Brasileiro de Estudos Colaborativos sobre Leucemia Aguda em Lactentes.

Desde junho de 1999, um registro com base não-populacional foi criado com o objetivo de conduzir um estudo imunofenotípico e molecular em crianças com menos de dois anos de idade com leucemia aguda para determinar associações com fatores de risco selecionados, e caracterizar anomalias cromossômicas e marcadores moleculares nas leucemias agudas dos lactentes.

Inserido neste contexto, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de caracterizar os genes envolvidos em rearranjos com o gene *MLL* em leucemia aguda *de novo* dos lactentes a fim de estabelecer a freqüência e tipos de rearranjos nestes pacientes; as amostras foram submetidas a técnicas citogenéticas e moleculares com diferentes abrangências.

Os resultados obtidos são de relevância para que o diagnóstico e o tratamento melhorem de qualidade proporcionando a estes pequenos pacientes a chance de terem uma vida pela frente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conceito e classificação das Leucemias Agudas

A leucemia pode ser definida como a proliferação ou expansão incontrolada de células hematopoiéticas que não retêm a capacidade de diferenciação em células maduras do sangue. As leucemias resultam da expansão clonal de uma única célula tronco pluripotente que adquiriu sucessivas alterações genéticas, as quais se acumulam formando um único clone celular, conferindo vantagem proliferativa em relação às demais células e impedindo seu processo de diferenciação normal e morte subseqüente (Greaves, 2002).

A classificação morfológica das leucemias mais amplamente aceita Franco-Americana-Britânica 1976 (FAB) divide as LLA em três subtipos: L1, L2 e L3. Baseada nessa sistematização, a LLA pode ser classificada em morfologia L1: células com características linfóides (citoplasma escasso e nucléolo não bem definido), L2: forma mais pleomórfica e com nucléolo proeminente e citoplasma mais abundante e L3 apresentando citoplasma com intensa basofilia e presença de vacúolos (TABELA 1) (Bennett, Catovsky *et al.*, 1976; Pombo De Oliveira e Colaboradores, 2008).

Baseado no padrão de reatividade intracitoplasmática e/ou de superfície de anticorpos monoclonais, as LLA foram subclassificadas, de acordo com o grau de maturação da célula leucêmica em comparação com o caminho da diferenciação linfóide normal, em quatro subclasses de relevância clínica: leucemia precoce de origem B, que compreende a LLA pró-B e CALLA+ (55% de todas as leucemias linfóides), leucemia pré-B (25%), leucemia B madura (1%) e leucemia de origem T (15%). Exceto pela associação entre o subtipo L3 e LLA B madura, não existe correlação direta entre os subtipos definidos pela morfologia com a classificação imunológica (Basso, Buldini *et al.*, 2001).

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO FAB PARA AS LEUCEMIAS LINFÓIDES AGUDAS

Aspecto Morfológico	Subtipos FAB		
	L1	L2	L3
Tamanho das células	Predominância de células pequenas,	Grandes, heterogêneas	Grandes, homogêneas
Cromatina nuclear	Homogênea	Heterogênea	Pontilhada Homogênea
Forma do núcleo	Regular	Irregular, podendo apresentar fendas ou endentação	Regular oval ou redonda
Nucléolo	Indistintos ou não visíveis	Visível, podendo ser grande	Proeminente
Citoplasma	Escasso	Variável, podendo ser abundante	Moderado
Basofilia Citoplasmática	Leve a moderada	Variável	Intensa
Vacuolização	Variável	Variável	Proeminente

FONTE: Adaptado de: (Pombo De Oliveira e Colaboradores, 2008).

De acordo com o imunofenótipo, a LLA pode ser classificada como derivada de precursores de células B em torno de 70% dos casos, precursores de células T em 15% e de células B em menos de 5%.

Ainda, de acordo com o perfil de alguns marcadores celulares, podemos classificar as LLA(s) derivadas de precursores de células B em sub-tipo pró-B, Leucemia Comum, pré-B e transicional. Na pré-B há a presença de imunoglobulina no citoplasma, na Comum antígeno CD10 e, na pró-B a ausência deste antígeno (TABELA 2) (Riley Rs, Massey D *et al.*, 2002).

TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DAS LLA(S) BASEADA EM ALGUNS MARCADORES DIFERENCIAIS

	Imunoglobulina de Citoplasma	Freqüência %	Imunoglobulina de superfície	Presença de CD10	Receptores de células T
LLA Pró-B	-	4	-	-	-
LLA comum	-	54	-	+	-
LLA Pré-B	+	25	-	+	-
LLA B	-	5	+μ ou λ	±	
LLA T	-	15	-	±	+
LLA transicional	+μ	<1	+μ	+*	-

FONTE: Adaptado de: (Pereira, 2006).
NOTA:*em 80% dos pacientes

O sistema de escore para classificação das leucemias do *European Group for the Immunological Classification of Leukemias* **(**EGIL**)** é baseado no número e grau de especificidade dos marcadores linfóides (TABELA 3 e TABELA 4) e mielóides (TABELA 6) expressos nos blastos (Bene, Castoldi *et al.*, 1995; Egil, 1998).

TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO EGIL PARA AS LLA(S) DE LINHAGEM B

Todas as categorias são CD19+ e/ou CD79a+ e/ou CD22+; TdT+ para a maioria dos casos com exceção de células B maduras	
B-I (pró-B)	CD10(-), Ig Cy(-), Ig Ms(-)
B-II (comum)	CD10 (+)
B-II (pré-B)	IgM Cy (+)
B-IV (células B maduras)	κ ou λ Cy ou Ms

FONTE: Adaptado de: (Pombo De Oliveira e Colaboradores, 2008).
NOTA: Cy intracitoplasmático; MS membrana de superfície

TABELA 4 - CLASSIFICAÇÃO EGIL PARA AS LLA(S) DE LINHAGEM T

Todos os casos são positivos para CD3 Cy ou Ms; alguns são positivos para CD10	
T-I (pró-T)	CD7(+), CD2(-), CD5(-), CD1a(-)
T-II (pré-T)	CD2(+) e/ou CD5(+) e/ou CD8(+), CD1a(-)
T-III (T cortical)	CD1a(+), CD3 Ms(+) ou (-)
T-IV (T maduro)	CD3 Ms(+), CD1a(-)
* Grupo a	Anti-TCR α β (+) γ δ
* Grupo b	Anti-TCR γ δ (+)

FONTE: Adaptado de: (Pombo De Oliveira e Colaboradores, 2008).
NOTA: MS membrana de superfície

A TABELA 5 mostra a classificação morfológica FAB para as LMA(s) onde são descritos os oito subtipos e a TABELA 6 mostra a classificação EGIL das LMA(s) (Cheson, Cassileth *et al.*, 1990; Bene, Castoldi *et al.*, 1995; Vardiman, Harris *et al.*, 2002).

TABELA 5 - CLASSIFICAÇÃO FAB DAS LMA(S)

Sub-tipo FAB	Nomenclatura	Morfologia e critérios para diagnóstico
M0	LMA indiferenciada	Blastos com elevado grau de imaturidade
M1	LMA sem maturação	Blastos com diferenciação parcial; <20% e células monocíticas; <50% de eritroblastos
M2	LMA com maturação	>10% de células granulocíticas em maturação; <20% de células monocíticas; e <50% de eritroblastos
M3	Leucemia promielocítica aguda	>10% de promielócitos atípicos e hipergranulares; bastonetes de Auer
M3 ve Variante hiperbasofílica	Leucemia promielocítica (variante microgranular e hiperbasofílica)	Promielócitos atípicos com granulações finas;o núcleo pode apresentar forma semelhante a rim; na variante hiperbasofílica o núcleo é lobulado, citoplasma com basofilia intensa e grânulos ausentes ou em pequeno número.
M4	LMA mielomonocítica	>20% de células com morfologia monocítica; >20% de células granulocíticas; <50% de eritroblastos;
$M4E_o$	LMA mielomonocítica com eosinofilia	Eosinófilos anormais com grânulos eosinofílicos e basofílicos; >30% de blastos; <50% de eritroblastos.
M5a	LMA monoblástica	>80% das células representadas por monoblastos
M5b	LMA monoblástica	<80% das células são monoblastos, embora a maioria apresente morfologia monocítica.
M6	Eritroleucemia	>50% das células representadas por eritroblastos, incluindo formas megaloblastoides e multinucleadas; blatos não eritróides >30%.
M7	Leucemia megacariocítica	Megacarioblastos com morfologia heterogênea podendo assemelhar-se à blastos de LLA-L2, LMA-M0 e M1; células com projeções citoplasmáticas – megacariócitos grandes e atípicos, blastos mononucleados ou multinucleados intensivamente basófilos. Mielofibrose.

FONTE: Adaptado de: (Pombo De Oliveira e Colaboradores, 2008).

TABELA 6 - CLASSIFICAÇÃO EGIL PARA AS LMA(S)

1. Linhagem mielomonocítica[a]: Anti-MPO(+),CD13(+),CDW65(+), e/ou CD117(+), CD14(-)
2. Linhagem eritróide (eritróide pura M6) Blastos imaturos: não classificáveis por marcadores monoclonais Blastos maduros: anti-glicoforina A(+) e CD31(+)
3. Linhagem megacariocítica (M7): CD41(+) e/ou CD61(-) (MS/Cy), CD36(+)
4. LMA minimamente diferenciada (M0): somente definida por marcadores imunológicos. Fenótipo como em LMA mielomonocítica, mas com citoquímica e marcadores linfóides específicos negativos: CD3, CD79a, CD22.
5. LMA TdT(+)
6. LMA com expressão de antígenos linfóides(LMA+LY)

FONTE: Adaptado de: (Pombo De Oliveira e Colaboradores, 2008).
NOTA: [a]positivo com no mínimo dois ou mais marcadores mielóides; MS membrana de superfície; Cy intracitoplasmático

Mais recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs nova classificação para as LMA(s) baseada em critérios citogenéticos e de evolução da doença. A TABELA 7 apresenta esta classificação com abordagem pediátrica conforme proposto por Hasle (2003) (Hasle, Niemeyer *et al.*, 2003).

TABELA 7 - CLASSIFICAÇÃO DA OMS PARA AS LMA(S)

Subtipos
LMA com alterações citogenéticas recorrentes
LMA com t(8;21) (*RUNX1/ETO*)
LMA com inv(16) ou t(16;16) (*CBFβ/MYH11*)
Leucemia promielocítica aguda – t(15;17) (*PML/RARα)*
LMA com anormalidades 11q23(*MLL*)
LMA não caracterizada de outra forma
LMA minimamente diferenciada
LMA sem maturação
LMA com maturação
LMA mielomonocítica
LMA monocítica
LMA eritróide
LMA megacarioblástica (não relacionada à síndrome de Down (SD))
Sarcoma granulocítico (cloroma)
Síndromes Mielodisplásicas (Mieloproliferativas)
Leucemia Mielomonocítica juvenil
Leucemia Mielomonocítica crônica (secundária)
Leucemia Mielomonocítica crônica (Ph negativo)
Doença relacionada à síndrome de Down
Mielopoise anormal transitória
Leucemia Mielocítica em SD

FONTE: Adaptado de: (Pereira, 2006).

2.2 Aspectos epidemiológicos das leucemias agudas da infância e adolescência e das leucemias agudas dos lactentes

As leucemias agudas são as neoplasias mais comuns na infância até a idade de 15 anos. Representam em torno de 30% dos cânceres dentro desta faixa etária sendo a LLA a mais comum.

Cerca de 20% destas leucemias estão relacionados à LMA e em 80% à LLA. Ambas são doenças heterogêneas em relação a sua natureza biológica, apresentação clínica, especificidade terapêutica e evolução.

Na LLA há um pico de incidência na idade pré-escolar de 2 a 4 anos e na LMA este perfil é relativamente constante havendo um pico de pequena amplitude no primeiro ano de vida. Estas incidências praticamente se invertem na idade adulta havendo uma franca predominância da LMA (Swensen, Ross *et al.*, 1997).

A etiologia é ainda indeterminada, mas há uma série de fatores que tem sido atribuída a participação na causa das leucemias agudas. Várias especulações têm surgido para explicar o expressivo pico de incidência da LLA.

Registros epidemiológicos mais antigos não identificam um perfil semelhante ao atual. Parece que gradualmente foi se estabelecendo este comportamento que ocorreu primeiro em países desenvolvidos como o Reino Unido, Estados Unidos e posteriormente o Japão. Em populações menos desenvolvidas e sociedades afluentes este comportamento epidemiológico vem se estabelecendo lentamente (Swensen, Ross *et al.*, 1997; Greaves, 1999; Hrusak, Trka *et al.*, 2002; Bellec, Baccaini *et al.*, 2008).

Em crianças da raça negra nos Estados Unidos o esboço deste pico epidemiológico de incidência tornou-se perceptível a partir da década de 1980 (Smith, Morgan *et al.*, 1988). Uma das interpretações para este fato é da possibilidade de a restrição ambiental, o maior cuidado com as condições de higiene e restrições de contato interpessoal possa ter reduzido a exposição às infecções e retardado o amadurecimento do sistema imunológico (Macmahon, 1992).

Nas leucemias agudas de linhagem mielóide muitos dos fatores possivelmente relacionados à etiologia são de significado estatístico ainda discutível. Ao mesmo tempo em que a exposição a altas doses de radiação e a produtos

derivados do benzeno são consideradas importantes, o mesmo grau de evidencia não é confiado em relação a outros produtos químicos e baixas doses de radiação.

Num estudo realizado pelo *Children´s Cancer Group* (grupo CCG) usando metodologia de caso/controle, aspectos de exposições pré e pós-natal de produtos químicos, entre os quais eram incluídos derivados do petróleo, pesticidas, solventes e também radiações ionizantes, foram analisados (Buckley, Robison *et al.*, 1989). Um risco maior foi verificado em mães que consumiam maconha. Radiações com finalidade de diagnóstico durante o período intra-uterino, exposição a pesticidas e produtos derivados do petróleo no ambiente doméstico foram relacionados a uma maior incidência de leucemia. Quanto à maconha não fica excluída a possibilidade da participação de defensivos agrícolas que eventualmente possam ser usados nessa cultura ilícita.

Uma série de síndromes, algumas relacionadas à instabilidade cromossômica podem estar associados à maior freqüência de leucemia, mas devido à raridade de ocorrência a participação numérica é pequena (TABELA 8).

TABELA 8 - DOENÇAS GENÉTICAS QUE FACILITAM A PREDISPOSIÇÃO A LMA NA INFÂNCIA

Anemia de Fanconi
Síndrome de Down
Síndrome de Kostman
Ataxia teleangectasia
Síndrome de Bloom
Anemia de Blackfan-Diamond
Síndrome de Shwachman
Neurofibromatose
Síndrome de Klinefelter
Síndrome de Turner
Incontinentia pigmenti

FONTE: Adaptado de: (Pereira, 2006).

2.3 Leucemia Linfocítica Aguda em Lactentes

A leucemia aguda em lactentes é de ocorrência rara. Estabelecendo-se como 12 meses o limite superior de idade, representa em torno de 2,5% a 5% das LLA e de 6% a 14% das LMA em crianças. Isoladamente a LLA incide em 126 lactentes por ano nos Estados Unidos e parece haver uma ligeira predominância no sexo feminino. A relação de freqüência entre a LLA e a LMA em lactentes difere da observada na infância em geral, apresentando índices aproximadamente iguais (Gurney, Ross *et al.*, 1997).

Uma série de fatores clínicos, citogenéticos, imunofenotípicos, moleculares e terapêuticos caracterizam a LLA do lactente como uma doença que diverge essencialmente da LLA na infância e adolescência.

Clinicamente se manifesta com hepatoesplenomegalia, e envolvimento freqüente do SNC. Por vezes é observada em outros locais extramedulares, incluindo a pele. Certos sintomas e sinais como palidez, petéquias, equimoses e febre não diferem dos observados em crianças com idade superior a 1 ano (Pui, Kane *et al.*, 1995).

Laboratorialmente apresenta elevada leucocitose, às vezes, atingindo número de leucócitos em torno de 300000/µL. Em casos com leucocitoses não muito expressivas e sem características definitivas de LLA ou LMA torna-se necessário fazer diagnóstico diferencial entre reações leucemóides resultantes de sepsis, reações hemolíticas e principalmente hipóxia neonatal, (Sande, Arceci *et al.*, 1999).

Na LLA o imunofenótipo é caracterizado na grande maioria dos casos por não expressão do antígeno CD10 (CALLA¯), expressão dos marcadores TdT, CD19, HLA-DR. Ao mesmo tempo é comum a co-expressão de antígenos associados a linhagem mielóide, entre eles o CD15 e CD65 (Pui, Kane *et al.*, 1995).

A expressão do gene da mieloperoxidase na LLA especifica esta doença em lactentes. A ocorrência da LLA-T é muito rara nesta faixa etária. Cerca de 3% dos casos foram encontrados em uma população de 328 casos reunidos em uma série de 8 estudos citados por Pui et al. (1995) (Pui, Kane *et al.*, 1995).

As aberrações envolvendo a banda 11q23 podem ocorrer em até 80% dos casos e constitui, talvez, o evento mais importante que participa no desenvolvimento da LLA em lactentes, mas que tem conotação de influir de forma diversa no

prognóstico dependendo da idade do paciente (Felix e Lange, 1999; Biondi, Cimino *et al.*, 2000).

Um número crescente de genes associados ao *MLL* em translocações cromossômicas vem sendo descritos. A t(4;11) é a mais freqüente e talvez a mais bem caracterizada. As translocações t(1;11), t(6;11), t(9;11), t(10;11) e del(11q23) são também identificadas com certa freqüência (Felix e Lange, 1999).

Considera-se que há um inter-relacionamento entre a falta de expressão de CD10, a expressão de antígenos associados à linhagem mielóide e o rearranjo do gene *MLL* na LLA. Esta associação tem uma relação inversa com a idade do paciente. Embora haja uma forte correlação entre a falta de expressão de CD10, com rearranjos *MLL* na região 11q23, ela não é considerada completa (Hilden, Dinndorf *et al.*, 2006).

Em relação ao pior prognóstico imputado a t(4;11) em alguns estudos, este fato não tem sido sempre confirmado, quando outros genes associados à translocação envolvendo o gene *MLL* são considerados (Heerema, Arthur *et al.*, 1994; Rubnitz, Camitta *et al.*, 1999). É, no entanto, importante salientar que a t(4;11) não tem o mesmo significado prognóstico relacionando-se a idade. Há uma franca diferença de comportamento clínico observando-se uma pior evolução em lactentes comparada às crianças com mais idade (Pui, Frankel *et al.*, 1991; Pui, Behm *et al.*, 1994).

Dados derivados de 497 crianças e adultos jovens com LLA apresentando vários tipos de anormalidade na região 11q23 e incluindo as translocações t(4;11), t(9;11) e t(11;19) tratados com terapia intensiva acompanhada ou não de Transplante de Medula Óssea, revelaram que a idade foi o fator prognóstico mais importante (Pui, Chessells *et al.*, 2003). Lactentes abaixo de um ano de idade tiveram prognóstico significativamente pior enquanto crianças com idade maior tiveram um melhor prognóstico. Dependendo do regime de tratamento, a presença do rearranjo em 11q23 tem importante significado de mau prognóstico em não lactentes.

Nos lactentes todos os rearranjos envolvendo a região 11q23 resultaram em prognóstico desfavorável. Em pacientes com idade maior que 1 ano a t(4;11) e t(9;11) conferiram um pior prognóstico comparadas às outras alterações de 11q23. Nesta análise foram recrutados pacientes de 11 grupos ou instituições isoladas abrangendo o período de 1983 a 1995. Embora em lactentes a incidência de

anormalidades na banda cromossômica 11q23 seja de 60% a 80%, em crianças com idade superior a 1 ano estes rearranjos são observados em 4,5% a 5,7% dos casos sendo a t(4;11) a de maior freqüência observada em 2% de crianças e adultos (Pui, Chessells *et al.*, 2003).

A análise de 115 casos com a caracterização molecular do rearranjo *MLL* na região 11q23 cadastrados no protocolo CCG1953 mostrou que a comparação da sobrevida livre de eventos (SLE) entre os principais tipos de rearranjos não alcançou diferença significativa. Foram incluídas as t(4;11), t(9;11), t(11;19) e outras. A ordem decrescente dos fatores de impactos negativo para o prognóstico foi representada por negatividade de CD10, idade inferior a 6 meses e o rearranjo *MLL* (Hilden, Dinndorf *et al.*, 2006). Não foi observada diferença significativa na SLE entre os subtipos citogenéticos em lactentes pelo protocolo UKALL1987-1999 (UK Medical Research Council (MRC)) (Chessells, Harrison *et al.*, 2002).

Na LLA em lactentes são raras algumas aberrações citogenéticas encontradas com maior freqüência em crianças com idade superior a 1 ano, inclusive algumas características de bom prognóstico como hiperdiploidia maior de 50 cromossomos e a t(12,21). São também pouco freqüentes as translocações t(1;19) e t(9;22).

Várias características da LLA em lactentes sugerem que esta doença tenha origem em uma célula progenitora precoce com potencialidade de expressar características comuns às linhagens linfóides e mielóides. Esta hipótese pode ser reforçada pela imaturidade do rearranjo de genes de imunoglobulina (Wasserman, Galili *et al.*, 1992).

Baseada no perfil de expressão gênica a LLA com translocações envolvendo o gene *MLL* pode ser qualificada como uma entidade nosológica com características próprias e independentes das LLA(s) sem esta aberração. É inclusive sugerido renomeá-la como Leucemia de Linhagem Mista. Este conceito é apoiado pelas comparações de amostras com *MLL* a outras de LLA de precursores B, convencionais, com a ausência de rearranjo *MLL*. Cerca de 1000 genes, são sub-expressos e 200 são super-expressos no grupo que possui o rearranjo *MLL*. A diferença de expressão é tão significativa que se pode corretamente classificar 95% das amostras de células leucêmicas em *MLL*, LLA e LMA. Estes achados sugerem que o evento oncogênico ocorra em um progenitor hematopoiético ontogenicamente

muito imaturo e ainda não definido quanto à especificidade da linhagem (Armstrong, Staunton *et al.*, 2002).

Lactentes com o gene *MLL* em configuração de linhagem germinal (*germline configuration*), isto é, sem rearranjo deste gene apresentam geralmente CD10+ e ausência de marcadores mielóides assemelhando-se aos casos de LLA com progenitores B observados em não lactentes. Estes pacientes tem uma idade média mais elevada, em torno de 9 meses comparada a 4 meses nos casos com o rearranjo *MLL*. O número de leucócitos é menor (cerca de 20000/µL). A evolução é significativamente melhor apresentando SLE de 60 a 70%, portanto próximo da alcançada em não lactentes (Hilden, Dinndorf *et al.*, 2006; Pieters, Schrappe *et al.*, 2007).

2.4 Leucemia Mielocítica Aguda em Lactentes

Na apresentação clínica é comum a presença de grandes organomegalias (esplenomegalia e hepatomegalia). É também freqüente o comprometimento do SNC e presença de sarcomas granulocíticos que podem se situar em qualquer região anatômica, como por exemplo, a região retrobulbar do olho. A leucemia cutânea com a apresentação dermatológica característica é mais evidente quando esta ocorre no período neonatal. Apesar da presença de um grande volume de doença, acompanhada de leucocitose muito elevada, segundo as observações de alguns especialistas, a ocorrência de acidente cérebro-vascular e leucostase pulmonar é menos freqüente que em não lactentes. Em cerca de 50% destes pacientes a morfologia das células é de padrão mielomonocítico ou monocítico, FAB M4 e M5 respectivamente. Também aproximadamente metade destes lactentes apresenta rearranjos na região 11q23, da mesma forma, que na LLA uma série de genes estão associados ao rearranjo do *MLL* (Pui, Kane *et al.*, 1995; Felix e Lange, 1999; Sande, Arceci *et al.*, 1999).

A translocação t(9;11) parece ser a mais frequente seguida pela t(11;19). A presença de outras translocações mais comuns em crianças com LMA que incluem a t(8;21), t(15;17), inv(16) e t(11;16) são infreqüentes (Chowdhury e Brady, 2008).

Casos com morfologia (FAB M4 e M5) sem translocações do gene *MLL* pode incluir inv(16) com a morfologia (FAB M4) acompanhada de eosinofilia (FAB M4E0). Outras aberrações citogenéticas como a monossomia do cromossomo 7, del 7q, ou mesmo o cariótipo normal podem acompanhar estas morfologias.

O pico de incidência da LMA se apresenta no primeiro ano de vida ao contrário da LLA que é observado na idade pré-escolar na maioria das análises epidemiológicas. Cerca de 6 a 20% das LMA em crianças ocorre em lactentes.

A conotação de mau prognóstico, identificado na LLA em lactentes, que é considerada tanto pior quanto mais jovem é o paciente, não é observada na LMA.

Da mesma forma o rearranjo do gene *MLL* não tem o mesmo valor na definição do prognóstico como na LLA. Algumas translocações como a t(9;11) tanto em lactentes quanto em crianças, parecem estar relacionadas a um melhor prognóstico. São também incluídas como favoráveis em crianças com mais idade as translocações t(4;11), t(11;19), além da t(9;11). Em relação ao imunofenótipo tanto a LLA como a LMA em lactentes apresentam níveis elevados de expressão de CD15. (Johansson, Moorman *et al.*, 1998; Rubnitz, Camitta *et al.*, 1999; Biondi, Cimino *et al.*, 2000; Lie, Abrahamsson *et al.*, 2003).

2.5 Leucemias Secundárias

As leucemias secundárias ou também chamadas leucemias relacionadas à terapia são comuns e responsáveis por cerca de 40% de todas as LMA ou síndromes mielodisplásicas (SMD). Leucemia secundária é um termo coletivo usado para descrever um grupo de pacientes com LMA ou SMD que tenham história de exposição ambiental, ocupacional ou terapêutica (hematotoxinas ou irradiação). Podem ser grupos distintos, a clássica leucemia relacionada a terapia (t-LMA) que tipicamente ocorre 5 a 7 anos após exposição a agentes alquilantes e/ou irradiação; a mielodisplástica com envolvimento das três linhagens e citogeneticamente com deleções total ou parcial dos cromossomos 5 ou 7. Um pequeno grupo de pacientes que evolui para a leucemia secundária em curto espaço de tempo após o tratamento é caracterizado por anormalidades que envolvem o 11q23 e respondem por cerca de 3% de todas as leucemias mielóides secundárias. São pacientes significativamente

mais jovens e freqüentemente receberam inibidores da topoisomerase II (Dann e Rowe, 2001).

Após o tratamento da LLA com epipodofilotoxina, Etoposide (VP16) e Teniposide (VM26) vem sendo observadas leucemias secundárias de linhagem mielóide. Em estudo conduzido no *Saint Jude Children´s Research Hospital* (SJCRH) o uso destes quimioterápicos em intervalos semanais ou duas vezes por semana, tiveram um risco maior comparado ao que se observa em pacientes que receberam estes fármacos com espaço de tempo mais prolongado (Pui, Ribeiro *et al.*, 1991). O início da doença, via de regra, não passa por um período intermediário de mielodisplasia como geralmente é observado em leucemias secundárias relacionadas a agentes alquilantes (Kumar, 1993).

A morfologia predominante é a FAB M4 e M5. Citogeneticamente há rearranjos envolvendo a região 11q23, relacionado ao uso destes inibidores da topoisomerase II que facilita a quebra cromossômica participando desta maneira nas translocaçôes. A quase totalidade destas leucemias são de linhagem mielóide (Pui, Ribeiro *et al.*, 1991; Kumar, 1993). Em circunstâncias semelhantes pode ser raramente observada a LLA secundária (Andersen, Christiansen *et al.*, 2001).

A grande semelhança clínica e biológica entre as leucemias em lactentes com envolvimento da região 11q23 e a observada nos casos de leucemias secundárias relacionados ao uso das epipodofilotoxinas, impõe uma reflexão sobre a possibilidade de agentes etiológicos similares. O fato das leucemias em lactentes apresentarem uma série de peculiaridades em relação a crianças com mais idade, facilita a pesquisa de possíveis fatores etiológicos que atuaram num espaço de tempo limitado, tornando este rastreamento de mais fácil execução e, com maior aprofundamento de análise epidemiológica e biológica.

Desta maneira, o recrutamento de forma cooperativa de doenças raras para estes tipos de análises, como é o caso das leucemias em lactentes, pode contribuir na investigação orientada para o esclarecimento de fatores etiológicos de neoplasias e inclusive, sugerir ou implementar possíveis medidas de prevenção.

Hoje se sabe que as leucemias agudas podem ter origem ainda na fase intra-uterina de desenvolvimento. Um dos fatores que confirma esta ocorrência é a presença, em sangue de cordão umbilical armazenados, de aberrações cromossômicas em casos que mais tarde desenvolvem leucemias (Wiemels, Cazzaniga *et al.*, 1999; Biondi, Cimino *et al.*, 2000).

Em casos de gêmeos univitelinos foi possível identificar alterações moleculares idênticas em ambos os irmãos. Este fenômeno é interpretado como resultado do desenvolvimento da leucemia em um dos gêmeos e a transfusão de células leucêmicas para o outro, por via placentária, ou mesmo através da circulação da mãe. Em muitos casos eventos adicionais talvez sejam necessários para consolidar o fenótipo da célula leucêmica. O longo período de tempo que às vezes separa a ocorrência da leucemia entre estes pacientes sugere a necessidade de eventos posteriores, que inclusive possam ser de natureza ambiental.

Na t(12;21) a fusão dos genes *ETV6-RUNX1* (*TEL/AML1*) identificada em gêmeos univitelinos resulta na ocorrência de LLA em ambos em uma pequena proporção destes casos. Também são observados assincronismos do início da leucemia por períodos superiores a 10 anos (Wiemels, Cazzaniga *et al.*, 1999).

A origem da leucemia em lactentes na fase de vida intra-uterina já foi comprovada. Em gêmeos univitelinos o grau de concordância é elevado e pode alcançar uma freqüência em torno de 50%. Nestes casos o início da doença tem sido observado em períodos de poucos meses após o nascimento ou inclusive na fase neonatal. Também não há grande assincronismo entre o aparecimento da leucemia entre ambos os irmãos (Clarkson e Boyse, 1971; Ford, Ridge *et al.*, 1993).

É possível, nestes casos que somente um evento oncogênico seja suficiente para dar origem a transformação leucêmica (Gill Super, Rothberg *et al.*, 1994; Mahmoud, Ridge *et al.*, 1995; Bayar, Kurczynski *et al.*, 1996). Baseados nesta série de evidências surgiram as hipóteses de uma possível exposição fetal a vários produtos usados tanto como alimentos ou medicações, pela mãe no período de gestação, que poderiam atuar como inibidores da topoisomerase II.

Estudos epidemiológicos vêm sendo implementados usando o modelo caso/controle. No grupo CCG foi planejado um destes projetos para resgatar informações das mães de lactentes que já haviam participado em um dos três estudos prévios desenvolvidos pelo CCG sobre a possível exposição a estas substâncias. Neste protocolo foi criado um cadastro de alimentos que contém inibidores da topoisomerase II e uma gradação da exposição em baixa, média e elevada (Ross, Potter *et al.*, 1996). Em relação a potenciais inibidores da topoisomerase II foram incluídas as quinolonas, laxativos naturais, podofilina, derivados do benzeno e estrogênios sintéticos e nos alimentos: o genisteína (na soja), quercetina em cebolas, maçãs e outros, as catequinas no chá, no cacau e

vinho, cafeína e ácido elágico (amora). Nesta análise não houve uma associação positiva com a LLA, mas sim com a LMA que foi estatisticamente significante para graus de exposição médios e altos.

Outro estudo mais recente vem sendo elaborado pelo grupo COG de acordo com o modelo caso/controle e abrangendo um número maior de indivíduos. Com uma disponibilidade técnica maior, a presença ou não dos rearranjos no *MLL* foi caracterizada em mais de 80% dos casos. Na avaliação deste estudo é identificada uma associação fraca do índice de inibidores de topoisomerase II, nos casos de LLA/*MLL*+ e LLA/*MLL*-, ou LMA/*MLL*-. Nos casos com LMA/*MLL*+ houve uma tendência linear progressiva de aumento de incidência com a elevação de consumo de alimentos com topoisomerase II. Estes resultados são considerados preliminares e sujeitos a vieses que acompanham os estudos de caso controle (Ross, 2000; Spector, Xie *et al.*, 2005).

Algumas considerações vêm sendo feitas em relação aos níveis de bioflavonóides que seguem a ingestão de determinados alimentos. A biodisponibilidade de alguns destes produtos depende do alimento consumido. Um dos exemplos citados é o da quercetina cuja biodisponibilidade é de cerca de 30% quando provinda da ingestão de maçãs comparada a de cebolas (Hollman, Van Trijp *et al.*, 1997; Ross e Kasum, 2002). Em relação à permeabilidade placentária é importante salientar que metabólitos de fitoestrogênio que incluem genisteina, foram encontrados em níveis semelhantes no sangue do cordão e da mãe (Adlercreutz, Yamada *et al.*, 1999).

Uma das evidências que reforça a hipótese de os biflavonóides estarem relacionados a uma das possíveis causas das leucemias em lactentes, é a sua atuação produzindo quebras do gene *MLL* em linhagens celulares tanto de progenitores mielóides como linfóides. Especificamente a localização da quebra corresponde ao mesmo local observado no caso da droga Vepeside (VP16) (Strick, Strissel *et al.*, 2000). Uma análise caso-caso foi direcionada para a avaliação de inibidores da topoisomerase II e outros agentes com ação deletéria sobre o DNA que inclui dipirona, metronidazol, pesticidas e inseticidas. Os riscos foram considerados aumentados significativamente em relação ao uso de um pesticida e a ingestão de dipirona nos casos de lactentes com rearranjo do gene *MLL*. Não houve relação estatisticamente significativa no grupo com *MLL*- (Alexander, Patheal *et al.*, 2001).

Embora muitas evidências convirjam para uma relação causal destas substâncias em relação às leucemias durante o período fetal, muitas questões como o período crítico de exposição, a importância de certos polimorfismos de genes envolvidos na detoxificação e metabolismo de substâncias participantes da etiologia destas doenças permanecem pendentes exigindo novos estudos apoiados em novas tecnologias.

2.6 Leucemia no Período Fetal e Neonatal

Embora o neuroblastoma seja a neoplasia mais comum neste período, a leucemia é a de maior mortalidade, principalmente a LLA devido ao baixo índice de cura. O termo perinatal refere-se ao espaço de tempo próximo e após o nascimento e a designação neonatal é limitada ao primeiro mês de vida.

A leucemia fetal pode ocorrer em fases relativamente precoces da gestação com a suspeita baseada na detecção de polidrâmnio, hidropsia e hepatoesplenomegalia pela ultrassonografia e a confirmação pela análise do sangue de cordão em idade de até 33 semanas (Isaacs, 2003).

Tanto na LLA como na LMA há uma elevada co-expressão de antígenos mielóides e linfóides. As translocações envolvendo a região 11q23 são comuns e, portanto semelhantes ao que ocorre em outras idades durante o período de um ano após o nascimento. Morfologicamente na LMA predomina os subtipos FAB M4 e M5.

Neste trabalho devido ao seu objetivo, não será desenvolvido em detalhes as leucemias em pacientes com Síndrome de Down que correspondem à morfologia M7 com marcadores específicos para linhagem megacarioblástica e, às vezes com evolução auto limitada e resolução aparentemente espontânea.

O alto peso ao nascimento tem sido associado a um risco mais elevado de ocorrer leucemia na infância (Hjalgrim, Rostgaard *et al.*, 2004; Koifman e Pombo-De-Oliveira, 2008). Embora não se tenha explicações convincentes para sugerir o mecanismo envolvido nestes casos e em outro estudo relaciona o peso elevado ao nascer à ocorrência de LLA com rearranjo no gene *MLL*. Uma das hipóteses relaciona a um eventual aumento do nível de IGF1 (*Insulin like growth factor*) que poderia ter uma ação leucemogênica em células hematopoiéticas que previamente

apresentassem aberrações citogenéticas (Ross, Potter *et al.*, 1996; Tower e Spector, 2007).

Hipóteses sobre a influência de certos polimorfismos como os que implicam a redução de atividade do NADPH: quinona oxiredutase NQO1, tem sido mais freqüente em lactentes com leucemia. Também a deleção dos genes que codificam as Glutationas S tranferases (*GSTT1* e *GSTM1*) em pais de lactentes com leucemias parece elevar a incidência de leucemias nestes pacientes.

A presença de polimorfismos no gene do 5,10-Methylenetetrahydrofolate - *redutase* tem sido relacionada à patogênese da leucemia (Duthie, Narayanan *et al.*, 2002). A redução de atividade da enzima resultante que é importante para a síntese do DNA e manutenção da integridade da molécula. Num estudo caso-controle centralizado no INCA, não foi observada associação entre os polimorfismos 677>C ou 1298A>C em relação ao risco de LLA. No entanto, o alelo 677T foi relacionado a um risco menor de LLA. Na LMA o genótipo 677CT está também associado a um menor risco enquanto o genótipo 1298AC esteve acompanhado a um maior risco em crianças não brancas (Da Costa Ramos, Cartaxo Muniz *et al.*, 2006; Zanrosso, Hatagima *et al.*, 2006; Pombo De Oliveira, Koifman *et al.*, 2009).

2.7 Tratamento das leucemias agudas da infância e adolescência e das leucemias agudas dos lactentes

2.7.1 Tratamento das Leucemias Linfocíticas Agudas

O tratamento da LLA na infância e adolescência evoluiu de uma doença inicialmente fatal para curável em até 80 a 85% dos casos em um período inferior a quatro décadas. O uso racionalizado de fármacos que estavam disponíveis há quase 40 anos permitiu que gradativamente fossem atingidos patamares cada vez mais elevados de cura.

Durante a década de 1970 a LLA da infância foi reconhecida como uma doença curável, embora ainda houvesse descrença de muitos profissionais, que ainda a tratavam com finalidade paliativa.

O que se pode caracterizar como a era moderna deste tratamento, coincide com o reconhecimento de drogas que apresentavam maior atividade como indutoras de remissões e outras com melhor ação quando usadas posteriormente e, a longo prazo.

Inicialmente foi estabelecido o uso de um corticosteróide, a Prednisona (PRED) e a Vincristina (VCR), que associadas eram capazes de levar ao desaparecimento das células leucêmicas, à microscopia ótica, em mais de 90% dos pacientes com LLA. A participação deste par de drogas evidenciava o sinergismo, ou pelo menos, um efeito aditivo. A indução como começou a ser chamada esta fase do tratamento, tinha como componentes estes dois fármacos que eram usados em intervalos semanais para a VCR intravenosa e diários para o corticosteróide. Em aproximadamente quatro semanas era alcançada a remissão que se caracterizava pelo desaparecimento dos blastos (menos de 5% de células jovens com identidade indeterminada) e repopulação da medula óssea (MO) com células normais. Clinicamente o paciente devia estar restabelecido do desequilíbrio metabólico, da deficiência de hemostasia e recuperado de eventuais processos infecciosos. No sangue periférico (SP) o número de plaquetas, leucócitos e a taxa de hemoglobina se aproximavam das normais ou em tendência de elevação para a normalidade (Aur e Pinkel, 1973).

Na fase seguinte de continuação prolongada do tratamento (manutenção) foram tentadas várias alternativas, incluindo a monoterapia, às vezes, seqüencial adicionando outras drogas. Por fim estabeleceu-se como espinha dorsal desta fase a associação do Methotrexate (MTX), geralmente semanal e da 6-Mercaptopurina diária.

Com o controle da doença sistêmica por períodos cada vez mais prolongados, começou-se a observar a recidiva da doença no sistema nervoso central, que foi caracterizado como um santuário, onde drogas administradas por via sistêmica não venciam a barreira hemato-encefálica com concentração suficiente para erradicar a doença sub-clínica presumivelmente pré-existente.

Ao longo de vários ensaios no SJCRH que incluíram a radioterapia em doses crescentes até 24 Gy dirigida ao neuro-eixo ou à associação do MTX à irradiação craniana foi alcançada a prevenção da neuroleucemia em mais de 90%, quando anteriormente atingia cifras acima de 50% dos casos. A interação das três fases de tratamento, indução, profilaxia do SNC e manutenção, passou a ser chamada de

Terapia Total. Durante a década de 1970 foi consolidado este conceito, que representou uma fase muito importante de desenvolvimento de protocolos de investigação desenvolvidos nessa instituição e, em vários grupos cooperativos nos Estados Unidos e em outros países (Aur e Pinkel, 1973).

Desde então algumas novas drogas foram incluídas e a configuração dos protocolos foi adicionada de outros componentes.

Um dos fatos importantes foi o da interdependência das diversas fases do tratamento. Enquanto se pensava que a indução era fundamental somente para se alcançar uma remissão, tornou-se evidente que a intensificação desta fase repercutiu na evolução posterior do paciente propiciando índices mais elevados de Sobrevida Livre de Eventos (SLE) e Sobrevida Global (SG).

Entre as drogas acrescidas podem ser salientadas a L Asparaginase e os antracíclicos, principalmente a Daunorrubicina e a Doxorrubicina. No grupo BFM (*Berlin-Frankfurt-Münster*) foi implementado um protocolo em que a indução-consolidação somava os fármacos: Pred, VCR, Doxo, L-Aspar, Ciclo, Citosina arabinoside (Ara-C), 6MP e MTX IT (Clavell, Gelber *et al.*, 1986). Esta sistematização elevou os índices de SLE e SG, inicialmente de 40% para 70% em certos grupos de pacientes. Em vários estudos foi acrescentada a fase de intensificação-consolidação, que consiste no uso de quimioterapia intensiva, partindo de uma medula em remissão. Essa fase visa reduzir adicionalmente a população residual de células leucêmicas (Dahl, Rivera *et al.*, 1987; Nachman, Sather *et al.*, 1997; Heerema, Sather *et al.*, 1998; Raffini, Slater *et al.*, 2002). Em alguns regimes de intensificação são usadas altas doses de MTX, geralmente entre 1g/m² e 5g/m² acompanhada de resgate com leucovorin (Gustafsson, Schmiegelow *et al.*, 2000). Com este tipo de terapia tem sido observada uma redução sensível do número de recidivas em testículo e sistema nervoso central.

Outras drogas como os derivados da epipodofilotoxina têm também sido incluídas em casos de risco elevado (Dahl, Rivera *et al.*, 1987).

Consolidações posteriores, ao longo do tratamento, com formato de induções, isto é, incluindo VCR e corticosteróides, geralmente dexametasona e L-Asparaginase, tem se mostrado serem importantes para certos grupos de risco e fazem parte da maioria dos protocolos atuais.

O longo período de tempo da terapia de manutenção particulariza a LLA das demais neoplasias. Na maioria dos protocolos, se estende pelo mesmo período de

dez ou mais meses. As doses dos quimioterápicos são relativamente baixas e ajustadas à toxicidade medular controlada pelo nível de hemoglobina, número de leucócitos e plaquetas e tolerância clínica. Os quimioterápicos básicos são a 6-Mercaptopurina diária e a MTX semanal. Variações de administração destas drogas são freqüentes e objeto de protocolos de investigação. Em muitos regimes são intercalados pulsos de terapia com outras drogas como a VCR e corticosteróides (Chessells, Harrison *et al.*, 2002).

Uma das modificações importantes que ocorreram na Terapia Total para o tratamento da leucemia sub-clínica em SNC na LLA foi a substituição, na grande maioria dos casos, da irradiação do SNC pela quimioterapia intratecal. Ainda hoje é objeto de estudo a inclusão da radioterapia em doses mais baixas em casos de maior risco.

A interdependência da quimioterapia sistêmica e o controle da doença sub-clínica em SNC é também muito importante. Em estudos nas transições das décadas de 1960 e 1970, níveis de radioterapia da ordem de 12 Gy eram ineficientes, o que não ocorre atualmente com regimes de quimioterapia substancialmente mais intensos. Sullivan et al.(1982), demonstrou a equivalência da quimioterapia IT comparada a radioterapia (Sullivan, Chen *et al.*, 1982). Visto a radioterapia poder induzir a complicações tardias que incluem distúrbios cognitivos, disfunção neuroendócrina, redução do crescimento e aparecimento de tumores secundários (Blatt, Bercu *et al.*, 1984; Mulhern, Wasserman *et al.*, 1988; Mulhern, Fairclough *et al.*, 1991; Neglia, Meadows *et al.*, 1991; Ochs, Mulhern *et al.*, 1991; Jankovic, Brouwers *et al.*, 1994).

A quimioterapia intratecal é iniciada no começo da indução e estendida durante os períodos posteriores de tratamento com número de aplicações e intervalos variáveis dependendo do regime proposto e do nível de risco do paciente. Isoladamente o fármaco mais usado é o MTX. A terapia tríplice com a associações de MTX, Ara-C e corticosteróide (dexametasona ou hidrocortisona) é hoje a mais freqüentemente usada.

Na maioria dos protocolos desenvolvidos pelos grupos cooperativos nos países desenvolvidos são alcançados índices de sobrevida global em torno de 80% (Brandalise, Odone *et al.*, 1993; Tubergen, Gilchrist *et al.*, 1993; Schrappe, Reiter *et al.*, 2000; Brandalise, Viana *et al.*, 2004; Pui, Sandlund *et al.*, 2004; Moricke, Reiter *et al.*, 2008).

Um dos fatores mais relevantes no desenvolvimento dos protocolos para a LLA foi a identificação de fatores prognósticos, o que permite adaptar a intensidade do tratamento por vezes, a configuração do regime terapêutico de acordo com o nível de risco do paciente. Assim, alguns subtipos de LLA com prognóstico muito desfavorável como a LLA T e a LLA B passaram a ter sobrevidas próximas as alcançadas pelas formas mais comuns da doença como a LLA pré-B precoce e pré-B. No primeiro caso a intensificação do tratamento nas fases iniciais e no segundo a modificação do regime, tendo como drogas fundamentais a ciclofosfamida e o MTX, em doses intermediárias ou altas, e o tratamento com duração menor (< de 1 ano) assemelhando-se ao usado em linfomas B de pequenas células não clivadas (Patte, Philip *et al.*, 1986; Anderson, Jenkin *et al.*, 1993; Reiter, Schrappe *et al.*, 1999; Gaynon, Trigg *et al.*, 2000; Patte, Auperin *et al.*, 2001; Woessmann, Seidemann *et al.*, 2005).

Hoje um conceito simplificado de fatores de risco patrocinado pelo *National Cancer Institute* (NCI) em que as crianças são agrupadas em risco standard: idade entre 1 e 9 anos com LLA de células B precursoras e número de leucócitos <50.000/µL; alto risco: leucócitos > 50.000/µL e idade >igual 10 anos.

Outros fatores adicionais são também importantes: mensuração da doença residual mínima, resposta inicial ao uso de corticosteróides tanto na avaliação do SP como na MO, presença de hipodiploidias, t(9;22) e outras aberrações citogenéticas como as translocações envolvendo a banda 11q23 comentado em outras seções deste estudo (Mastrangelo, Poplack *et al.*, 1986; Smith, Bleyer *et al.*, 1996).

Nomenclaturas especiais de risco têm sido usadas por diferentes grupos cooperativos (Pui, Sallan *et al.*, 2001). Fatores raciais são ainda de interpretação controversa (Pui, Boyett *et al.*, 1995; Pollock, Debaun *et al.*, 2000). Na verdade, com o aprimoramento do tratamento, alguns fatores de mau prognóstico perderam a sua importância ou tiveram o seu valor atenuado (Pui e Evans, 2006).

2.7.2 Tratamento das Leucemias Linfocíticas Agudas dos lactentes

Ao contrário dos resultados excepcionais observados na LLA na infância e adolescência, o mesmo não ocorre com os lactentes, que apresentam idade inferior a um ano.

Nos lactentes sem alterações na banda 11q23, com os genes em configuração germinal e CD10+ os resultados do tratamento são semelhantes aos alcançados em crianças acima de dois anos de idade. Admitindo-se que em torno de 80% dos lactentes apresente aberrações envolvendo o gene *MLL*, a população de prognóstico favorável é muito pequena, visto a raridade de incidência da LLA neste grupo etário. A proposta de tratamento para este grupo de pacientes tem sido variada, podendo-se inclusive, considerar regimes usados em pacientes com idade superior a um ano.

Em dois estudos do CCG foram observadas SLE de 33% e 39% embora constasse de quimioterapia intensiva que incluía altas doses de MTX e Ara-C com tolerabilidade satisfatória. O baixo nível da SLE deveu-se aos óbitos conseqüentes às recidivas. Devido às seqüelas conseqüentes à radioterapia do SNC estes pacientes receberam quimioterapia IT (Reaman, Sposto *et al.*, 1999).

Comparado a estudos históricos deste grupo com índices de sobrevida de 22% estes foram considerados superiores, atribuindo-se os melhores resultados a intensificação do regime. Foram considerados como fatores de mau prognóstico: idade inferior a 3 meses, leucócitos em número acima de 50.000/µL, CD10 negativo, resposta lenta à indução e a ocorrência da t(4;11) (Reaman, Sposto *et al.*, 1999).

No grupo UK foram implementados dois protocolos denominados Infant 87 e Infant 92, sendo que neste último foi admitida a possibilidade de transplante de MO em primeira remissão, tanto de doadores aparentados como não aparentados. As SLE foram: de 33% no Infant 92 e 22% no Infant 87; curiosamente a sobrevida não foi superior nos pacientes com expressão do antígeno CD10, apesar de terem sofrido um menor índice de recidiva medular. Nestes protocolos também foram usadas doses elevadas de MTX e AraC (Chessells, Harrison *et al.*, 2002).

O transplante de MO em lactentes é ainda motivo de controvérsia.

No Japão um grupo de lactentes com rearranjo 11q23 foi tratado com regime intensivo de quimioterapia e posteriormente receberam transplante de MO. A SLE foi

de 43,6%. Foram selecionados como fatores de mau prognóstico: idade inferior a 6 meses, número de leucócitos >100.000/µL e casos com comprometimento do SNC (Kosaka, Koh *et al.*, 2004).

Na análise do protocolo CCG 1953 o tipo de translocação ocorrida: t(4;11), t(11;19) e t(9;11) não tiveram diferença estatisticamente significante nos resultados do tratamento. A SLE em 4 anos foi de 36,6% nos pacientes com rearranjo de 11q23 e de 60% nos com *MLL* em configuração germinal (Hilden, Dinndorf *et al.*, 2006).

Entre 1999 e 2004 foi desenvolvido o protocolo Interfant 99 que foi implementado com capacidade para captar pacientes em escala internacional, visto a raridade da LLA em lactentes e a dificuldade de reunir um número suficiente de casos para análise em um espaço razoável de tempo, somente com pacientes oriundos de grupos cooperativos, ou de instituições com atividade individualizada. Nesse estudo a estruturação do regime foi híbrida, embora tenha sido observado dominantemente um esquema intensivo para LLA, foram também associados componentes de tratamento apropriados para a LMA com a inclusão de Ara-C em doses baixas e elevadas (Pieters, Schrappe *et al.*, 2007).

A sensibilidade a Ara-C *in vitro* de células de LLA de lactentes e, in vivo de pequeno número de pacientes adultos com LLA pró-B e também de lactentes, favorece a inclusão desta droga no tratamento deste grupo de pacientes. Neste estudo foram registradas 482 lactentes com LLA, que foram tratados com o regime misto, tendo alcançado uma SLE de 47% (Pieters, Schrappe *et al.*, 2007).

Noventa e cinco pacientes foram randomizados para receber um curso de intensificação tardia de quimioterapia que repetia altas doses de AraC, MTX e convencionais de 6MP, VCR associadas ao tratamento IT. Não houve, no entanto superioridade de SLE com a adição deste bloco de quimioterápicos e a toxicidade foi considerável. Os investigadores desse grupo consideram que os resultados desse protocolo são superiores à maioria dos estudos até agora realizados (Pieters, Schrappe *et al.*, 2007).

Mesmo com a grande intensificação dos regimes de quimioterapia o progresso tem sido lento e de resultados ainda insatisfatórios.

É improvável que, com o arsenal de terapia ablativa até o momento disponível, possamos alcançar níveis satisfatórios de sobrevida, sem morbidade aceitável. Uma das expectativas é o aparecimento de novas drogas com mais especificidade para essa doença. Outras estratégias deverão ser associadas ao

tratamento com os inibidores de *FLT3* e drogas que participem da diferenciação celular como o Ácido trans retinóico (ATRA), 5-Azacitidina e agentes que ajam desmetilando genes supressores como a Decitabina, já em uso nas mielodisplasias. Várias propostas de terapêuticas dirigidas a alvos moleculares vêm sendo cogitadas (Niitsu, Hayashi *et al.*, 2001; Stam, Den Boer *et al.*, 2006).

2.7.3 Tratamento das Leucemias Mielocíticas Agudas

O tratamento da LMA da infância e adolescência teve um menor progresso comparado ao obtido em outras neoplasias comuns neste grupo etário e passou da condição de doença incurável para a de controlável em cerca de 40 a 50% dos casos. Tanto a quimioterapia intensiva como as diversas modalidades de transplante de células progenitoras hematopoéticas contribuíram para alcançar estes níveis de cura. Também foi importante a melhoria dos cuidados de suporte, principalmente relacionados ao controle de infecções (Pereira, 2006).

O primeiro objetivo a ser alcançado é a remissão completa; sem atingir esta condição ficam comprometidas as fases subseqüentes da quimioterapia e as possibilidades de cura tornam-se mínimas.

O tratamento de indução da LMA só tornou-se eficaz a partir da disponibilidade da Ara-C e dos antraciclínicos. A remissão completa, por vezes prolongada, com o uso individual de uma destas drogas, tornou-se real, embora beneficiando uma pequena fração dessa população de pacientes. O passo seguinte foi a associação destes quimioterápicos, que mostrou ter efeito terapêutico aditivo. Várias formas de combinações foram avaliadas, respectivamente, variando as doses, o período de tratamento e a maneira de administração desses fármacos. A Ara-C foi administrada por via subcutânea e, endovenosa por infusão rápida ou contínua. O período de tratamento na maioria dos estudos, variou entre 5 e 10 dias e as doses entre 100 mg/m^2 e 200 mg/m^2 diários (Pereira, 2006).

Os antraciclínicos inicialmente disponíveis, Doxorrubicina e Daunorrubicina (Dauno), foram usados por infusão venosa em doses geralmente entre 40 e 60 mg/ m^2 I.V. durante 3 dias. O tratamento durante sete dias com Ara-C e três dias com Dauno, conhecido como o regime 7+3 foi o mais divulgado e capaz de induzir a

remissão completa em 70 a 80% dos pacientes. A infusão contínua de Ara-C mostrou-se mais eficaz, comparada a doses equivalentes administradas por infusão rápida, mas a toxidade gastrointestinal foi possivelmente maior. Doses diárias de 200 mg/m^2 não mostraram ser mais eficazes que as de 100 mg/m^2 em infusão contínua (Dillman, Davis *et al.*, 1991).

Num estudo desenvolvido na Austrália, os pacientes que receberam adicionalmente altas doses de Ara-C e VP16 tiveram sobrevida maior, comparada aos tratados com doses convencionais (Bishop, Matthews *et al.*, 1996). Outro tipo de intensificação inicial foi proposto no protocolo CCG que consta na iniciação do segundo ciclo dez dias após o começo do primeiro, independente do quadro citológico medular, em um dos grupos de pacientes, ou após quatorze ou mais dias, dependendo da recuperação medular no outro grupo. Embora os índices de remissão tivessem sido equivalentes, a mortalidade inicial foi maior nos pacientes que receberam a modalidade intensiva. No entanto, a sobrevida deste grupo foi superior a observada nos pacientes que receberam o regime convencional.

O tratamento pós-remissão tem como alvo a doença residual mínima (DRM). Estima-se que quando alcançada a remissão possam ainda ser viáveis no paciente, mais de 10^9 células leucêmicas, o que corresponde a um número inacessível à detecção pelos métodos convencionais de análise da MO.

Clinicamente, a presença da DRM (Doença Residual Mínima) pode ser inferida pela recidiva sistemática dos pacientes que não recebem tratamento adicional. Atualmente, a proposta desta terapia resume-se ao transplante de células hematopoéticas alogênicas e autólogas, mais raramente singênicas e a quimioterapia (Pereira, 2006).

Visto, aproximadamente, dois terços dos pacientes não terem doadores aparentados, e, ainda, a dificuldade de recrutar um doador não aparentado, torna a quimioterapia torna-se o procedimento mais usado para esses casos.

Historicamente, esse tratamento constava de quimioterapia pouco intensa, tendo passado para regimes mais mielossupressores, devido ao alto índice de recidivas observadas com a quimioterapia branda. Várias combinações de quimioterápicos e intensidade de doses têm sido propostas.

Para normatizar a terminologia que define a forma de tratamento pós-remissão, três designações são usuais: A – Manutenção – que significa o uso de quimioterápicos em doses baixas e de efeito mielossupressivo inferior ao observado

na indução. A duração é geralmente de 2 a 3 anos e o regime é administrado, na maioria das vezes, em ambulatório; B – Consolidação – tanto as drogas quanto as doses são semelhantes às usadas na indução; C – Intensificação – definida como a terapia com os mesmos quimioterápicos da fase de indução em doses substancialmente maiores, ou, outros fármacos em doses capazes de produzir intensa mielossupressão (Pereira, 2006).

A consolidação é uma prática comum, principalmente no tratamento de pacientes não alocados em regimes de investigação, ou adicionados a intensificação.

A intensificação parece ser essencial para atingir melhores índices de sobrevida. Uma das formas ainda proposta é de regimes com pares de drogas administrados seqüencialmente e capazes de induzir intensa mielossupressão. O protocolo VAPA foi modelo para desenvolvimento de outros (Weinstein, Mayer *et al.*, 1983).

Os resultados animadores apresentados por este estudo levaram os investigadores do SJCRH a propor um regime semelhante cujos resultados foram inferiores (Dahl, Kalwinsky *et al.*, 1990).

A intensificação com altas doses de Ara-C tem sido proposta como um meio de superar a resistência a drogas em doses convencionais (Ravindranath, Steuber *et al.*, 1991).

Certos tipos de leucemias como as observadas nas translocações t(8;21), t(16;16), inv(16) apresentam índices elevados de sobrevida com esta forma de tratamento. Outros tipos de LMA têm também mostrado índices encorajadores de sobrevida livre de doença com esse modelo de tratamento. Com relação à leucemia promielocítica aguda (LPMA), há referência, em pelo menos um estudo, desaconselhando a alta dose de Ara-C. Não é bem definido, no entanto, o número ideal de doses de cada ciclo, assim como a quantidade de ciclos e a dose ideal.

Num protocolo do *Cancer and Leukemia Group B* (grupo CALGB), os pacientes adultos foram alocados em três grupos que receberam Ara-C quatro cursos de 5 dias de 100 mg/m2 ou 400 mg/m2 ou 3g/m2 a intervalos de 12 horas nos dias 1, 3 e 5. O índice de remissão contínua completa foi de 24%, 29% e 44% para os grupos de dose convencional, intermediária e a alta respectivamente (Mayer, Davis *et al.*, 1994).

A toxicidade desse tratamento é considerável e pode comprometer o SNC. Doses entre 1 g/m^2 e 2 g/m^2 apresentam menor toxicidade, embora seja discutível a comparabilidade de efeito terapêutico. Doses de um grama em número de 6 com intervalos 12/12 horas – associado a 10 mg/m^2 de Mitoxantrona durante 5 dias foram usados no protocolo MRC AML 10, como um dos componentes deste regime (Stevens, Hann *et al.*, 1998).

A duração do tratamento pós-remissão tem sido objeto de controvérsia. No protocolo VAPA, por exemplo, a duração era de 16 meses e no grupo BFM variaram entre 24 e 18 meses. A tendência atual, porém, é o tratamento intensivo por períodos inferiores a 1 ano. Índices de 48% de sobrevida livre de doença e 56% de sobrevida total foram observados no protocolo MRC AML 10 que consistiu em 4 ciclos de quimioterapia, incluindo a fase de indução. Neste estudo após o quarto ciclo os pacientes foram alocados para transplante autólogo, transplante alogênico ou suspensão do tratamento (Stevens, Hann *et al.*, 1998; Pereira, 2006).

O tratamento preventivo do sistema nervoso central (SNC) não tem mostrado o mesmo impacto favorável nos índices de sobrevida comparado aos obtidos na LLA. No entanto, a radioterapia craniana ou crânio-espinhal e a quimioterapia intra-tecal, são capazes de controlar a doença no SNC.

A maioria das análises de estudos retrospectiva e prospectiva revela a superioridade do transplante de células progenitoras hematopoéticas (CPH) alogênicas de doador aparentado sobre o tratamento não ablativo pós-remissão. Entretanto, vários vieses incidem nestas avaliações: seleção de casos com melhor prognóstico, alocação biológica em vez de aleatória, divergência da família ou paciente quanto ao tratamento proposto e transplante em fase prolongada da remissão, constituem os principais conflitos dessas análises. A avaliação de resultados com base na alocação determinada pelo protocolo, independente do procedimento realizado: transplante ou quimioterapia tem sido uma das maneiras aconselhadas para minorar estes problemas (Pereira, 2006).

O resgate de pacientes com “recidiva mínima” ou após segunda remissão pode atingir índices de 30 a 40%. A tentativa de induzir uma segunda remissão depende, em parte, do período que o paciente permaneceu sem evidência de recidiva.

Investigadores do grupo cooperativo CCG analisaram os resultados do protocolo CCG-2891 que evidenciou a superioridade dos índices de sobrevida total

dos pacientes submetidos a transplante alogênico de MO (Woods, Neudorf *et al.*, 2001). Este estudo é um marco importante na interpretação das condutas para o tratamento da LMA na infância e adolescência. Foram avaliados os dados de 652 pacientes após mais de 4 anos de encerrado o protocolo. Adicionalmente, não houve divergência expressiva entre número de pacientes alocados de acordo com a determinação do protocolo e o tratamento recebido. Estes aspectos, sem dúvida, conferem maior consistência a estas conclusões (Woods, Neudorf *et al.*, 2001).

O transplante autólogo, como tratamento pós-remissão, permanece controverso. A maioria dos estudos não tem revelado superioridade sobre os resultados obtidos com a quimioterapia intensiva não ablativa. As recidivas são as maiores causas de falhas deste tratamento. Há evidências, inclusive, da permanência de células com marcadores da doença no material transplantado (Brenner, Rill *et al.*, 1993).

Devido à reduzida disponibilidade de doadores aparentados, o transplante autólogo pode ser uma opção para os pacientes recidivados sem doadores aparentados.

Apesar da maior morbidade, o transplante de células hematopoéticas provenientes de MO, células periféricas ou de cordão umbilical de doadores não aparentados, resulta em menor índice de recidivas. Tanto nos casos sabidamente de mau prognóstico como nas recidivas esse tipo de transplante pode ser a alternativa mais adequada. No protocolo do grupo CCG referido anteriormente, o transplante autólogo não revelou superioridade sobre a quimioterapia intensiva (Pereira, 2006).

2.7.4 Tratamento das Leucemias Mielocíticas Agudas dos lactentes

Ao contrário dos lactentes com LLA, os com LMA são geralmente tratados de acordo com os regimes quimioterápicos usados em não lactentes.

Comparativamente, os pacientes com idade inferior a um ou dois anos dependendo do tratamento, não apresentam sobrevida mais desfavorável em relação às crianças com mais idade.

Pui et al. (2000) descreveram em pacientes com menos de dois anos de idade dois fatores considerados favoráveis: FAB M4 ou M5 e a t(9;11). A contagem

leucocitária e a presença de translocações 11q23, que não seja a t(9;11), não tiveram significância prognóstica. Nos pacientes com mais idade a leucometria <50.000/µL, a t(9;11) e pertencer ao gênero feminino identificaram pacientes com melhor prognóstico. Neste grupo de pacientes é especulada a possibilidade de o tratamento em que foram incluídas drogas derivadas das epipodofilotoxinas que tem maior eficiência nos pacientes com morfologia M5 e posteriormente 2-clorodeoxiadenosina (2-CDA) que também parece ter maior eficácia em pacientes com LMA deste tipo morfológico ter influenciado na melhor evolução destes casos (Pui, Raimondi *et al.*, 2000).

Como em alguns estudos, é considerada para os lactentes, a idade limite de dois anos, torna-se menos precisa a definição de prognóstico. Em um estudo desenvolvido pelo *Pediatric Oncology Group* (POG8498) o prognóstico foi melhor em relação às crianças com mais idade, o mesmo não acontecendo com os pacientes tratados conforme o protocolo do grupo BFM 1983 (Biondi, Cimino *et al.*, 2000).

O transplante de MO representa uma alternativa de tratamento de indicação controversa, inclusive na LMA de crianças não lactentes não incluídas no grupo de alto risco.

Resultados, inclusive superiores, aos observados em crianças e adolescentes com LMA, foram obtidos por um grupo japonês com o chamado protocolo ANLL91 (Kawasaki, Isoyama *et al.*, 2001). Neste regime muito intensivo foram incluídos os quimioterápicos: etoposide, alta dose de Ara-C e antraciclínicos. A sobrevida média e a SLE em três anos foi de 72% e 76% respectivamente. Vinte e nove de 35 pacientes apresentavam translocações na banda 11q23 e rearranjos do *MLL*.

Houve uma tendência de melhor SLE nos pacientes com morfologia FAB M4 e M5. Idade, gênero, número de leucócitos e a presença do rearranjo do gene *MLL* não influíram significativamente na evolução destes pacientes. Somente seis pacientes foram transplantados o que não permite nenhuma conclusão quanto à validade do procedimento em comparação ao tratamento quimioterápico intensivo (Kawasaki, Isoyama *et al.*, 2001).

2.8 Gene *Mixed Lineage Leukemia* (*MLL*)

O gene MLL foi mapeado no cromossomo 11 região q23 (Cimino, Moir *et al.*, 1991; Ziemin-Van Der Poel, Mccabe *et al.*, 1991), ocupa uma extensão de aproximadamente 100 kb, tem 38 exons, sua transcrição ocorre na direção centromérica-telomérica, gerando um transcrito (mRNA) com 13-15kb e seqüência codificadora de 11,9 kb (FIGURA 1A). Este gene é um homólogo do gene *Thritorax* da Drosophila, do gene *ALR* (humano) e do gene *MLL2* (humano) e é também denominado de *ALL1, HRX, Htrx-1* (Felix e Lange, 1999; Huret, 2005; Ono, Nosaka *et al.*, 2005).

Codifica uma proteína de 3969 aminoácidos com um peso molecular de aproximadamente 430 kDa; que contém do N-terminal para o C-terminal 3 AT *hooks* homólogos ao grupo protéico de alta mobilidade HMGA1 e HMGA2, que se ligam a alça menor do DNA; 2 sinais de localização nuclear; 2 domínios de repressão RD1 (ou CXXC: cisteína metiltransferase, ligada ao DNA rico em CpG, que tem atividade de repressão transcripcional) e RD2 (recruta histona desacetilases HDAC1 e 2), 3 homeodomínios (domínio dedo de zinco rico em cisteína, com propriedades de homodimerização),1 bromodomínio (que pode ligar histonas acetiladas), e um homodomínio repressor; esses domínios podem estar envolvidos na interação proteína-proteína; um domínio FYRN e um FRYC; um domínio de transativação que se liga a CBP; pode acetilar H3 e H4 na área HOX; um domínio SET: metiltransferase; metilação de H3, incluindo histonas na área HOX permitindo que a cromatina seja aberta para a transcrição. A proteína MLL é clivada pela enzima taspase 1 em dois fragmentos protéicos, antes de entrar no núcleo: a p300/320 N-terminal chamada MLL-N e uma proteína p180 C-terminal, chamada MLL-C (Figura 1B). Os domínios FYRN e FRYC da MLL nativa associados aos fragmentos MLL-N e MLL-C formam um complexo multiproteico estável com o fator de transcrição TFIID (Huret, 2005).

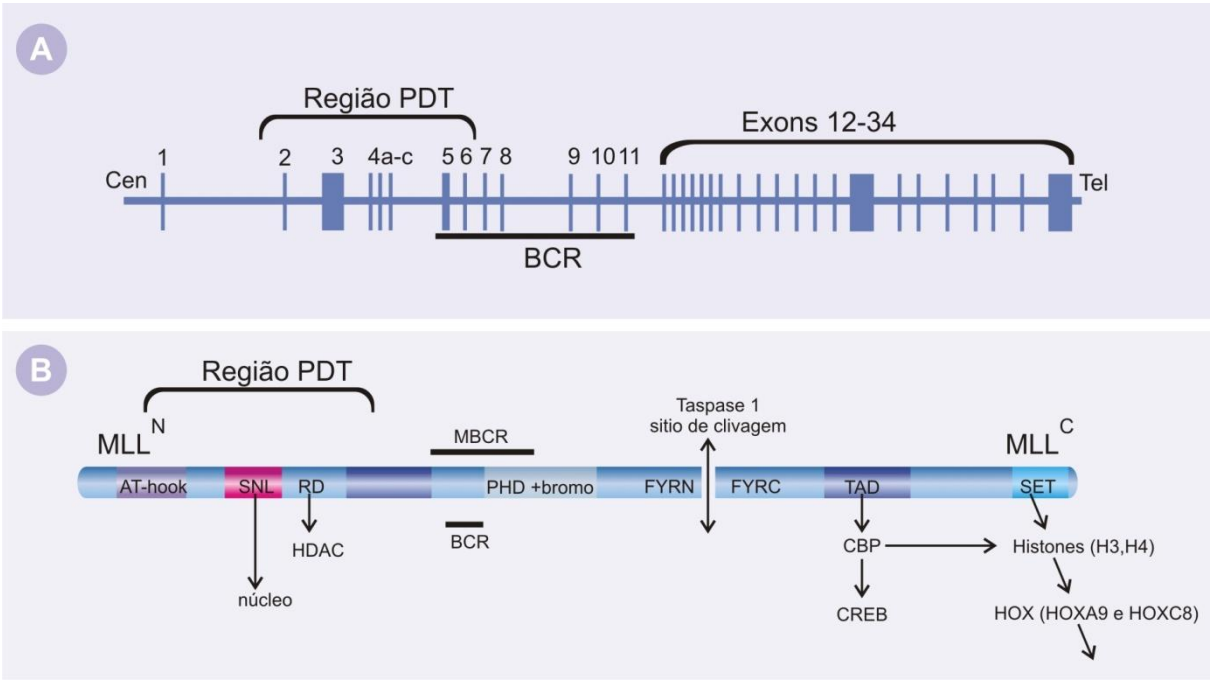

FIGURA 1 – ESTRUTURA DO GENE *MLL* E DA PROTEÍNA MLL

FONTE: Adaptado de: (Huret, 2005; Harper e Aplan, 2008).
NOTA: PTD, localização da região *partial tandem duplication;* BCR, *breakpoint cluster region;* SNL, sítio de localização nuclear; RD, Domínio de repressão; PHD+Bromo, Homeodomínio e bromodomínio; FYRN e FRYC, domínios protéicos; TAD, domínio de transativação; CBP, Putativo fator de transcrição; SET, Domínio metiltransferase SET

A proteína MLL é de localização nuclear e amplamente expressa especialmente no cérebro, rim, tireóide, em linfócitos B e celulas mielóides. Atua como reguladora transcricional dos genes *HOX* através de ligação direta com as seqüências promotoras e promovendo acetilação e metilação de histonas. Pode estar associado com mais de 30 proteínas, incluindo os componentes do núcleo do complexo de remodelação da cromatina SWI/SNF e o complexo transcripcional TFIID (Huret, 2005; Harper e Aplan, 2008).

A proteína MLL é a principal reguladora da hematopoiese e do desenvolvimento embriogênico, através da regulação positiva da expressão dos genes *HOX*, em particular o gene *HOXA9* (Huret, 2005).

O gene *MLL* está fusionado a uma grande variedade de genes nas leucemias agudas, através de mais de 80 diferentes translocações (Figura 2) (Huret, 2005; Meyer, Schneider *et al.*, 2006; Shih, Liang *et al.*, 2006). Estes rearranjos ocorrem em cerca de 80% dos casos de LLA dos lactentes, 50% dos casos de LMA dos lactentes e em 80% das variantes monoblásticas da LMA em lactentes e crianças jovens (Felix e Lange, 1999; Chowdhury e Brady, 2008).

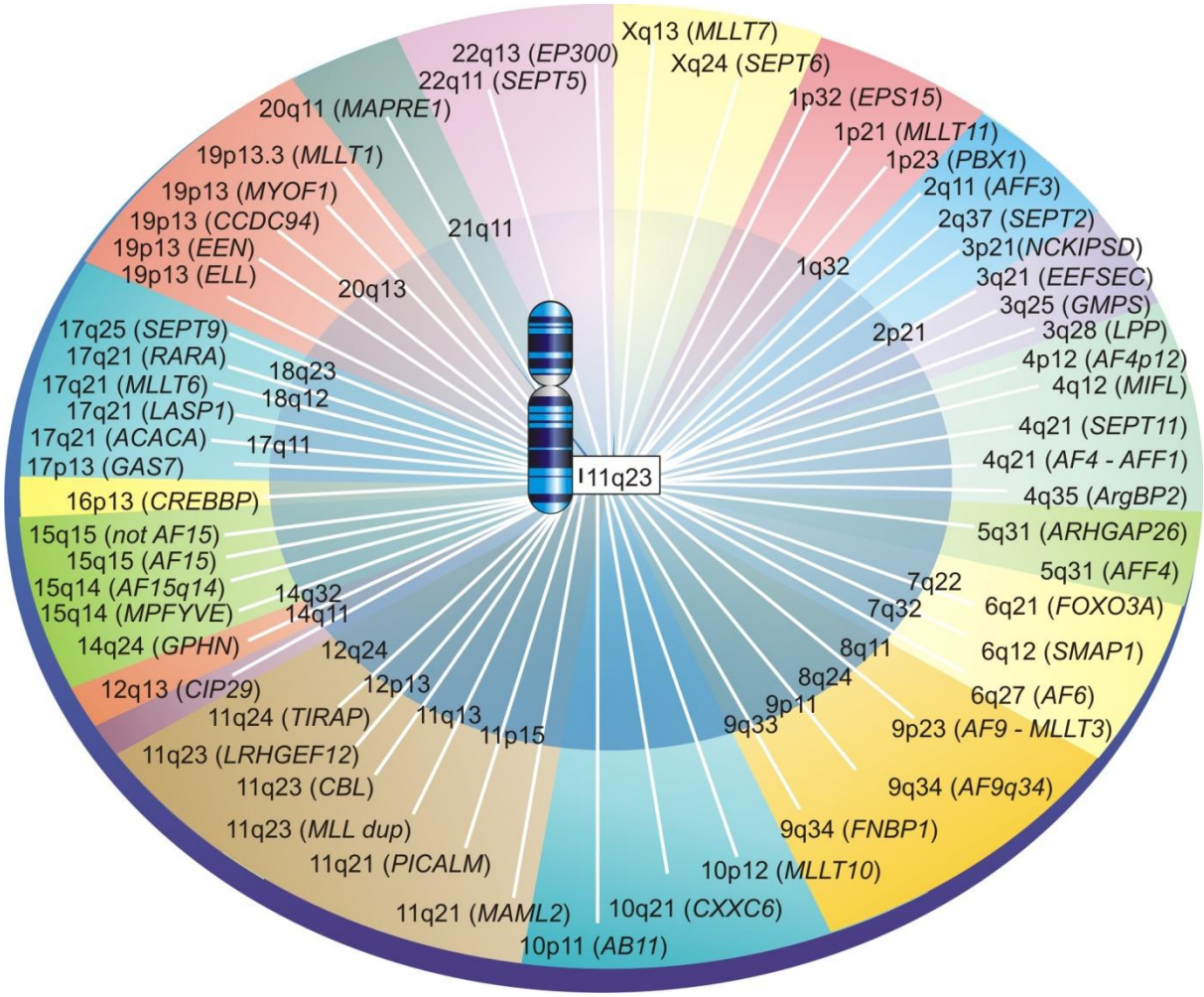

FIGURA 2 – CROMOSSOMOS E GENES ENVOLVIDOS EM REARRANJOS COM O GENE *MLL*.
FONTE: Adaptado de: (Huret, 2005).
NOTA: Observação que acompanha a figura acima no texto original: "*We implore researchers not to discover further MLL partners: there is no more room. Editor, 06/2000, last update 09/2001*.

Nas células leucêmicas com rearranjos do *MLL*, as regiões de ponto de quebra genômicas estão em um fragmento de 8,3kb que inclui do exon 5 ao 11 do gene *MLL*, sendo chamada de "região de concentração dos pontos de quebras" (*breakpoint cluster region*). Esta região contém o sítio de clivagem da topoisomerase II, assim como a região de ligação na matriz nuclear que provavelmente contribuem para o mecanismo pelo qual a translocação ocorre (FIGURA 1A) (Chowdhury e Brady, 2008; Harper e Aplan, 2008; Pombo De Oliveira e Colaboradores, 2008).

Pelo menos 50 *MLL FPGs* (*Fusion Partner Genes*) com funções diversificadas já foram descritos, sendo que alguns podem ser classificados em grupos (TABELA 9). O primeiro grupo caracteriza-se por gerar produtos de fusão nucleares, AFF1, MLLT3, AF10, MLLT1 e ELL, e compreendem a maioria dos rearranjos do *MLL* nas

leucemias (Meyer, Schneider *et al.*, 2006; Krivtsov e Armstrong, 2007). O segundo grupo inclui proteínas citoplasmáticas como GAS7, EEN, AF1p, AF6 e AFX, que podem possuir domínios de oligopolimerização *coil-coiled* que são importantes para sua potencial transformação. Outro pequeno grupo inclui as septinas, SEPT2, SEPT5, SEPT6, SEPT9 e SEPT11, que são proteínas citoplasmáticas que parecem estar envolvidas em diversos processos como controle do ciclo celular e vesícula de transporte e compartimentalização da membrana plasmática, embora seu significado fisiológico permaneça desconhecido. Um quarto grupo inclui as histonas acetiltransferases P300 e CBP, as fusões da MLL com essas proteínas mantêm a atividade acetiltrasferase da histona. Ambas as proteínas são conhecidas por formar complexos com a proteína MLL através do seu domínio TA, que está deletado em produtos de fusões do *MLL*. Outro tipo, o *MLL*-PTD (*partial tandem duplication*), é resultado de duplicações internas em tandem de exons específicos (Krivtsov e Armstrong, 2007).

De maneira geral, todos os produtos de fusões do *MLL* retêm o domínio *AT-hook* e o motivo dedo de zinco (essenciais para a habilidade de transformação causada pelo produto de fusão) e a perda do domínio SET C-terminal (mediador da metilação de H3K4). Apesar disso, a fusão do *MLL* ainda regula positivamente a transcrição dos genes *HOXA*, assim como de muitos outros genes, sugerindo um mecanismo diverso de regulação gênica pela proteína MLL normal e a proteína de fusão.

Em resumo, os rearranjos do gene *MLL* parecem constituir o processo leucemogênico principal e são associados a um mau prognóstico, o que justifica a importância da sua detecção para o correto direcionamento da terapêutica (Felix e Lange, 1999).

TABELA 9 - CLASSIFICAÇÃO DOS PARCEIROS DE FUSÃO (FPG) DO *MLL*

Cromossomo	Gene Parceiro	Função provável do produto protéico	Freqüência
4q21 9p23 19p13.3 10p12 19p13.1	*AFF1* *MLLT3* *MLLT1* *AF10* *ELL*	Grupo 1 Nuclear; provável proteína de ligação ao DNA	>80%
1q32 17p13 19p13 6q27 Xq13	*EPS15* *GAS7* *EEN* *AF6* *AFX*	Grupo 2 Citoplasmática; presença de domínio de oligomerização *coiled-coil*	>10%
Xq22 22q11 Xq24 17q25 4q21	*SEPT2* *SEPT5* *SEPT6* *SEPT9* *SEPT11*	Grupo 3 Citoplasmática; família Septina, interage com filamentos do citoesqueleto, atuando na mitose	>1%
16q13 22q13	*CBP* *P300*	Grupo 4 Nuclear; histona acetiltransferases	>1%
11q23		Grupo 5 Duplicação parcial em tandem dos exons 5-11 do *MLL* (*MLL*–PTD)	4 a7% das LMA com cariótipo normal

FONTE: Adaptado de: (Krivtsov e Armstrong, 2007).
NOTA: CBP, proteína de ligação CREB; PTD, duplicação parcial em tandem

As translocações cromossômicas levam à leucemia por ativação ou por fusão gênica. A ativação gênica ocorre quando a translocação resulta na justaposição do gene a elementos regulatórios de outro gene, causando a ativação transcricional. Por outro lado, a fusão gênica ocorre quando a translocação resulta na formação de RNAm quimérico e oncoproteína quimérica. Acredita-se que as translocações do gene *MLL* sejam leucemogênicas mais pelo mecanismo de fusão gênica do que por ativação gênica. O derivativo do cromossomo 11 produz um transcrito que codifica uma proteína de fusão composta pela região amino terminal do *MLL* e a carboxila terminal do outro cromossomo. O gene de fusão do outro derivativo resultante da translocação pode ou não ser expresso. Foram identificados transcritos de fusão mesmo nos casos em que havia apenas duplicação parcial em

tandem do *MLL*, passando-se, então, a considerá-las como tipos especiais de translocações, levando Schichman et al. (1994) a propor que as translocações do gene *MLL* são leucemogênicas por um mecanismo dominante negativo, no qual a região amino terminal do *MLL* está desacoplada da proteína restante, levando a formação de complexos protéicos inativos. Estudos adicionais são necessários para o total entendimento do papel das muitas proteínas de fusão na leucemogênese (Schichman, Caligiuri *et al.*, 1994; Felix e Lange, 1999).

2.9 Citogenética das Leucemias Agudas

O conhecimento da biologia celular e molecular das leucemias é de fundamental importância para o sucesso terapêutico e conhecimento dos mecanismos etiopatogênicos dos diferentes subtipos de LA. Os avanços nos estudos citogenéticos contribuíram para a detecção de anomalias cromossômicas específicas associadas aos aspectos morfológicos e perfis imunofenotípicos das LLAs e LMAs. Além disso, estas anomalias cromossômicas adquiridas são a maior evidência de que mudanças genéticas na transformação da célula normal para neoplásica poderia ser o primeiro passo nos mecanismos leucemogênicos.

A identificação de anomalias cromossômicas tornou-se essencial como instrumento de auxílio ao diagnóstico, à caracterização do grupo de risco, à escolha da modalidade terapêutica e monitoramento da DRM.

A citogenética convencional permite a detecção de anomalias recorrentes, numéricas e/ou estruturais, alterações adicionais e complexas. Algumas alterações citogenéticas crípticas, não visualizáveis pelo procedimento convencional, podem ser identificadas pela citogenética molecular com o uso de sondas específicas direcionadas para as regiões alvo da análise.

2.10 Citogenética das Leucemias Linfocíticas Agudas

A análise citogenética na LLA constitui um dos maiores desafios dentro das neoplasias hematopoéticas devido ao baixo índice mitótico, à aparência difusa dos cromossomos (dificultando o emprego de técnicas de bandeamento) e também à complexidade de alguns cariótipos. Assim, algumas células anormais não são identificadas em decorrência dos métodos de cultivo celular e ou o número de metáfases analisadas em cada paciente. Alguns autores sugerem também que os cariótipos normais podem ser decorrentes de modificações cromosômicas sub-microscópicas ou de clones leucêmicos inativos em cultura.

As LLAs podem ter cariótipo normal (46 cromossomos sem anomalias estruturais evidentes), cariótipo pseudodiplóide (46 cromossomos com anomalias estruturais) e podem ser classificadas de acordo com o número cromossômico modal.

Quanto ao número modal são divididas em hiperdiplóides (hiperdiploidia moderada com número cromossômico entre 47-50 e hiperdiploidia acentuada quando tem número cromossômico maior que 51 cromossomos) ou hipodiplóides (com número cromossômico menor do que 45 cromossomos). O número modal (modal number - mn) pode ser expresso como um intervalo entre dois números cromossômicos (TABELA 10) (Shaffer e Tommerup, 2005).

TABELA 10 - NÚMERO CROMOSSÔMICO MODAL

Quasi haplóide (23±)	≤34	Pentaploidia (115±)	104-126
Hipohaplóide	<23	Hipopentaplóide	104-114
Hiperhaplóide	24-34	Hiperpentaplóide	116-126
Diploidia (46±)	35-57	Hexaploidia (138±)	127-149
Hipodiplóide	35-45	Hipohexaplóide	104-114
Hiperdiplóide	47-57	Hiperhexaplóide	116-126
Triploidia (69±)	58-80	Heptaploidia (161±)	150-172
Hipotriplóide	58-68	Hipoheptaplóide	150-160
Hipertriplóide	70-80	Hiperheptaplóide	162-172
Tetraploidia (92±)	81-103	Octaploidia (184±)	173-195
Hipotetraplóide	81-91	Hipooctaplóide	173-183
Hipertetraplóide	93-103	Hiperoctaplóide	185-195

FONTE: Adaptado de: (Shaffer e Tommerup, 2005).

A freqüência de cariótipos normais nas leucemias varia amplamente na literatura, mesmo quando os estudos são prospectivos e incluídos grande número de pacientes (Heerema, Sather *et al.*, 1998).

Ganhos e perdas de um cromossomo (trissomias ou monossomias) como únicas anomalias são menos comuns nas LLAs do que nas LMAs (4 e 17% respectivamente). As trissomias dos cromossomos 8 e 21 e a monossomia do cromossomo 20 são as mais freqüentemente encontradas (Heim e Mitelman, 1995).

A hiperdiploidia ocorre entre 25 e 30% das crianças com LLA, sendo que 20% tem o número cromossômico entre 47 e 49 e cerca de 12% tem mais que 50 cromossomos (Mitelman, 1994; Pieters e Carroll, 2008). As células hiperdiploides na LLA têm um aumento na tendência a sofrer apoptose (Pieters e Carroll, 2008). Ocasionalmente todos os cromossomos podem estar envolvidos em trissomias, entretanto, os cromossomos X, 4, 6, 10, 14, 17, 18, 20 e 21 são os mais comprometidos; o cromossomo 21 freqüentemente apresenta-se tetrassômico. Em 62% dos cariótipos hiperdiplóides com mais de 50 cromossomos podem ser observadas anomalias estruturais e em cerca de 20% são detectadas translocações cromossômicas. Este padrão cariotípico é associado a fatores de risco favoráveis incluindo a idade entre 2-10 anos, contagem leucocitária $<10 \times 10^9$/L e o fenótipo imunológico CD10+. É rara em lactentes e tem baixa incidência em adultos. A hiperdiploidia com número variando entre 81-103 cromossomos (tetraploidia) é pouco freqüente, parece estar associada ao fenótipo imunológico da LLA tipo T (3%) e morfologia L2, com idades entre 8-10 anos (Pui, Crist *et al.*, 1990).

A hipodiploidia é encontrada em cerca de 10% dos casos de LLA da infância. A maioria desses cariótipos é representada por 45 cromossomos e origina-se da perda de um cromossomo inteiro (monossomia), de translocações não balanceadas e da formação de cromossomos dicêntricos. Dentro do grupo da hipodiploidia observa-se a ocorrência de cariótipos mostrando número cromossômico modal entre 26-28 que são denominados de *quasi* haplóide (<0,5%). Visto estar relacionado como fator importante de mau prognóstico, torna-se de grande relevância a identificação desta anomalia citogenética que com certa freqüência está mascarada pela presença de uma população celular hiperdiplóide. Relatos recentes descrevem pacientes com cariótipos *quasi* haplóides identificados na fase da recidiva, pois uma população hiperdiplóide dominante, no momento do diagnóstico, pode ser erroneamente interpretada como de bom prognóstico.

Os cariótipos pseudodiplóides correspondem a cerca de 40% do padrão cromossômico da LLA. Esta pseudodiploidia é constituída principalmente por translocações cromossômicas. Aproximadamente 30 tipos diferentes de anomalias cromossômicas estruturais foram identificados nas LLA.

A TABELA 11 mostra as principais alterações cromossômicas específicas na LLA, os genes envolvidos nos pontos de quebra e as associações imunofenotípicas destas alterações (Heim e Mitelman, 1995). Algumas das alterações mais importantes nas LLA são descritas a seguir.

2.10.1 Alterações Cromossômicas da LLA de Linhagem B

2.10.1.1 Translocação t(4;11)

A translocação envolvendo os braços longos dos cromossomos 4 e 11 [t(4;11)(q21;23)] foi descrita pela primeira vez por Oshimura et al.(1977), e foi associada a LLA por Van Den Berghe et al.(1979). Está presente em 2 a 5% das crianças com LLA e 60% dos lactentes (Oshimura, Freeman *et al.*, 1977; Pui, Frankel *et al.*, 1991; Jennings e Foon, 1997; Faderl, Kantarjian *et al.*, 1998). Tem sido associada à idade <12 meses, alta contagem leucocitária, esplenomegalia, imunofenótipo pró-B (CD10-) e mau prognóstico (Smith, Morgan *et al.*, 1988).

As análises dos genes envolvidos revelaram que as fusões ocorrem em fase não alterando as matrizes de leitura dos dois genes. Assim, no cromossomo 11 derivativo será transcrito um RNAm que contém na extremidade 5' a região codificada pela porção centromérica do gene *MLL* (domínios *AT-hooks*) associada à porção telomérica de *AFF1,* resultando em um rearranjo *MLL/AFF1*.

TABELA 11 - PRINCIPAIS ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS NAS LLAS.

Rearranjo	Genes Envolvidos	Imunofenótipo Típico
t(1;7)(p32;q34)	*TAL1;TCRB*	Linhagem T
t(1;7)(p34;q34)	*LCK;TCRB*	Linhagem T
t(1;14)(p32-34;q11)	*TAL1;TCRD*	Linhagem T
t(1;19)(q23;p13)	*PBX1;E2A*	Pré-B
dup(1)(q12-21q31-32)	?	Pré-B e Célula B
t(2;8)(p12;q24)	*IGK;MYC*	Célula B
t(4;11)(q21;q23)	*AFF1;MLL*	Pró-B, Bifenotípica
del(6q)	?	Linhagem B ou T
dic(7;9)(p11-13;p11)	?	Pré-B
t(7;9)(q34-36;q34)	*TCRB;TAN1*	Linhagem T
t(7;9)(q34;q32)	*TCRB;TAL2*	Linhagem T
t(7;10)(q34-36;q24)	*TCRB;HOX11*	Linhagem T
t(7;11)(q34-36;p13)	*TCRB;RHOM2*	Linhagem T
t(7;19)(q34;p13)	*TCRB;LYL1*	Linhagem T
t(8;14)(q24;q11)	*MYC;TCRA/TCRD*	Linhagem T
t(8;14)(q24;q32)	*MYC;IGH*	Célula B
t(8;22)(q24;q11)	*MYC;IGL*	Célula B
t/dic(9;12)	? PAX5/ETV6	LLA-Comum e Pré-B
i(9q)	?	Pré-B
t(9;22)(q34;q11)	*ABL;BCR*	Linhagem B
t(10;11)(p13-14;q14-21)	AF10;CALM	Linhagem T
t(10;14)(q24;q11)	*HOX11;TCRD*	Linhagem T
t(11;14)(p15;q11)	*RBTN1;TCRD*	Linhagem T
t(11;14)(p13;q11)	*RBTN2;TCRD*	Linhagem T
t(11;19)(q23;p13)	*MLL;MLLT1*	Bifenotípica
t(12;17)(p13;q21)	?	LLA-Comum e Pré-B
t/del(12p)	ETV6	Linhagem T ou B
t(12;21)(p13;q22)	*ETV6;RUNX1*	LLA-Comum
t(14;18)(q32;q21)	*IGH;BCL2*	Linhagem B
t(14;22)(q32;q11)	*IgH/BCR*	
t(17;19)(q22;p23)	*HLF;E2A*	Pré-B
+21	?	Linhagem B

FONTE: Adaptado de: (Heim e Mitelman, 1995).

2.10.1.2 Translocação t(12;21)

Anomalias cromossômicas afetando o braço curto do cromossomo 12 ocorrem em aproximadamente 20% a 30% das LLA pediátricas (Bolufer, Barragan *et al.*, 2002). A banda cromossômica 12p12 é freqüentemente rearranjada e inclui deleções, translocações balanceadas e cromossomos dicêntricos.

A maioria dos casos citados na literatura associa a presença da translocação *ETV6;RUNX1* ao imunofenótipo B. No entanto, alguns casos de linhagem T já foram diagnosticados. Trata-se do rearranjo mais freqüente nas LLAs em crianças, ocorrendo em aproximadamente 25% dos casos, com baixa freqüência em LLAs de adultos (<2%) (Borkhardt, Cazzaniga *et al.*, 1997).

Romana et al. (1994), utilizando a técnica de FISH hibridação *in situ,* demonstraram que a del(12)(p12-p13) descrita em crianças com LLA era resultante de uma translocação críptica t(12;21)(p12-13;q22). Posteriormente, os estudos moleculares mostraram que a t(12;21) resulta na fusão dos genes *ETV6* (mapeado na região 12p12-13) e *RUNX1* (mapeado na região 21q22) produzindo uma proteína quimérica com domínios de ligação ao DNA Helix loop Helix helice-alça-hélice do gene *ETV6* e domínios de transativação do gene *RUNX1*. A fusão gênica *ETV6/RUNX1* está presente em 20 a 25 % das crianças com LLA CD10+ (Romana, Le Coniat *et al.*, 1994). No Brasil as freqüências observadas por Magalhães et al. (2000), Zen et al. (2004) e Veiga et al. (2004) foram de 20%, 19% e 40% respectivamente. Os critérios de seleção dos pacientes analisados justificam o alto percentual da terceira amostra (Magalhaes, Pombo-De-Oliveira *et al.*, 2000; Veiga, Coser *et al.*, 2004; Zen, Lima *et al.*, 2004).

O gene *ETV6* codifica uma proteína com um domínio amino-terminal altamente conservado que lhe confere a sua capacidade de agir como fator de transcrição. Foi inicialmente identificado como fator de transcrição, através da sua ligação ao receptor de fatores de crescimento em um caso de leucemia mielomonocítica que apresentava a translocação t(5;12) (Rowley, 1998).

A proteína codificada pelo gene *RUNX1* (*AML1* ou *CBFα2*) funciona como fator de transcrição de *TCRβ*, ativando sua expressão. A fusão da região 5’ de *ETV6* com o gene *RUNX1* quase inteiro produz uma proteína com alvos ainda desconhecidos,

porém, sabe-se que a expressão de *TCRβ* é inibida e que ocorre a perda das atividades normais dos genes envolvidos (Romana, Le Coniat *et al.*, 1994).

2.10.1.3 Translocação t(1;19)

A translocação recíproca envolvendo o braço longo do cromossomo 1 e o braço curto do cromossomo 19 [t(1;19)(q23;p13)] é uma translocação específica da LLA da infância e foi descrita por grupos independentes de investigadores. Esta translocação tem sido observada em 5 a 6% dos pacientes (Heim e Mitelman, 1995; Biondi e Masera, 1998; Faderl, Kantarjian *et al.*, 1998) e em aproximadamente 1% dos lactentes com LLA pré-B (Pui, Crist *et al.*, 1990; Raimondi, Behm *et al.*, 1990).

A translocação t(1;19) (q23;p13) foi descrita em 1984 por diferentes grupos que estudavam LLA pré-B. Sendo o resultado da fusão dos genes *E2A* (cromossomo 19) e *PBX1* (cromossomo 1), essa fusão esta relacionada à presença de riscos clínicos como elevada contagem celular, altos níveis séricos de desidrogenase lática e envolvimento do SNC (Pombo-De-Oliveira, Cordoba *et al.*, 2005).

Apesar de, ao diagnóstico, não haver nenhum aspecto clínico que diferencie o grupo de pacientes com a t(1;19), este rearranjo é encontrado, na quase totalidade dos casos, em leucemias pré-B com clgM+ e muito raramente em células imaturas.

Duas formas citogenéticas da t(1;19) podem ocorrer: i) a mais comum (~75%) é a forma não balanceada, onde se encontram dois cromossomos 1 normais e um cromossomo 19 contendo o material cromossômico do braço longo do cromossomo 1. Isto resulta em trissomia parcial do braço longo do cromossomo 1; ii) a outra forma (~25%) é caracterizada por uma troca cromossômica balanceada entre os cromossomos 1 e 19 (Heim e Mitelman, 1995).

Os estudos moleculares neste tipo de translocação mostraram o envolvimento de um gene homeobox denominado *PBX1,* mapeado no cromossomo 1, e do gene *E2A,* mapeado no cromossomo 19, que codifica os fatores E12 e E47 (proteínas ativadoras de imunoglobulina). Assim, no cromossomo translocado [der(19)] o gene híbrido *E2A-PBX1* possui uma seqüência 5' que codifica um domínio ativador transcricional de *E2A* ligado à seqüência 3' que codifica uma região de homeodomínio do gene *PBX1* (Pui, Crist *et al.*, 1990). O gene *E2A* codifica fatores

de transcrição essenciais para a linfopoese normal e a regulação do desenvolvimento da célula (Pui, Crist *et al.*, 1990; Faderl, Kantarjian *et al.*, 1998). Em células normais, o gene *PBX1* atua como fator de transcrição do gene *HOX*, que possui importante papel durante a fase de desenvolvimento embrionário devido à regulação da síntese de fatores de crescimento que determinam o posicionamento e a organização celular. Desta forma, as células que possuem o gene de fusão *E2A-PBX1* ativam constitutivamente a transcrição de genes normalmente regulados por *PBX1* (Mcwhirter, Goulding *et al.*, 1997).

2.10.2 Alterações Cromossômicas da LLA de Linhagem T

A LLA de linhagem T (LLA-T) representa 15% da LLA da infância. Esta leucemia se apresenta com contagens leucocitárias elevadas e envolvimento do sistema nervoso central e está associada a mau prognóstico. Embora se caracterize pela ausência de hiperdiploidia (>50 cromossomos), 70% dos pacientes com LLA-T apresenta um padrão cariotípico anormal. Neste padrão são vistos 30% dos cariótipos apresentando pontos de quebra cromossômica dentro de regiões onde estão localizados os genes para as cadeias de receptores de célula T (*TCRA*, *TCRD* em 14q11, *TCRB* em 7q34 e *TCRG* em 7p14), sugerindo que estas alterações são resultantes de rearranjos ocorridos durante a diferenciação da célula T (Raimondi, 2007).

As principais alterações cromossômicas da LLA-T incluem: t(1;14)(p32-34;q11), t(8;14)(q24;q11), t(10;14)(q24;q11), t(11;14)(p15;q11) e t(11;14)(p13;q11) estão presente nas freqüências de 3%, 2%, 5-10%, <1% e 5-10% respectivamente (Raimondi, 2007).

2.10.3 Citogenética das Leucemias Mielocíticas Agudas

A ocorrência de anomalias cromossômicas recorrentes na LMA é muito freqüente, atingindo mais de 80% dos casos quando analisados pelos métodos disponíveis (TABELA 12). Algumas das anomalias mais conhecidas e de importância para a LMA são descritas a seguir.

2.10.3.1 Translocação t(1;22)

A t(1;22)(p13;q13) geralmente relacionada à leucemia megacariocítica de lactentes está presente em 70 a 100% dos casos. Não ocorre em pacientes com Síndrome de Down e tem conotação de mau prognóstico. A caracterização desta anomalia é importante devido à apresentação atípica da doença que pode morfologicamente sugerir metástases de tumores sólidos da infância (Huret, 2001).

TABELA 12 - PRINCIPAIS ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS NAS LMAS.

Rearranjo	Genes Envolvidos	Grupo FAB
t(1;3)(p36;q21)	?	M1e M4
t(1;7)(q10;p10)	?	M4
t(1;11)(q21;q23)	*AF1q, MLL*	M4 e M5
t(1;22)(p13;q13)	*OTT; MAL*	M7
inv(3), ins(3;3), t(3;3)	*EVI1; RPN1*	M1, M4 e M6
t(3;5)(q21-25;q31-35)	?	M6
t(3;21)(q26;q22)	*EV11/MDS1; RUNX1*	Todos
+4	?	M2 e M4
-5/del(5q)	*IL9*	Todos
t(6;9)(p23;q34)	*DEK; CAN*	M2 e M4
t(6;11)(q27;q23)	*AF6; MLL*	M4 e M5
t(7;11)(p15;p15)	*HOXA9; NVP98*	M2
-7/del(7q)	RELN	Todos
+8	D8S508	M2; M4 e M5
t(8;16)(p11;p13)	*MOZ; CBP*	M5
t(8;21)(q22;q22)	*ETO; RUNX1*	M2

+9	?	M2, M4 e M5
t(9;11)(p21-22;q23)	*MLLT3; MLL*	M5
del(9q)	D9S15	Todos
t(9;22)(q34;q11)	*ABL; BCR*	M1 e M2
t(10;11)(p11-15;q13-23)	*ABI/MLL*	M5
+11	?	M2, M4 e M5
t(11;17)(q23;q25)	*MLL; MSF*	M2, M4 e M5
t(11;17)(q23;q21)	*PLZF; RARA*	M3
t(11;19)(q23;p13)	*MLL; MLLT1*	M4 e M5
t/del(11q23)	*MLL*	M5
t/del(12p)	?	Todos
+13	?	Todos
t(15;17)(q22;q11-21)	*PML; RARA*	M3
Inv(16), t(16;16), del(16)	*MYH11; CBFB*	M4EO
t(16;21)(p11;q22)	*FUS; ERG*	Todos
i(17)(q10)	?	Todos
del(20q)	?	Todos
+21	RUNX1	Todos
+22	BCR	M4
-Y	?	Todos

FONTE: Adaptado de: (Heim e Mitelman, 1995).

2.10.3.3 Translocações t(8;21)

Esta anomalia, juntamente com a t(16;16) e inv(16), têm em comum o comprometimento dos genes *RUNX1* e *CBF* beta que codificam um complexo heterodimérico que constitui o fator de transcrição designado “Core Binding Factor” (CBF), responsável pela regulação da transcrição de vários genes envolvidos na diferenciação de células hematopoéticas.

A t(8;21) foi descrita por Rowley em 1973 e resulta na fusão do gene *RUNX1* (cromossomo 21q22), também conhecido como *CBFα2*, com o gene *ETO – Eight Twenty One* (cromossomo 8q22), com a formação de um gene de fusão (*RUNX1-ETO*) no derivativo do cromossomo 8. Como alteração cromossômica única ou associada a outras, representa uma das anomalias estruturais mais comum e específica para a LMA, não havendo relatos da sua ocorrência em outras neoplasias. A t(8;21)(q22;q22) esta presente em 11,7% dos pacientes com LMA (Raimondi, Chang *et al.*, 1999). (Heim e Mitelman, 1995).

O ponto de quebra no cromossomo 21q ocorre entre os exons 5 e 6, enquanto no cromossomo 8q22 a quebra ocorre no exon 2 (Erickson, Gao *et al.*, 1992; Andrieu, Radford-Weiss *et al.*, 1996). A presença destas translocações crípticas indica a necessidade de análise do transcrito de fusão *RUNX1-ETO* por RT-PCR em todos os pacientes com LMA, à exceção daqueles com morfologia sugestiva de leucemia promielocítica aguda (Langabeer, Walker *et al.*, 1997).

Associa-se freqüentemente à morfologia FAB-M2, M1, à presença de bastonetes de Auer e eosinofilia medular, com vacúolos citoplasmáticos. Freqüentemente expressam antígeno CD19. Às vezes está acompanhada da perda do cromossomo sexual X no sexo feminino e Y no masculino. O sarcoma granulocítico é ocasionalmente observado (Heim e Mitelman, 1995).

2.10.3.4 Inversão do cromossomo 16 e t(16;16)

Ambas as anomalias resultam em alterações moleculares e expressão fenotípica idêntica. A inv(16) e, menos freqüentemente, a t(16;16) foram observadas em 10-12% das LMAs infantis e em 8-10% do adultos (Liu, Hajra *et al.*, 1995).

Nessas anomalias, inv(16)(p13;q22) e t(16;16)(p13;q22) a sub-unidade CBF beta do complexo CBF funde-se ao gene da cadeia pesada da miosina de músculo liso. Com a formação deste gene quimérico é codificada uma proteína que inativa funcionalmente o fator de transcrição CBF.

Embora possam ocorrer tipos morfológicos FAB-M2, M4 e M5, a apresentação com a morfologia M4Eo é a mais comum e consiste na presença de um número aumentado de eosinófilos que podem ser displásicos e exibir uma mistura de grânulos eosinofílicos e basofílicos irregulares e grandes.

O prognóstico destes pacientes é considerado relativamente favorável. Também foi relatada incidência mais elevada de envolvimento do sistema nervoso central (Heim e Mitelman, 1995; Huret, 1999).

2.10.3.5 Translocação envolvendo a banda 11q23

Nas leucemias de lactentes o rearranjo do gene *MLL* é a anomalia recorrente mais comum, atingindo cerca de 60 a 70% dos casos. Muitos casos não são detectados pela citogenética convencional necessitando de análise molecular.

A maioria dos casos em lactentes com rearranjo do *MLL* é de leucemias linfocíticas agudas caracterizadas como de mau prognóstico. São também observados casos de linhagem mista, sugerindo a possibilidade de o evento oncogênico ocorrer em fase celular ainda com potencialidade de diferenciação para mais de uma linhagem.

Na leucemia de lactentes e crianças de baixa idade com morfologia FAB-M4, M5 o rearranjo 11q23 é observado em cerca de 70% dos casos.

O significado prognóstico destas translocações na LMA não é bem definido, inclusive, uma análise realizada no SJCRH revelou que a t(9;11) pode conferir um caráter de prognóstico favorável (Raimondi, Chang *et al.*, 1999).

Em um estudo realizado por Pui et al. (2003) foi observado em 51% dos casos a t(4;11), em 10% a t(11;19), e em 4% dos casos t(9;11) e a del(11)(q23) foi observada em 19% dos casos, de 497 pacientes com anormalidade cromossômica 11q23 entre 1983 e 1995 em USA (Pui, Chessells *et al.*, 2003).

Mais de 80% das leucemias secundárias induzidas por drogas que atuam na toposisomerase II, representadas principalmente por derivados da epipodofilotoxina e antraciclínicos, apresentam rearranjo 11q23 (Settin, Al Haggar *et al.*, 2007). Há a possibilidade de que a gestante e o feto expostos à ação de agentes químicos-ambientais e outros fatores que interagiriam com a topoisomerase II serem um alvo em leucemias em lactentes.

2.10.3.6 Translocação t(15;17)

A t(15;17) é detectada em cerca de 5 a 15% da LMA da infância (Biondi, Rovelli *et al.*, 1994). Relacionada à quase totalidade dos casos de leucemia promielocítica aguda, a t(15;17)(q22;q11-22) envolve a fusão dos genes do receptor

de ácido transretinóico *RARA* (*RAR* alfa) no braço longo do cromossomo 17 ao gene *PML* (leucemia promielocítica) no braço longo do cromossomo 15. A constante expressão do produto quimérico *PML/RARA* nas células de LPMA sugere fortemente a participação desta proteína na patogênese da doença. A t(15;17)(q22;q12-21) está presente em 11,5% dos casos de pacientes com LMA (Raimondi, Chang *et al.*, 1999).

Mendes et al. (2004) relataram 5 pacientes com idade entre 14 e 21 meses com LMA-M3 num grupo de 45 LMA (5 de 45, 11%) (Mendes, Coser *et al.*, 2004).

A criação de um modelo através de um camundongo transgênico em que é induzida a expressão do gene *PML-RARA* nas células mielóides confirma esta hipótese. Nesses camundongos há o desenvolvimento de uma síndrome mieloproliferativa e cerca de 10% dos animais evoluem com doença semelhante à leucemia promielocítica aguda. Devido ao longo período de latência para o desenvolvimento da doença é sugerida a possibilidade de eventos moleculares adicionais.

Estudos recentes demonstram que a proteína *PML-RARA* interfere negativamente na transcrição de genes alvo, seqüestrando um complexo histona desacetilase, que inclui a proteína N-COR (co-repressor nuclear) e HDA C (histona desacetilase) facilitando a desacetilação da histona relacionada ao DNA, e resultando numa alteração conformacional da cromatina. Doses farmacológicas de ácido trans-retinóico (ATRA) podem desfazer esta alteração da cromatina liberando o complexo repressor e recrutando co-ativadores transcricionais, facilitando desta maneira a acetilação e a reativação da transcrição.

Por mecanismo diverso foi demonstrado que o trióxido de arsênico (As_2O_3) pode induzir remissões, interferindo na diferenciação celular, degradando a proteína quimérica e elevando a expressão das caspases, ativando, dessa forma, a apoptose.

2.10.3.7 Anomalias numéricas

A monossomia 7/del(7q) embora mais comum em mielodisplasias e leucemias secundárias de adultos, pode também ocorrer em leucemias agudas primárias da

infância. Não apresenta correlação com nenhum tipo morfológico específico. Organomegalia maciça, leucocitose moderadamente elevada e alterações medulares com características de mielodisplasia são observadas em alguns pacientes.

A del(5q) ou monossomia do cromossomo 5 é encontrada com certa freqüência em adultos com síndromes mielodisplásicas e leucemias agudas secundárias. Nas leucemias da infância esta anomalia é infreqüente e geralmente está associada aos subtipos M4 e M6 (Desangles, 1999).

A trissomia de cromossomo 8 é a mais freqüente alteração numérica nas LMA, ocorrendo como única em cerca de 5% de todos os casos com citogénetica normal e 15% se considerarmos sua ocorrência simultânea a outras alterações. Pode ocorrer ao diagnóstico da LMMCJ e na Síndrome da Monossomia do Cromossomo 7. Não é comprovado, no entanto, que uma cópia extra deste cromossomo participe do processo de leucemogênese (Huret, 2007).

2.11 Avanços nos métodos moleculares

A citogenética convencional é o método tradicional para identificação de alterações cromossômicas e também para avaliação da ploidia das células leucêmicas. Embora permaneça como o único procedimento capaz de possibilitar a avaliação conjunta de todo o genoma, infelizmente, na LLA, existe maior dificuldade para identificação de anormalidades cromossômicas clonais, pela baixa qualidade das metáfases e o baixo índice mitótico encontrado nas culturas. Desta maneira, algumas células anormais não são identificadas pelo número pequeno de metáfases analisadas, assim como algumas alterações menores, pela qualidade ruim das metáfases. Muitas vezes o resultado final é dado como normal, porém, existem alterações menores que não foram identificadas. Em condições consideradas ótimas podem ser detectados clones cariotipicamente anormais em 55% a 90% dos pacientes com LLA (Pui, Crist *et al.*, 1990; Heim e Mitelman, 1995). Para ser considerado um exame normal, representativo, devem ser avaliadas pelo menos 20 metáfases e nenhuma alteração cromossômica pode ser encontrada (ISCN, 2005).

Outros métodos utilizados são a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH); reação em cadeia da polimerase; *Southern Blotting* e PCR invertida de longa distância. Estes métodos são capazes de detectar alterações não identificadas pela citogenética; são complementares a esta aumentando a resolução de identificação de várias anormalidades cromossômicas presentes nas leucemias agudas infantis (Raimondi, 2000).

A hibridização *in situ* por fluorescência é uma técnica de citogenética molecular sensível que utiliza sondas fluorescentes de DNA para detectar aberrações cromossômicas específicas (Heim e Mitelman, 1995). Os três tipos de sondas mais utilizadas são centroméricas, loco específica e sondas de cromossomos inteiros. Sondas centroméricas são usadas para enumeração de cópias de cromossomos, enquanto as sondas loco específicas são utilizadas para detectar a presença de um gene específico. As sondas que colorem o cromossomo inteiro consistem de múltiplas seqüências descontinuadas de DNA no mesmo cromossomo, que são usadas para colorir todo o cromossomo. Estes tipos de sondas são utilizados em combinação de uma ou mais cores diferentes, simultaneamente, o que facilita a visualização subseqüente. Quando se usam as sondas centroméricas, algumas alterações estruturais podem não ser detectadas se o segmento do cromossomo onde elas se encontram não está sendo avaliado por esta determinada sonda. Nesses casos, as sondas de cromossomos inteiros são muito úteis para identificar estas anormalidades estruturais, colorindo todo o cromossomo ou segmentos de cromossomos em cores diferentes. Uma grande vantagem da técnica de FISH é que tanto os cromossomos em metáfase quanto os núcleos em interfase (não-mitóticos) podem ser analisados com sondas obtidas de seqüências específicas de cromossomos. Esta técnica é uma complementação muito importante para a citogenética por conseguir identificar alterações que não são por ela detectadas. É útil também na pesquisa de doença residual mínima, assim como para identificar o envolvimento de linhagens de células diferentes nas leucemias agudas (Heim e Mitelman, 1995).

Durante a última década foram desenvolvidas e aprimoradas não somente FISH usando sondas de cromossomo inteiro como também técnicas de bandeamento com FISH. Usando colorações diferentes para os 24 cromossomos humanos foram descritas as técnicas denominadas Multiplex-FISH (M-FISH), *spectral karyotyping* (SKY), *multicolor-FISH* (m-FISH), COBRA-FISH (*Combined*

Binary RAtio labeling-FISH), ou 24-color-FISH (Liehr, Starke *et al.*, 2004). Como estas técnicas eram limitadas para alterações intracromossômicas ou quando a exata localização do ponto de quebra era necessária, diferentes métodos de bandeamento com FISH foram desenvolvidos. Os métodos de bandeamento com FISH são aqueles que possibilitam caracterizar simultaneamente muitas sub-regiões cromossômicas pequenas, menores que um braço curto (excluindo os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos). Estes podem ter características diferentes, mas tem em comum a habilidade de produzir bandeamento cromossômico DNA-específico.

Cerca de nove métodos são disponíveis atualmente sendo quatro para avaliar todo o genoma humano com abordagem de uma única etapa: *IPM stands for IRS-PCR multiplex FISH* (IPM-FISH) (Aurich-Costa, Vannier *et al.*, 2001), *cross-species color banding* (Rx-FISH) (Muller, O'brien *et al.*, 1998), *somatic cell hybrid-based chromosome bar code* (CBC) (Muller, Rocchi *et al.*, 1997) e *multitude multicolor banding* (mMCB) (Weise, Heller *et al.*, 2003). Métodos para avaliar cromossomos específicos que são usados quando se quer avaliar um, dois ou poucos cromossomos evitando gastos desnecessários; dois tipos básicos estão disponíveis: o primeiro baseado em sondas de região cromossômica específica, derivadas de microdissection, *Microdissection-based multicolor banding* (MCB ou m-band), *spectral color banding* (SCAN), e M-FISH *chromosome region-specific probes* (CRP); e segundo baseado em sondas locos específicos, YAC/BAC-*based multicolor banding* (Y/B-MCB) e YAC/BAC-*based chromosome bar code* (CBC) (Liehr, Starke *et al.*, 2006).

O *Southern Blotting* é uma técnica que permite obter informação sobre a massa molecular e a quantidade relativa de uma determinada seqüência de DNA. A técnica, desenvolvida por Edwin Southern, é uma combinação de eletroforese em gel do DNA (previamente fragmentado por enzimas de restrição), transferência deste para uma membrana e hibridização com uma sonda marcada (com material radioativo ou fluorescente). Após a hibridização, a membrana é lavada para remover sondas não ligadas ao DNA e obtêm-se uma imagem através de auto-radiografia ou auto-fluorescência. A imagem obtida mostra a localização da sonda no DNA, com a intensidade do sinal dando uma medida relativa da quantidade de sonda hibridizada ao DNA. Um estudo desenvolvido por Mathew et al. (1999) comparando as técnicas de citogenética, FISH e *Southern Blotting* mostrou pouca discrepância nos

resultados. Além de salientar a importância de profissionais habilitados tanto para a citogenética quanto para a observação das preparações de FISH, os autores recomendam esta técnica, como primeiro teste, pois é de acesso rápido (menos de 24 horas) e passível de ser realizado com pequenas quantidades de material (Mathew, Behm *et al.*, 1999).

O método de Transcrição Reversa e Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) permite amplificar um segmento de DNA localizado entre duas regiões de seqüência conhecida. Essencialmente, trata-se de uma síntese de DNA *in vitro* a partir de dois oligonucleotídeos utilizados como iniciadores da reação (*primers*). O processo consiste em uma série de reações catalisadas por uma enzima DNA polimerase termoestável (*Taq* Polimerase) em condições físico-químicas específicas e ciclos térmicos pré-definidos. Os iniciadores são complementares aos extremos 5' e 3' de seqüências que flanqueiam a seqüência de DNA alvo da amplificação. A PCR tem início a partir da desnaturação da dupla fita de DNA a 90-95ºC, em presença de um excesso de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores e dos quatro deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP e dGTP). A seguir, a temperatura diminui até que um valor apropriado para a ligação complementar dos iniciadores com as seqüências correspondentes (temperatura de *annealing*) seja atingido. Logo após, a extensão do produto é obtida pela ação da *DNA polimerase*, na temperatura ideal para sua atividade. A sucessão destas três etapas (desnaturação, anelamento e polimerização) é conhecida como "ciclo". O processo de PCR é baseado na repetição destes ciclos e, dado que os produtos de um ciclo servem como moldes para o próximo, a amplificação é exponencial. Em teoria, o método de PCR permite a amplificação de até 10 milhões de cópias de uma seqüência determinada de DNA a partir de poucas moléculas iniciais (Pombo De Oliveira e Colaboradores, 2008).

A clonagem molecular de pontos de quebras de translocações cromossômicas pode revelar o envolvimento de genes de função biológica desconhecida ou o potencial oncogênico desconhecido de genes conhecidos. O método LDI-PCR pode permitir clonagem molecular de translocações primárias a partir de material clínico (Sonoki, Willis *et al.*, 2004). Técnicas de diagnóstico usando o DNA genômico de pacientes com leucemia têm sido estabelecidas para as translocações que envolvem a região 11q23. O grande benefício destes métodos é a determinação das seqüências genômicas derivadas do sítio de fusão recíproca dos

cromossomos. Devido ao fato dessas seqüências serem específicas de cada paciente e existirem na forma de uma cópia única por célula leucêmica, elas poderão ser usadas como marcadores confiáveis para estudos de doença residual mínima (DRM) (Meyer, Schneider *et al.*, 2005; Meyer, Schneider *et al.*, 2006).

Uma vez que as alterações genéticas são os principais fatores prognósticos utilizados no estabelecimento de terapias atuais contra a leucemia aguda, é fundamental a análise molecular para identificação de alterações genéticas ao diagnóstico. A importância da biologia molecular se deve à independência desta metodologia do sucesso de culturas celulares e obtenção de metáfases, que provoca falhas freqüentes na análise citogenética, alem da possibilidade de detectar alterações crípticas.

Os métodos moleculares mais utilizados para a identificação de marcadores de prognóstico e grupos de risco terapêutico nas leucemias agudas são baseados na PCR a partir do DNA ou na RT-PCR a partir do RNA. A aplicação de tais métodos no diagnóstico das leucemias agudas proporciona a detecção, desde o início, de marcadores tumorais específicos e universais que apresentam valor prognóstico e são utilizados para classificar os diferentes grupos de leucemia no momento do diagnóstico. Os resultados obtidos por RT-PCR são altamente influenciados pela qualidade das amostras de RNA analisadas. Além disso, somente as fusões *MLL* mais freqüentes são rotineiramente avaliadas por métodos RT-PCR simples ou múltiplos (Meyer, Schneider *et al.*, 2005; Meyer, Schneider *et al.*, 2006). A LDI-PCR tem contribuído de forma bastante importante para a identificação de seqüencias gênica ainda não descrita como associadas ao *MLL.*

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar, através de uma investigação sistematizada, a presença do rearranjo do gene *MLL* em leucemias agudas *de novo* em lactentes, identificando a seqüência gênica envolvida como parceira no rearranjo.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Estimar a freqüência do rearranjo do gene *MLL* em leucemias agudas *de novo* em lactentes da população brasileira,

3.2.2 Caracterizar os rearranjos mais freqüentes,

3.2.3 Avaliar a sensibilidade dos diferentes métodos de identificação do rearranjo do gene *MLL*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da amostra

A amostra foi constituída por 112 pacientes com Leucemia Aguda *de novo*, 48 (43%) do sexo feminino e 64 (57%) do sexo masculino; com idades entre 4 dias e ≤24 meses ($\bar{x}$ = 11,64 ± 6,9) sendo que 62 (55,35%) pacientes apresentavam idade ≤12 m e, 50 (44,64%) pacientes com idade >12m e ≤24m; 58 (52%) brancos, 27 (24%) pardos, 9 (8%) negros e 1(~1%) índio, e em 17 (15%) pacientes não havia informação sobre sua origem étnica (TABELA 13). O diagnóstico de leucemia foi firmado de acordo com os critérios aceitos internacionalmente; os subtipos de leucemias foram classificados morfologicamente de acordo com a classificação FAB e a imunofenotipagem seguindo os critérios do grupo EGIL. Foram excluídos aqueles com história prévia de síndrome mielodisplásica e também os com diagnóstico de síndrome de Down.

Freqüentemente é difícil determinar com precisão os relatos de *neonates* e *infants* (neonatos e infantes ou infantis) com leucemias e outras doenças neoplásicas. Uma variedade de termos com *neonatal*, *infant* e *congenital* (neonatal, infantil e congênita) encontrados na literatura torna difícil uma pesquisa precisa. Os termos *perinatal* (perinatal ou neonatal) designam o período imediatamente anterior e posterior ao parto (até um mês de vida); *newborn* (recém-nascido) aqueles com três meses ou menos; e *infancy* (infância) o primeiro ano de vida. Porém muitos estudos de *infant leukemia* avaliam os pacientes do nascimento até 18 ou 24 meses (Sande, Arceci *et al.*, 1999; Isaacs, 2003). O Grupo Brasileiro de Estudos Colaborativos sobre Leucemia Aguda em Lactentes e também esta amostra inclui pacientes com idade entre zero e 24 meses, porém para várias análises serão estratificados em dois grupos, o primeiro com a idade ≤12 meses e o segundo com a idade entre >12 meses e ≤24 meses (Emerenciano, Agudelo Arias *et al.*, 2006).

Estes pacientes fazem parte do projeto de investigação epidemiológica "**Estudo multi-institucional das leucemias infantis: contribuição dos marcadores imunomoleculares na distinção de diferentes fatores etiopatogênicos**", sendo provenientes de diferentes regiões do Brasil e atendidos no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2008. As instituições que fazem parte

deste projeto constituem o Grupo Brasileiro de Estudos Colaborativos sobre Leucemia Aguda em Lactentes e estão relacionadas na TABELA 14.

Este estudo tem sido coordenado pela Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira e tem aprovação das Comissões de Ética do Instituto Nacional do Câncer sob o número 008/06-CCEC. Todos os pais ou tutores legais dos pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido para a condução do trabalho.

No Anexo estão os artigos publicados sobre leucemia dos lactentes pelos componentes do grupo brasileiro no período de 2004 a 2009: Mendes, Coser *et al.*, 2004; Emerenciano, Agudelo Arias *et al.*, 2006; Pombo-De-Oliveira e Koifman, 2006; Emerenciano, Koifman *et al.*, 2007; Emerenciano, Menezes *et al.*, 2008; Koifman e Pombo-De-Oliveira, 2008; Pombo De Oliveira, Koifman *et al.*, 2009

TABELA 13 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES CONFORME SEXO E ETNIA

	n (%)	Brancos	Pardos	Negros	Indígena
Masculino	64 (57)	32	18	7	1
Feminino	48 (43)	26	9	2	0
Total	112	58	27	9	1

TABELA 14 - GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS COLABORATIVOS SOBRE LEUCEMIA AGUDA EM LACTENTES

Instituição	Cidade	Estado
Sociedade de Oncologia da Bahia	Salvador	BA
Centro de Pesquisa e Serviço de Hematologia – Instituto Nacional do Câncer	Rio de Janeiro	RJ
Centro Infantil de Investigações Hematológicas Domingos Boldrini	Campinas	SP
Hospital Martagão Gesteira	Salvador	BA
Hospital de apoio Brasília Unidade de Onco-Hematologia Pediátrica	Brasília	DF
Departamento de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria	Santa Maria	RS
Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira – UFRJ	Rio de Janeiro	RJ
Instituto de Oncologia Pediátrica – GRAAC	São Paulo	SP
Hospital Oswaldo Cruz – CEON	Recife	PE
Hospital do Câncer AC Camargo	São Paulo	SP
Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG	Belo Horizonte	MG
Hospital Santa Marcelina	São Paulo	SP
Associação de Combate ao Câncer em Goiás – Hospital Araújo Jorge	Goiânia	GO
Hospital Infantil Darcy Vargas	São Paulo	SP
Hospital Bom Jesus – ISPON	Ponta Grossa	PR

Hospital de Clínicas de Curitiba	Curitiba	PR
Hospital Regional de Mato Grosso do Sul Rosa Pedrossian	Campo Grande	MS
Santa Casa de Misericórdia Hospital Manoel Novaes	Itabuna	BA

4.1.1 Desenho do estudo

As coletas das amostras foram realizadas nos centros de origem dos pacientes e encaminhadas via correio (Sedex) ou transporte aéreo para a Coordenadoria de pesquisa do INCA/ Medicina Experimental, no Rio de Janeiro, para confirmação diagnóstica, realização de exames especializados e pesquisa.

As instruções para o encaminhamento das amostras eram que todas fossem encaminhadas acompanhadas de lâminas (SP e/ou MO), identificadas de forma legível, com o nome do paciente, tipo de material, data de coleta e as seguintes informações do paciente: data de nascimento, sexo, cor da pele, hemograma, se em uso de medicamentos e se tem sinais de alguma síndrome congênita.

As amostras de MO enviadas deveriam conter 2 mL ou mais do aspirado em EDTA para imunofenotipagem e 1 a 2 mL em heparina para citogenética. Devendo ser enviadas em temperatura ambiente em até 24 horas. Já as amostras de SP, para biologia molecular e/ou imunofenotipagem deveriam conter 4-5 mL em dois tubos com EDTA, sendo também enviados em até 24 horas em temperatura ambiente.

Ao chegarem ao laboratório eram distribuídas para serem submetidas às análises de imunofenotipagem e índice de DNA através da citometria de fluxo e processadas para citogenética convencional.

As etapas subseqüentes para determinação do *status* do gene *MLL* seguiram o fluxograma da FIGURA 3. Nos casos em que a quantidade de material era limitada discutia-se o passo seguinte para otimizar os resultados.

Quando a análise citogenética não foi realizada, ou era normal, ou inconclusiva para alterações cromossômicas, o *status* do gene *MLL* era investigado por FISH e/ou RT-PCR ou Southern blotting.

Se o FISH fosse positivo para a ruptura do *MLL*, era realizada a RT-PCR para as fusões prevalentes. Se fosse identificado o parceiro da fusão, a busca estava encerrada.

Se o FISH fosse positivo para a ruptura do *MLL*, e a RT-PCR fosse negativa, o DNA genômico era então encaminhado para a realização da LDI-PCR seguida do seqüenciamento automatizado do DNA.

A quase totalidade das análises citogenéticas e o FISH foram realizados no Laboratório de Citogenética do Serviço de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria da Universidade Federal de Santa Maria.

As análises por RT-PCR e Southern blotting foram realizadas no INCA.

As análises por LDI-PCR e o seqüenciamento foram realizados, gratuitamente, no *Diagnostic Center of Acute Leukemia* (DCAL) do *Institute of Pharmaceutical Biology* da *Johann Wolfgang Goethe – University in Frankfurt/Main*, na Alemanha, através de parceria com o DCAL, por meio do Prof. Dr. Rolf Marschalek e do Prof. Dr. Claus Meyer.

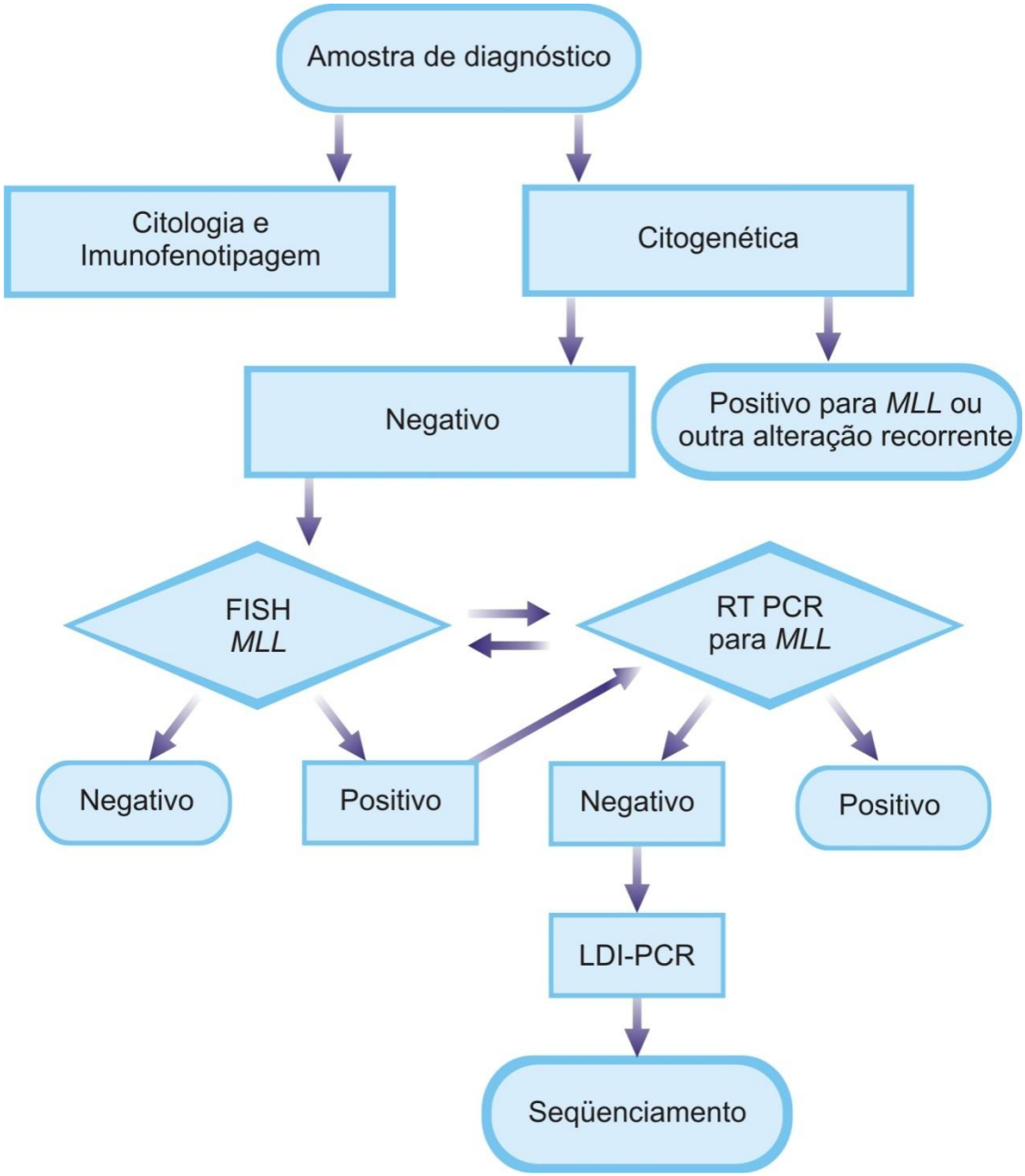

FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS REALIZADOS NESTE ESTUDO

4.2 Procedimentos técnicos

4.2.1 Citogenética de células da medula óssea

4.2.1.1 Obtenção das amostras

A coleta do material foi realizada nas diversas instituições colaborativas.

Cerca de 2 ml de MO foram aspirados em seringa heparinizada a partir da crista ilíaca postero-superior ou porção anterior da tíbia.

4.2.1.2 Cultura e Preparação Citológica

A análise citogénetica convencional foi realizada em 50 pacientes.

Para a obtenção dos cromossomos metafásicos em amostras de MO, foi utilizado o método descrito por RAIMONDI et al. (1999), com modificações, conforme descrito a seguir (Raimondi, Chang *et al.*, 1999).

Cerca de 2 ml do material diluído 1:1 em solução fisiológica foram submetidos a um gradiente de Ficoll-Hypaque para separação das células mononucleares que após lavadas com meio de cultura (RPMI 1640) foram colocadas em dois frascos de cultura com 5 ml de meio de cultura (RPMI 1640) suplementado com 10% de soro bovino fetal e incubado por 24 horas a 37°C. Após este período, o protocolo de preparação citológica seguia três etapas principais: interrupção mitótica, quando é adicionado 0,1 ml de colchicina (Sigma – 16 µg/ml) na cultura, que é mantida a 37°C por 40 minutos; tratamento hipotônico com solução de cloreto de potássio (KCL-0,75M) a 37°C por 15 minutos e a fixação do material com 3 volumes de metanol para 1 de ácido acético glacial recém preparado. Duas gotas da suspensão foram distribuídas em lâminas previamente lavadas e geladas, e após a secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram armazenadas em estufa a 37°C, para obtenção das bandas G (Figura 4).

4.2.1.3 Bandeamento cromossômico GTG

Foi utilizada a técnica de SCHERES (1972), com modificações. O material foi desidratado em soluções decrescentes de álcoois (95%, 85%, 70%) e após hidratado em tampão fosfato pH 6,8 por 5 minutos. A seguir, as lâminas foram imersas em solução de tripsina 0,02% e coradas em solução de Giemsa diluída em tampão fosfato 0,06M (14,2 g/l de $NaHPO_4$ + 8,16 g/l de KH_2PO_4), pH 6,8, na proporção de 1:30, durante 5 minutos (FIGURA 4) (Scheres, 1972).

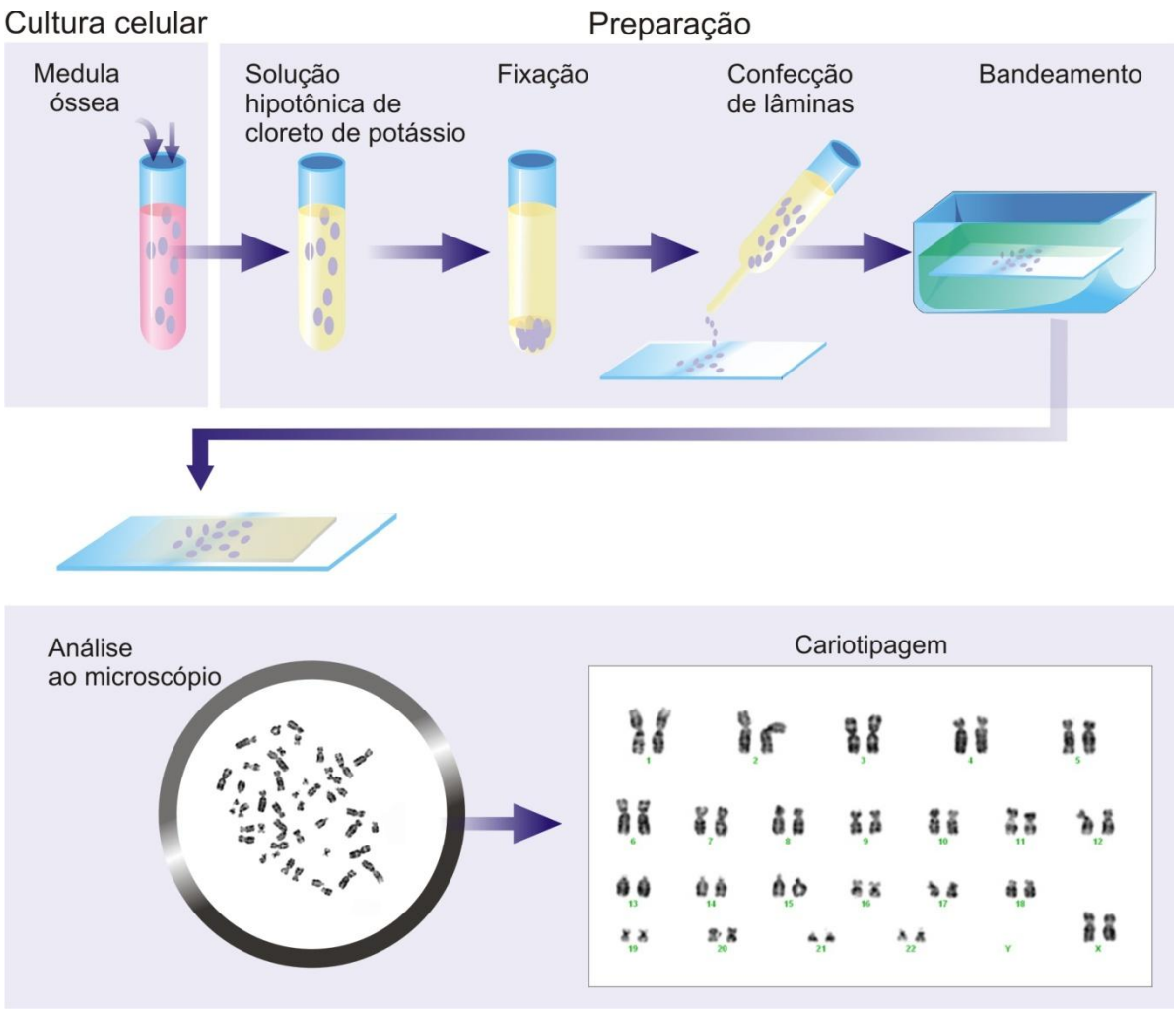

FIGURA 6 - METODO PARA ANÁLISE CITOGENÉTICA
FONTE: Adaptado de: (Passarge, 2004).

4.2.1.4 Análise e cariotipagem

Após o bandeamento GTG, sempre que possível, um mínimo de 20 metáfases bandeadas foram analisadas em desenhos e sistema de imagem para a identificação da presença ou ausência de aberrações cromossômicas. Foram utilizados como critérios para a classificação, os recomendados pelo ISCN, 2005. Neste, define-se como clone, a presença de duas células com a mesma aberração estrutural ou cromossomo adicional e três células com ausência do mesmo cromossomo. Foram considerados normais os cariótipos cuja análise de pelo menos 20 metáfases bandeadas não apresentou alterações cromossômicas clonais e foram considerados como contendo aberrações, os cariótipos cuja análise demonstrou a presença de pelo menos um clone anormal (Shaffer e Tommerup, 2005). No mínimo duas metáfases de cada paciente foram selecionadas e capturadas em microscópio comum, equipado com sistema de imagem *Applied Imaging CytoVision*®.

4.2.2 Hibridização *in situ* por fluorescência

A análise por FISH foi realizada em 68 pacientes para os rearranjos no gene *MLL*.

Foi utilizada a sonda comercial LSI *MLL* (Vysis Inc) que é uma sonda de dupla coloração, composta de uma porção centromérica de 350kb na região bcr do gene *MLL* marcada com espectro verde e outra telomérica do bcr com aproximadamente 190kb marcada por espectro laranja (Figura 5).

Para a hibridização das sondas nas amostras e detecção dos sinais fluorescentes, foi utilizada a técnica recomendada pelo fabricante (Vysis,Inc.).

O material, em lâminas preparadas no dia anterior, foi desnaturado (70%formamida/2xSSC, pH 7.0 a 8.0) a 73 $\pm$ 1^{o}C por 5 minutos e, imediatamente após as lâminas foram imersas em soluções de etanol (70%, 85%, 100%). A sonda (1 µl) com 7 µl de tampão de hibridação, e 2 µl de água deionizada foi desnaturada a 73 $\pm$ 1^{o}C em banho-maria por 5 minutos. A seguir, esta solução era aplicada na lâmina, em área demarcada que era coberta com lamínula de vidro e vedavam-se as

bordas. As lâminas eram então colocadas em câmara úmida e escura, pré-aquecida a 37^{o}C e incubadas em estufa por 16 horas a 37^{o}C.

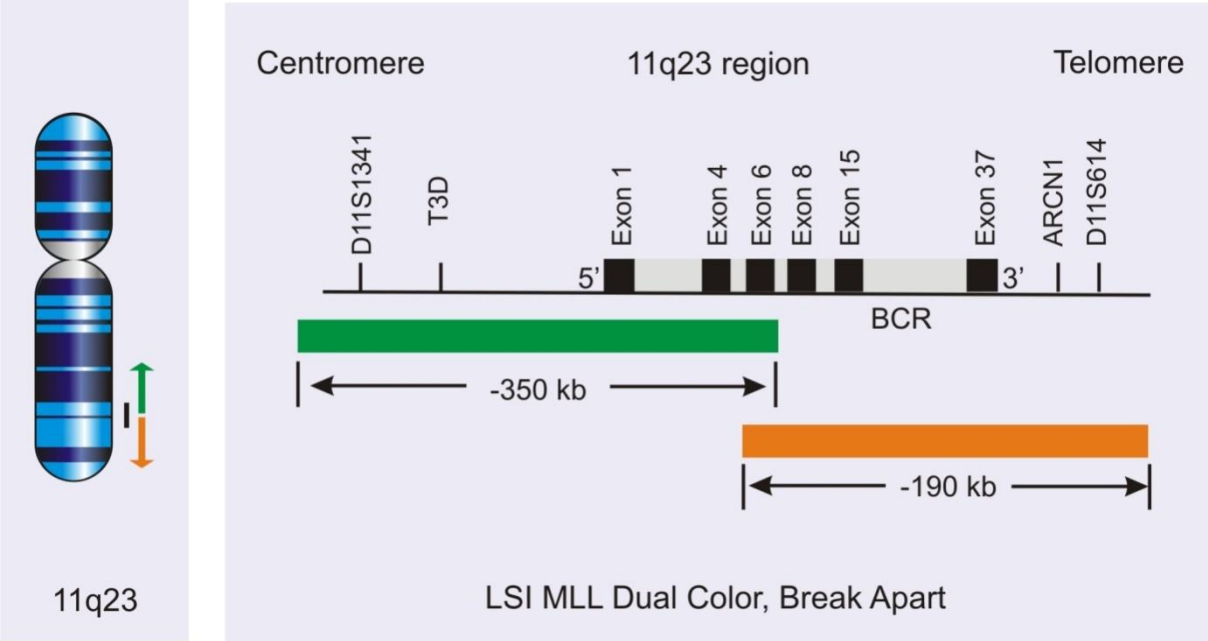

FIGURA 4 - LSI® *MLL* DUPLA COLORAÇÃO

FONTE: Adaptado de: Vysis®

NOTA: região centromérica do bcr marcada com espectro verde e telomérica do bcr marcada com espectro laranja.

Lavagem lenta - a lamínula era retirada com cuidado, e a lâmina era submetida a três banhos consecutivos de formamida 50 /2xSSC a 45^{o}C por 10 minutos cada e após, era transferida para um frasco com 2xSSC a 45^{o}C por 10 minutos. Após, era transferida para um frasco com 0,1%NP40 / 2xSSC a 45^{o}C por 5 minutos.

Visualização da hibridização - Deixava-se a lâmina secar, protegida da luz, colocava-se 10 µl de contra corante DAPI II e cobria-se com lamínula (DAPI II Counterstain Part mistura que contém 4',6-diamidino-2-phenylindole e p - phenylenediamine em salina tamponada e glicol). Quando usado como contracorante no FISH, o DAPI II aparece como um azul brilhante nas células interfásicas e nas metáfases (FIGURA 6).

A observação foi realizada em um microscópio Carl Zeiss Axiolab equipado com lâmpada HBO 100W e com filtro DAPPI/Hoechst (Zeiss). Já, para a

visualização da emissão da passagem de luz da contra coloração, foram utilizados os filtros Zeiss de bandas simples dos espectros verde (15), laranja (09) e azul (02).

Para a documentação dos resultados da hibridização in situ, utilizaram-se imagens capturadas através de câmara CCD (S-30) e processador de imagem Meta Systems equipado com software ISIS. Para melhor visualização, as imagens das metáfases capturadas foram equalizadas no programa Adobe Photoshop 5.02, através de um filtro (*levels*) que equilibra as quantidades de tons claros e escuros das imagens, que evidencia o material marcado e diminui a marcação inespecífica. Após, as imagens foram impressas em impressora jato de tinta.

Foram analisadas pelo menos 20 células entre cromossomos metafásicos e/ou núcleos interfásicos, de acordo com os critérios descritos por Hopman et al. (Hopman, Kamps *et al.*, 2005). Nas células normais, os sinais verdes e laranjas permaneceram unidos e a separação destes indicava ruptura do gene *MLL*.

As análises foram realizadas por dois observadores no Laboratório de Citogenética do Serviço de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria da UFSM.

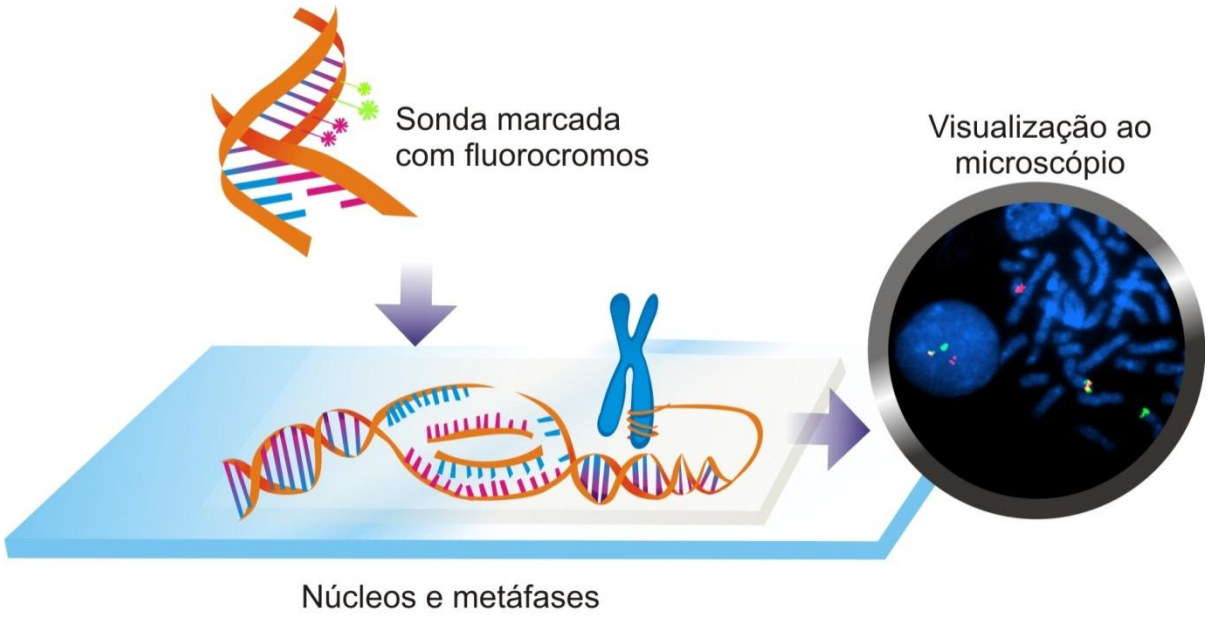

FIGURA 5 - MÉTODO DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA
FONTE: Adaptado de: (Smeets, 2004)

4.2.3 Transcrição Reversa e Reação em cadeia da polimerase

A análise por RT-PCR foi realizada em 85 pacientes para os rearranjos no gene *MLL*, através da amplificação das regiões de fusão para as seqüências mais comumente envolvidas nas translocações com o *gene MLL: MLL/AFF1, MLL/MLLT3, MLL/MLLT1.*

Para as reações de PCR foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) previamente descritos e controles positivos. Após a ciclagem o produto da RT-PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com Brometo de Etídio, visualizado em transiluminador UV e fotografado usando sistema de fotografia e análise EDAS da KodaK.

4.2.3.1 Métodos de extração de DNA e RNA

4.2.3.1.1 Separação de linfócitos por Ficoll-Hipaque

AS amostras de sangue periférico ou medula óssea foram diluídas com solução fisiológica e colocadas sobre Ficoll-hipaque. Após centrifugação por 20 min a 1800 rpm, o anel leucocitário era retirado e lavado com solução fisiológica. Posteriormente parte do *pellet* era ressuspendido em solução fisiológica e solução desnaturante (proporção de 1µL:6 µL), sendo a outra parte estocada a -80ºC.

4.2.3.1.2 Extração de DNA

Seguiu-se o método utilizando-se fenol-clorofórmio: Ressuspender os pellets de células, com no máximo 0,5 mm de altura, em 50 µL de salina num tubo. Adicionar 20 µL de proteinase K (10 mg/ml) e 700 µL de tampão TLL e incubar a 42^{o}C por 12 horas. Adicionar 750 µL de fenol equilibrado em TE (10:1) pH 8,0. Agitar vigorosamente por uns 5 min. Centrifugar a 8000 rpm (T^{o}C amb) por 10-15 min. e

coletar 600 µL da fase aquosa. Adicionar 600 µL de clorofórmio/álcool isoamílico [24:1], vigorosamente, centrifugar e coletar 500 µL da fase aquosa. Repetir a etapa anterior usando 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico [24:1]. Coletar 400 µL da fase aquosa e adicionar 40 µL de acetato de sódio 3M + 1100 µL de etanol 100%; Agitar várias vezes suavemente até o DNA formar uma medusa. Centrifugar a 10.000 rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante e acrescentar 1000 µL de etanol 70%. Centrifugar por 5 minutos e descartar o sobrenadante. Secar o DNA à T^{o}C ambiente, dissolvê-lo em 20 a 100 µL de TE(10:1) e quantificar no espectrofotômetro UV (Gross-Bellard, Oudet *et al.*, 1973).

4.2.3.1.3 Extração de RNA por TRIZOL®

As células em suspensão foram centrifugadas a 12.000xg, por 10 minutos. Adicionar 1 ml de TRIZOL® no pellet de células obtido na prévia centrifugação. Incubar por 5 minutos temperatura ambiente. Após, adicionar 200 µL de clorofórmio, agitando vigorosamente com a pipeta, a fim de obter uma solução homogênea. Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 12500rpm, por 15 minutos, em uma centrífuga refrigerada a 4ºC. Retirava-se a fase aquosa que estava na fase superior da solução, e passava-se para um novo tubo. Adicionar 500 µL de álcool isopropílico. Incubar por 10 minutos. Centrifugar a 12.500rpm, por 10 minutos, em uma centrífuga refrigerada a 4ºC. Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado (RNA) com 1 mL de etanol 75%. Soltar o pellet, lavando-o com o auxílio de um vórtex. Centrifugar a 7.500rpm, por 5 minutos, em uma centrífuga refrigerada a 4ºC. Secava-se o precipitado, porém não completamente. Adicionar 20 µl de água purificada homogeneizando bem. Incubar, por 10 minutos, a 55-60ºC, para dissolver o pellet. Guardar o RNA em um freezer -80ºC para posterior estudo (Pombo De Oliveira e Colaboradores, 2008).

4.2.3.2 RT-PCR

A obtenção do cDNA é realizada com 2,5 µg de RNA de acordo com a metodologia descrita no Kit Superscript SSRT III (INVITROGEN) usando *primers* hexâmeros. A RT-PCR é realizada com os *primers* específicos para as alterações cromossômicas citadas por Van DONGEN et al.(1999) (Van Dongen, Macintyre *et al.*, 1999). A reação é executada com 2 µL de cDNA, tampão 1X, 1,5mM de MgCl2, 50 pM de primers, 10 nM de dNTPs, 0,1U/reação de Taq DNA polimerase (INVITROGEN), nas condições de ciclagem 95ºC por 5 min. (1 ciclo); 94ºC por 30 seg.; 65ºC por 1 min.; 72ºC por 1 min. (35 ciclos). Um ciclo de extensão final a 72ºC por 2 minutos em termociclador. O produto da RT-PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com Brometo de Etídio, visualizado em transiluminador UV e fotografado usando sistema de fotografia e análise EDAS da Kodak (FIGURA 7).

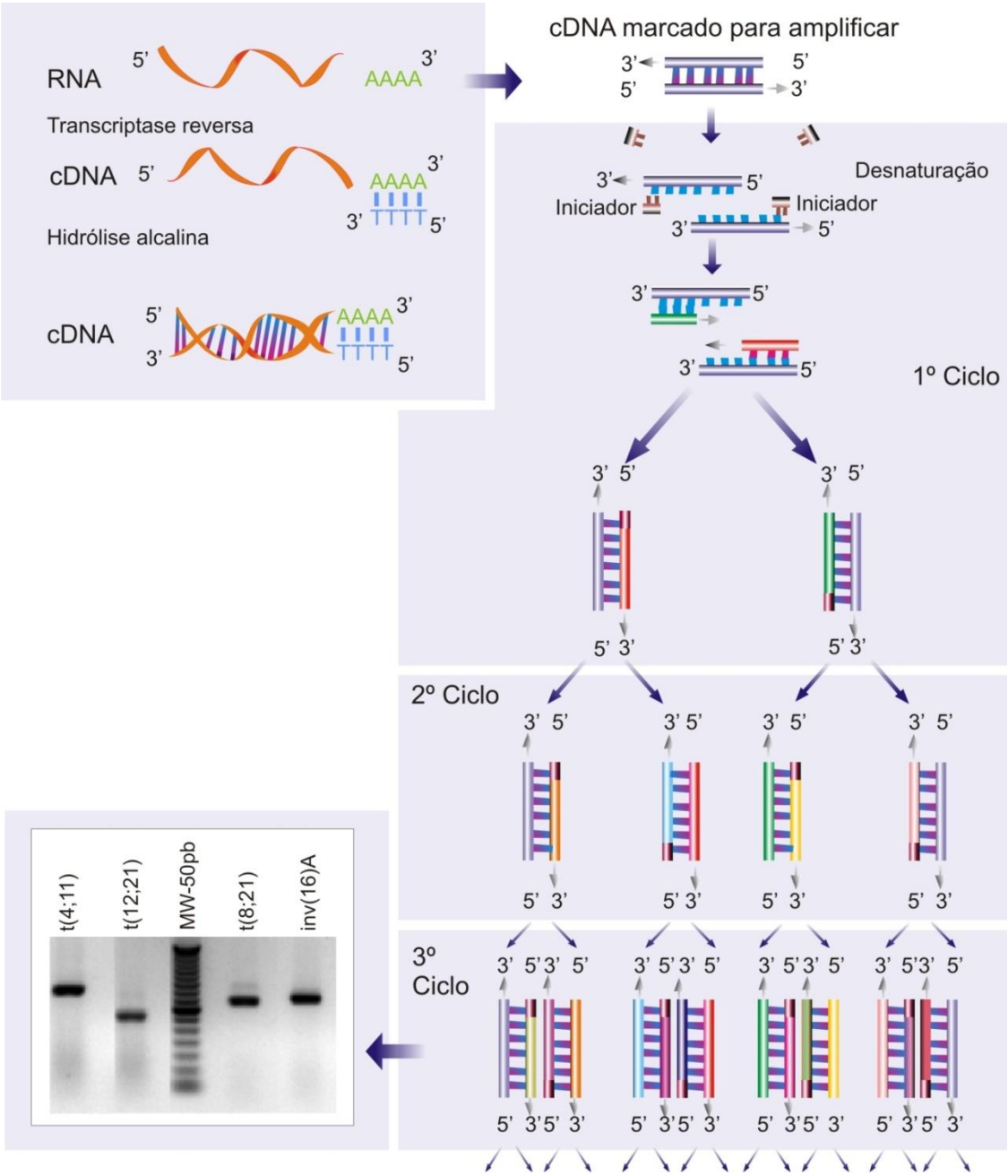

FIGURA 6 - REAÇÃO DE RT-PCR

FONTE: Adaptado de: (Volkenandt, Lohr *et al.*, 1990; Passarge, 2004).

4.2.4 Southern Blotting

A reação de *Southern blotting* foi realizada em quatro pacientes do INCA, visando à identificação de rearranjos do *MLL* não detectados pelas técnicas que o precederam. Seis microgramas de DNA foram digeridos completamente com BamHI, seguiu-se hibridização, com sonda de 0,74-kb e a eletroforese em gel de agarose a 0,8% (FIGURA 8).

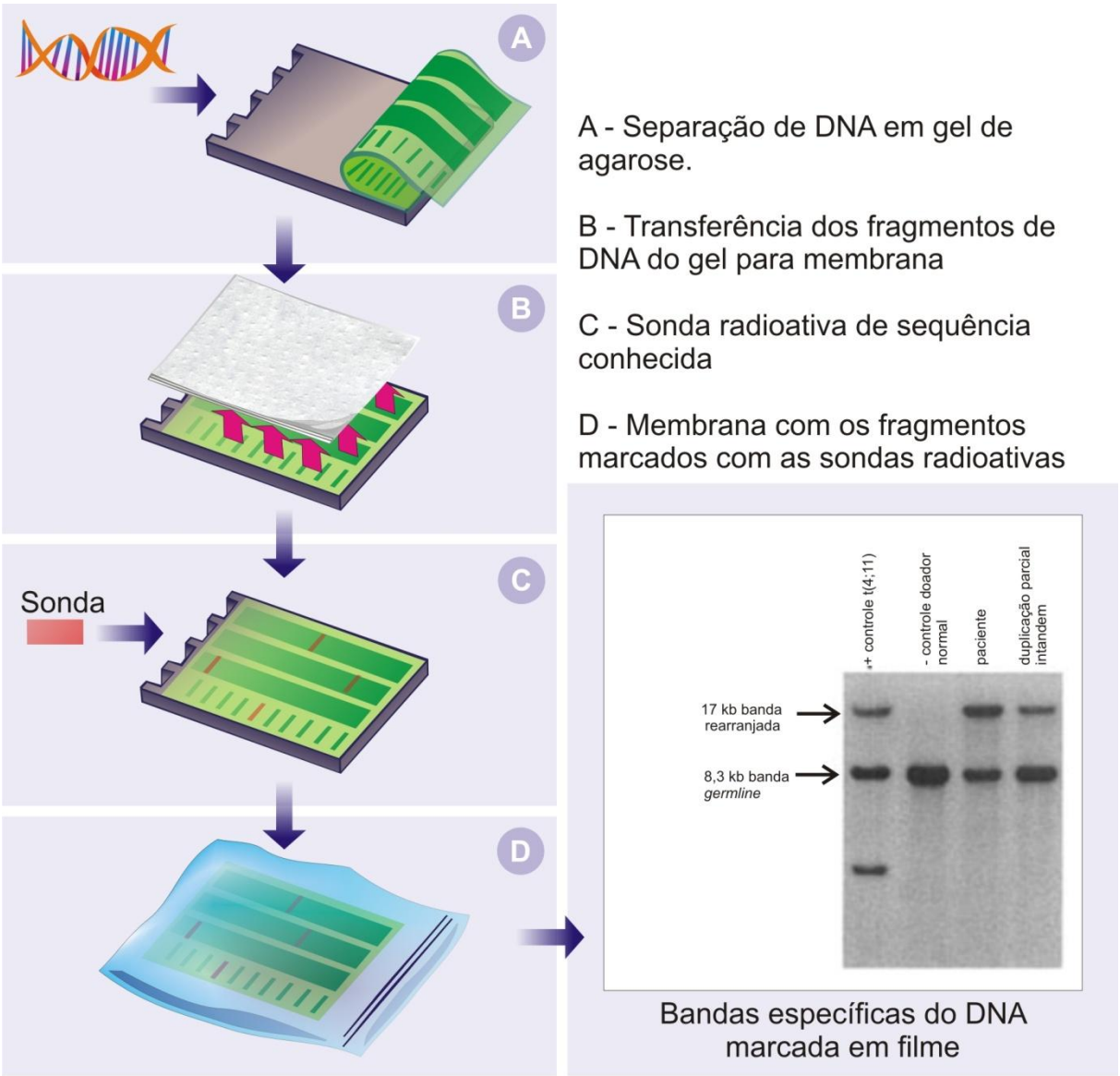

FIGURA 7 - MÉTODO DE *SOUTHERN BLOTTING*
FONTE: Adaptado de: (Wang, Wang *et al.*, 2003).

4.2.5 PCR Invertida de Longa de Distância

Em 13 pacientes, foi realizado o método descrito por Meyer et al. (2005) que utiliza PCR reversa de longa distância (LDI-PCR) para identificar rearranjos do gene *MLL* independente do gene parceiro envolvido ou outras aberrações do *MLL* que ocorreram dentro da região bcr. Esse método possibilita análises de grande escala, pois seqüências do *MLL* fusionadas podem ser obtidas com apenas quatro reações de PCR. Além disso, requer somente pequenas quantidades de DNA genômico (1 µg) e fornece informações genéticas relevantes que podem ser usadas diretamente para análises quantitativas de Doença Residual Mínima.

De cada paciente, 1 µg de DNA genômico foi digerido com a enzima de restrição BamHI. As amostras de DNA digerido foram ligadas a 16°C por cerca de 18 horas (*overnight)* em um volume total de 50 µL na presença de 5 unidades de "ligase DNA T4". Todas as reações de ligação foram interrompidas por 10 minutos a 65°C. Foram utilizados 5 µL de DNA genômico religado (100 ng) para todas as análises LDI-PCR subseqüentes (Meyer, Schneider *et al.*, 2005).

Oligonucleotides específicos para o gene *MLL* foram desenhados de acordo com seqüências de DNA publicadas (inserção no. AJ235379 do GenBank). Para o DNA genômico digerido por BamHI e religado, os cinco oligonucleotides A-E foram usados em quatro diferentes combinações (A-B, A-C, A-D, e A-E; Figura 9). Cada análise incluiu um controle positivo através do uso de oligonucleotides B e F que amplificam um fragmento de DNA de 7.9 kb da região de concentração de quebras no gene *MLL*, independentemente da existência de um ou dois alelos *MLL* do tipo selvagem (*germline)* na amostra de um certo paciente. Todas as reações LDI-PCR foram realizadas utilizando o sistema "PCR TripleMaster" (Eppendorf), conforme recomendações do fabricante. Os produtos amplificados foram separados em géis de agarose 0.8%. Os produtos mutantes foram extraídos do gel e seqüenciados diretamente. Quando nenhum alelo der(11) pôde ser determinado, uma abordagem recíproca foi aplicada para identificar o alelo recíproco através do uso das combinações dos *primers* G-L, H-L, I-L, e K-L (Figura 9C). Anotações das seqüências *MLL* fusionadas foram obtidas através de pesquisa no banco de dados do genoma humano (Genomic blast, www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/Blast). Seqüências de DNA dos oligonucleotides A-L estão disponíveis em

www.biozentrum.unifrankfurt.de/PharmBiol/Mitarbeiter/Marschalek/download.html (Meyer, Schneider *et al.*, 2005).

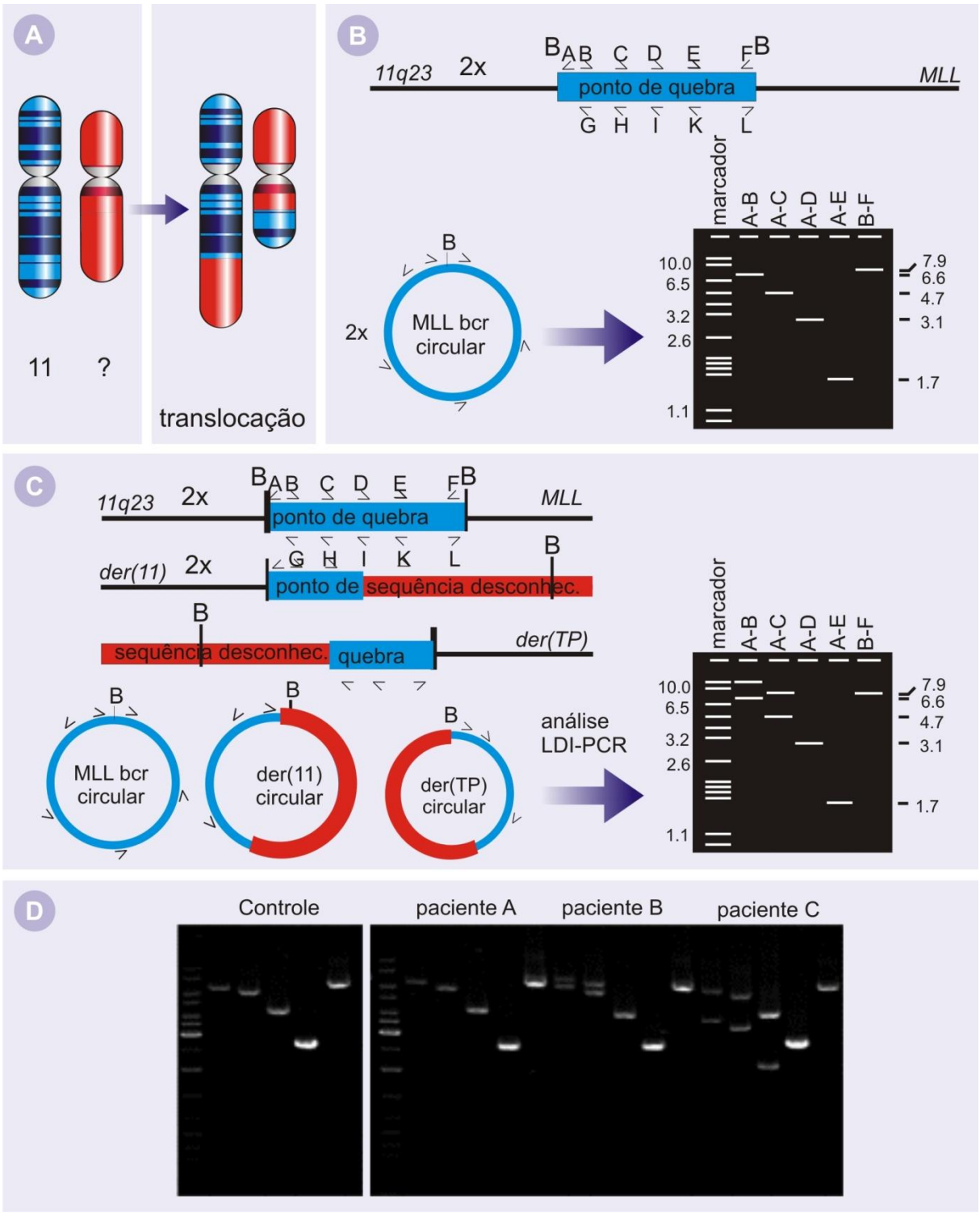

FIGURA 8 - MÉTODO DE LDI-PCR
FONTE: Adaptado de: (Meyer, Schneider *et al.*, 2005).

NOTA: (A) Translocação cromossômica alvo da enzima de restrição (B) Alelos *MLL* não rearranjados: digestão por BamHI e religação do bcr *MLL* levará a dois DNA circulares que podem ser amplificados por uma combinação de primers A–B, A–C, A–D, e A–E. A combinação do primer B–F serve como controle interno. (B - sito de restrição reconhecido pela BamHI; bcr, breakpoint cluster region. (C) Presença do alelo *MLL* rearranjado. Digestão pela BamHI e religação dos 2 alelos *MLL* levará a 3 DNAs circulares diferentes [der(11) e der(TP); TP - parceiro da translocação] que podem ser amplificados pela combinação de primers A–L. (D) DNA Genomico dos pacientes foi testado com 4 combinações diferentes de oligonucleotideos (A–B, A–C, A–D, and A–E). (Esquerda) DNA marcador de tamanho e controle normal (placenta). (Direita) Análise de diferentes pacientes (A–C).

4.2.6 Seqüenciamento automatizado do DNA

Após a PCR reversa de longa distância, a banda correspondente ao produto de fusão foi recortada do gel, o DNA foi purificado e diretamente seqüenciado em seqüenciador automático MegaBace.

O seqüenciamento do genoma humano permite analisar dezenas de milhares de genes ao mesmo tempo, tornou possível processar grande número de amostras tumorais, aferindo cada um dos aproximadamente 30000 genes humanos, na procura de possíveis alterações gênicas associadas ao câncer (Armstrong, Staunton *et al.*, 2002).

O seqüenciamento de DNA é um processo que determina a ordem dos nucleotídeos em uma amostra. Esta é uma reação semelhante à reação de PCR, onde uma pequena amostra de DNA é amplificada milhares de vezes *in vitro*, porém, de forma diferente da reação de PCR, apenas um *primer* é utilizado para a síntese de fitas.

O seqüenciamento automatizado do DNA envolve quatro fluoróforos, um para cada base nucleotídica. O sinal fluorescente resultante é registrado em um ponto fixo, quando o DNA passa através de um tubo capilar que contém um gel eletroforético. As marcas fluorescentes específicas para as bases são ligadas aos trifosfatos de didesoxinucleotídeos (ddNTP). Cada ddNTP é marcado com uma cor diferente. Todas as cadeias terminadas em adenina produzirão um sinal de uma cor, as terminadas em citosina produzirão outra cor, e assim por diante. Essas reações são realizadas automaticamente em tubos capilares de seqüenciamento. A migração eletroforética das cadeias marcadas de ddNTP no gel do tubo capilar passa diante de um feixe de luz de laser focalizado em uma posição fixa. A luz de laser induz um sinal fluorescente, que depende da marca específica, representativo de um dos

quatro nucleotídeos. A seqüência é lida e registrada eletronicamente, sendo visualizada como picos alternantes em uma das quatro cores, representando os nucleotídeos alternantes em suas posições na seqüência (Rosenthal, 1995).

A mistura de reação de seqüenciamento consistiu em um volume de 10 µL sendo 4µL de solução para seqüenciamento (DyEnamyc TM ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for Mega Bace DNA Analysis Systems, Amersham Biosciences), 1µL de primer numa concentração de 5 pmols/µL e 5 µL do produto de PCR purificado. As amostras foram amplificadas em termociclador automático na seguinte programação: 95^0C por 20 segundos, 50^0C por 15 segundos, e 60^0C por 1 minuto sendo repetido em 25 ciclos, e a seguir são aplicadas no seqüenciador (Pombo De Oliveira e Colaboradores, 2008).

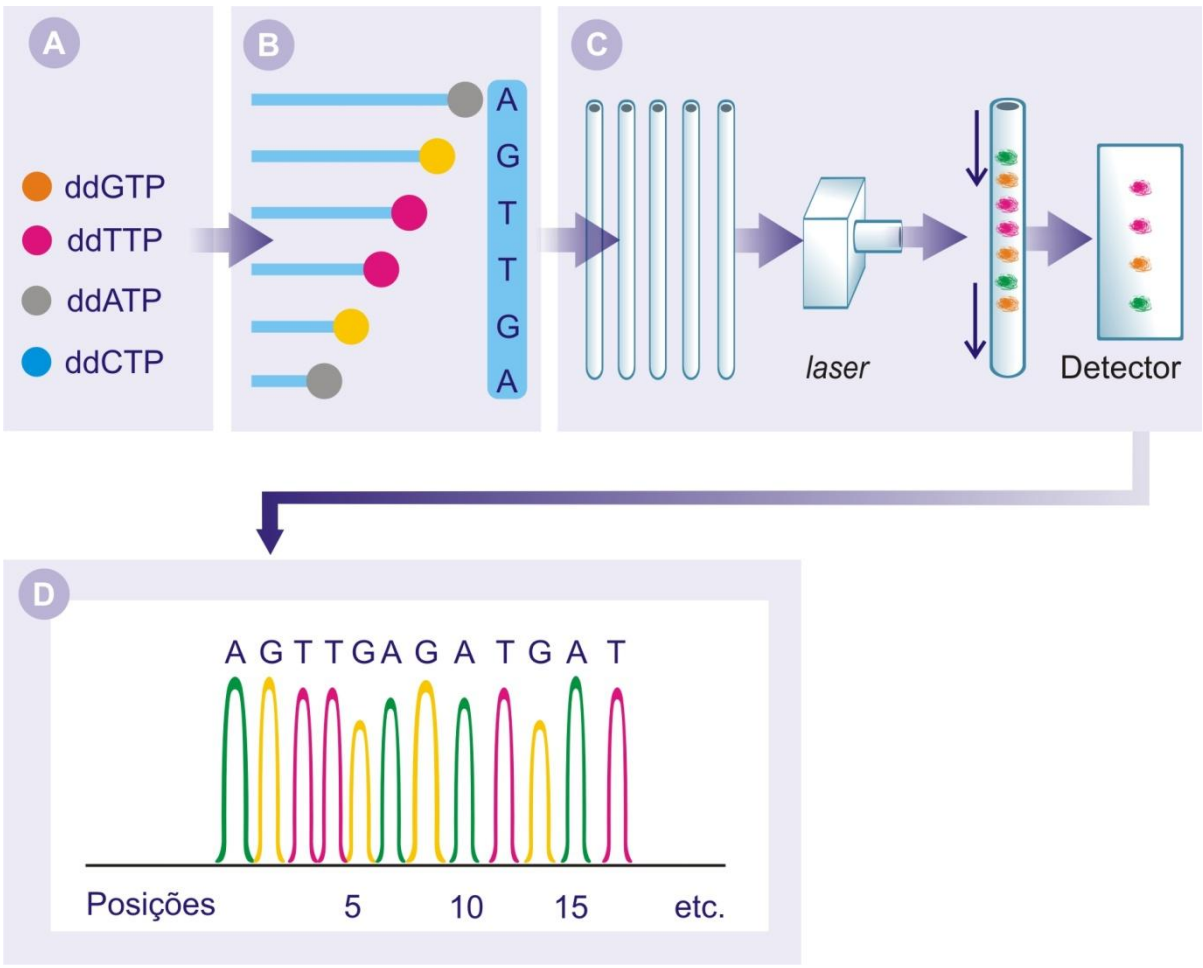

FIGURA 9 - MÉTODO DE SEQÜENCIAMENTO AUTOMATIZADO DO DNA
FONTE: Adaptado de: (Passarge, 2004).

NOTA: Seqüenciamento baseado na marcação com fluorescência do DNA e detecção por eletrosferogramas. A) ddNTPs, cada um com um marcador fluorescente diferente, B)Reações de seqüenciamento, C) Capilares de seqüenciamento, D) Impressão automatizada da seqüência – eletrosferograma.

4.3 Análise estatística

As variáveis contínuas analisadas foram caracterizadas pela média, mediana e desvio padrão e, as categóricas, por seus respectivos percentuais na amostra.

A associação entre a variável faixa de idade e sexo, presença do gene *MLL* e Ploidia, respectivamente, foi analisada estatisticamente por meio do Teste do Qui-Quadrado. Este teste foi também utilisado para avaliar as diferenças dos resultados obtidos por diferentes métodos moleculares. A significância das diferenças entre as médias das contagens hematológicas foi avaliada pelo teste *T* (de student). Foi considerado o nivel de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra

Trata-se de um estudo descritivo observacional do tipo exploratório, citogenético e molecular, para uma série de casos com diagnóstico clínico de leucemia aguda em lactentes.

Dos 112 pacientes, 65 (58%) foram diagnosticados com LLA, 44 (39%) com LMA, 2 (1,8%) como Leucemia Bifenotípica e 1 (0,9%) como Leucemia Bilineal. A distribuição dos pacientes quanto ao tipo e subtipo da leucemia aguda em relação à faixa etária do paciente esta demonstrada na TABELA 15. Os pacientes com LLA e com LMA não se distribuíram igualmente nas duas faixas etárias ($\chi^2 = 4,20$; $p<0,05$).

TABELA 15 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES CONFORME FAIXA ETÁRIA E SUBTIPO DE LA

Sub-tipo de LA	≤12 meses	>12m e ≤24m	Freqüência (n)	Total (%)
LLA pró-B	27	06	33	65 (58%)
LLA comum	11	11	22	
LLA pré-B	-	04	04	
LLA-T	03	03	06	
LA Bifenotípica	01	01	02	3 (2,7%)
LA Bilineal	01	-	01	
LMA-M0	-	01	01	44 (39,3%)
LMA-M1	02	-	02	
LMA-M2	-	04	04	
LMA-M3	-	04	04	
LMA-M4 E0	05	06	11	
LMA-M5	03	03	06	
LMA-M6	01	01	02	
LMA-M7	03	05	08	
LMA sem classificação	05	01	06	
Total	62	50	112	

Dos 62 pacientes com idade ≤12 meses, 27 eram do sexo feminino e 35 do sexo masculino; dos 50 com idade >12m e ≤24m, 21 eram do sexo feminino e 29 eram do sexo masculino. Não foi observada associação estatisticamente significativa quando se comparou as faixas de idade com o sexo (χ_1^2= 1,26; p >0,20)

5.2 Dados Clínicos

A história clínica da maioria destes pacientes é curta, de 5 a 20 dias, com febre, alguns com problema infeccioso como pneumonia e diarréia, outros com manifestação cutânea hemorrágica ou infiltração leucêmica, aumento do volume abdominal, palidez progressiva e diminuição da atividade.

Nos 62 pacientes com idade ≤12 meses, 31 pacientes apresentaram hepatoesplenomegalia, 4 hepatomegalia, 4 esplenomegalia, 8 sem organomegalia e em 15 esta informação não constava. A presença de linfonodos aumentados foi observada em 14 pacientes, em 29 não e 19 sem esta informação; 1 com alargamento de mediastino; 6 com processo infeccioso documentado; 4 pacientes com SNC comprometido; 4 com infiltração de pele e um com hipertrofia gengival.

Nos 50 pacientes com idade >12m e ≤24m, 21 pacientes apresentaram hepatoesplenomegalia, 2 hepatomegalia, 1 esplenomegalia, 12 sem organomegalia e em 14 esta informação não constava. Em 14 pacientes foi observada a presença de linfonodos aumentados de tamanho, em 21 não (15 sem esta informação); 1 pacientes com SNC comprometido; 2 com alargamento do mediastino, 5 com processo infeccioso; 1 com fenda labial e palatina e 1 com cardiopatia não sindrômicos.

Em relação ao primeiro hemograma, ao diagnóstico, o valor de hemoglobina variou de 1,04 a 13,3 g/dl, com mediana de 7,3 g/dL, e a média (± desvio padrão) foi igual a 7,3 ± 2,7. O número de leucócitos variou de 1600 a 1112000/µL, com mediana de 39300/µL e a média (± desvio padrão) foi igual a 91237 ± 157645/µL. A porcentagem de blastos no sangue periférico variou de 0 a 100%, com mediana de 40%; o número de plaquetas variou de 3890 a 620000/µL, com mediana de 43000/µL e a média (± desvio padrão) foi igual a 67112 ± 89542/µL; a distribuição por faixa etária está demonstrada na TABELA 16. As médias de cada um dos

parâmetros nas duas faixa etárias não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando avaliadas pelo teste t (hemoglobina: t= 0,30; p>0,70; leucócitos: t'= 0,49< tc=3,11; plaquetas: t=0,34. p>0,70 e blastos: t=0,35; p.0,70)

TABELA 16 - CONTAGENS HEMATOLÓGICAS

Faixa etária	Hemoglobina (Média±ep)	Leucócitos (Média±ep)	Plaquetas (Média±ep)	Blastos (Média±ep)
≤12 m	7,3 ± 2,3g/dL	116132 ± 201946 /µL	61320 ± 78839 /µL	48 ± 40%
>12m e ≤24m	7,6 ± 3,0 g/dL	65070 ± 87633 /µL	49000 ± 95675/µL	45 ± 37%

NOTA: dp, desvio padrão; Dados faltantes: hemoglobina ≤12 m (n=21) e >12m e ≤24m (n = 9); Leucócitos ≤12 m (n=4) e >12m e ≤24m (n = 9); plaquetas ≤12 m (n=20) e >12m e ≤24m (n = 7); blastos ≤12 m (n=11) e >12m e ≤24m (n = 13);

5.3 Análise citogenética

Dos 112 pacientes, 38 (34%) não foram coletadas amostras para análise citogenética; dos outros 74 (66% da amostra total), em 50 (67,5%) pacientes foi realizada citogenética com bandeamento GTG das células da MO ao diagnóstico e em 24 (32,5%) a má qualidade ou a ausência de metáfases não permitiu a conclusão da análise.

Dos 50 analisados citogeneticamente, 21 (42%) pacientes apresentavam cariótipo normal e em 29 (58%) foram detectadas alterações que serão descritas a seguir.

O índice de DNA (ID), técnica de quantificação do DNA por citometria de fluxo, cujos valores de referencia são: ID = 1,0 a 1,16 - diplóide; ID = <1,0 - hipodiplóide; ID = >1,16 – hiperdiplóide foi realizado em 18 pacientes. Nove foram analisados apenas pelo índice de DNA, sendo que 6 foram diplóides (ID = 1,0 em 4 pacientes, ID = 1,03 e ID = 1,06) e, 3 hiperdiplóides (ID = 1,23, ID = 1,52 e ID = 1,54). Nos outros 9 pacientes a citogenética também foi realizada, havendo concordância quanto à ploidia em 3 pacientes: 2 citogenéticas diplóides e ID = 1,03 e ID = 1,09, uma hiperdiplóide com 52 cromossomos com ID= 1,22. Em 6 pacientes houve discordância, 3 citogenéticas diplóides com ID hiperdiplóide (ID = 1,33, ID =

1,39 e ID = 1,48), um diplóide com t(4;11) e ID = 1,41(hiperdiplóide); uma citogenética hiperdiplóide com 49 cromossomos e ID = 1,04 (diplóide); uma citogenética hipodiplóide com 45 cromossomos e ID= 1,04 (TABELA 17).

A TABELA 18 apresenta números absolutos e as freqüências das ploidias dos 50 pacientes analisados por citogenética nas respectivas faixas etárias. Não se observou diferença estatiscamente significante na distribuição de células dioloide e com diferentes ploidias (consideradas em uma única classe) nas duas faixas etárias (χ_1^2=0,05; p>0,80).

TABELA 17 - DADOS DOS PACIENTES ANALISADOS POR INDICE DE DNA E CITOGENÉTICA

Paciente	Idade /sexo	Diagnóstico	Citogenética	Índice de DNA	ID
33	2/M	LLA pró-B	NR	diploidia	1,03
54	4/M	LLA pró-B	NR	hiperdiploidia	1,23
29	4/M	LLA pró-B	NR	hiperdiploidia	1,52
3	5/F	LLA-Comum	NR	diploidia	1
5	5/F	LLA pró-B	NR	diploidia	1,06
65	11/M	LLA-T	NR	diploidia	1
30	12/M	LLA pró-B	NR	hiperdiploidia	1,54
17	14/F	LLA-Comum	NR	diploidia	1
13	21/M	LLA-Comum	NR	diploidia	1
			Discordantes		
69	0,011/F	LLA-Comum	46,XX (diploidia)	hiperdiploidia	1,39
80	8/M	LLA-T	49,XY,+3,+8,+19[06]/46,XY[01] (hiperdiploidia)	diploidia	1,04
44	9/F	LLA pró-B	46,XX,t(4;11)(q21;q23) (diploidia)	hiperdiploidia	1,41
34	15/M	LMA-M2	45,XY,-19 (hipodiploidia)	diploidia	1,04
39	15/F	LLA-T	46,XX (diploidia)	hiperdiploidia	1,48
40	18/M	LLA-Comum	46,XY(diploidia)	hiperdiploidia	1,33
			Concordantes		
31	1/M	LLA pró-B	46,XY	diploidia	1,03
91	23/M	LLA pró-B	46,XY	diploidia	1,09
107	23/M	LLA-Comum	52,XY,+7,+8,+9,+17,+21,+22[8]/ 46,XY[12]	hiperdiploidia	1,22

NR: não realizada

TABELA 18 - RESULTADOS DA PLOIDIA IDENTIFICADA POR CITOGENÉTICA NOS 50 PACIENTES

Ploidia (n=50)	≤12 meses n=19 (%)	>12m e ≤24m n=31(%)	Total(%)
Diplóide	8 (42)	14 (45)	22 (44)
Hiperdiplóide	1 (5)	3 (10)	4 (8)
Hipodiplóide	1 (5)	1 (3)	2 (4)
Pseudodiplóide	9 (48)	13 (42)	22 (44)

Na análise citogenética, complementada pela molecular, foram identificados 20/112 (17,85%) pacientes com alterações cromossômicas recorrentes não envolvendo o gene *MLL*. Foram quatro pacientes com t(15;17) (LMA-M3); três com inv(16); um com del(7q); um com t(7;17); um com add(13p); quatro com hiperdiploidia; e dois com t(1;19) sendo que em um destes a citogenética foi normal e o diagnóstico foi realizado por PCR. Foram considerados neste grupo quatro pacientes que tiveram a t(12;21) identificadas por RT-PCR e que foram confirmadas por FISH (TABELA 19).

A idade deste grupo variou de 2 a 24 m, com média de idade 15,6 m ($\bar{x}$ = 15,6 ± 6,8 m), sendo que 4 pacientes tinham idade < de 12m.

Os pacientes, que constam da TABELA 19, por apresentarem outras alterações recorrentes, não foram avaliados para as alterações do *MLL* e, portanto foram excluídos das próximas análises que consideraram número total de 92 pacientes.

A Figura 11 apresenta um exemplo de uma destas alterações recorrentes não envolvendo a região 11q23, uma inversão do cromossomo 16, paciente 25, masculino, 23 meses, diagnóstico LMA-M4E0, leucócitos 165000/µL, com hepatomegalia e esplenomegalia.

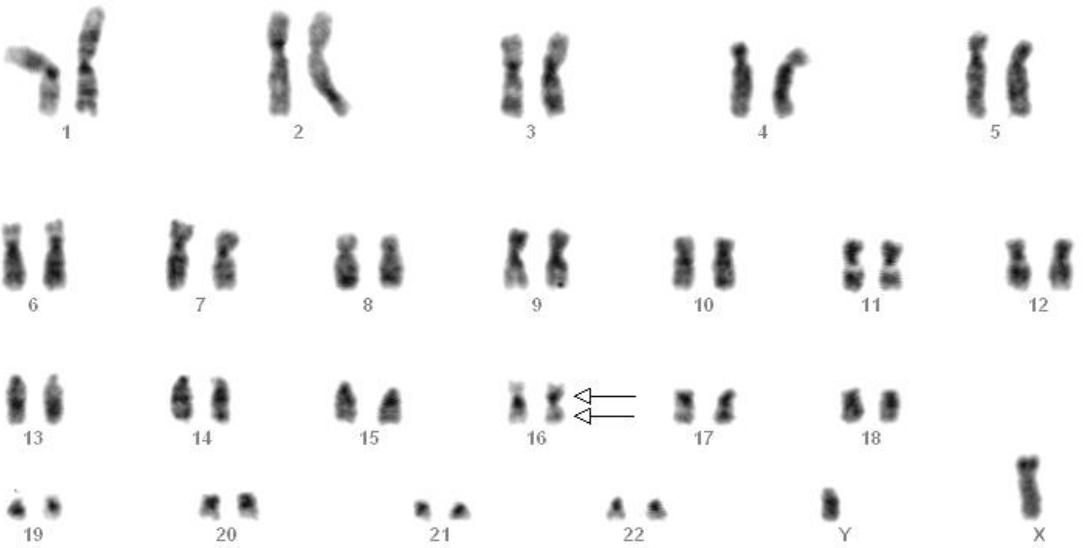

FIGURA 10- METÁFASE OBSERVADA NO PACIENTE 25: 46,XY,inv(16)(p13q22)
Cariótipo com inversão pericêntirca do cromossomo 16.

TABELA 19 - PACIENTES PORTADORES DE ALTERAÇÕES RECORRENTES NÃO ENVOLVENDO O 11q23 IDENTIFICADAS POR CITOGENÉTICA E RT-PCR

Paciente	Idade /sexo	Diagnóstico	Citogenética	RT-PCR
36	17/F	LLA pré-B	46,XX,der(19),t(1;19)(q23;p13), del(13)(?q12q14)[3]/46,XX[17]	(+) *E2A/PBX1*
91	23/M	LLA pré-B	46,XY	(+) *E2A/PBX1*
90	23/F	LLA pré-B	56,XX,+4[3],+6[4],+6[2],+7[4],+10[3],+12[2],+17[4],+18[4],+18[2],+21[4],+21[4],cp [4]	
1	15/M	LLA-Comum	46,XY,del(7)(q22)	
107	23/M	LLA-Comum	52,XY,+7,+8,+9,+17,+21,+22[8]/46,XY[12]	
80	8/M	LLA-T	49,XY,+3,+8,+19[06]/46,XY[01]	
61	6/F	LMA	46,XX,add(13)(p13)	
22	17/M	LMA-M3	46,XY,t(15;17)(q22;q22)	(+) *PML/RARA*
60	14/F	LMA-M3	46,XX,t(15;17)(q22;q22)	
81	16/M	LMA-M3	46,XY,t(15;17)(q22;q21-22)	
99	24/F	LMA-M3	46,XX,t(15;17)(q22;q22)	
25	23/M	LMA-M4/Eo	46,XY,inv(16)(p13q22)	(+) *CBFB-MYH11*
26	14/F	LMA-M4/Eo	46,XX,inv(16)(p13;q22)	
57	15/M	LMA-M4/Eo	46,XY,inv(16)(p13q22)	(+) *CBFB-MYH11*
48	16/F	LMA-M6	50~52,XX,+5[3],+6[7],del(6)(q23)[7],+8[7],add (14)(q32)[6],+16[7],+20[4],+mar[8][cp8]/ mn(100~104)[8]/46,XX	

95	3/M	LMA	45,XY,t(7;17)(q11;q11),-18[13]/ 46,sl,+mar[2]/46,XY[16]	LDI-PCR negativo
19	2/F	LLA pró-B	NR	(+) *ETV6/RUNX1*
17	14/F	LLA-Comum	NR	(+) *ETV6/RUNX1*
45	23/F	LLA-Comum	NR	(+) *ETV6/RUNX1*
6	7/M	LLA-Comum	NR	(+) *ETV6/RUNX1*

NR: não realizada

Através da análise citogenética, convencional e molecular, em 13 pacientes foram identificadas alterações cromossômicas recorrentes envolvendo a região 11q23: 5 pacientes com t(4;11); um com t(3;11); um com t(9;11); um com t(1;11); um com add(11). Os casos com 46,XX,del(12p); com 46,XX,del(22)(q11); 46,XY,add(14)(p13) e um com 45,XY,-19 tiveram o envolvimento do cromossomo 11 comprovado por FISH (TABELA 20). Complementando a TABELA 20, estão apresentadas as demais análises moleculares realizadas.

TABELA 20 - ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS RECORRENTES ENVOLVENDO O 11q23 E ANALISES MOLECULARES COMPLEMENTARES

Paciente	Idade /sexo	Diagnóstico	Citogenética	*MLL/ AFF1*	*MLL/ MLLT3*	*MLL/ MLLT1*	FISH-MLL	LDI-PCR
9	2/F	LLA pró-B	46,XX,t(4;11)(q23;q23)	(+)			NR	
78	3/M	LLA pró-B	46,XY,t(4;11)(q21;q23)	(+)	(-)		(+)	*AFF1*
44	9/F	LLA pró-B	46,XX,t(4;11)(q21;q23)	(+)			NR	
50	7/F	LLA-Comum	46,XX,t(1;11)(p?32-q23)	(-)	(-)		(+)	
35	20/F	LLA-T	46,XX,del(12p)	(-)	(-)		(+)	
34	15/M	LMA-M2	45,XY,-19	(-)	(-)	(-)	(+)	
83	20/M	LMA-M2	46,XY,add(14)(p13)	(-)			(+)	
97	17/F	LMA-M4/Eo	46,XX,t(3;11)(p23;q23) inv(11)(p12q24)	(-)			(+)	
51	6/M	LMA-M4/Eo	46,XY,t(4;11)(q21;q23)	NR	(-)		(+)	
52	12/M	LMA-M4/Eo	46,XY,del(22)(q11)	(-)	(-)	(-)	(+)	
76	1/F	LMA-M7	46,XX,t(4;11)(q21;q23)	(+)	(-)		NR	
108	13/M	LMA-M7	46,XX,add(11)(q23)	(-)	(-)		(+)	
112	12/M	LMA	46,XY,add(9)(p22), der(11)del(11)(p13)add (11)(q23),add(13)(?q31 -32)				(+)	

NR: não realizada

A FIGURA 12 apresenta um exemplo de t(4 ;11), a que apresentou maior recorrência entre os pacientes identificada pelo bandeamento GTG observada no paciente 76, feminino, 1 mês, diagnóstico LMA-M7, leucócitos 11000/µL.

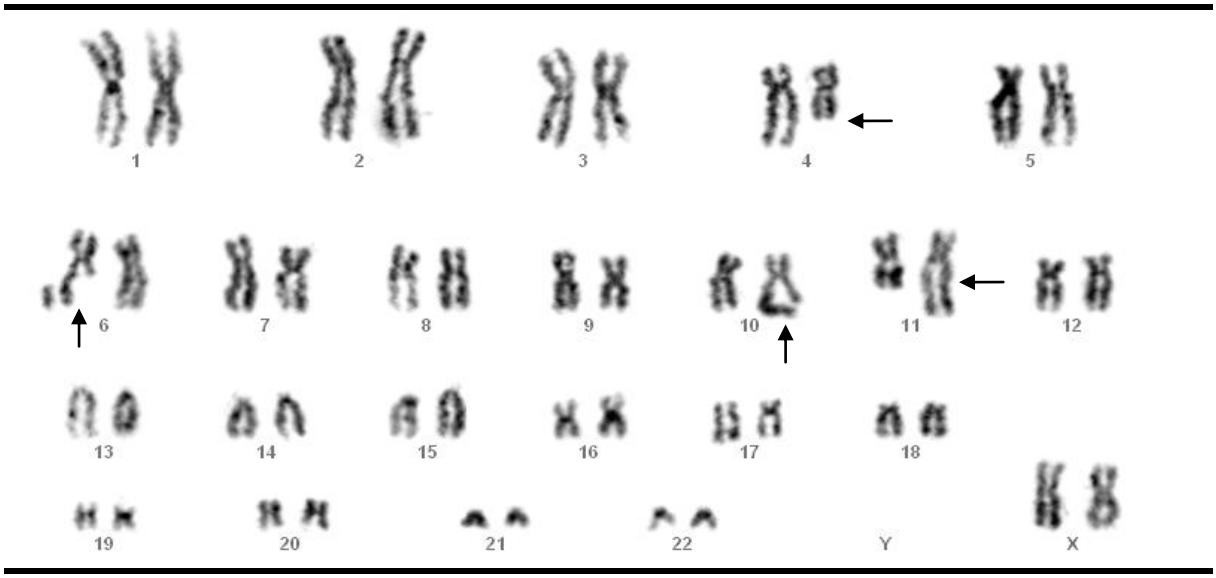

FIGURA 11 - METÁFASE OBSERVADA NO PACIENTE 76: 46,XX,t(4;11)(q21;q23).

Cariótipo apresentando translocação entre os cromossomos 4 e 11. Neste paciente foram também observadas quebras cromatídicas em vários cromossomos.

A TABELA 21 apresenta os 21 pacientes com análise citogenética normal, e as respectivas análises moleculares posteriores.

TABELA 21 - PACIENTES COM CITOGENÉTICA SEM ALTERAÇÕES CLONAIS E ANÁLISES MOLECULARES COMPLEMENTARES

Paciente	Idade /sexo	Diagnóstico	Citogenética	*MLL/AFF1*	*MLL/MLLT3*	*MLL/MLLT1*	FISH-MLL
15	21/M	LLA pro-B	46,XY	(-)	(-)		(-)
31	1/M	LLA pró-B	46,XY		(-)		(+)
79	18/M	LLA pró-B	46,XY	(-)	(-)		(+)
69	0,011/F	LLA-Comum	46,XX	(-)	(-)		(-)
66	7/M	LLA-Comum	46,XY				(-)
88	11/F	LLA-Comum	46,XX	NR			NR
62	18/F	LLA-Comum	46,XX	(-)	(-)		(+)
40	18/M	LLA-Comum	46,XY	(-)	(-)		NR
87	19/F	LLA-Comum	46,XX	(-)	(-)		(-)

89	20/M	LLA-Comum	46,XY	(-)	(-)		(-)
12	7/F	LLA-T	46,XX				(-)
39	15/F	LLA-T	46,XX	(-)	(-)		(-)
27	20/F	LMA-M2	46,XX	(-)			(-)
16	9/F	LMA-M4/Eo	46,XX	(-)			(-)
96	17/M	LMA-M4/Eo	46,XY				(-)
67	12/M	LMA-M5	46,XY				(-)
100	17/F	LMA-M5	46,XX	(-)			(-)
70	12/F	LMA-M7	46,XX				(-)
41	15/F	LMA-M7	46,XX	(-)	(+)	(-)	(+)
68	16/M	LMA-M7	46,XY	(-)	(-)		(-)
28	22/M	LMA-M7	46,XY,16qh+	(-)	(-)		(-)

NR: não realizada

5.4 Análise molecular

Quatro pacientes foram analisados por FISH para a t(12;21) e 82 pacientes para o *MLL.* Os quatro analisados para t(12;21) foram positivos e confirmatórios da análise por RT-PCR. Os resultados dos pacientes analisados por FISH para o gene *MLL*, de acordo com a faixa etária, são apresentados na TABELA 22, não se observando diferença estatisticamente significante na distribuiçãos dos três tipos de resultados, nas duas faixas etárias (χ^2_2=1,30; p>0,50)

O *Southern Blotting* que foi realizado em 4 pacientes sendo que os 4 apresentaram resultado positivo para o rearranjo do gene *MLL*.

A RT-PCR visando à identificação dos rearranjos do *MLL* com os genes *AFF1, MLLT3, MLLT1* e outros rearranjos nos pacientes com os respectivos resultados estão na TABELA 23, não se observando diferença estatisticamente significante na distribuiçãos dos resultados positivos e negativos, nos rearranjos com a presença e ausência do gene MLL (χ^2_1=1,24; p>0,20)

TABELA 22 - RESULTADOS DA ANALISE POR FISH PARA O GENE *MLL* DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA

	FISH para gene *MLL*			
	Positivo	Indeterminado	Negativo	Total
≤12 m	27 (53%)	5(10%)	17(35%)	49
>12m e ≤24m	14 (43%)	4(12%)	15(45%)	33
Total	41	9	32	82

TABELA 23 - RESULTADOS DA ANÁLISE POR RT-PCR

	Positivo	Negativo	Total (n)
MLL/AFF1	7 (8%)	73 (92%)	80
MLL/MLLT3	1 (1,3%)	71 (98,7%)	72
MLL/MLLT1	3 (6,8%)	41 (93,2%)	44
ETV6/RUNX1	4 (9,3%)	39 (90,7%)	43
E2A/PBX1	2 (4,6%)	30 (95,4%)	32
CBFB-MYH11	2(16,6%)	10 (83,4%)	12

A FIGURA 13 e a FIGURA 14 mostram um exemplo da complementação dos métodos de análise no paciente 83, masculino, 20 meses, diagnóstico LMA-M2, leucócitos 101000/µL. Na análise por bandeamento GTG foi identificada a presença de material adicional no braço curto do cromossomo 14, sendo que pela análise por FISH este material pode ser identificado como parte do gene *MLL.* O FISH foi realizado com a sonda Vysis LSI® *MLL* Dupla Coloração onde o sinal “amarelo” é o gene *MLL* normal e os sinais “verde” e “vermelho” significam que o gene está rompido.

Estamos aguardando o resultado da identificação por LDI-PCR do gene parceiro envolvido nesta translocação.

FIGURA 12 - METÁFASE OBSERVADA NA PACIENTE 83: 46,XY,add(14)(p13)
Cariótipo apresentando fragmento adicional no braço curto do cromossomo 14.

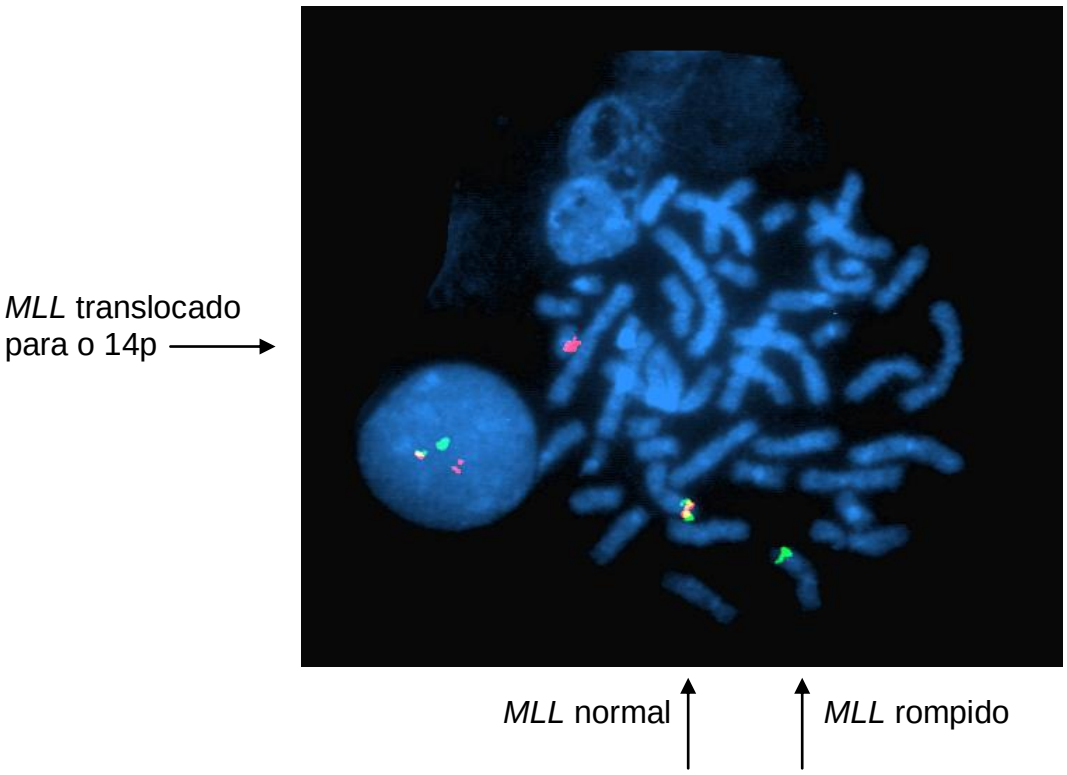

FIGURA 13 - FISH DE METÁFASE OBSERVADA NO PACIENTE 83
Cariotipo : 46,XY,add(14)(p13); ajustado após FISH .ish (MLL x 2)(5´MLL sep 3´MLL x 1)

A FIGURA 15 e a FIGURA 16 mostram exemplo semelhante, onde análise por FISH identifica o rearranjo do *MLL* com o cromossomo 3 no paciente 97,

feminino, 17 meses, diagnóstico LMA-M4E0, leucócitos 450000/µL. Estamos aguardando o resultado da identificação por LDI-PCR do gene parceiro envolvido nesta translocação.

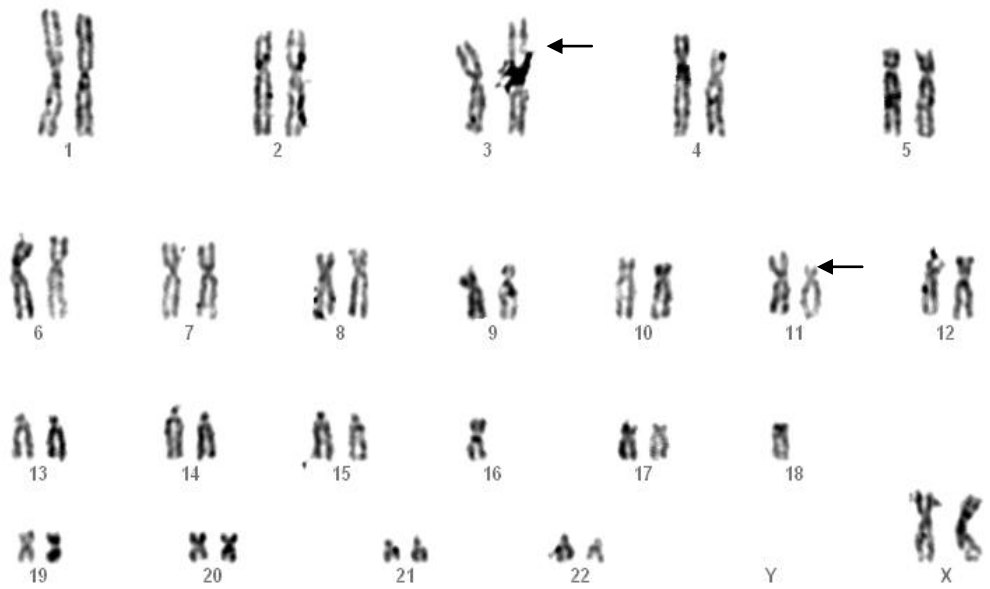

FIGURA 14 - METÁFASE OBSERVADA NO PACIENTE 97: 44,XX,add(3)(p13),del(11)(p12)

Cariótipo apresentando fragmento adicional no braço curto do cromossomo 3 e deleção parcial do braço curto do cromossomo 11. As perdas cromossômicas não são clonais.

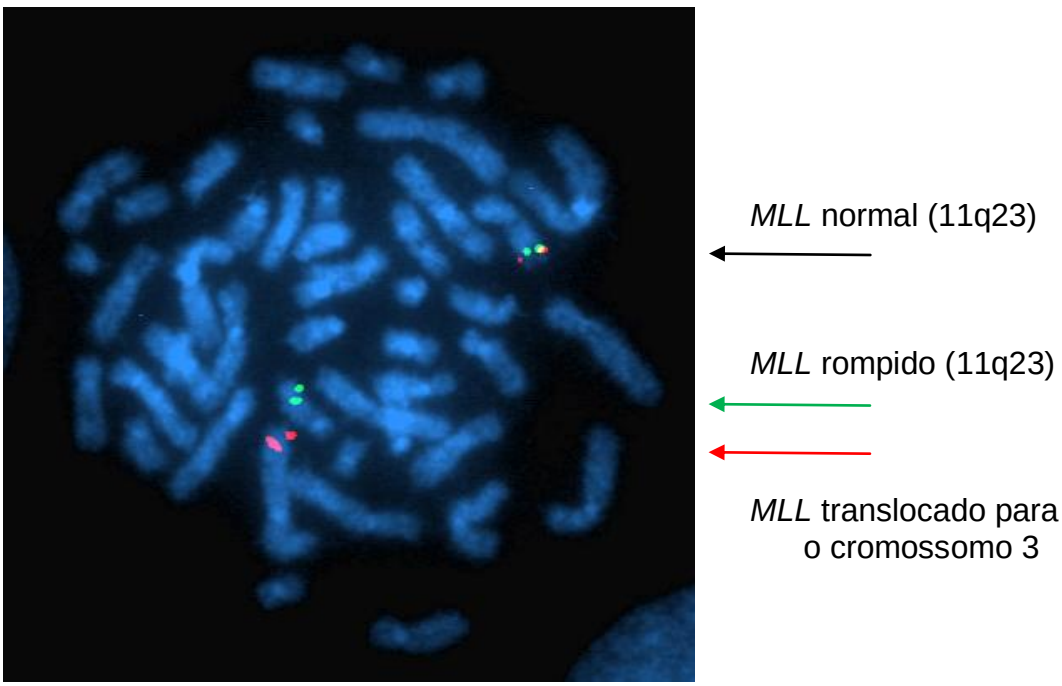

FIGURA 15 - FISH - METÁFASE OBSERVADA POR FISH NO PACIENTE 97

Cariótipo apresentando fragmento adicional no braço curto do cromossomo 3. der(3)t(3;11)(p23;q23)inv(11)(p12q24),der(11)t(3;11)

Em relação às analises por LDI-PCR, foram enviadas 47 amostras ao DECAL. Destas, 21 amostras apresentaram DNA de má qualidade para realização do método, 13 amostras tiveram quantidade insuficientes DNA e 13 foram analisadas com sucesso, sendo que os genes parceiros foram identificados em nove. Os dados da analise por LDI-PCR estão apresentados na TABELA 24, que mostra também as outras análises realizadas nestes pacientes, por FISH e PCR, para uma comparação entre os métodos. Observa-se que houve 89% (8/9) de concordância entre os resultados obtidos por LDI-PCR e FISH e 45% (5/11) entre os obtidos por LDI-PCR e RT-PCR.

TABELA 24 – RESUTADOS DAS ANÁLISES POR LDI-PCR, RT-PCR E FISH

Paciente	Idade/sexo	LDI-PCR	FISH	RT-PCR
78	3/M	*AFF1*	(+)	(+) *AFF1*
98	8/M	*AFF1*	Ind	(-)
101	6/F	*MLLT1*	Ind	(+)*
29	4/M	*MLLT1*	(+)	(+) *MLLT1*
71	8/M	*MLLT3*	(+)	(-)
103	23/M	*MLLT3*	(+)	(-)
85	21/M	*EPS15*	(+)	(-)
47	11/M	*NEBL*	(+)	(-)
11	11/F	*MLLT10*	(+)	(-)
4	1/M	Negativo	(-)	(-)
95	3/M	Negativo	NR	(-)
43	5/M	Negativo	(+)	(-)
63	15/F	Negativo	NR	(+)*

Analisados por SB; Ind, Indeterminado;* NR, Não realizado

A FIGURA 17 mostra a análise por FISH com a sonda Vysis LSI® *MLL* Dupla Coloração onde o sinal amarelo é o gene *MLL* normal e os sinais verde e vermelho significam que o gene está rompido.

Posteriormente, o gene parceiro foi identificado por LDI-PCR como sendo o gene NEBL, gerando o rearranjo *MLL/NEBL*, inédito na literatura. Este rearranjo foi

detectado no paciente 47, de 11 meses, masculino, de origem indígena, da tribo Guarani-Kaiowa da aldeia do Limão Verde em Amambaí-MS, proveniente do Hospital Regional do Mato Grosso do Sul Rosa Pedrossian, apresentando ao diagnóstico hepatoesplenomegalia, desnutrição, e leucocitose de 106000/µL, com 56% de blastos, foi diagnosticado como Leucemia Bilineal (LMA-M5 + LLA-proB).

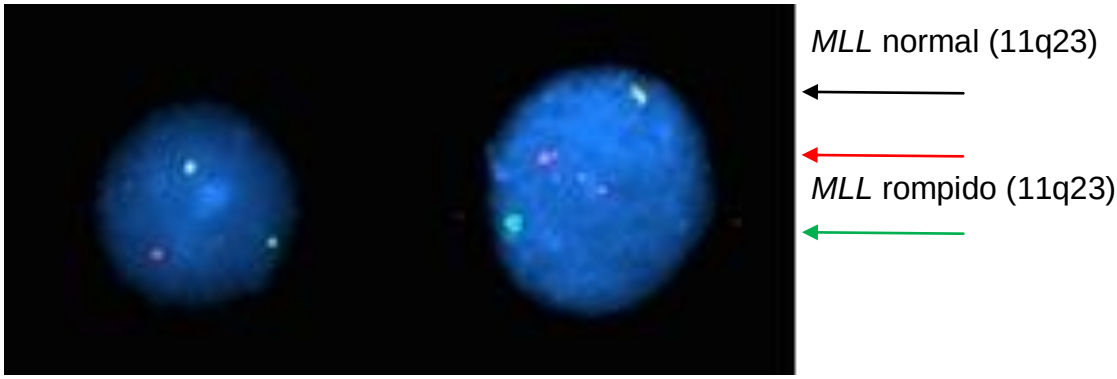

FIGURA 16 - FISH - NÚCLEOS INTERFÁSICOS OBSERVADOS POR FISH NO PACIENTE 47

A TABELA 25 apresenta um resumo dos resultados encontrados. As distribuições das freqüências dos 19 diferentes tipos de alterações cromossômicas observadas nos 112 pacientes estudados estão dispostas, demonstrando a freqüência das alterações nos 70 pacientes com diagnóstico de rearranjos gênicos através das metodologias empregadas neste estudo. Apresenta também a freqüência dos cariótipos normais e dos pacientes em que não foram detectadas alterações. Cabe ressaltar que neste ultimo grupo não foi possível a realização de todas as técnicas e, portanto não podemos considerá-los em nenhum dos grupos anteriores. Observa-se nesta tabela que a frequência de alterações cromossômicas com rearranjos não relacionados (n=20) e relacionados ao gene *MLL* (n=50) não ocorreram ao acaso (χ^2_1=12,86; p<0,001).

TABELA 25 - NÚMEROS ABSOLUTOS E FREQÜÊNCIAS OBSERVADAS DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS, CARIÓTIPOS NORMAIS E AVALIAÇÕES INCOMPLETAS

Alterações cromossômicas	Número (n)	Percentual (%)	Rearranjos gênicos
t(15;17)(q22;q22)	4	3,6	
t(12;21)	4	3,6	Não
Hiperdiplóide	4	3,6	relacionados
inv(16)(p13q22)	3	2,7	ao *MLL*
t(1;19)(q23;p13)	2	1,78	n=20
t(7;17)(q11;q11)	1	0,89	17,85%
add(13)(p13)	1	0,89	
del(7)(q22)	1	0,89	
t(3;11)(p23;q23)	1	0,89	
t(4;11)(q21;q23)	9	8,0	
t(9;11)	1	0,89	
t(11;19)	3	2,7	
del (11q23)	2	1,78	Relacionados
add(11)(q23)	1	0,89	ao *MLL*
del(12p)	1	0,89	n=50
add(14)(p13)	1	0,89	44,65%
-19	1	0,89	
del(22)(q11)	1	0,89	
Cariótipo	1	0,89	
MLL (+)	28	25	
Normal	21	18,75	
Avaliações incompletas	21	18,75	
Total	112	100	

O fluxograma a seguir resume os resultados estratificados de acordo com as técnicas (FIGURA 18).

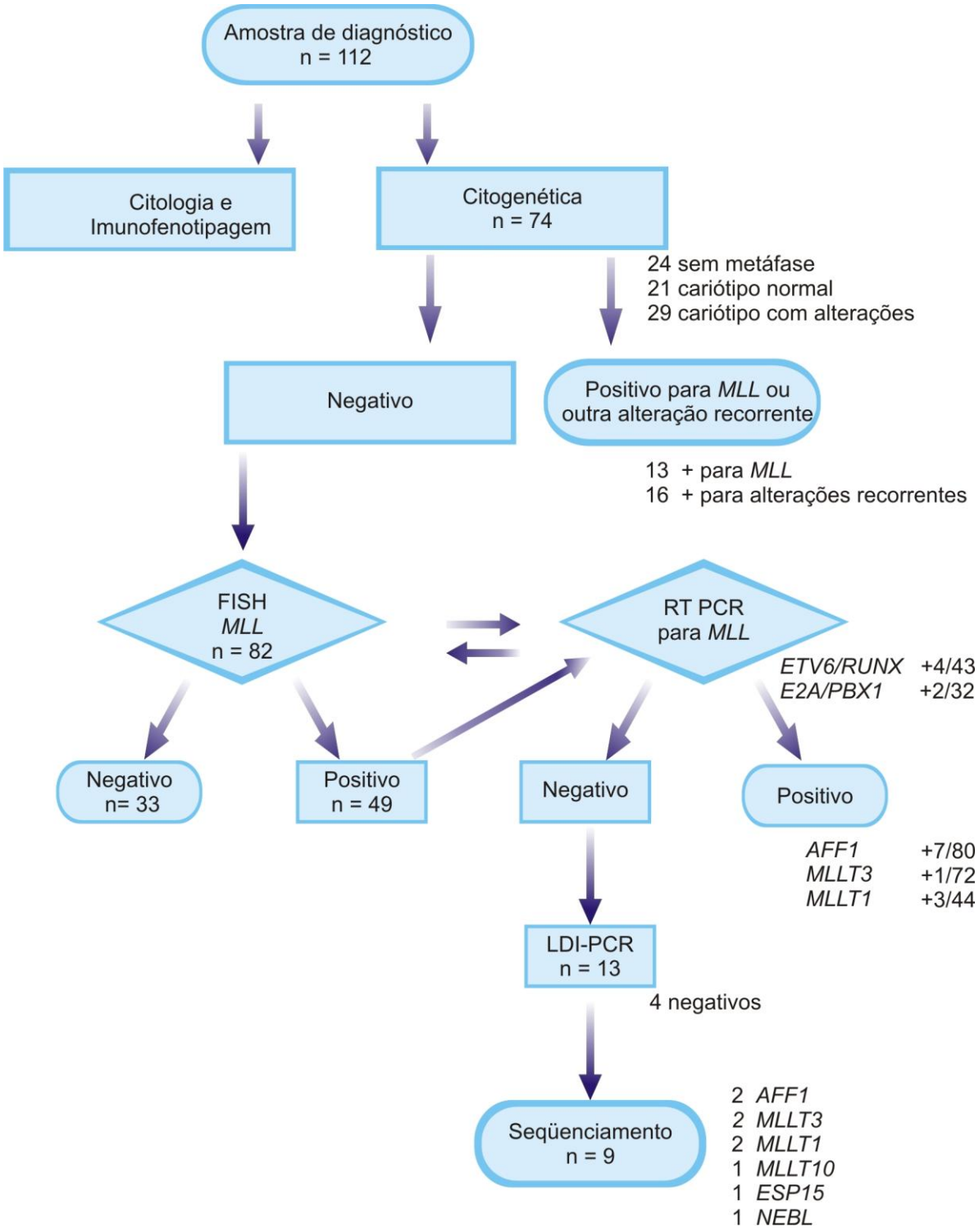

FIGURA 17 - FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS COM RESUMO DE RESULTADOS

6 DISCUSSÃO

As leucemias agudas são a forma mais comum de câncer na infância, representando um terço das doenças malignas e sendo a primeira causa de mortalidade relacionada ao câncer. São de ocorrência rara, 30 casos por milhão de nascidos vivos (20/milhão para LLA e 10/milhão para LMA) (Felix e Lange, 1999).

Para o diagnóstico das leucemias agudas são necessárias análises citogenéticas e moleculares que servem não só para complementação diagnóstica, mas também porque algumas das alterações detectadas são fatores prognósticos independentes e usados para prever a evolução e para estratificar grupos de riscos terapêuticos (Chowdhury e Brady, 2008).

O perfil genético das neoplasias pode ser acessado em diferentes níveis de resolução, todos os quais dependem de uma metodologia particular onde cada uma tem suas próprias vantagens e desvantagens. As técnicas incluem citologia, citometria de fluxo, citogenética e estudos por genética molecular ao nível de genes ou estrutura primária do DNA. Esta última abordagem tem, nas últimas décadas, despertado o interesse de muitos pesquisadores (Heim e Mitelman, 1995).

Cabe salientar o aspecto complementar dos métodos, pois na maioria das vezes busca-se alterações genômicas envolvendo regiões de DNA não acessíveis aos métodos morfológicos como a citogenética convencional, mas passíveis de serem estudadas pelos métodos de genética molecular. Por outro lado, a análise molecular apresenta limitações inerentes que não devem ser ignoradas e discutidas somente pela perspectiva molecular (Heim e Mitelman, 1995).

Em resumo, as investigações citogenéticas e a genética molecular das células neoplásicas devem ser balanceadas. Somente então a informação parcialmente sobreposta, e parcialmente única, produzida pelos dois métodos pode ser sintetizada a um conceito de carcinogenese que seja ao mesmo tempo profundo em entendimento e abrangente no seu âmago (Heim e Mitelman, 1995).

A participação de instituições especializadas e a formação de grupos cooperativos para o tratamento do câncer infantil em estudos nacionais e internacionais levou-as a desenvolverem critérios uniformes para o diagnóstico, tratamento, avaliação de resultados e a obtenção de conhecimentos que permitiram as abordagens multidisciplinares. Esses processos criaram condições para a

realização de estratégias adequadas às condições locais, permitindo o desenvolvimento conjunto e criando condições para que o paciente receba o melhor atendimento e para que os profissionais sejam estimulados a continuar obtendo respostas para as inúmeras perguntas a cada novo desafio.

6.1 Dados clínicos e classificação

Sabemos que a leucemia dos lactentes está associada com manifestações clinicas e biológicas únicas. A amostra de diagnóstico é de fundamental importância e deve ser cuidadosamente analisada em conjunto, para que marcadores celulares de importância diagnóstica, prognóstica e para a DRM sejam identificados. Para a realização de todas as técnicas é necessário que a amostra tenha qualidade e quantidade mínima de SP ou MO que em lactentes nem sempre é obtida.

Nesta amostra tivemos acesso limitado aos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes, porém mesmo assim observamos as características clássicas de apresentação das leucemias agudas em lactentes, que incluem leucocitose, envolvimento do SNC, leucemia cutânea, organomegalia e processos infecciosos.

Nos nosso dados, a contagem de leucócitos foi mais alta nos pacientes menores de 1 ano de idade do que nos com de 12 a 24 meses de idade (TABELA 16). Embora a diferença entre as médias não tenha sido estatisticamente significante (provavelmente devido ao tamanho das amostras) os resultados observados estão na mesma direção de outros descritos na literatura por Pui, Raimondi *et al.*, 1994. Esta informação é relevante por ser considerada um fator de pior prognóstico.

Em 1459 pacientes brasileiros, com menos de 16 anos, estudados por Pombo-De-Oliveira, Cordoba *et al.*, 2005 foi observado que 70,4% dos pacientes tiveram diagnóstico de LLA, 23,6% diagnóstico de LMA e 0,82% dos casos a leucemia não pode ser classificada, mostrando que há uma predominância de LLA em pacientes pediátricos. Quando o grupo foi estratificado, analisando os 286 pacientes com menos de 1 ano que representa 20% desta amostra, 162 (20%), apresentaram diagnóstico de LLA com precursores B, 14 (6,35%) com LLA-T, 95 (27,6%) com LMA e 15 (17,5%) com LA sem classificação.

Um levantamento feito por Emerenciano, Agudelo Arias *et al.*, 2006 em 207 pacientes foi observado que 140 (67,6%) apresentaram diagnóstico de LLA, 62 (30%) com LMA e 5 (2,4%) com LA Bifenotípica.

Os dados destes dois estudos previamente relatados pelo “Grupo Brasileiro de Estudos Colaborativos sobre LA em Lactentes”, em amostras diferentes da analisada neste estudo, estão de acordo com nosso estudo onde obtivemos uma freqüência de 58% de LLA, sendo que destes 33% apresentaram diagnóstico de LLA com precursores B, e que a freqüência da LMA foi de 39% dos casos.

6.2 Ploidia

A ploidia quando analisada pelo índice de DNA através da citometria de fluxo é uma informação rápida e que fornece uma estimativa do número de cromossomos na análise citogenética, que na maioria das vezes demora mais tempo para ser realizada. A análise da ploidia, determinada tanto por ID quanto por citogenética, é relevante principalmente nas LLA onde a hiperdiploidia tem melhor prognóstico e a hipodiploidia tem pior prognóstico.

A ploidia foi quantificada por citometria de fluxo em 18 pacientes e pode ser observada nos 50 pacientes avaliados citogeneticamente. De nove pacientes em que as duas técnicas foram realizadas, três apresentaram concordância (3/9=33%). Esta divergência pode ter sido influenciada por fatores de ambas as técnicas.

A quantificação de DNA por citometria de fluxo fornece sempre um valor relativo a uma população de células e não um valor absoluto da quantificação de DNA, sendo uma medida indireta da ploidia celular, já que o conceito de ploidia está diretamente relacionado à análise do cariótipo (Pombo De Oliveira e Colaboradores, 2008). A análise de conteúdo de DNA está relacionada com a intensidade de fluorescência que é proporcional a quantidade de DNA nuclear. Esta relação pode ser afetada pela presença de RNA na amostra, pelo procedimento de fixação e permeabilização do material e estrutura da cromatina das células (Pombo De Oliveira e Colaboradores, 2008).

A citogenética por problemas relacionados ao número de metáfases e também a má qualidade de certas preparações pode deixar de incluir clones que possam estar presentes em baixa freqüência, alterando assim a ploidia final.

Quanto aos dados de ploidia dos 56 pacientes analisados por citogenética e ID, 46% apresentaram cariótipo diplóide, 12,5% hiperdiplóide, 1,5% hipodiplóide e 40% pseudodiplóide.

Mrozek, Heerema *et al.*, 2004 num levantamento que sumarizou os dados de várias publicações, observaram freqüências de 18-26% pseudodiplóides, 31-40% diplóide normal, 7% hipodiplóide e 23% hiperdiplóide, em crianças com LLA estudadas cariotipicamente. Pui, Williams *et al.*, 1987 em uma população de 409 crianças com LLA, observou uma freqüência de 41% pseudodiplóide, 10,5% diplóide, 7,5% hipodiplóide e 41% hiperdiplóide, em 701 crianças estudadas por bandeamento cromossômico.

Os dados deste estudo e os dois autores acima citados apresentam diferenças que acreditamos serem por aspectos metodológicos e também porque as populações avaliadas nos dois artigos incluem pacientes com idades maiores que 24 meses, limite etário desta casuística.

6.3 Alterações citogenéticas recorrentes que não envolveram a região 11q23

Neste estudo, das vinte alterações recorrentes que não envolveram a região do *MLL* 15 (75%) ocorreram nas crianças com mais de 12 meses fato este que reforça a diferença com o grupo menor de 12 meses.

Em 4 pacientes com LMA-M3 foi observada t(15;17) o que corresponde a 3,6% dos 112 casos estudados. Dois destes pacientes fazem parte de duas publicações, uma de Mendes, Coser *et al.*, 2004, *The apparent excess of acute promyelocytic leukemia in infant acute leukemias in Brazil* e outra de Emerenciano, Agudelo Arias *et al.*, 2006 *Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia*. O primeiro relata os 5 casos de um levantamento de 45 casos de LMA (11%), em crianças menores de 23 meses e sugere que o aparente excesso de lactentes com LMA-M3, nesta

serie brasileira, possa ser mais relacionada a fatores ambientais distintos do que a um *background* étnico. Já Emerenciano relata uma freqüência de 4 casos em 95 pacientes pediátricos menores de 23 meses, de uma coorte com 207 pacientes com leucemia aguda, tanto LLA como LMA (4,2%).

Neste estudo, em 4 pacientes, 3 com LLA-Comum, com 7, 14 e 23 meses de idade, respectivamente, e 1 com 2 meses de idade e LLA pró-B, foi detectada a t(12;21), o que corresponde a 3,6% dos 112 casos estudados.

A translocação críptica t(12;21) é encontrada em 25% dos casos de LLA infantil quando usados métodos de FISH e PCR, porém em menos de 0,05% dos pacientes consegue ser detectada por citogenética (Romana, Mauchauffe *et al.*, 1995). Esta translocação é mais freqüentemente observada em crianças maiores de 24 meses (Emerenciano, Koifman *et al.*, 2007). Um estudo de Emerenciano, Agudelo Arias *et al.*, 2006 relata uma freqüência de 9 casos em 61 pacientes analisados, correspondendo a 15%.

A inv(16) foi detectada em 3 (2,7%) pacientes com LMA-M4/Eo e com 14, 15 e 23 meses de idade. Dos 95 pacientes analisados citogeneticamente por Emerenciano, Agudelo Arias *et al.*, 2006 apenas 1(1,05%) paciente apresentou a inv(16). Raimondi, Chang *et al.*, 1999 observaram que 28 pacientes de 478 crianças com LMA estudadas, apresentaram a inv(16) (5,9%). Os pacientes tinham idade menor que 21 anos e este resultado é comparável ao de adultos com a mesma translocação. Em uma revisão feito por Pui, Kane *et al.*, 1995 foram relatados 3 casos em 37 (8,1%) e Ishii, Okamura *et al.*, 1991 observaram 3 casos em 48 (6,2%) analisados.

Emerenciano, Agudelo Arias *et al.*, 2006 relatam a t(1;19)(q23;p13) numa freqüência de 2 casos em 95 pacientes analisados, correspondendo a 2,1%. A freqüência desta translocação observada por Mrozek, Heerema *et al.*, 2004 em crianças foi de 4-5%. Nós observamos uma freqüência de 2 casos (1,8%), um pouco inferior, mas de acordo com o esperado Mrozek, Heerema *et al.*, 2004.

Quanto a t(7;17)(q11;q11); add(13)(p13) e del(7)(q22) cada uma destas alterações foram observadas em 1 paciente (0,89%). Estas alterações são pouco freqüentes sendo a del(7q) a mais citada na literatura. Emerenciano, Agudelo Arias *et al.*, 2006 relatam 2 casos de del(7)(q22) em 95 pacientes analisados, correspondendo a 2,1% e Mrozek, Heerema *et al.*, 2004 observou esta alteração em 4%, Raimondi, Chang *et al.*, 1999 relatam uma freqüência de 5 a 6 % em menores

de 21 anos e de 6 a 8% em adultos. Novamente, as diferenças de freqüências podem ser atribuídas às diversas faixas etárias estudadas.

6.4 Alterações citogenéticas recorrentes que envolveram a região 11q23

A translocação mais freqüente neste estudo, a t(4;11) estava presente em 5 lactentes e o rearranjo *AFF1/MLL* gerado por esta tanslocação, foi observado em 4, todos os nove pacientes com idade inferior a 12 meses, representando 16,1% entre os 49 pacientes com rearranjo no *MLL*.

Os três relatos a seguir apresentam freqüências superiores às encontrados nesta casuística provavelmente porque a maioria dos pacientes com o rearranjo do gene MLL foi identificada por FISH, a técnica que não identifica o parceiro. Por Emerenciano, Agudelo Arias *et al.*, 2006 foi observado que 13 pacientes menores de 23 meses de idade dos 28 que apresentaram anormalidades na região 11q23, apresentavam a t(4;11) numa freqüência de 46,4%. Heerema, Sather *et al.*, 1999 num estudo de lactentes do CCG, observou que a t(4;11) estava presente em 21 de 56 pacientes (37,5%) e que estes eram significantemente mais jovens e com pior prognóstico que os com *MLL* normal. Já Kosaka, Koh *et al.*, 2004 estudando 54 pacientes com até 12 meses, detectaram rearranjos na região 11q23 em 44 pacientes e, destes, 27 (61%) apresentaram a t(4;11).

A t(9;11) identificada em 1 paciente portador de LMA, por RT-PCR, representando 0,89% dos casos apresenta uma freqüência baixa em relação aos estudos abaixo relacionados.

Em um estudo de (Mathew, Behm *et al.*, 1999), em 67 crianças com anormalidades em 11q23, com mediana de idade de 6,3 anos, detectou através de FISH a t(9;11) em 3(7%) dos 42 com LLA, e em 11(44%) dos 25 pacientes com LMA. E também para Kosaka et al.(2004) estudando 54 pacientes com até 12 meses de idade, que detectaram rearranjos na região 11q23 em 44 pacientes e, destes, 3(7%) evidenciaram a t(9;11) (Kosaka, Koh *et al.*, 2004).

Um estudo citogenética e molecular por Rubnitz, Raimondi *et al.*, 2002, de 295 pacientes com diagnóstico primário de LMA, onde observou que os 15(9,8%) pacientes com a t(9;11) tiveram um melhor prognóstico.

Nossas análises identificaram a t(11;19) em 3 pacientes por RT-PCR, representando 6,8% dos casos e não diferindo dos relatos a seguir.

Na amostragem de Kosaka, Koh *et al.*, 2004, de 44 pacientes com até 12 meses de idade, com rearranjo 11q23, 4(9%) apresentaram a t(11;19).

Foi observado por Raimondi, Chang *et al.*, 1999 em 666 pacientes menores de 21 anos, 19(4%) com a t(11;19). Já Burmeister, Meyer *et al.*, 2009, por LDI-PCR, de 184 pacientes adultos com LLA, detectou a presença do rearranjo *MLL-ENL* em 11(6,0%).

O FISH detectou a del(11q23) em 2 pacientes, representando 1,78% dos 112 casos, essa freqüência foi menor que as observadas pelos autores a seguir.

Emerenciano, Agudelo Arias *et al.*, 2006 observaram que 7 pacientes dos 28 que apresentaram anormalidades na região 11q23, apresentavam a del(11q23) representando 25% dos casos. E em crianças com anormalidades 11q23, com mediana de idade de 6,3 anos, detectou através de FISH a del(11q23) em 5(42%) pacientes de 12 pacientes com LLA (Mathew, Behm *et al.*, 1999).

Foi observado, por citogenética e, posteriomente, confirmado por FISH um paciente com add(11)(q23), um com del(12p), um com monossomia do cromossomo 19 (-19), um com del(22)(q11), um com add(14)(p13) e um com t(3;11). Exemplos de uma metáfase e uma hibridização por FISH destes dois últimos casos estão apresentados nas Figuras 13 e 14 e Figuras 15 e 16 respectivamente. Cada um destes casos corresponde a 0,89% dos casos deste trabalho.

Segundo Harrison (2001), 2% das crianças com LLA e com anormalidades cromossômicas apresentaram algum tipo de alteração cromossômica na região 11q23 (Harrison, 2001). Já Emerenciano, Agudelo Arias *et al.*, 2006 observaram em 7,3% dos lactentes outro tipo de alteração na região 11q23.

Nos 54 pacientes com até 12 meses estudados por Kosaka, Koh *et al.*, 2004, foi detectado rearranjos na região 11q23 em 44 pacientes e destes 2 (4,5%) apresentaram translocações com baixa freqüência.

A LDI-PCR detectou 9 pacientes positivos para rearranjos do gene *MLL*. Os resultados do LDI em relação aos resultados da PCR foram divergentes em 7 pacientes. Dos 2 pacientes que tiveram resultado positivo para rearranjos do gene *AFF1*, um deles foi positivo por PCR e outro negativo. Quanto aos 2 pacientes com rearranjos no *MLLT1* detectados por LDI-PCR, 1 foi também observado pela PCR. E

os 2 pacientes com rearranjos no *MLLT3* que a LDI-PCR identificou foram negativos para a PCR. O paciente que foi positivo para o *MLLT10,* foi negativo por PCR.

Essa divergência entre estes resultados pode ser devido a diferenças nas metodologias, tais como a utilização de *primers* diferentes, que podem abranger seqüências maiores ou menores da seqüência do DNA que se está pesquisando, ou a interferência de fatores como a qualidade da extração e a quantidade de DNA.

A LDI-PCR identificou ainda, um paciente com rearranjo do gene *EPS15* e outro no gene *NEBL,* sendo que ambos foram negativos na análise por PCR. No caso do paciente *EPS15* positivo, este não havia sido pesquisado por PCR, por ser um rearranjo pouco freqüente.

Dos 4 pacientes com resultado negativo por LDI-PCR, dois deles foram positivos para outras técnicas moleculares, um por FISH e um por PCR, e outros 2 foram negativos também para o PCR. Essas outras discordâncias entre as técnicas são possivelmente devido a problemas técnicos.

O rearranjo *MLL/NEBL*, foi detectado no paciente 47, de 11 meses, masculino, de origem indígena, da tribo Guarani-Kaiowa da aldeia do Limão Verde em Amambaí-MS, proveniente do Hospital Regional do Mato Grosso do Sul Rosa Pedrossian, apresentando ao diagnóstico hepatoesplenomegalia, desnutrição, e leucocitose de 106.000/µL, com 56% de blastos, foi diagnosticado como Leucemia Bilineal.

Este rearranjo inédito no gene *MLL* que foi identificado pela LDI-PCR, ilustra de maneira elegante a sistemática usada neste tabalho. Nas análises prévias, a citogenética foi inconclusiva, o passo seguinte, o FISH foi positivo, e na seqüência a RT-PCR foi negativa. Em seguida, após a LDI-PCR, através do seqüenciamento foi identificado o gene NEBL.

O FISH mostrou-se a melhor técnica para detecção de rearranjos do gene *MLL* por ser uma técnica que identifica que houve quebra do gene *MLL* na região bcr tanto em núcleos interfásicos como em metáfases, mas não identifica o parceiro envolvido. Por sua vez a LDI-PCR parte do DNA genômico, do ponto de quebra do MLL, e amplifica além deste gene, o parceiro envolvido neste rearranjo. Logo em seguida, através do seqüenciamento foi identificado o gene *NEBL*.

O gene Nebulette (*NEBL*) pertence à família nebulina das proteínas de ligação da actina. Essa família compreende três proteínas musculares específicas *NEBULIN*, isoforma sarcomérica *NEBULETTE* e *N-RAP,* bem como as isoformas

não-musculares, isoforma não-muscular *Nebulette* e *LASP1*, a qual já foi descrita como um parceiro do gene *MLL*. O *NEBL* é, portanto, o segundo gene da família nebulina que se funde com o gene *MLL*. Este gene que codifica uma isoforma sarcomérica e não-muscular. A isoforma sarcomérica (107 kDa, 28 exons) é expressa exclusivamente no músculo cardíaco, enquanto que a isoforma não-muscular (31,2 kDa, 7 exons) é somente ativa em células não-musculares como o gene LASP1.

O ponto de quebra foi encontrado no intron 3 da isoforma não-muscular do nebulette, também chamado de *LIM-nebulette* (Li, Zhuang *et al.*, 2004). A proteína LIM-nebulette contém um domínio N-terminal LIM, dois módulos e meio de nebulin e uma serina truncada da região de ligações ricas, seguido por um domínio SH3 (Li, Zhuang *et al.*, 2004). LASP1 e LIM-Nebulette são encontradas em células não-musculares e são componentes de adesões focais, esqueleto de membrana e fibras de stress. Desempenha um papel importante na organização de aderências focais, com LASP1 (Perez-Saldivar, Ortega-Alvarez *et al.*, 2008).

A sobrevivência dos lactentes tratados por protocolos atuais embora tenha melhorado dramaticamente nos últimos anos ainda é muito inferior quando comparada a de crianças maiores. Torna-se, portanto, essencial a realização de um diagnóstico preciso que auxilie na escolha da terapia adequada. Este trabalho busca colaborar com estes aspectos escrevendo e avaliando uma série de métodos a serem seguidos para que se possa antingir este objetivo.

7 CONCLUSÃO

Este estudo teve como objetivos estimar a freqüência do rearranjo do gene *MLL* em uma amostra de crianças brasileiras, com idade de zero a 24 meses, portadoras de leucemia aguda *de novo* e caracterizar estes diversos rearranjos em relação à sua distribuição, identificação dos genes parceiros, além de avaliar o potencial dos vários métodos disponíveis para a análise.
As principais conclusões são:

1. A freqüência do rearranjo do gene *MLL* nesta amostra foi de 61% e tanto esta freqüência como a sua distribuição por faixa etária estão de acordo com as descritas na literatura.

2. O rearranjo mais freqüente foi o *AFF1/MLL*, observado em 16,1% dos pacientes portadores do rearranjo gênico. Apesar de ser o mais freqüente, corroborando dados da literatura, a freqüência foi inferior à descrita, provavelmente devido à predominância da identificação por FISH na nossa amostra.

3. A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) mostrou-se o melhor método para a detecção de rearranjos do gene *MLL*, por ser uma técnica que identifica as quebras do gene *MLL* na região bcr tanto em núcleos interfásicos como metafásicos. A limitação deste método, de não identificar o parceiro envolvido, foi eficientemente complementada pela LDI-PCR que, por sua vez, parte do DNA genômico, do ponto de quebra do *MLL*, e amplifica além deste gene, o parceiro envolvido neste rearranjo.

Acreditamos ser de grande importância que sejam ampliados os estudos epidemiológicos observacionais, visando a melhoria do conhecimento sobre as leucemias dos lactentes. A identificação e descrição de metodologias de diagnóstico, bem como dos fatores prognósticos que afetam a sobrevida de crianças portadores de leucemias, em nosso meio, são uma tentativa de contribuir para estabelecer as prioridades, que eventualmente possam levar à modificação de suas taxas de sobrevida.

8 REFERÊNCIAS

Adlercreutz, H., T. Yamada, *et al.* Maternal and neonatal phytoestrogens in Japanese women during birth. Am J Obstet Gynecol, v.180, n.3 Pt 1, Mar, p.737-43. 1999.

Alexander, F. E., S. L. Patheal, *et al.* Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. Cancer Res, v.61, n.6, Mar 15, p.2542-6. 2001.

Andersen, M. K., D. H. Christiansen, *et al.* Therapy-related acute lymphoblastic leukaemia with MLL rearrangements following DNA topoisomerase II inhibitors, an increasing problem: report on two new cases and review of the literature since 1992. Br J Haematol, v.114, n.3, Sep, p.539-43. 2001.

Anderson, J. R., R. D. Jenkin, *et al.* Long-term follow-up of patients treated with COMP or LSA2L2 therapy for childhood non-Hodgkin's lymphoma: a report of CCG-551 from the Childrens Cancer Group. J Clin Oncol, v.11, n.6, Jun, p.1024-32. 1993.

Andrieu, V., I. Radford-Weiss, *et al.* Molecular detection of t(8;21)/AML1-ETO in AML M1/M2: correlation with cytogenetics, morphology and immunophenotype. Br J Haematol, v.92, n.4, Mar, p.855-65. 1996.

Armstrong, S. A., J. E. Staunton, *et al.* MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. Nat Genet, v.30, n.1, Jan, p.41-7. 2002.

Aur, R. J. e D. Pinkel. Total therapy of acute lymphocytic leukemia. Prog Clin Cancer, v.5, p.155-70. 1973.

Aurich-Costa, J., A. Vannier, *et al.* IPM-FISH, a new M-FISH approach using IRS-PCR painting probes: application to the analysis of seven human prostate cell lines. Genes Chromosomes Cancer, v.30, n.2, Feb, p.143-60. 2001.

Basso, G., B. Buldini, *et al.* New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. Haematologica, v.86, n.7, Jul, p.675-92. 2001.

Bayar, E., T. W. Kurczynski, *et al.* Monozygotic twins with congenital acute lymphoblastic leukemia (ALL) and t(4;11)(q21;q23). Cancer Genet Cytogenet, v.89, n.2, Jul 15, p.177-80. 1996.

Bellec, S., B. Baccaini, *et al.* Childhood leukaemia and population movements in France, 1990-2003. Br J Cancer, v.98, n.1, Jan 15, p.225-31. 2008.

Bene, M. C., G. Castoldi, *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia, v.9, n.10, Oct, p.1783-6. 1995.

Bennett, J. M., D. Catovsky, *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol, v.33, n.4, Aug, p.451-8. 1976.

Biondi, A., G. Cimino, *et al.* Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. Blood, v.96, n.1, Jul 1, p.24-33. 2000.

Biondi, A. e G. Masera. Molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia. Haematologica, v.83, n.7, Jul, p.651-9. 1998.

Biondi, A., A. Rovelli, *et al.* Acute promyelocytic leukemia in children: experience of the Italian Pediatric Hematology and Oncology Group (AIEOP). Leukemia, v.8, n.8, Aug, p.1264-8. 1994.

Bishop, J. F., J. P. Matthews, *et al.* A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia. Blood, v.87, n.5, Mar 1, p.1710-7. 1996.

Blatt, J., B. B. Bercu, *et al.* Reduced pulsatile growth hormone secretion in children after therapy for acute lymphoblastic leukemia. J Pediatr, v.104, n.2, Feb, p.182-6. 1984.

Bolufer, P., E. Barragan, *et al.* Rapid quantitative detection of TEL-AML1 fusion transcripts in pediatric acute lymphoblastic leukemia by real-time reverse transcription polymerase chain reaction using fluorescently labeled probes. Haematologica, v.87, n.1, Jan, p.23-32. 2002.

Borkhardt, A., G. Cazzaniga, *et al.* Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. Blood, v.90, n.2, Jul 15, p.571-7. 1997.

Brandalise, S., V. Odone, *et al.* Treatment results of three consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols: GBTLI-80, GBTLI-82 and -85. ALL Brazilian Group. Leukemia, v.7 Suppl 2, Aug, p.S142-5. 1993.

Brandalise, S., M. Viana, *et al.* Chemoterapy in 853 unselected childhood all patients. results of the brasilian multicenter trial GBTLI ALL-93. SIOP XXXVI Congress meeting - Abstracts - Oslo. 2004

Brenner, M. K., D. R. Rill, *et al.* Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. Lancet, v.341, n.8837, Jan 9, p.85-6. 1993.

Buckley, J. D., L. L. Robison, *et al.* Occupational exposures of parents of children with acute nonlymphocytic leukemia: a report from the Childrens Cancer Study Group. Cancer Res, v.49, n.14, Jul 15, p.4030-7. 1989.

Burmeister, T., C. Meyer, *et al.* The MLL recombinome of adult CD10-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia - results from the GMALL study group. Blood, Jan 14. 2009.

Cheson, B. D., P. A. Cassileth, *et al.* Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol, v.8, n.5, May, p.813-9. 1990.

Chessells, J. M., C. J. Harrison, *et al.* Treatment of infants with lymphoblastic leukaemia: results of the UK Infant Protocols 1987-1999. Br J Haematol, v.117, n.2, May, p.306-14. 2002.

Chowdhury, T. e H. J. Brady. Insights from clinical studies into the role of the MLL gene in infant and childhood leukemia. Blood Cells Mol Dis, v.40, n.2, Mar-Apr, p.192-9. 2008.

Cimino, G., D. T. Moir, *et al.* Cloning of ALL-1, the locus involved in leukemias with the t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p22;q23), and t(11;19)(q23;p13) chromosome translocations. Cancer Res, v.51, n.24, Dec 15, p.6712-4. 1991.

Clarkson, B. D. e E. A. Boyse. Possible explanation of the high concoddance for acute leukaemia in monozygotic twins. Lancet, v.1, n.7701, Apr 3, p.699-701. 1971.

Clavell, L. A., R. D. Gelber, *et al.* Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med, v.315, n.11, Sep 11, p.657-63. 1986.

Da Costa Ramos, F. J., M. T. Cartaxo Muniz, *et al.* Association between the MTHFR A1298C polymorphism and increased risk of acute myeloid leukemia in Brazilian children. Leuk Lymphoma, v.47, n.10, Oct, p.2070-5. 2006.

Dahl, G. V., D. K. Kalwinsky, *et al.* Allogeneic bone marrow transplantation in a program of intensive sequential chemotherapy for children and young adults with acute nonlymphocytic leukemia in first remission. J Clin Oncol, v.8, n.2, Feb, p.295-303. 1990.

Dahl, G. V., G. K. Rivera, *et al.* Teniposide plus cytarabine improves outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia presenting with a leukocyte count greater than or equal to 100 x 10(9)/L. J Clin Oncol, v.5, n.7, Jul, p.1015-21. 1987.

Dann, E. J. e J. M. Rowe. Biology and therapy of secondary leukaemias. Best Pract Res Clin Haematol, v.14, n.1, Mar, p.119-37. 2001.

Desangles, F. -7/del(7q) in childhood. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol 1999.

Dillman, R. O., R. B. Davis, *et al.* A comparative study of two different doses of cytarabine for acute myeloid leukemia: a phase III trial of Cancer and Leukemia Group B. Blood, v.78, n.10, Nov 15, p.2520-6. 1991.

Duthie, S. J., S. Narayanan, *et al.* Impact of folate deficiency on DNA stability. J Nutr, v.132, n.8 Suppl, Aug, p.2444S-2449S. 2002.

Egil. The value of c-kit in the diagnosis of biphenotypic acute leukemia. EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukaemias). Leukemia, v.12, n.12, Dec, p.2038. 1998.

Emerenciano, M., D. P. Agudelo Arias, *et al.* Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia. Pediatr Blood Cancer, v.47, n.5, Oct 15, p.549-54. 2006.

Emerenciano, M., S. Koifman, *et al.* Acute leukemia in early childhood. Braz J Med Biol Res, v.40, n.6, Jun, p.749-60. 2007.

Emerenciano, M., J. Menezes, *et al.* Clinical relevance of FLT3 gene abnormalities in Brazilian patients with infant leukemia. Leuk Lymphoma, v.49, n.12, Dec, p.2291-7. 2008.

Erickson, P., J. Gao, *et al.* Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt. Blood, v.80, n.7, Oct 1, p.1825-31. 1992.

Faderl, S., H. M. Kantarjian, *et al.* Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. Blood, v.91, n.11, Jun 1, p.3995-4019. 1998.

Felix, C. A. e B. J. Lange. Leukemia in infants. Oncologist, v.4, n.3, p.225-40. 1999.

Ford, A. M., S. A. Ridge, *et al.* In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. Nature, v.363, n.6427, May 27, p.358-60. 1993.

Gaynon, P. S., M. E. Trigg, *et al.* Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995. Leukemia, v.14, n.12, Dec, p.2223-33. 2000.

Gill Super, H. J., P. G. Rothberg, *et al.* Clonal, nonconstitutional rearrangements of the MLL gene in infant twins with acute lymphoblastic leukemia: in utero chromosome rearrangement of 11q23. Blood, v.83, n.3, Feb 1, p.641-4. 1994.

Greaves, M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. Eur J Cancer, v.35, n.14, Dec, p.1941-53. 1999.

_____. Childhood leukaemia. Bmj, v.324, n.7332, Feb 2, p.283-7. 2002.

Greaves, M. F. Infant leukaemia biology, aetiology and treatment. Leukemia, v.10, n.2, Feb, p.372-7. 1996.

Gross-Bellard, M., P. Oudet, *et al.* Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. Eur J Biochem, v.36, n.1, Jul 2, p.32-8. 1973.

Gurney, J. G., J. A. Ross, *et al.* Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992. J Pediatr Hematol Oncol, v.19, n.5, Sep-Oct, p.428-32. 1997.

Gurney, J. G., R. K. Severson, *et al.* Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. Cancer, v.75, n.8, Apr 15, p.2186-95. 1995.

Gustafsson, G., K. Schmiegelow, *et al.* Improving outcome through two decades in childhood ALL in the Nordic countries: the impact of high-dose methotrexate in the reduction of CNS irradiation. Nordic Society of Pediatric Haematology and Oncology (NOPHO). Leukemia, v.14, n.12, Dec, p.2267-75. 2000.

Harper, D. P. e P. D. Aplan. Chromosomal rearrangements leading to MLL gene fusions: clinical and biological aspects. Cancer Res, v.68, n.24, Dec 15, p.10024-7. 2008.

Harrison, C. J. The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Blood Rev, v.15, n.1, Mar, p.49-59. 2001.

Hasle, H., C. M. Niemeyer, *et al.* A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. Leukemia, v.17, n.2, Feb, p.277-82. 2003.

Heerema, N. A., D. C. Arthur, *et al.* Cytogenetic features of infants less than 12 months of age at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia: impact of the 11q23 breakpoint on outcome: a report of the Childrens Cancer Group. Blood, v.83, n.8, Apr 15, p.2274-84. 1994.

Heerema, N. A., H. N. Sather, *et al.* Cytogenetic studies of infant acute lymphoblastic leukemia: poor prognosis of infants with t(4;11) - a report of the Children's Cancer Group. Leukemia, v.13, n.5, May, p.679-86. 1999.

_____. Frequency and clinical significance of cytogenetic abnormalities in pediatric T-lineage acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. J Clin Oncol, v.16, n.4, Apr, p.1270-8. 1998.

Heim, S. e F. Mitelman. Cancer Cytogenetics. New York, NY: Wiley-Liss, Inc. 1995

Hilden, J. M., P. A. Dinndorf, *et al.* Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. Blood, v.108, n.2, Jul 15, p.441-51. 2006.

Hjalgrim, L. L., K. Rostgaard, *et al.* Birth weight and risk for childhood leukemia in Denmark, Sweden, Norway, and Iceland. J Natl Cancer Inst, v.96, n.20, Oct 20, p.1549-56. 2004.

Hollman, P. C., J. M. Van Trijp, *et al.* Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. Cancer Lett, v.114, n.1-2, Mar 19, p.139-40. 1997.

Hopman, A. H., M. A. Kamps, *et al.* HPV in situ hybridization: impact of different protocols on the detection of integrated HPV. Int J Cancer, v.115, n.3, Jun 20, p.419-28. 2005.

Hrusak, O., J. Trka, *et al.* Acute lymphoblastic leukemia incidence during socioeconomic transition: selective increase in children from 1 to 4 years. Leukemia, v.16, n.4, Apr, p.720-5. 2002.

Huret, J. inv(16)(p13q22); t(16;16)(p13;q22); del(16)(q22). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 1999.

_____. t(1;22)(p13;q13) Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2001.

_____. Myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol
2005.

_____. +8 or trisomy 8. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. December 2007.

Isaacs, H., Jr. Fetal and neonatal leukemia. J Pediatr Hematol Oncol, v.25, n.5, May, p.348-61. 2003.

Ishii, E., J. Okamura, *et al.* Infant leukemia in Japan: clinical and biological analysis of 48 cases. Med Pediatr Oncol, v.19, n.1, p.28-32. 1991.

Jankovic, M., P. Brouwers, *et al.* Association of 1800 cGy cranial irradiation with intellectual function in children with acute lymphoblastic leukaemia. ISPACC. International Study Group on Psychosocial Aspects of Childhood Cancer. Lancet, v.344, n.8917, Jul 23, p.224-7. 1994.

Jennings, C. D. e K. A. Foon. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. Blood, v.90, n.8, Oct 15, p.2863-92. 1997.

Johansson, B., A. V. Moorman, *et al.* Hematologic malignancies with t(4;11)(q21;q23)--a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. European 11q23 Workshop participants. Leukemia, v.12, n.5, May, p.779-87. 1998.

Kawasaki, H., K. Isoyama, *et al.* Superior outcome of infant acute myeloid leukemia with intensive chemotherapy: results of the Japan Infant Leukemia Study Group. Blood, v.98, n.13, Dec 15, p.3589-94. 2001.

Koifman, S. e M. S. Pombo-De-Oliveira. High birth weight as an important risk factor for infant leukemia. Br J Cancer, v.98, n.3, Feb 12, p.664-7. 2008.

Kosaka, Y., K. Koh, *et al.* Infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements: outcome following intensive chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. Blood, v.104, n.12, Dec 1, p.3527-34. 2004.

Krivtsov, A. V. e S. A. Armstrong. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. Nat Rev Cancer, v.7, n.11, Nov, p.823-33. 2007.

Kumar, L. Epipodophyllotoxins and secondary leukaemia. Lancet, v.342, n.8875, Oct 2, p.819-20. 1993.

Langabeer, S. E., H. Walker, *et al.* Incidence of AML1/ETO fusion transcripts in patients entered into the MRC AML trials. MRC Adult Leukaemia Working Party. Br J Haematol, v.99, n.4, Dec, p.925-8. 1997.

Li, B., L. Zhuang, *et al.* Zyxin interacts with the SH3 domains of the cytoskeletal proteins LIM-nebulette and Lasp-1. J Biol Chem, v.279, n.19, May 7, p.20401-10. 2004.

Lie, S. O., J. Abrahamsson, *et al.* Treatment stratification based on initial in vivo response in acute myeloid leukaemia in children without Down's syndrome: results of NOPHO-AML trials. Br J Haematol, v.122, n.2, Jul, p.217-25. 2003.

Liehr, T., H. Starke, *et al.* Multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH) applied to FISH-banding. Cytogenet Genome Res, v.114, n.3-4, p.240-4. 2006.

_____. Multicolor FISH probe sets and their applications. Histol Histopathol, v.19, n.1, Jan, p.229-37. 2004.

Liu, P. P., A. Hajra, *et al.* Molecular pathogenesis of the chromosome 16 inversion in the M4Eo subtype of acute myeloid leukemia. Blood, v.85, n.9, May 1, p.2289-302. 1995.

Macmahon, B. Is acute lymphoblastic leukemia in children virus-related? Am J Epidemiol, v.136, n.8, Oct 15, p.916-24. 1992.

Magalhaes, I. Q., M. S. Pombo-De-Oliveira, *et al.* TEL-AML1 fusion gene frequency in paediatric acute lymphoblastic leukaemia in Brazil. Br J Haematol, v.111, n.1, Oct, p.204-7. 2000.

Mahmoud, H. H., S. A. Ridge, *et al.* Intrauterine monoclonal origin of neonatal concordant acute lymphoblastic leukemia in monozygotic twins. Med Pediatr Oncol, v.24, n.2, Feb, p.77-81. 1995.

Mastrangelo, R., D. Poplack, *et al.* Report and recommendations of the Rome workshop concerning poor-prognosis acute lymphoblastic leukemia in children: biologic bases for staging, stratification, and treatment. Med Pediatr Oncol, v.14, n.3, p.191-4. 1986.

Mathew, S., F. Behm, *et al.* Comparison of cytogenetics, Southern blotting, and fluorescence in situ hybridization as methods for detecting MLL gene rearrangements in children with acute leukemia and with 11q23 abnormalities. Leukemia, v.13, n.11, Nov, p.1713-20. 1999.

Mayer, R. J., R. B. Davis, *et al.* Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. N Engl J Med, v.331, n.14, Oct 6, p.896-903. 1994.

Mcwhirter, J. R., M. Goulding, *et al.* A novel fibroblast growth factor gene expressed in the developing nervous system is a downstream target of the chimeric homeodomain oncoprotein E2A-Pbx1. Development, v.124, n.17, Sep, p.3221-32. 1997.

Mendes, W. L., V. M. Coser, *et al.* The apparent excess of acute promyelocytic leukemia in infant acute leukemias in Brazil. Haematologica, v.89, n.11, Nov, p.ELT16. 2004.

Meyer, C., B. Schneider, *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias. Leukemia, v.20, n.5, May, p.777-84. 2006.

_____. Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.2, Jan 11, p.449-54. 2005.

Mitelman, F. Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer New York, NY: Wiley-Liss. 1994

Moricke, A., A. Reiter, *et al.* Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. Blood, v.111, n.9, May 1, p.4477-89. 2008.

Mrozek, K., N. A. Heerema, *et al.* Cytogenetics in acute leukemia. Blood Rev, v.18, n.2, Jun, p.115-36. 2004.

Mrozek, K., K. Heinonen, *et al.* Adult patients with de novo acute myeloid leukemia and t(9; 11)(p22; q23) have a superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: a cancer and leukemia group B study. Blood, v.90, n.11, Dec 1, p.4532-8. 1997.

Mulhern, R. K., D. Fairclough, *et al.* A prospective comparison of neuropsychologic performance of children surviving leukemia who received 18-Gy, 24-Gy, or no cranial irradiation. J Clin Oncol, v.9, n.8, Aug, p.1348-56. 1991.

Mulhern, R. K., A. L. Wasserman, *et al.* Memory function in disease-free survivors of childhood acute lymphocytic leukemia given CNS prophylaxis with or without 1,800 cGy cranial irradiation. J Clin Oncol, v.6, n.2, Feb, p.315-20. 1988.

Muller, S., P. C. O'brien, *et al.* Cross-species colour segmenting: a novel tool in human karyotype analysis. Cytometry, v.33, n.4, Dec 1, p.445-52. 1998.

Muller, S., M. Rocchi, *et al.* Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence in situ hybridization. Hum Genet, v.100, n.2, Aug, p.271-8. 1997.

Nachman, J., H. N. Sather, *et al.* Augmented Berlin-Frankfurt-Munster therapy abrogates the adverse prognostic significance of slow early response to induction chemotherapy for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia and unfavorable presenting features: a report from the Children's Cancer Group. J Clin Oncol, v.15, n.6, Jun, p.2222-30. 1997.

Neglia, J. P., A. T. Meadows, *et al.* Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. N Engl J Med, v.325, n.19, Nov 7, p.1330-6. 1991.

Niitsu, N., Y. Hayashi, *et al.* Sensitization by 5-aza-2'-deoxycytidine of leukaemia cells with MLL abnormalities to induction of differentiation by all-trans retinoic acid and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. Br J Haematol, v.112, n.2, Feb, p.315-26. 2001.

Ochs, J., R. Mulhern, *et al.* Comparison of neuropsychologic functioning and clinical indicators of neurotoxicity in long-term survivors of childhood leukemia given cranial radiation or parenteral methotrexate: a prospective study. J Clin Oncol, v.9, n.1, Jan, p.145-51. 1991.

Ono, R., T. Nosaka, *et al.* Roles of a trithorax group gene, MLL, in hematopoiesis. Int J Hematol, v.81, n.4, May, p.288-93. 2005.

Oshimura, M., A. I. Freeman, *et al.* Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XXVI. Binding studies in acute lymphoblastic leukemia (ALL). Cancer, v.40, n.3, Sep, p.1161-72. 1977.

Passarge, E. Genética Texto e Atlas. Porto Alegre: ARTMED Editora S.A. 2004

Patte, C., A. Auperin, *et al.* The Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique LMB89 protocol: highly effective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia. Blood, v.97, n.11, Jun 1, p.3370-9. 2001.

Patte, C., T. Philip, *et al.* Improved survival rate in children with stage III and IV B cell non-Hodgkin's lymphoma and leukemia using multi-agent chemotherapy: results of a study of 114 children from the French Pediatric Oncology Society. J Clin Oncol, v.4, n.8, Aug, p.1219-26. 1986.

Pereira, W. V. Leucemia Mielóide Aguda na Infância e Adolescência In: A. C. Lopes (Ed.). Tratado de Clínica Médica. São Paulo: Editora Roca LTDA, v.II, 2006. Leucemia Mielóide Aguda na Infância e Adolescência p.3056-3067

Perez-Saldivar, M. L., M. C. Ortega-Alvarez, *et al.* Father's occupational exposure to carcinogenic agents and childhood acute leukemia: a new method to assess exposure (a case-control study). BMC Cancer, v.8, p.7. 2008.

Pieters, R. e W. L. Carroll. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Clin North Am, v.55, n.1, Feb, p.1-20, ix. 2008.

Pieters, R., M. Schrappe, *et al.* A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. Lancet, v.370, n.9583, Jul 21, p.240-50. 2007.

Pollock, B. H., M. R. Debaun, *et al.* Racial differences in the survival of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. J Clin Oncol, v.18, n.4, Feb, p.813-23. 2000.

Pombo-De-Oliveira, M. S., J. C. Cordoba, *et al.* Biological diversity variations of pediatric acute leukemia in Brazil: contribution of immunophenotypic profiles to epidemiological studies. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v.27, p.21-26. 2005.

Pombo-De-Oliveira, M. S. e S. Koifman. Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.15, n.12, Dec, p.2336-41. 2006.

Pombo De Oliveira, M. S. e Colaboradores. Leucemias Agudas Abordagem Imunomolecular no Diagnóstico e na Pesquisa. Rio de Janeiro, RJ: INCA. 2008

Pombo De Oliveira, M. S., S. Koifman, *et al.* Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. Blood Cells Mol Dis, v.42, n.2, Mar-Apr, p.121-5. 2009.

Pui, C. H., F. G. Behm, *et al.* 11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol, v.12, n.5, May, p.909-15. 1994.

Pui, C. H., J. M. Boyett, *et al.* Outcome of treatment for childhood cancer in black as compared with white children. The St Jude Children's Research Hospital experience, 1962 through 1992. Jama, v.273, n.8, Feb 22, p.633-7. 1995.

Pui, C. H., J. M. Chessells, *et al.* Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. Leukemia, v.17, n.4, Apr, p.700-6. 2003.

Pui, C. H., W. M. Crist, *et al.* Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood, v.76, n.8, Oct 15, p.1449-63. 1990.

Pui, C. H. e W. E. Evans. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med, v.354, n.2, Jan 12, p.166-78. 2006.

Pui, C. H., L. S. Frankel, *et al.* Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): a collaborative study of 40 cases. Blood, v.77, n.3, Feb 1, p.440-7. 1991.

Pui, C. H., J. R. Kane, *et al.* Biology and treatment of infant leukemias. Leukemia, v.9, n.5, May, p.762-9. 1995.

Pui, C. H., S. C. Raimondi, *et al.* Immunologic, cytogenetic, and clinical characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(1;19) (q23; p13) or its derivative. J Clin Oncol, v.12, n.12, Dec, p.2601-6. 1994.

_____. Prognostic factors in infants with acute myeloid leukemia. Leukemia, v.14, n.4, Apr, p.684-7. 2000.

Pui, C. H., R. C. Ribeiro, *et al.* Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllotoxins for acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med, v.325, n.24, Dec 12, p.1682-7. 1991.

Pui, C. H., S. Sallan, *et al.* International Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Workshop: Sausalito, CA, 30 November-1 December 2000. Leukemia, v.15, n.5, May, p.707-15. 2001.

Pui, C. H., J. T. Sandlund, *et al.* Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIIB at St Jude Children's Research Hospital. Blood, v.104, n.9, Nov 1, p.2690-6. 2004.

Pui, C. H., D. L. Williams, *et al.* Hypodiploidy is associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood, v.70, n.1, Jul, p.247-53. 1987.

Raffini, L. J., D. J. Slater, *et al.* Panhandle and reverse-panhandle PCR enable cloning of der(11) and der(other) genomic breakpoint junctions of MLL translocations and identify complex translocation of MLL, AF-4, and CDK6. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.7, Apr 2, p.4568-73. 2002.

Raimondi, S. T-lineage acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol 2007.

Raimondi, S. C. Fluorescence in situ hybridization: molecular probes for diagnosis of pediatric neoplastic diseases. Cancer Invest, v.18, n.2, p.135-47. 2000.

Raimondi, S. C., F. G. Behm, *et al.* Cytogenetics of pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia with emphasis on prognostic implications of the t(1;19). J Clin Oncol, v.8, n.8, Aug, p.1380-8. 1990.

Raimondi, S. C., M. N. Chang, *et al.* Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821. Blood, v.94, n.11, Dec 1, p.3707-16. 1999.

Ravindranath, Y., C. P. Steuber, *et al.* High-dose cytarabine for intensification of early therapy of childhood acute myeloid leukemia: a Pediatric Oncology Group study. J Clin Oncol, v.9, n.4, Apr, p.572-80. 1991.

Reaman, G. H., R. Sposto, *et al.* Treatment outcome and prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukemia treated on two consecutive trials of the Children's Cancer Group. J Clin Oncol, v.17, n.2, Feb, p.445-55. 1999.

Reiter, A., M. Schrappe, *et al.* Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: A report of the Berlin-Frankfurt-Munster Group Trial NHL-BFM 90. Blood, v.94, n.10, Nov 15, p.3294-306. 1999.

Riley Rs, Massey D, *et al.* Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. In: V. Hematol Oncol Clin North Am. Apr;16(2):245-99 (Ed.), 2002. Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia.

Romana, S. P., M. Le Coniat, *et al.* t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. Genes Chromosomes Cancer, v.9, n.3, Mar, p.186-91. 1994.

Romana, S. P., M. Mauchauffe, *et al.* The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. Blood, v.85, n.12, Jun 15, p.3662-70. 1995.

Rosenthal, N. Fine structure of a gene--DNA sequencing. N Engl J Med, v.332, n.9, Mar 2, p.589-91. 1995.

Ross, J. A. Dietary flavonoids and the MLL gene: A pathway to infant leukemia? Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.9, Apr 25, p.4411-3. 2000.

Ross, J. A. e C. M. Kasum. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. Annu Rev Nutr, v.22, p.19-34. 2002.

Ross, J. A., J. D. Potter, *et al.* Maternal exposure to potential inhibitors of DNA topoisomerase II and infant leukemia (United States): a report from the Children's Cancer Group. Cancer Causes Control, v.7, n.6, Nov, p.581-90. 1996.

Rowley, J. D. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. Annu Rev Genet, v.32, p.495-519. 1998.

Rubnitz, J. E., B. M. Camitta, *et al.* Childhood acute lymphoblastic leukemia with the MLL-ENL fusion and t(11;19)(q23;p13.3) translocation. J Clin Oncol, v.17, n.1, Jan, p.191-6. 1999.

Rubnitz, J. E., S. C. Raimondi, *et al.* Favorable impact of the t(9;11) in childhood acute myeloid leukemia. J Clin Oncol, v.20, n.9, May 1, p.2302-9. 2002.

Sande, J. E., R. J. Arceci, *et al.* Congenital and neonatal leukemia. Semin Perinatol, v.23, n.4, Aug, p.274-85. 1999.

Scheres, J. M. Human chromosome banding. Lancet, v.1, n.7755, Apr 15, p.849. 1972.

Schichman, S. A., M. A. Caligiuri, *et al.* ALL-1 partial duplication in acute leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.13, Jun 21, p.6236-9. 1994.

Schrappe, M., A. Reiter, *et al.* Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. Leukemia, v.14, n.12, Dec, p.2205-22. 2000.

Settin, A., M. Al Haggar, *et al.* Prognostic cytogenetic markers in childhood acute lymphoblastic leukemia. Indian J Pediatr, v.74, n.3, Mar, p.255-63. 2007.

Shaffer, L. G. e N. Tommerup. ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, Switzerland: S. Karger. 2005

Shih, L. Y., D. C. Liang, *et al.* Characterization of fusion partner genes in 114 patients with de novo acute myeloid leukemia and MLL rearrangement. Leukemia, v.20, n.2, Feb, p.218-23. 2006.

Smeets, D. F. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. Clin Biochem, v.37, n.6, Jun, p.439-46. 2004.

Smith, M., A. Bleyer, *et al.* Uniform criteria for childhood acute lymphoblastic leukemia risk classification. J Clin Oncol, v.14, n.2, Feb, p.680-1. 1996.

Smith, S. D., R. Morgan, *et al.* Clinical and biologic characterization of T-cell neoplasias with rearrangements of chromosome 7 band q34. Blood, v.71, n.2, Feb, p.395-402. 1988.

Sonoki, T., T. G. Willis, *et al.* Rapid amplification of immunoglobulin heavy chain switch (IGHS) translocation breakpoints using long-distance inverse PCR. Leukemia, v.18, n.12, Dec, p.2026-31. 2004.

Spector, L. G., Y. Xie, *et al.* Maternal diet and infant leukemia: the DNA topoisomerase II inhibitor hypothesis: a report from the children's oncology group. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.14, n.3, Mar, p.651-5. 2005.

Stam, R. W., M. L. Den Boer, *et al.* Silencing of the tumor suppressor gene FHIT is highly characteristic for MLL gene rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. Leukemia, v.20, n.2, Feb, p.264-71. 2006.

Stevens, R. F., I. M. Hann, *et al.* Marked improvements in outcome with chemotherapy alone in paediatric acute myeloid leukemia: results of the United Kingdom Medical Research Council's 10th AML trial. MRC Childhood Leukaemia Working Party. Br J Haematol, v.101, n.1, Apr, p.130-40. 1998.

Strick, R., P. L. Strissel, *et al.* Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.9, Apr 25, p.4790-5. 2000.

Sullivan, M. P., T. Chen, *et al.* Equivalence of intrathecal chemotherapy and radiotherapy as central nervous system prophylaxis in children with acute lymphatic leukemia: a pediatric oncology group study. Blood, v.60, n.4, Oct, p.948-58. 1982.

Swensen, A. R., J. A. Ross, *et al.* The age peak in childhood acute lymphoblastic leukemia: exploring the potential relationship with socioeconomic status. Cancer, v.79, n.10, May 15, p.2045-51. 1997.

Tower, R. L. e L. G. Spector. The epidemiology of childhood leukemia with a focus on birth weight and diet. Crit Rev Clin Lab Sci, v.44, n.3, p.203-42. 2007.

Tubergen, D. G., G. S. Gilchrist, *et al.* Improved outcome with delayed intensification for children with acute lymphoblastic leukemia and intermediate presenting features: a Childrens Cancer Group phase III trial. J Clin Oncol, v.11, n.3, Mar, p.527-37. 1993.

Van Dongen, J. J., E. A. Macintyre, *et al.* Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. Leukemia, v.13, n.12, Dec, p.1901-28. 1999.

Vardiman, J. W., N. L. Harris, *et al.* The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood, v.100, n.7, Oct 1, p.2292-302. 2002.

Veiga, L. B., V. M. Coser, *et al.* High frequency of t(12;21)(p13;q22) in children with acute lymphoblastic leukemia and known clinical outcome in southern Brazil. Leuk Res, v.28, n.10, Oct, p.1033-8. 2004.

Volkenandt, M., M. Lohr, *et al.* [Gene amplification by the polymerase chain reaction]. Dtsch Med Wochenschr, v.115, n.17, Apr 27, p.670-6. 1990.

Wang, P. H., Y. T. Wang, *et al.* Species-specific PCR primers for Pythium developed from ribosomal ITS1 region. Lett Appl Microbiol, v.37, n.2, p.127-32. 2003.

Wasserman, R., N. Galili, *et al.* Predominance of fetal type DJH joining in young children with B precursor lymphoblastic leukemia as evidence for an in utero transforming event. J Exp Med, v.176, n.6, Dec 1, p.1577-81. 1992.

Weinstein, H. J., R. J. Mayer, *et al.* Chemotherapy for acute myelogenous leukemia in children and adults: VAPA update. Blood, v.62, n.2, Aug, p.315-9. 1983.

Weise, A., A. Heller, *et al.* Multitude multicolor chromosome banding (mMCB) - a comprehensive one-step multicolor FISH banding method. Cytogenet Genome Res, v.103, n.1-2, p.34-9. 2003.

Wiemels, J. L., G. Cazzaniga, *et al.* Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. Lancet, v.354, n.9189, Oct 30, p.1499-503. 1999.

Woessmann, W., K. Seidemann, *et al.* The impact of the methotrexate administration schedule and dose in the treatment of children and adolescents with B-cell neoplasms: a report of the BFM Group Study NHL-BFM95. Blood, v.105, n.3, Feb 1, p.948-58. 2005.

Woods, W. G., S. Neudorf, *et al.* A comparison of allogeneic bone marrow transplantation, autologous bone marrow transplantation, and aggressive chemotherapy in children with acute myeloid leukemia in remission. Blood, v.97, n.1, Jan 1, p.56-62. 2001.

Yu, M., K. Honoki, *et al.* MLL tandem duplication and multiple splicing in adult acute myeloid leukemia with normal karyotype. Leukemia, v.10, n.5, May, p.774-80. 1996.

Zanrosso, C. W., A. Hatagima, *et al.* The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population. Leuk Res, v.30, n.4, Apr, p.477-81. 2006.

Zen, P. R., M. C. Lima, *et al.* Prevalence of TEL/AML1 fusion gene in Brazilian pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet Cytogenet, v.151, n.1, May, p.68-72. 2004.

Ziemin-Van Der Poel, S., N. R. Mccabe, *et al.* Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.23, Dec 1, p.10735-9. 1991.

ANEXOS

Pediatr Blood Cancer 2006;47:549–554

Molecular Cytogenetic Findings of Acute Leukemia Included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia

Mariana Emerenciano, Msc,[1] Diana Patricia Agudelo Arias, Msc,[1] Virginia Maria Coser, MD,[3] Gilena Dantas de Brito, Msc,[1] Maria L. Macedo Silva, PhD,[2] and Maria S. Pombo-de-Oliveira, MD, PhD[1]*

Background. Chromosome abnormalities often occur prenatally in childhood leukemia, characterizing an early event in leukemogenesis. The majority of the abnormalities occurring in infants involve the *MLL* gene on chromosome band 11q23. We describe the molecular cytogenetic findings of 207 infant acute leukemia (IAL) cases included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia. ***Procedure.*** The diagnosis of Acute Lymphoblastic leukemia (ALL) or acute myeloblastic leukemia (AML) was made according to morphology and immunophenotyping classification, followed by conventional karyotyping. Samples were then screened using RT-PCR for the presence of specific chromosome translocations. FISH assay for *MLL* rearrangements was performed only in cases with negative or inconclusive cytogenetic or PCR results. ***Results.*** The characteristics of children with IAL were as follows: 115 boys and 92 girls, age range 0–23 months, mean age 12 months, 145 ALL, and 62 AML. A statistically significant association was observed between pro-B ALL cases and MLL^{+ve} ($P = 0.0001$) cases and the age group 0–3 months with MLL^{+ve} ($P = 0.008$) cases. Two rare cases of pro-T ALL with MLL^{+ve} were found. Other than *MLL* rearrangements, various other molecular aberrations were detected including *TEL/AML1*$^{+ve}$ (n = 9), *E2A/PBX1*$^{+ve}$ (n = 4), *PML/RARA*$^{+ve}$ (n = 4), and *AML1/ETO*$^{+ve}$ (n = 2). Cytogenetic analysis revealed hyperdiploidy (n = 6), del(7) in two cases and del(11)(q23) in seven cases. ***Conclusions.*** Our results show that not only *MLL* rearrangements, but also other molecular abnormalities occur before birth and may contribute to leukemogenesis. Pediatr Blood Cancer 2006;47:549–554. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

Key words: *AML1/ETO*; *E2A/PBX1*; Infant acute leukemia; *MLL*; *PML/RARA*; *TEL/AML1*

INTRODUCTION

Reciprocal translocations are the majority of the abnormalities involving chromosome band 11q23. Some reports demonstrated that chromosome translocations can arise during fetal life involving the mixed lineage leukemia *(MLL)* gene [1] and may be associated with maternal exposure to drugs that inhibit DNA topoisomerase II during pregnancy [2,3]. This prenatal exposure to risk factors, relevant to the development of infant acute leukemia (IAL), is of importance for public health [4,5]. There is also now compelling evidence that other common chromosome changes in childhood arise during fetal hematopoiesis. Tests provided by screening DNA in Guthrie cards [6,7] have confirmed the prenatal origin of *MLL* fusion genes in IAL and show that most of *TEL/AML1* and *AML1/ETO* fusions also originate in utero. One potential exception concerning this in utero origin is the *E2A/PBX1* fusion. Even so, this lesion has been described in neonatal blood spots of ALL cases with a frequency of approximately 10% [8]. Furthermore, *IGH* clonal markers of neonatal blood spots indicate the prenatal origin of most of the hyperdiploidy cases [9,10].

Although chromosome translocations are known to play an important role by initiating leukemogenesis, they are usually not sufficient, requiring additional postnatal events to generate leukemia [11,12]. The *MLL*-fusion gene could be the exception for this model, either causing leukemia itself [13] or facilitating the acquisition of additional genetic changes [14]. As these chromosome translocations are associated with biologically different subtypes of the disease, leukemia blast cell markers and clinical features may predict their occurrence [15].

© 2005 Wiley-Liss, Inc.
DOI 10.1002/pbc.20654

We carried out an analysis combining immunophenotype and conventional and molecular cytogenetics in IAL as tools to identify markers that could be associated with maternal exposure to DNA-damaging substances during pregnancy. At first, the molecular study had a focus for the abnormalities involving chromosome 11q23; however, the preliminary results demonstrated the occurrence of unexpected chromosome alterations, which led us to further investigate the frequency of *TEL/AML1*, *AML1/ETO*, and *E2A/PBX1*.

METHODS

Subjects

During the period of January 1998 to January 2005, diagnostic specimens (bone marrow aspirates and/or peripheral blood cells) from 207 infants with acute lymphoblastic leukemia (ALL) or de novo AML from different regions of Brazil were analyzed, prior to any treatment as part of the Brazilian Collaborative Study Group of Infant leukemia

[1]Divisão de Medicina Experimental, Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; [2]Laboratório de Citogenética, CEMO, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; [3]Departamento de Hematologia/Oncologia, Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Grant sponsor: CNPq; Grant number: 550891/01-3; Grant sponsor: INCA-FAF/Swiss Bridge Foundation; Grant number: 230150-4.

*Correspondence to: Maria S. Pombo-de-Oliveira, Divisão de Medicina Experimental, CPq- Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti, 37, CEP: 20231-050, Rio de Janeiro, Brazil.
E-mail: mpombo@inca.gov.br

Received 5 May 2005; Accepted 31 August 2005

WILEY InterScience® DISCOVER SOMETHING GREAT

(BCSGIL) [16]. The BCSGIL criterion for age range inclusion in this study was 0–23 months, broader than those ordinarily applied (<12 months). The delay to identify acute leukemia (AL) in some areas of Brazil would represent a significant loss in the exploratory epidemiological study of IAL. Thus, 39 children aged between 18 months and 23 months were included as "infants." The epidemiological study excludes previous history of myelodysplastic syndrome and Down syndrome cases. The leukemia subtypes were defined based on morphologic aspects according to *French-American-British* (FAB) co-operative group [17] and immunophenotyping following the criteria defined by the *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias* (EGIL) [18].

Conventional Cytogenetics

Metaphase chromosomes from bone marrow samples were G-banded using Wright stain, as previously described protocol [19]. In each case, at least 20 metaphase cells were examined. Karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature 1995 (ISCN) [20]. Analyses were performed either at the Laboratório de Citogenética, Instituto Nacional de Câncer, Brazil (G.D.B. and M.L.M.S.) or at Departamento de Hematologia/Oncologia, Hospital Federal de Santa Maria, Brazil (V.M.C.).

Molecular-Cytogenetic Analysis

To investigate the *MLL* status, conventional cytogenetics were first done, followed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in negative or inconclusive cases. The final screening used fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis, performed in 36 negative and/or inconclusive cases, or in 7 cases with insufficient biologic material for other tests. For those MLL^{-ve} cases, further investigation was performed for *TEL/AML1* fusion gene in B-cell precursor ALL (Bp-ALL) cases and for *E2A/PBX1* in Bp-ALL $TEL/AML1^{-ve}$ cases. AML MLL^{-ve} cases were also screened for detection of *AML1/ETO* fusion gene.

RNA Purification and cDNA Synthesis

Total RNA was prepared using the TRIzol reagent kit (Gibco/BRL, Carlsbad, CA, USA, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The RNA was stored at −70°C until cDNA synthesis was performed. cDNA was generated by reverse transcription of 5 μg of total RNA using Ready-To-Go™ T-Primed First-Strand Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA, 2001), and stored at −20°C. The integrity of RNA and cDNA was examined by amplifying a fragment of the *GAPDH* gene, using the primers F1 (5′-TGACCCCTTCATTGACCTCA-3′) and R1 (5′-AGTCCTTCCACGATACCAAA-3′).

RT-PCR Analysis

The presence of the chromosome translocations *MLL/AF4*, *TEL/AML1*, *E2A/PBX1*, and *AML1/ETO* was assessed by RT-PCR using primers previously described by *BIOMED-1 Concerted Action* [21]. The cell lines RS4, 11, REH, and KAZUMI-1 were used as positive controls for the translocations *MLL/AF4*, *TEL/AML1*, and *AML1/ETO*, respectively. The detection of *MLL/ENL*, *MLL/ELL*, *MLL/AF9* and *MLL/AF10* was performed using primers previously described [22,23]. No cell lines were available for *MLL/ENL*, *MLL/ELL*, *MLL/AF9*, *MLL/AF10*, and *E2A/PBX1* fusions genes; in these cases, known positive patients samples were used. The reactions were run in a thermal cycler (PCR-System 9700 Gene Amp®, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), as follows: 95°C for 60 sec for initial melting, 35 cycles of 94°C for 30 sec, 65°C for 60 sec, and 72°C for 60 sec, and final extension of 72°C for 5 min. For observation, PCR products were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gels followed by ethidium bromide staining.

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

Metaphase (when available) and interphase analyses were documented according to the criteria described by Hopman et al. [24]. At least 200 cells were analyzed per sample by FISH software (Cytovision, Applied Imaging, San Jose CA, USA). Hybridization was performed using *MLL* dual color break-apart probe following the protocol recommended by Vysis Inc. (G.D.B.). The *MLL* dual color break-apart probe is made of differentially labeled cosmids located on either side of the *MLL* break point cluster region. In the case of *MLL* gene disruption, interphase/metaphase cells show co-localized orange and green (yellow) signal representing the normal *MLL* gene. The presence of separated orange and green signals indicates an *MLL* break. In metaphase cell, the transposition of orange signal to a derivative chromosome indicates translocation of 3′ part of *MLL* gene.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS 13.0 Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2004). For statistical evaluation of the frequencies and associations between the clinical data and the presence or absence of chromosome abnormalities, the Pearson Chi-Square-test was used. A P value = 0.05 was considered significant.

RESULTS

The main clinical and laboratorial features of IAL cases are shown in Table I. The predominance of pro-B ALL was associated with infants less than 12 months of age, whereas c-ALL was more frequent in children older than 14 months. Eight different AML subtypes were found, although M4, M5, and M7 were predominant.

TABLE I. Clinical and Laboratorial Characteristics of Infant Acute Leukemia

IAL	*n/n* total (%)
ALL	140/207 (67.6)
AML	62/207 (30)
Bi-AL	5/207 (2.4)
Age (months)	
0–12	103/207 (49.8)
13–18	65/207 (31.4)
≥19	39/207 (18.8)
Sex	
Male	115/207 (55.6)
Female	92/207 (44.4)
Clinical findings	
Hepatomegaly	83/114 (72.8)
Splenomegaly	80/114 (70)
Leukemia cutis	31/72 (43)
WBC ($\times 10^9$/L)	
≤50	98/207 (47.3)
>50	109/207 (52.7)
ALL immunophenotype[a]	
Pro-B	63/133 (47.3)
c-ALL	59/133 (44.4)
Pre-B	4/133 (3)
Pro-T	7/133 (5.3)
AML—FAB subtypes	
M0	4/62 (6.4)
M1	2/62 (3.2)
M2	7/62 (11.3)
M3	5/62 (8.1)
M4–M5	28/62 (45.2)
M6	2/62 (3.2)
M7	14/62 (22.6)
Cytogenetic abnormalities[b]	
11q23 abnormality	28/95 (29.5)
t(4;11)(q21;q23)	13/28 (46.4)
t(11;19)(q23;p13)	3/28 (10.7)
t(1;11)(q21;q23)	3/28 (10.7)
t(6;11)(q27;q23)	1/28 (3.6)
t(9;11)(p22;q23)	1/28 (3.6)
del(11q23)	7/28 (25)
Hyperdiploidy	7/95 (7.3)
46,XY, del(7)(q22)	2/95 (2.1)
46,XY; t (2;19) (q31;q13,2)	1/95 (1.05)
46,XX,dic(7;9)(p13;q11)	1/95 (1.05)
47,XY,+8,+del11(q23)	1/95 (1.05)
46,XX dic(7;12)	1/95 (1.05)
47,XY,t(1;3)(q25,q27) [20]	1/95 (1.05)
46,XX, inv(16)(p13;q22)	1/95 (1.05)
46,XX,-8,+13	1/95 (1.05)
t(11;14)(p13;q11)	1/95 (1.05)
t(15;17)(q22;q21)	4/95 (4.2)
t(1;19)(q23;p13)	2/95 (2.1)
t(8;21)(q22;q22)	1/95 (1.05)

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; Bi-AL, biphenotypic acute leukemia; WBC, white blood cells count, FAB, French-American-British group.
[a]Seven cases were not tested.
[b]Results by conventional karyotyping.

The association of phenotype and genotype was statistically significant between pro-B ALL and MLL^{+ve} cases ($P = 0.001$). An opposite association was observed with c-ALL immunophenotypic subtype and MLL^{-ve} cases ($P = 0.005$). Also, a statistically significant association was observed when age at diagnosis and *MLL* status were compared. The age group 0–3 months was associated with MLL^{+ve} cases ($P = 0.004$), while the age group >13 months was associated with MLL^{-ve} cases ($P = 0.05$). A statistically significant association between high white blood cell (WBC) counts and MLL^{+ve} cases was also observed ($P = 0.009$).

The priority of tests used to detect the *MLL* gene rearrangements and other chromosome abnormalities was defined according to IAL subtypes and the results are shown in Table II. In 36 cases, no mitosis were obtained, but further analysis was feasible by FISH. RT-PCR was performed in 103 cases overlapping some cases with previous cytogenetic testing. Sixty-one patients with Bp-ALL were studied by RT-PCR assay to address the detection of the *TEL/AML* fusion gene. Nine out of 61 (15%) were positive and with high concordance to c-ALL (7 cases). Twenty-three Bp-ALL cases were tested by RT-PCR to address the detection of the *E2A/PBX1* fusion gene. Four were positive and all of these presented the typical immunophenotype findings, characterizing the pre-B stage of differentiation. Two were diagnosed with the chromosome translocation t(1;19)(q23;p13) both by conventional karyotyping and RT-PCR. Eleven AML cases were investigated for the presence of *AML1/ETO* fusion gene, and two positive cases were found. One case was positive by both conventional cytogenetics and RT-PCR. Table III summarizes the final results of these chromosome translocations according to age range.

Molecular cytogenetic findings are described in Table IV. Two of them were diagnosed with pro-T ALL. A 14-month-old white boy presented with bone marrow infiltration with lymphoblasts characterized by CD7+/cCD3+ cells, while CD19/CD10 and myeloid markers were negative. The second case, a 20-month-old white girl, with 90% of blasts, presented with leukemia characterized by being CD7+/cCD3+/TdT+ and having the fusion gene *MLL/AF4* detected by RT-PCR, conventional cytogenetics and FISH (Fig. 1).

In the ALL-group, two children with hyperdiploidy were younger than 16 months of age. Among the infants with AML, two cases had trisomy 8 and a deletion at chromosome band 11q23. Deletions at chromosome band 11q23 were found in the other seven cases. Among these, five were MLL^{+ve} and two were MLL^{-ve}. The positive cases were confirmed only by RT-PCR in two patients, only by FISH in other two patients, and both by RT- PCR and FISH in one patient. One MLL^{+ve} [t(9;11)(p22;q23] case carried an additional karyotype abnormality, characterized by del(7)(q22). One girl and one boy, aged 18 and 20 months, respectively, presented with AML-M2 according to FAB classification, and immunophenotyping (a-MPO/CD33/CD19+) and the

TABLE II. Comparison of Methods Used for *MLL* Rearrangement Detection

	Cytogenetics	RT-PCR	FISH	*MLL* status	
Subtype	n^{+ve}/n^{total} (%)	n^{+ve}/n^{total} (%)	n^{+ve}/n^{total} (%)	n^{+ve}/n^{total} (%)	*P*
Pro-B ALL	13/23 (56)	28/37 (76)	8/9 (89)	42/58 (74)	0.001
c-ALL	3/26 (11.5)	10/24 (42)	1/10 (10)	14/53 (23)	0.005
Pre-B ALL	0/2 (0)	0/5 (0)	0/0 (0)	0/4	>0.05
Pro-T ALL	0/5 (0)	2/3 (67)	0/1 (0)	2/6 (33)	>0.05
Bi-AL	1/2 (50)	1/3 (33)	0/1	2/5 (40)	>0.05
ALL	0/2 (0)	1/2 (50)	1/4 (25)	2/7 (28)	>0.05
AML	11/35 (31)	13/29 (45)	8/11 (73)	19/47 (40)	0.07
Total	28/95 (29)	43/103 (42)	18/36 (50)	81/180 (45)	

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; Bi-AL, biphenotypic acute leukemia.

TABLE III. Summary of Chromosome Translocations According to Age

	0–12 months	12–23 months	
Fusion gene	n^{+ve}/n^{total} (%)	n^{+ve}/n^{total} (%)	*P*
MLL	50/86 (58%)	31/78 (40%)	0.011
TEL/AML1	4/29 (14%)	5/32 (16%)	1.000
E2A/PBX1	1/10 (10%)	3/13 (23%)	0.604
AML1/ETO	1/6 (17%)	2/5 (40%)	0.545

t(8;21)(q22;q22) translocation was detected by both conventional cytogenetics and RT-PCR. Conventional cytogenetics further revealed the presence of the chromosome translocation, t(15;17)(q22;q21), resulting in *PML/RAR*α fusion gene in four IAL samples. The ages at diagnosis were 14, 16, 17, and 21 months and all of them presented with an AML-M3 subtype. These cases have been reported elsewhere [25]. Finally, a 14-month girl presented AML-M4 subtype and a karyotype characterized by 46,XX, inv(16)(p13;q22).

DISCUSSION

The risk of leukemia in children reflects a combination of factors that include inherited predisposition, exogenous exposures to agents with leukemogenic potential, and chance events [26]. These genetic changes have provided not only diagnostic markers but also insight into the pathogenesis of leukemia. In this context, the de novo form of leukemia restricted to infants with translocations of the *MLL* gene deserves special attention [1,26,27].

TABLE IV. Characteristics of IAL

	Sex	Age (months)	WBC ($\times 10^9$/L)	IAL subtype	Conventional and molecular cytogenetics	Outcome
1	M	14	57.1	Pro-T ALL	del(11)(q23); *MLL/AF4*$^{+ve}$	Death
2	F	20	330	Pro-T ALL	t(4;11)(q21;q23); *MLL/AF4*$^{+ve}$	Alive
3	M	12	26.1	AML-M7	del(11)(q23); *MLL*$^{+ve}$	Death
4	F	21	2.7	AML-M7	*MLL/AF4*$^{+ve}$	Lost follow-up
5	F	21	107.1	AML-M7	t(11;19)(q23;p13); *MLL/ENL*$^{+ve}$	Lost follow-up
6	M	1	7.6	c-ALL	*TEL/AML1*$^{+ve}$; *MLL*$^{-ve}$	Lost follow-up
7	F	3	132.5	c-ALL	*TEL/AML1*$^{+ve}$; *MLL/AF4*$^{-ve}$	Death
8	M	7	152.3	c-ALL	*TEL/AML1*$^{+ve}$; *MLL/AF4*$^{-ve}$	Lost follow-up
9	F	5	140.1	ND	*TEL/AML1*$^{+ve}$; *MLL/AF4*$^{-ve}$	Alive
10	F	14	150.1	Pre-B	t(1;19)(q23;p13); *E2A/PBX1*$^{+ve}$	Death
11	M	19	82.1	Pre-B	*E2A/PBX1*$^{+ve}$	Alive
12	F	22	55.7	Pre-B	*E2A/PBX1*$^{+ve}$	Lost follow-up
13	F	10	20.8	Pre-B	t(1;19)(q23;p13); *E2A/PBX1*$^{+ve}$	Alive
14	M	14	3.9	c-ALL	46,XY,del(7)(q22), t(9;11)(p22;q23)	Alive
15	F	20	5.32	AML-M2	t(8;21)(q22;q22)	Alive
16	M	18	36.5	AML-M2	*AML1/ETO*$^{+ve}$	Alive
17	F	14	9.5	AML-M4	46,XX, inv(16)(p13;q22)	Alive
18	M	16	10.9	AML-M3	t(15;17)(q22;q21); *PML/RARA*$^{+ve}$	Death
19	M	14	78.9	AML-M3	t(15,17)(q22;q21)	Death
20	M	17	5.1	AML-M3	t(15;17)(q22;q21)	Alive

M, male; F, female; c-ALL, common ALL; ND, immunophenotype with subtype not defined because CD10 was not applied; AML, acute myeloid leukemia; WBC, white blood cells.

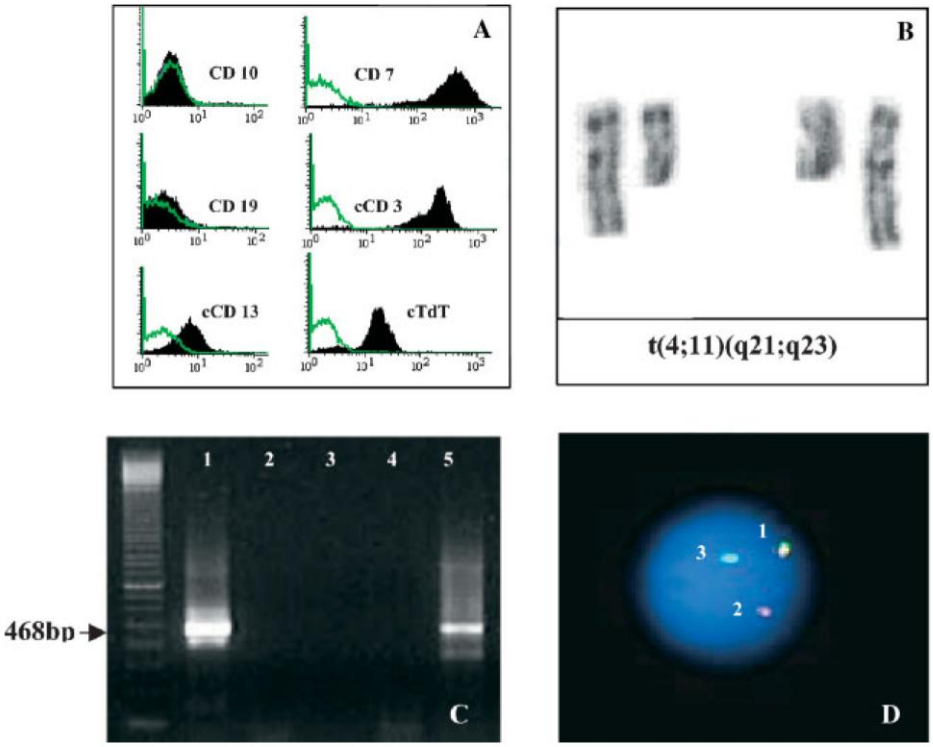

Fig. 1. Results of the tests applied to verify the *MLL* status in the patient with pro-T ALL subtype. **A**: Immunophenotype profile defined for pro-T ALL cases. **B**: Karyotype analysis showing chromosome translocation t(4;11)(q21;q23). **C**: Ethidium bromide-stained agarose gel showing the RT-PCR for detection of *MLL/AF4* transcripts; lane 1 shows positive control, lane 2 shows negative control, lanes 3 and 4 show negative patients, and lane 5 shows the pro-T ALL patient. **D**: FISH analysis showing co-localized orange and green signal (1) representing the normal *MLL* gene, and the presence of separated orange and green signals (2 and 3, respectively) indicates the *MLL* break.

In most IAL cases, rearrangements of the *MLL* gene are present both in ALL and AML [27,28]. These expected molecular biological features are described in the present study as well. Its important to mention that a relevant percentage of MLL^{+ve} cases were found in the age range 12–23 months (Table III), supporting our choice to include these children in this report. As previously reported, the *MLL* gene has been found to be involved in approximately 30 different translocations [29]. Each fusion partner has been characterized with distinct functional properties. Several unusual MLL^{+ve} cases were found in our study. However, it is important to point out that if we relied only on previous associations related to the genotype-immunophenotype patterns, we would have missed these findings [30].

Our screening revealed four positive cases of TEL/AML1 rearrangement in patients less than 1 year of age. Studies in twins with AL indicate that the *TEL/AML1* fusion gene, usually seen in c-ALL, requires additional postnatal genetic changes to lead to leukemia [11,12]. Studies of IGH clonal markers showed 100% of positiveness for hyperdiploidy in neonatal blood spots [9,10]. We report seven IAL cases, all of them c-ALL, presenting with hyperdiploidy.

There is also a report of one case with neonatal blood spot testing that is positive for *PML/RARA*, and another positive for *CBFβ/MYH11* [31]. Two out of 11 AML-M2 cases in our cohort (18%) had *AML1/ETO* fusion gene abnormalities. In addition, four interesting cases presenting with the t(15;17)(q22;q21) translocation were found.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Desireé Murta for helping in the RT-PCR technique standardization for detection of *MLL* rearrangements and the Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia for the infant samples and the information given. We are also very grateful to Dr. Mel Greaves as well as Dr. Anthony Ford who provided all conditions to allow the FISH analysis in this study. This work was supported in part by a grant-in-aid from the CNPq (No.550891/01-3) and INCA-FAF/Swiss Bridge Foundation (No.230150-4).

REFERENCES

1. Ford AM, Ridge SA, Cabrera ME, et al. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. Nature 1993; 363:358–360.

2. Abe T. Infantile leukemia and soybeans—A hypothesis. Leukemia 1999;13:317–320.
3. Strick R, Strissel PL, Borgers S, et al. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:4790–4795.
4. Abstracts of the American Society of Hematology 45th Annual Meeting. December 6–9, 2003. San Diego, California, USA. Blood 2003;102:1a-1092a.
5. Alexander FE, Patheal SL, Biondi A, et al. Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. Cancer Res. 2001;61:2542–2546.
6. Gale KB, Ford AM, Repp R, et al. Backtracking leukemia to birth: Identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:13950–13954.
7. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. Lancet 1999;354: 1499–1503.
8. Wiemels JL, Leonard BC, Wang Y, et al. Site-specific translocation and evidence of postnatal origin of the t(1;19) E2A-PBX1 fusion in childhood acute lymphoblastic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:15101–15106.
9. Panzer-Grumayer ER, Fasching K, Panzer S, et al. Non-disjunction of chromosomes leading to hyperdiploid childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is an early event during leukemogenesis. Blood 2002;100:347–349.
10. Taub JW, Konrad MA, Ge Y, et al. High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002;99:2992–2996.
11. Maia AT, Koechling J, Corbett R, et al. Protracted postnatal natural histories in childhood leukemia. Genes Chromosomes Cancer 2004;39:335–340.
12. Wiemels JL, Ford AM, Van Wering ER, et al. Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. Blood 1999;94:1057–1062.
13. Ayton PM, Cleary ML. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. Oncogene 2001;20:5695–5707.
14. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: Lessons in natural history. Blood 2003;102:2321–2333.
15. Rowley JD. Biological implications of consistent chromosome rearrangements in leukemia and lymphoma. Cancer Res 1984;44: 3159–3168.
16. Abstracts of the 18th UICC International Cancer Congress. 30 June-5 July 2002. Oslo, Norway. Int J Cancer Suppl 2002;13:1–526.
17. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol 1976;33:451–458.
18. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia 1995;9:1783–1786.
19. Silva ML, Land MG, Maradei S, et al. Translocation (11;11)(p13-p15;q23) in a child with therapy-related acute myeloid leukemia following chemotherapy with DNA-topoisomerase II inhibitors for Langerhans cell histiocytosis. Cancer Genet Cytogenet 2002;135 :101–102.
20. Mitelman F. ISCN, an international system for human genetic nomenclature. Basel: S. Karger 1995.
21. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 concerted action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. Leukemia 1999; 13:1901–1928.
22. Rubnitz JE, Behm FG, Curcio-Brint AM, et al. Molecular analysis of t(11;19) breakpoints in childhood acute leukemias. Blood 1996;87:4804–4808.
23. Andersson A, Hoglund M, Johansson B, et al. Paired multiplex reverse-transcriptase polymerase chain reaction (PMRT-PCR) analysis as a rapid and accurate diagnostic tool for the detection of MLL fusion genes in hematologic malignancies. Leukemia 2001;15:1293–1300.
24. Hopman AH, Voorter CE, Ramaekers FC. Detection of genomic changes in cancer by in situ hybridization. Mol Biol Rep 1994;19: 31–44.
25. Mendes WL, Coser VM, Ramos G, et al. The apparent excess of acute promyelocytic leukemia in infant acute leukemias in Brazil. Haematologica 2004;89:ELT16.
26. Greaves M. Childhood leukaemia. BMJ 2002;324:283–287.
27. Chen CS, Sorensen PH, Domer PH, et al. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. Blood 1993;81:2386–2393.
28. Sorensen PH, Chen CS, Smith FO, et al. Molecular rearrangements of the MLL gene are present in most cases of infant acute myeloid leukemia and are strongly correlated with monocytic or myelomonocytic phenotypes. J Clin Invest 1994;93:429–437.
29. Harrison CJ, Cuneo A, Clark R, et al. Ten novel 11q23 chromosomal partner sites. European 11q23 Workshop participants. Leukemia 1998;12:811–822.
30. Hrusak O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. Leukemia 2005;16:1233–1258. Ref Type: Generic.
31. McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, et al. Prenatal origin of childhood acute myeloid leukemias harboring chromosomal rearrangements t(15;17) and inv(16). Blood 2003;101:4640–4641.

2336

Infant Acute Leukemia and Maternal Exposures during Pregnancy

Maria S. Pombo-de-Oliveira,[1] Sergio Koifman,[2] and Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia

[1]Division of Experimental Medicine, Research Center, Instituto Nacional de Câncer and [2]Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

Infant acute leukemia (IAL) has a unique profile characterized by the high incidence of translocations involving the *MLL* gene located at the 11q23 region. To test the potential role of intrauterine and perinatal factors linked to the risk of IAL development, a hospital-based case-control study was conducted in different cities of Brazil. A total of 202 children (ages 0-21 months) with newly diagnosed IAL was enrolled (1999-2005), and 440 age-matched controls were selected from the same hospitals wherein IAL cases were treated. A statistically significant association between maternal use of hormones during pregnancy and IAL was observed [odds ratio (OR), 8.76; 95% confidence interval (95% CI), 2.85-26.93] in a multivariable analysis. The association of certain exposures during pregnancy (hormones, dipyrone, metronidazole, and misoprostol) and *MLL* gene rearrangements was tested using a case-case approach. Despite the lack of statistical significance, the magnitude of the OR for maternal exposure to dipyrone (OR, 1.45; 95% CI, 0.75-2.86), metronidazole (OR, 1.72; 95% CI, 0.64-4.58), quinolones (OR, 2.25; 95% CI, 0.70-25.70), and hormones (OR, 1.88; 95% CI, 0.50-7.01) may suggest the occurrence of interactions between such maternal exposures during pregnancy and *MLL* rearrangements, yielding into IAL development. The strong and statistically significant association between IAL and estrogen exposure during pregnancy observed in this study deserves further investigation to investigate its role in intrauterine leukemogenesis. (Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15(12):2336–41)

Introduction

The understanding of leukemogenic pathways in childhood has been improved markedly by identification of a series of critical and consistent mutations occurring during pregnancy (1, 2). The causes of these genetic alterations are not known, but the different pediatric leukemia subtypes are thought to have distinct etiologies (3). Most cases of infant acute leukemia (IAL) have rearrangements involving the *MLL* gene at region 11q23 and arise *in utero* as confirmed by retrospective analyses of neonatal blood spots of affected infants (1, 4). This biologically and clinically unique leukemia (5-7) has an extremely short latency period. Moreover, *MLL* fusions resemble those found in secondary acute myelogenous leukemia resulting from exposure to topoisomerase II (topo-II) inhibitors. This has led to the proposal that inadvertent exposure to biochemically similar topo-II inhibitors during pregnancy may be involved in the causation of IAL (8, 9). Given the rarity of this leukemia, there have been very few epidemiologic studies focused especially on IAL with *MLL* fusions (10).

Nevertheless, in an international collaborative study, significant associations between exposures to DNA-damaging drugs and mosquitocidals during pregnancy and MLL^{+ve}, but not MLL^{-ve}, leukemia were noted (11). However, because there were few molecularly classified cases in this study, further independent analysis was needed to confirm or refute these apparent associations (11).

We conducted a case-control study in Brazil to explore the hypothesis that certain environmental exposures could increase the risk of IAL with *MLL* gene rearrangements. In this report, we present the preliminary data exploring the association of maternal exposure to environmental risk factors and IAL.

Materials and Methods

Study Population. The Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia is a national cooperative group supported by Instituto Nacional de Câncer-Ministério da Saúde (Rio de Janeiro, Brazil) and by a network of academic medical centers and hospitals located in 10 different states in Brazil as listed in Appendix A. Fifteen institutions and >45 physicians from different Brazilian cities enrolled patients (cases and controls) to this study. Participants were recruited from hospitals situated in the following cities: Rio de Janeiro, Campinas, Belo Horizonte, Salvador, Recife, João Pessoa, Brasília, Goiania, and Florianópolis, Santa Maria, and São Paulo. We estimate that ~91% of the ascertainment of IAL cases for each Brazilian participating region were notified to the Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia during the period of the study. This estimate was ascertained taking into account data provided by the population-based cancer registries established in all Brazilian regions.

Epidemiologic Design. A hospital-based case-control study was conducted to evaluate the magnitude of association between IAL exposure to selected environmental risk factors during pregnancy. The association between *MLL* rearrangements and selected environmental exposures was also explored using either a case-case study (12) or a case-only study approach (13).

Case Definition. Cases were eligible if (*a*) they were diagnosed with acute lymphoblastic leukemia or acute

Received 5/11/06; revised 8/28/06; accepted 10/12/06.

Grant support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPq) grants 55.0891/2001-3 and 308532/2003-1, Instituto Nacional de Câncer, Fundação Ary Frauzino, and Swiss Bridge Foundation grant 2301504.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Maria S. Pombo-de-Oliveira, Instituto Nacional de Câncer, Centro de Pesquisa, Rua André Cavalcanti 37, CEP 20231-050, Rio de Janeiro, Brazil. Phone: 55-21-3233-1324; Fax: 55-21-3233-1470. E-mail: mpombo@inca.gov.br

Copyright © 2006 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0031

Table 1. Sociodemographic variables distribution, IAL cases and controls, Brazil, 1999-2005

	Cases (n = 202), n (%)	Controls (n = 440), n (%)	P
Age at hospitalization (mo)			
0-15	103 (51.0)	262 (59.5)	0.04
16-21	99 (49.0)	178 (40.5)	
Sex			
Male	100 (49.6)	233 (53.0)	0.488
Female	102 (50.4)	207 (47.0)	
Race (skin color)*			
White	106 (52.5)	156 (35.6)	0.004
Intermediate	58 (28.7)	142 (32.2)	
Black	38 (18.8)	142 (32.2)	
Maternal age (y)			
<18	4 (2.0)	39 (8.9)	0.002
18-24	66 (32.7)	185 (42.0)	
25-34	99 (49.0)	162 (36.8)	
>35	33 (16.3)	54 (12.3)	
Population density (residence area)			
<10,000	11 (5.4)	18 (4.0)	0.001
10,000-39,999	28 (13.9)	36 (8.2)	
40,000-99,999	27 (13.4)	52 (11.9)	
100,000-499,000	50 (24.8)	83 (18.9)	
500,000-1,000,000	18 (8.9)	39 (8.9)	
>1,000,000	68 (33.7)	212 (48.1)	
Geographic origin in Brazil			
Southeast	117 (57.9)	251 (57.1)	0.001
Northeast	51 (25.2)	104 (23.6)	
South	24 (11.9)	51 (11.6)	
Central plateau	10 (5.0)	34 (7.7)	
Mother education (y)			
<4	104 (51.5)	208 (47.2)	0.001
5-9	74 (36.6)	198 (45.0)	
≥10	24 (11.9)	34 (7.7)	
Monthly family income†			
<400	99 (49.0)	276 (62.7)	0.001
400-999	50 (24.8)	111 (25.2)	
1,000-1,999	35 (17.3)	42 (9.5)	
≥2,000	18 (8.9)	11 (2.5)	

*According to Parra et al. (14).
†In Real ($R, the Brazilian currency).

myelogenous leukemia according to standard classifications (14) at age ≤21 months and (*b*) bone marrow aspirates were available for immunophenotyping and molecular analysis. The cut point of 21 months for eligibility was determined with consideration to the frequent delay in identification of acute leukemia in some areas of Brazil. Had cases been limited to those diagnosed at <1 year of age, there would have been a significant loss for those with *MLL* gene rearrangements. The analyses to characterize *MLL* status were done by conventional karyotype, by reverse transcription-PCR assay, and/or by fluorescence *in situ* hybridization. Details of the immunophenotyping and molecular data of this study are described elsewhere (15).

Control Selection. All controls were age frequency matched with IAL cases selected among hospitalized children in the same regional hospitals. The mothers of the controls were approached for participation when the case was still hospitalized. Controls that presented with severe life-threatening conditions to minimize recall bias were selected. The pathologies included were the following: trauma (n = 28, 6.3%), cardiopathy (n = 40, 9.1%), infectious diseases (n = 87, 19.7%), metabolic disorders (n = 18, 4.1%), neurologic diseases (n = 16, 3.6%), sickle cell anemia (n = 56, 12.7%), nonsyndrome defects (n = 18, 4.1%), allergy/asthma (n = 64, 14.5%), pneumonia (n = 72, 16.3%), nutritional disturbances (n = 30, 6.8%), and seizures (n = 12, 2.7%).

Exclusion Criteria. Cases and controls presenting clinical syndromes resulting from chromosomal abnormalities, such as Down syndrome, and other selected conditions, such as myelodysplastic syndrome, Fanconi anemia, Bloom syndrome, ataxia telangiectasia, and neurofibromatosis, were excluded. The absence of a well-established diagnosis and the inaccessibility to the biological mother and/or children >21 months at diagnosis were also exclusion criteria from the study enrollment.

Race Criteria. The Brazilian population has a historical background of intensive intermarriage among different ethnic groups, and consequently, ethnic/race stratification is very difficult to characterize by applying the same criteria usually used elsewhere. Skin color denotes the Brazilian equivalent of the English term ''race'' and is based on a complex phenotypic evaluation that takes into account besides skin complexion, hair type, and nose and lip shape. In this study, we categorized the children by skin color as whites, intermediates, and blacks according to criteria described by Parra et al. (16).

Data Collection. Mothers were interviewed in person in the hospital with the aid of a well-structured questionnaire divided in two major sections. The first part of the questionnaire was devoted to childbirth and nursing and the second part of the questionnaire to exposures during pregnancy. Questions about demographics included family income, maternal age, and education level. Maternal history of diseases and reasons for use of medications were obtained from questions about the use of different types of drugs taken due to infectious illnesses, previous fetal loss threat, anemia, backache, etc. [e.g., antibiotics, herbal medicines, vitamins, pain killers, and hormones (oral contraceptives, hormones for pregnancy retention, and thyroid hormones)]. This analysis included information about maternal exposures during the 3 months before the index pregnancy, during the index pregnancy, and during nursing of the index child.

The mothers of 96% of IAL cases and 95% of potential controls consented to interview. The median (range) of the interval between the dates of IAL diagnoses and the date of mothers' interviews was 9 (0.1-36) months.

Ethical Aspects. All collaborating institutions approved the study protocol, and a written consent was obtained for diagnostic procedures and interview.

Statistical Analysis. Statistical analyses on the association between exposure to selected environmental variables and IAL during the period of index pregnancy were carried out toward the use of unconditional logistic regression with regular methods implemented by the Statistical Package for the Social Sciences version 13 (SPSS, Chicago, IL). All analyses were adjusted for region of residence, sex, income, maternal age, and birth weight. Results are expressed as odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95% CI), and all P values are two sided. Case-control analyses were conducted for combined IAL and IAL stratified by *MLL* gene status as a case-case analysis (12). The association between *MLL* rearrangements and selected variables was ascertained using ORs and 95% CI adjusted for the aforementioned variables.

Results

The study accrued 642 subjects (202 cases and 440 controls), with enrollment starting in January 1999 and ending in July 2005. The main demographic characteristics of IAL cases and controls distribution are summarized in Table 1, and the geographic origins of the cases and controls are outlined in Fig. 1. According to age at enrollment, 51.0% of cases and 59.5% of controls were ages ≤15 months (P = 0.04). Mean age

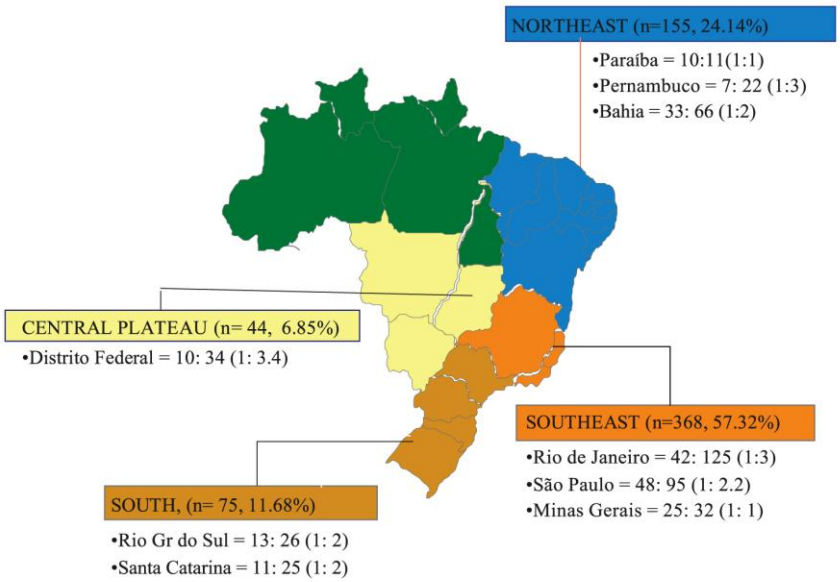

Figure 1. Distribution of cases and controls (ratio) by geographic regions, Brazil, 1999-2005.

at diagnosis in the study was 12.9 months for IAL cases, and mean age at entry into the study was 14.1 months for controls ($P = 0.580$). A higher proportion of white children were observed among IAL cases (52.5%) than controls (35.6%; $P < 0.0001$).

The majority of the children in this series, either cases or controls, came from urban or semiurban environments surrounding the largest participating cities, with population sizes usually >1 million people. The majority of cases (57.9%) and controls (57.1%) were enrolled in the southeastern cities, with the northeast cities running second (25.2% and 23.6%, respectively). Mothers of cases showed an age distribution older than mothers of controls ($P = 0.002$).

There were 140 cases of acute lymphoblastic leukemia, mainly B-cell precursors, and 62 cases of acute myelogenous leukemia, whose immunophenotypes and *MLL* status are described elsewhere (15). The highest frequency of *MLL* rearrangements was found in pro-B acute lymphoblastic leukemia ($P < 0.001$). Other chromosomal abnormalities, such as *TEL/AML1*, *AML1/ETO*, and *PML/RARA*, were also detected in this series of IAL cases, but the frequency distribution was too small for individual associations with risk factors (15).

The results of the main variables related to exposures during pregnancy of IAL cases and controls are shown in Table 2. Maternal exposure to smoking tobacco or marijuana and alcohol intake during pregnancy (OR, 0.87; 95% CI, 0.63-1.21) were not associated with IAL in this study. Medication consumption ascertained according to the reason for use during the pregnancies was explored. These medications included vitamins, pain relievers, antibiotics for urinary or respiratory tract infections, antiemetics, antidiarrheas, antifungal, fertility medications or abortive drugs, and herbal medicines.

Table 2. Maternal exposures during pregnancy, IAL cases and controls, Brazil, 1999-2005

	IAL, *n* (%)	Controls, *n* (%)	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)*
Tobacco	37 (18.3)	101 (23.0)	0.75 (0.49-1.15)	0.89 (0.631-1.25)
Marijuana	7 (3.5)	17 (3.9)	0.90 (0.37-2.20)	0.87 (0.63-1.20)
Pain relievers				
Dipyrone	124 (61.4)	228 (51.9)	1.48 (1.05-2.08)	1.45 (1.02-2.06)
Others†	50 (24.8)	111 (25.2)		0.97 (0.66-1.43)
Antibiotics				
Amoxicillin	25 (12.4)	62 (14.1)	0.86 (0.52-1.42)	0.88 (0.63-1.25)
Ciprofloxacilin (quinolone)	5 (2.5)	11 (2.5)	0.99 (0.34-2.89)	0.94 (0.32-2.77)
Vitamins/iron supplement	73 (36.1)	169 (38.4)	0.77 (0.52-1.14)	0.90 (0.63-1.28)
Folic acid	28 (13.9)	47 (10.7)	1.35 (0.82-2.22)	1.22 (0.73-2.05)
Antiemetic	18 (8.9)	25 (5.7)	1.62 (0.86-3.04)	1.69 (0.87-3.28)
Antifungic (metronidazole)	38 (13.9)	44 (10.1)	1.45 (0.87-2.40)	1.39 (0.82-2.34)
Abortive drugs				
All‡	40 (19.8)	90 (20.5)	0.96 (0.63-1.45)	0.81 (0.53-1.25)
Misoprostol	6 (3.0)	7 (1.8)	1.28 (0.40-4.06)	1.23 (0.38-4.02)
Hormones§	18 (8.9)	4 (0.9)	10.66 (3.56-31.94)	8.76 (2.85-26.93)
Herbal infusions	4 (2.0)	5 (1.1)	1.76 (0.47-6.62)	1.93 (0.49-7.58)
Pesticides	91 (45.3)	119 (27.0)	2.23 (1.58-3.16)	2.18 (1.53-2.13)

*Adjusted for sex, income, maternal age, and birth weight.
†Paracetamol, aspirin, hyoscine, and codeine.
‡Misoprostol, herbal infusions, and other compounds used as abortive.
§Oral contraceptives, antiabortive progesterone treatment, and thyroid hormones.

Table 3. Hormonal intake during preconception and pregnancy and IAL according to MLL status, Brazil, 1999-2005

Hormones intake	IAL, *n* (%)	MLL^{+ve}, *n* (%)	MLL^{-ve}, *n* (%)	Controls, *n* (%)	IAL vs controls, OR (95% CI)*	MLL^{+ve} vs controls, OR (95% CI)*	MLL^{-ve} vs controls, OR (95% CI)*
Preconception †							
Present	24 (12.2)	14 (21.5)	6 (7.7)	23 (5.3)	2.26 (1.21-4.21)	3.34 (1.51-7.36)	1.13 (0.40-3.14)
Absent	173 (87.8)	51 (78.5)	72 (92.3)	409 (94.7)			
1st trimester							
Present	17 (8.4)	5 (7.4)	4 (5.0)	3 (0.7)	11.35 (3.20-40.20)	10.57 (2.33-47.91)	7.55 (1.50-37.94)
Absent	185 (91.6)	63 (92.6)	76 (95.0)	438 (99.3)			
2nd trimester							
Present	7 (3.5)	1 (1.5)	2 (2.5)	3 (0.7)	4.49 (1.07-18.87)	2.62 (0.15-17.56)	3.52 (0.51-24.02)
Absent	195 (96.5)	67 (98.5)	78 (97.5)	438 (99.3)			
3rd trimester							
Present	6 (3.0)	1 (1.5)	3 (3.8)	3 (0.7)	2.32 (0.60-8.98)	1.02 (0.10-9.93)	3.94 (0.80-19.28)
Absent	196 (97.0)	67 (98.5)	77 (96.2)	438 (99.3)			

*Reported hormonal intake 1 year before pregnancy.
†*MLL* status and hormonal exposure OR (case-case approach) adjusted for sex, income, maternal age, and birth weight.

As shown in Table 2, a multivariate analysis revealed significant increased risks for IAL cases associated with maternal use of hormones during pregnancy after adjustments for sex, income, birth weight, maternal age, and history of cancer in first-degree relatives. The review of IAL mother's records who reported having used hormonal substances during pregnancy revealed that four of them did so to prevent fetal loss considering previous personal antecedents. The remaining 14 women reported use of contraceptives for abortion purposes or because they were not aware of the current pregnancy. Although an elevated OR was found for herbal medicine exclusively for the total series of IAL compared with controls, no significant association was found.

Results for maternal exposure during pregnancy to domestic pesticides and dipyrone reveal a moderate statistically significant association with IAL (Table 2). Joint exposure to dipyrone and metronidazole during pregnancy, reported by 54 mothers, was tested and revealed no association (OR, 1.05; 95% CI, 0.32-3.41).

In the multivariable analysis using logistic modeling, the environmental exposures that showed statistically significant association with IAL were the following: hormones (OR, 8.76; 95% CI, 2.85-26.93), pesticides at home (OR, 2.18; 95% CI, 1.53-2.13), and dipyrone (OR, 1.4; 95% CI, 1.02-2.06).

Hormonal exposure before and during pregnancy was associated to IAL compared with controls, both with and without *MLL* gene rearrangements. The mothers of 18 cases reported the consumption of hormones during pregnancy: 12 (66.7%) of them as oral contraceptives, 4 (3.2%) as thyroid hormones, and 2 (1%) as therapeutic drugs for pregnancy retention. We also explored whether the timing of the exposure (pregnancy trimester) would be associated with IAL risk magnitude, and for most medications, the direction of the OR remained similar to the overall OR, although a small decrease in risk estimates was observed in the second and third trimester in MLL^{+ve} cases (Table 3). The highest magnitudes of association were observed for consumption of hormones during the first trimester of pregnancy [OR, 11.35 (95% CI, 3.20-40.20) for all IAL cases; OR, 10.57 (95% CI, 2.33-47.91) for MLL^{+ve} cases; and OR, 7.55 (95% CI, 1.50-37.94) for MLL^{-ve} cases]. An association between MLL^{-ve} and hormonal exposure during the first trimester of pregnancy (OR, 7.55; 95% CI, 1.50-37.94) was also observed. In the case-case approach, the associations of dipyrone, metronidazole, quinolones, and hormones with *MLL* rearrangements showed ORs higher than the unity, without statistical significance (Table 4).

Discussion

Previous studies support the hypothesis that IAL with *MLL* rearrangements could be caused by exposures to compounds *in utero* that could inhibit topo-II activity (11, 17). We conducted a case-control study of IAL aiming to evaluate a selected maternal exposures during pregnancy and to assess previously reported associations with DNA-damaging substances. Despite the fact that this study was not designed as a population-based study, we estimate that it includes ~91% of the acute leukemia cases in children ages <12 months diagnosed in the participating centers in this particular time period, taking into account the expected number of IAL cases according to the population-based cancer registries data in Brazil and the number of cases of IAL ascertained in this study.

There were no major differences in this study about the distributions of demographic features among Brazilian regions. However, the overrepresentation of cases in the southeastern cities and the vast difference in the numbers of controls and cases in the highest population density areas are explained by the easier access to health care and by health care practices. Brazilian health care is public and available to all members of the population by law. Because private hematology-oncology care is very expensive, even affluent people make use of the public health care. However, for less expensive treatments, the middle and upper classes turn to private institutions. This socioeconomic phenomenon may

Table 4. Association of selected environmental exposures during pregnancy and *MLL* status, IAL cases, in a case-case analysis, Brazil, 1999-2005

Exposure	Exposed and MLL^{+ve} (*n*)	Unexposed and MLL^{+ve} (*n*)	Exposed and MLL^{-ve} (*n*)	Unexposed and MLL^{-ve} (*n*)	Crude OR (95% CI)*	Adjusted OR † (95% CI)
Dipyrone	47	23	44	34	1.58 (0.80-3.08)	1.45 (0.75-2.86)
Metronidazole	12	54	7	72	2.29 (0.84-6.19)	1.72 (0.64-4.58)
Quinolones	2	65	1	79	2.43 (0.21-27.41)	2.25 (0.70-25.70)
Hormones	6	57	4	76	2.00 (0.54-7.42)	1.88 (0.50-7.01)
Misoprostol	3	17	2	10	0.88 (0.12-6.21)	0.44 (0.50-7.01)

*Interaction OR between *MLL* gene status and selected exposures (case-only approach).
†ORs for *MLL* gene status and selected exposures adjusted for sex, income, maternal age, and birth weight.

explain why we have a more ''deprived'' control population. The concern about introducing bias in the maternal hormone result, as the more affluent group (cases) might have better access to health care/contraception, should be ruled out because birth control pills are distributed freely in the public heath care system. Although a higher proportion of white children were observed among cases than controls ($P < 0.0001$), we consider that such statistical difference should be analyzed cautiously considering the intense genetic mixing of the Brazilian population (16). Several interviewers in the different participation centers carried out the characterization of skin complexion, presenting subjective variability in such classification procedures. Therefore, the results observed in this study must be analyzed prudently for the aforementioned reasons. We believe that maternal education and income distribution in cases and controls reflect the social environment experienced by all participants more so than the ethnic profile.

Lower socioeconomic status, as measured by income and maternal education, was associated with an increased risk of IAL, which is similar to previous reports in a more developed country (18). These results contrast with children ages >24 months from middle and upper classes who tend to have an increased risk of developing common acute lymphoblastic leukemia associated with overprotection and high living standards (4, 19). This difference is plausible and can be explained by the inadvertent exposure to environmentally harmful compounds among mothers with lower education/income status and generally less knowledge about health risk factors in general.

As a whole, this study suggested that some environmental exposures during pregnancy might yield an increased risk of IAL in offspring. A markedly higher statistically significant risk was observed for hormonal exposure during pregnancy (OR, 8.76; 95% CI, 2.85-26.93), which deserves further scrutiny. A positive association with maternal exposure to dipyrone and household pesticides and IAL offers support for previous studies (11, 20). Dipyrone consumption during pregnancy was previously found to be associated with Wilms' tumor (21) and was found in this study to be associated with IAL with *MLL* rearrangements, suggesting that dipyrone should be considered hazardous during pregnancy, especially in Brazil where it is a cheap compound and may show a high attributable risk for childhood malignancies (11, 21).

The mechanisms of leukemogenesis in IAL are related to the fact that the growing fetus is more sensitive to the effects of potential DNA damage insults during the early stage of pregnancy. The gene fusion resulting from chromosomal translocation is assumed to be the initiating event in leukemogenesis (2, 3). Because reciprocal rearrangements of the *MLL* gene are the most common genetic feature in IAL, it is important to understand how these fusion genes might possibly have originated as an effect of transplacental exposures. It is well known that chemotherapeutic drugs that target topo-II, which inhibit the resealing of broken DNA strand ends, trigger the formation of *MLL* translocations (22). Among the topo-II inhibitors are benzene metabolites, such as benzoquinone, isoflavones, anthraquinone, and quinolone antibiotics (8). The potential role of exogenous estrogens in breast cancer studies was shown in descriptive studies and in experimental models, pointing out that the results of the DNA damage were induced by their metabolites causing mainly single-strand breaks (23-25). As the metabolite products in the estrogen biosynthesis are semiquinone and quinone, a pathway mimicking the same topo-II inhibitors could explain the high association found in this series of IAL.

Although it is speculated that the gene fusion resulting from *MLL* rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia might occur in a restricted period of the beginning of B lymphopoiesis, clonotypic DJ rearrangements of the immunoglobulin heavy chain genes indicate that the second event leading to overt leukemia could happen at a later time during fetal development (26). The association between hormonal exposure either before or during pregnancy and *MLL* status, ascertained using a case-case approach (12), revealed an association in all studied periods, although higher during the first trimester of pregnancy. However, due to the diversity of *MLL* gene rearrangements with several gene partners, false-negative results could occur and this misclassification would artificially decrease the magnitude of association (27).

The present study provides evidence that hormone exposure during pregnancy should be studied in more depth as cause-effect *in utero* leukemogenesis.

Appendix A. Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia

Members: Paulo Ivo C. Araújo,[3] Dora Márcia Alencar,[4] Silvia R. Brandalise,[5] Eni Guimarães Carvalho,[6] Virginia M. Coser,[7] Imaruí Costa,[7] José Carlos Córdoba,[8] Mariana Emerenciano,[1] Jane Dobbin J,[1] Maria Célia Moraes Guerra,[3] Venâncio Gumes Lopes,[4] Isis Q. Magalhães,[8] Núbia Mendonça,[4] Andrea Gadelha,[9] Gilson Guedes,[9] Flávia Pimenta,[9] Vitória P. Pinheiro,[5] Waldir Pereira,[7] Gilberto Ramos,[10] Terezinha J.M. Salles,[11] Denise Bousfield da Silva,[12] Marcelo P. Land,[3] Elaine Sobral,[3] Fernando Werneck,[13] Carlos Scridelli,[14] Luis Gonzaga Tone,[14] Lincoln Vermondi,[12] Luis Fernando Lopes,[15] Wellinghton Mendes.[15]

Affiliations:

1. Centro de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil
2. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil
3. Instituto de Pediátria e Puericultura Martagão Gesteira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
4. Sociedade de Oncologia da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil
5. Centro Infantil de Investigações Hematológicas D. Boldrini, Campinas, São Paulo, Brazil
6. Hospital Martagão Gesteira, Salvador, Bahia, Brazil
7. Departamento de Hematologia, Universidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil
8. Hospital de Apoio Brasília, Unidade de Onco-Hematologia Pediátrica, Brasília, Brazil
9. Hospital Napoleão Laureano, João Pessoa, Paraiba, Brazil
10. Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
11. Hospital Oswaldo Cruz, Centro de Oncologia Pediátrica, Recife, Pernambuco, Brazil
12. Serviço de Oncologia do Hospital Joana de Gusmão Florianópolis, Santa Catarina, Brazil
13. Departamento de Pediatria, Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
14. Departamento de Pediatria, Hospital das Clinicas, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil
15. Hospital do Câncer AC Camargo, São Paulo, Brazil

Acknowledgments

We thank the mothers who, despite having the dramatic experience of seeing their children suffer, have dedicated their time to answering the questionnaires (the success of the Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia has depended on their help); Alessandra Faro and Marcos Thanus for data set organization and secretarial assistance; Eliane Esteves and Marina P. Oliveira for interviewing assistance; Prof. Mel Greaves for his comments and suggestions; and Jozina Aquino, Reinaldo Del Belo, Ricardo Bigni, Lilian Burlemaqui,

Tereza Cristina Cardoso, Kadma Carriço, Dolores Dorea, Maurício Dumond, Fernando Augusto de Freitas, Ednalva Leite, Carmen M. Mendonça, and Flávia Nogueira (pediatricians and hematologists) for their assistance.

References

1. Ford AM, Ridge SA, Cabrera ME, et al. *In utero* rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. Nature 1993;363:358–60.
2. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. Nat Rev Cancer 2003;3:639–49.
3. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. Lancet 1997;349:344–9.
4. Gale KB, Ford AM, Repp R, et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:13950–4.
5. Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui CH. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. Blood 2000;96:24–33.
6. Isaacs H, Jr. Fetal and neonatal leukemia. J Pediatr Hematol Oncol 2003;25: 348–61.
7. Isoyama K, Okawa H, Hayashi Y, et al. Clinical and biological aspects of acute lymphoblastic leukemia in 62 infants: retrospective analysis of the Tokyo Children's Cancer Study Group. Pediatr Int 1999;41:477–83.
8. Ross JA, Potter JD, Robison LL. Infant leukemia, topoisomerase II inhibitors, and the MLL gene. J Natl Cancer Inst 1994;86:1678–80.
9. Strick R, Strissel PL, Borgers S, Smith SL, Rowley JD. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:4790–5.
10. Ross JA, Potter JD, Reaman GH, Pendergrass TW, Robison LL. Maternal exposure to potential inhibitors of DNA topoisomerase II and infant leukemia (United States): a report from the Children's Cancer Group. Cancer Causes Control 1996;7:581–90.
11. Alexander FE, Patheal SL, Biondi A, et al. Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. Cancer Res 2001;61: 2542–6.
12. Barletta E, Gorini G, Vineis P, et al. Ras gene mutations in patients with acute leukaemia and exposure to chemical agents. Carcinogenesis 2004;25: 749–75.
13. Khoury MJ, Flanders WD. Nontraditional epidemiologic approaches in the analysis of gene-environment interaction: case-control studies with no controls. Am J Epidemiol 1996;144:207–13.
14. Bain BJ. Leukemia diagnosis. London: Blackwell Science; 1997.
15. Emerenciano M, Agudelo Arias DP, Coser VM, et al. Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia. Pediatr Blood Cancer 2006;47:549–54.
16. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:177–82.
17. Spector LG, Xie Y, Robison LL, et al. Maternal diet and infant leukemia: the DNA topoisomerase II inhibitor hypothesis: a report from the children's oncology group. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005;14:651–5.
18. Ross JA, Potter JD, Shu XO, et al. Evaluating the relationships among maternal reproductive history, birth characteristics, and infant leukemia: a report from the Children's Cancer Group. Ann Epidemiol 1997;7:172–9.
19. Alexander FE, Cartwright RA, McKinney PA, Ricketts TJ. Leukaemia incidence, social class, and estuaries: an ecological analysis. J Public Health Med 1990;12:109–17.
20. Ma X, Buffler PA, Gunier RB, et al. Critical windows of exposure to household pesticides and risk of childhood leukemia. Environ Health Perspect 2002;110:955–60.
21. Sharpe CR, Franco EL.; Brazilian Wilms' Tumor Study Group. Use of dipyrone during pregnancy and risk of Wilms' tumor. Epidemiology 1996;7:533–5.
22. Bromberg KD, Burgin AB, Osheroff N. A two-drug model for etoposide action against human topoisomerase IIα. J Biol Chem 2003;278:7406–12.
23. Baik I, Devito WJ, Ballen K, et al. Association of fetal hormone levels with stem cell potential: evidence for early life roots of human cancer. Cancer Res 2005;65:358–63.
24. Cavalieri EL, Stack DE, Devanesan PD, et al. Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:10937–42.
25. Cavalieri EL, Li KM, Balu N, et al. Catechol ortho-quinones: the electrophilic compounds that form depurinating DNA adducts and could initiate cancer and other diseases. Carcinogenesis 2002;23:1071–7.
26. Fasching K, Panzer S, Haas OA, et al. Presence of N regions in the clonotypic DJ rearrangements of the immunoglobulin heavy-chain genes indicates an exquisitely short latency in t(4;11)-positive infant acute lymphoblastic leukemia. Blood 2001;98:2272–4.
27. Garcia-Closas M, Thompson DW, Robins JM. Differential misclassification and the assessment of gene-environment interactions in case-control studies. Am J Epidemiol 1998;147:426–33.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2007) 40: 749-760
ISSN 0100-879X Review

Acute leukemia in early childhood

M. Emerenciano[1], S. Koifman[2] and M.S. Pombo-de-Oliveira[1]

[1]Divisão de Medicina Experimental, Centro de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
[2]Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Correspondence
Correspondence
M.S. Pombo-de-Oliveira
Coordenação de Pesquisa, CPq
Instituto Nacional de Câncer
Rua André Cavalcanti, 37
20231-050 Rio de Janeiro, RJ
Brasil
Fax: +55-21-3233-1470
E-mail: mpombo@inca.gov.br

M.S. Pombo-de-Oliveira and S. Koifman are recipients of CNPq scholarships (Nos. 308532/2003-1 and 400813/2005-0, respectively), and M. Emerenciano is supported by the Fundação Ary Frauzino/Swiss Bridge Foundation (No. 2301504).

Received August 10, 2006
Accepted March 27, 2007

Abstract

Acute leukemia in early childhood is biologically and clinically distinct. The particular characteristics of this malignancy diagnosed during the first months of life have provided remarkable insights into the etiology of the disease. The pro-B, CD10 negative immunophenotype is typically found in infant acute leukemia, and the most common genetic alterations are the rearrangements of the *MLL* gene. In addition, the *TEL/AML1* fusion gene is most frequently found in children older than 24 months. A molecular study on a Brazilian cohort (age range 0-23 months) has detected *TEL/AML1*$^{+ve}$ (N = 9), *E2A/PBX1*$^{+ve}$ (N = 4), *PML/RARA*$^{+ve}$ (N = 4), and *AML1/ETO*$^{+ve}$ (N = 2) cases. Undoubtedly, the great majority of genetic events occurring in these patients arise prenatally. The environmental exposure to damaging agents that give rise to genetic changes prenatally may be accurately determined in infants since the window of exposure is limited and known. Several studies have shown maternal exposures that may give rise to leukemogenic changes. The Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia has found that mothers exposed to dipyrone, pesticides and hormones had an increased chance to give birth to babies with infant acute leukemia [OR = 1.48 (95%CI = 1.05-2.07), OR = 2.27 (95%CI = 1.56-3.31) and OR = 9.08 (95%CI = 2.95-27.96)], respectively. This review aims to summarize recent clues that have facilitated the elucidation of the biology of early childhood leukemias, with emphasis on infant acute leukemia in the Brazilian population.

Key words
- Infant acute leukemia
- *MLL*
- Acute lymphoblastic leukemia
- Acute myeloid leukemia
- Maternal exposures
- Molecular and exploratory epidemiology

Clinical characterization

Acute leukemia in early infancy comprises a group of leukemias characterized by the diagnosis of acute lymphoblastic leukemia (ALL) or acute myeloid leukemia (AML) during the first years of life. The term infant acute leukemia (IAL) is usually applied when the diagnosis is made within the first twelve months after birth. The medical services of some countries, however, extend this time frame to 18 months of age. Leukemia is the second most common malignancy that occurs in the first year of life, following neuroblastoma (1-3). Although not as frequent as neuroblastoma, leukemia is the leading cause of death from neoplastic disease during the perinatal period. Despite being the second most common malignant disease in the first year of life, leukemia is a very rare disease in younger children, occurring much more frequently in later childhood (3). In some cases, the signs of leukemia appear at birth and the neonates die shortly thereafter, while others show normal development following delivery, with clinical and hematological prob-

lems appearing later (4). Today it is possible to correlate these differences with the variable biological background of each individual case, such as cases with Down syndrome that represent a distinct leukemia with spontaneous clinical remission (5).

Clinically, IAL is characterized by a high leukocyte count, hepatosplenomegaly, and central nervous system involvement. The pro-B immunophenotype, CD10 negative, and sometimes with aberrant expression of monocytoid differentiation is the one most frequently observed. These features indicate that the most common form of infant ALL originates in a stem cell still not fully committed to lymphoid and/or myeloid differentiation. This is corroborated by the observation that the multilineage gene expression profile precedes commitment of stem and progenitor cells to unilineage differentiation in the hematopoietic system, in which unilineage commitment is prefaced by a "promiscuous" phase of multilineage locus activation (6,7). On the other hand, the presence of leukemia-specific translocations in primitive lymphoid-restricted $CD34^+CD19^-$ cells purified from t(4;11)-positive ALL samples has been recently reported (8), indicating a primitive lymphoid-restricted progenitor/stem cell origin. In early infancy cases of myeloid origin (AML), the distribution of subtypes seems to be mostly M4 and M5, followed by the M7 subtype (characteristic of those with Down syndrome) (1). Surprisingly, however, in Brazil an apparent excess of acute promyelocytic leukemia has been reported in children younger than 18 months (9).

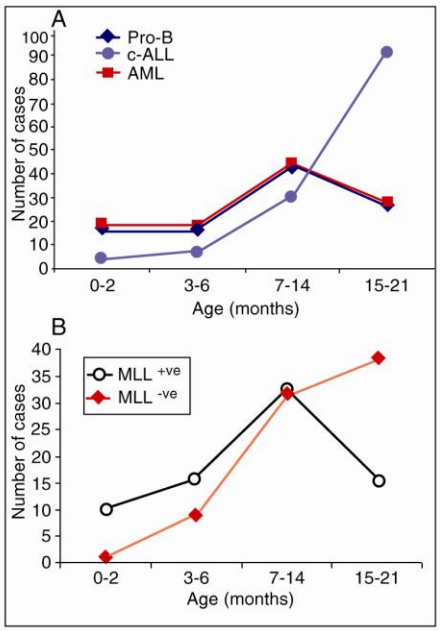

Figure 1. Distribution of infant acute leukemia cases according to immuno-molecular characterization and age. *A*, Immunophenotyping profile. *B*, *MLL* status. Pro-B = $CD19^+/CD10^-$ B precursor acute lymphoblastic leukemia; c-ALL = $CD19^+/CD10^+$ common acute lymphoblastic leukemia; AML = acute myeloid leukemia.

The most common genetic events occurring in children younger than 12 months, both in ALL and AML, are the rearrangements of the *MLL* gene on chromosome 11q23, which may be as high as 85% depending on the techniques applied (10,11). Infants diagnosed with acute leukemia harboring an 11q23 rearrangement have a particularly poor prognosis when compared to other children with acute leukemia (12). These singular characteristics seen in IALs - lack of CD10 expression, presence of myeloid markers, and *MLL* gene rearrangements - are inter-correlated, and their presence is inversely associated with age. For example, *MLL* rearrangement is associated with 90% of $CD10^-$ cases but only with 20% of $CD10^+$ cases. Also, the younger the child the higher is the frequency of *MLL* translocations (10,13). In series of IAL cases from different regions of Brazil, the comparison between age, immunophenotyping, and *MLL* rearrangements demonstrated that up to 14 months of age the pro-B subtype and the *MLL*-positive cases predominated ($P < 0.0001$), and among older cases, most of them were c-ALL and *MLL*-negative cases, as shown in Figure 1. Regarding the *MLL* gene status, it is important to note that even in cases older than 14 months, some were *MLL* positive (Figure 1B).

Regarding outcome, unfortunately, the prognosis in this age group still remains poor. At present, the overall 5-year survival for infant ALL patients remains approxi-

mately 40-50% (12,14). The above features and the short latency periods define IAL as a biologically and clinically distinct disease from childhood acute leukemia in general. Therefore, it seems probable that different genetic and environmental factors may be involved in the mechanisms of pathogenesis of IAL, childhood ALL and AML (1,13), and this knowledge is of great importance when dealing with this aggressive type of leukemia.

Mechanisms of pathogenesis

MLL gene rearrangements and topoisomerase II inhibitors

The mixed-lineage leukemia gene (*MLL/HRX/ALL1*), located at cytogenetic band 11q23, is often altered in IAL, being rearranged in more than 80% of cases (12,13). This gene consists of at least 36 exons, encoding a 3969-amino acid nuclear protein with a molecular weight of nearly 430 kDa that functions as a positive regulator of gene expression in early embryonic development and hematopoiesis. *MLL* translocation breakpoints cluster within an 8.3-kb region spanning exons 5-11 (Figure 2I). In its germ-line form, MLL protein, a human homologue of the transcriptional regulator Trithorax of *Drosophila*, is an upstream transcriptional effector of *HOX* genes, which play a key role in the regulation of hematopoietic development (15). To distinguish whether the *MLL* gene acts as an oncogene or whether the fusion

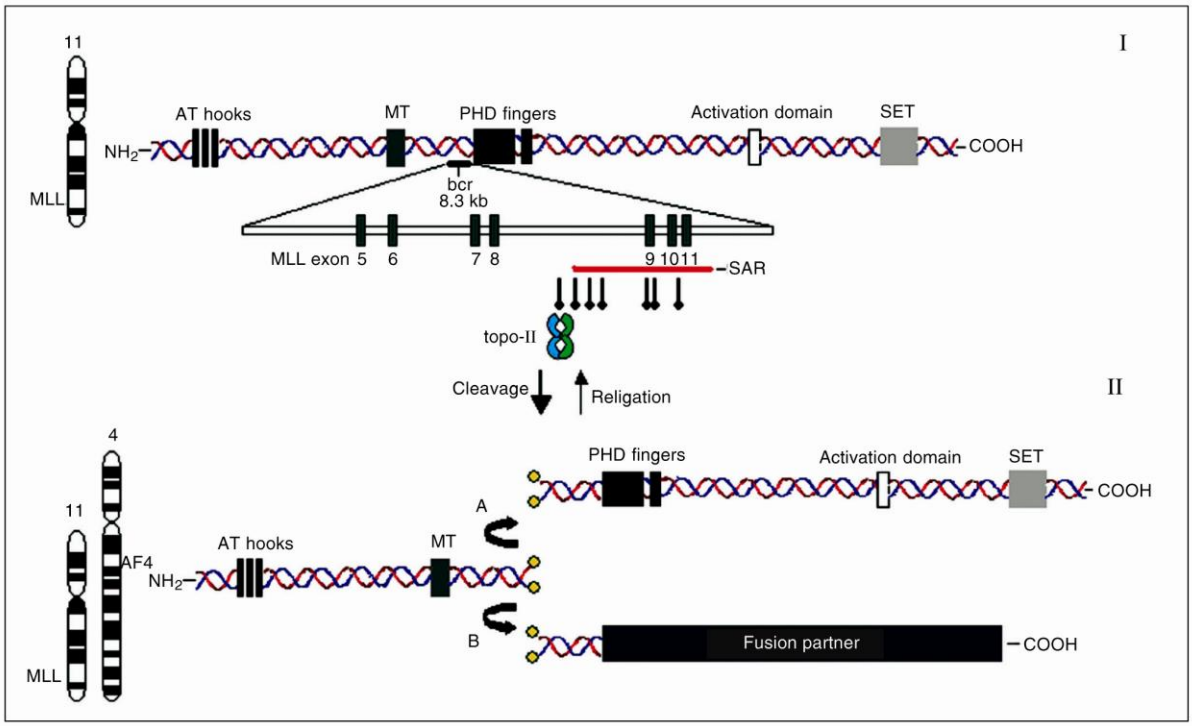

Figure 2. *I*, Structure of the *MLL* gene, with protein motifs indicated in the diagram. Three AT hooks are located near the N-terminal region. MT = DNA methyltransferase homology region; PHD = plant homeodomain zinc fingers; SET = su(var)3-9, enhancer of zeste, trithorax domain. Solid black bar just behind the PHD zinc fingers indicates the location of the breakpoint cluster region (bcr), and its exon/intron structure is highlighted. Solid red bar below exons 9, 10, and 11 indicates the high-affinity scaffold attachment region (SAR). Vertical arrows indicate the topo-II consensus sites. *II*, Consequences of topo-II cleavage. *A*, *MLL* double strand is correctly re-ligated, generating wild-type *MLL*. *B*, *MLL* is fused with frequent partner *AF4*, generating a fusion oncogene. The NCBI website (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) was extensively consulted for elaboration of this figure.

proteins resulting from the translocations have dominant negative effects, *in vitro* experiments using hematopoietic progenitors from embryos of homozygous *MLL* knockout mice were performed. The ability of wild-type AB2.1 embryonic stem (ES) cells and of single- or double-*ALL-1* gene knockout cells derived from them to differentiate along hematopoietic lineages was tested using *in vitro* colony formation assays. The results showed that ALL-1 double-knockout ES cells formed a significantly greater number of colonies with faster kinetics than wild-type and *ALL-1* single-knockout ES cells. Furthermore, parental ES cells formed lineage-restricted colonies, whereas single- and double-knockout ES cells developed, at high frequency, immature and/or biphenotypic colonies, mimicking the aberrant hematopoiesis typical of leukemia patients (16).

To date, over 87 chromosome partners of *MLL* have been described with diverse functions and variable function domains, and 51 of the presumptive gene partners of *MLL* have been cloned and analyzed at the molecular level (11). This marked promiscuity raises the question of whether the diverse partners contribute with common functions or have different effects in leukemogenesis. *MLL* partners can be divided into two groups. First, the nuclear fusion partners, including AF4, AF9, AF10, ENL, ELL, AF17, and others, which are associated with different aspects of transcriptional regulation. The other group is mainly cytoplasmic and frequently associated with cytoskeleton-dependent signal transduction, including *AF6*, *Septin 6*, *ABI-1*, *EEN*, and so on (17). Although the fusion partners display many different features, all of them delete a large 3' portion of the *MLL* gene and connect the remaining part with the corresponding partner and, regardless of whether the fusion partner itself is nuclear or cytoplasmic, the MLL chimeric proteins consistently form punctuated patterns in the nucleus (18), indicating that the localization of the fusion protein and its potential targets is mainly determined by the DNA-binding activity of the MLL portion and not by the fusion partner. Remarkable is the fact that the frequency and diversity of MLL-associated abnormalities vary according to *de novo* acute leukemia and therapy-related leukemias (19). Considering the role of the partner genes, these reports indicate that the transforming capacity of the truncated MLL alone is ineffective, suggesting that a gain of MLL function via a partner gene is crucial.

Although the mechanisms by which these rearrangements result in leukemia remain largely unknown, clues for understanding the mechanism of main translocations come from genomic details of the *MLL* gene. Several DNA motifs implicated in recombination of DNA have been identified and localized within the *MLL* breakpoint cluster region (bcr). These include topoisomerase-II (topo-II)-binding sites (20) and Alu sequences (21). Also, a high-affinity scaffold attachment region (SAR) was identified within the telomeric (3') region of the bcr (Figure 2II). SARs are sites for binding of DNA to nuclear matrix proteins, functioning to maintain the structure of chromosomal loops and to allow regulation of transcription, DNA replication, and recombination (20).

Suggestively, most of the topo-II-consensus sites overlap the SAR, clustering in the telomeric part of the *MLL* bcr. The observation of these recombination-prone sequences in the *MLL* bcr region indicates that the rearrangement might result from DNA breakage and recombination events (20). Several *in vitro* studies support the link between *MLL* cleavage and topo-II inhibitors in human hematopoietic cells (22,23). Nevertheless, these studies still do not prove the occurrence of recombination. The same biased distribution of gene breakpoints within *MLL* bcr seen in treatment-related leukemias has also been shown in IALs (24). On the basis of this finding, it is very likely that

the mechanisms of cleavage of the *MLL* gene in IALs are similar to those of topo-II inhibitor-induced secondary leukemias (20). It was then suggested that the critical leukemogenic event(s) occurring *in uterus* might similarly involve prenatal exposure to topo-II inhibitors as represented by several natural and medicinal substances, further discussed in molecular and exploratory epidemiology.

Other molecular markers

It is clear that chromosome translocations, especially those involving the *MLL* gene, are the genetic alterations most frequently found in early IAL. However, not only *MLL* rearrangements but also other chromosome translocations may be found within this group, especially when the age limit is 18 months of age.

For instance, another hallmark in pediatric acute leukemias is the chromosomal translocation t(12;21)(p13;q22), which fuses the *TEL* and *AML1* genes, resulting in the most common chromosomal alteration in childhood cancer. The *TEL/AML1* fusion gene occurs in approximately 25% of B-cell precursor ALL in children 2-12 years old. There is evidence that *TEL/AML1* usually arises prenatally as an early or initiating mutation. However, the low-twin concordance rate (~10%), the protracted and variable latency of the disease, and the transgenic modeling indicate that secondary postnatal genetic alterations are also required (25,26). While *MLL*-positive cases present a poor prognosis and are often associated with $CD10^-$ immunophenotypes, ALL cases expressing the TEL/AML1 fusion protein are associated with $CD10^+$ immunophenotypes and excellent prognosis (27).

A molecular study conducted on a Brazilian cohort (age range 0 to 23 months) has detected $TEL/AML1^{+ve}$ (N = 9), $E2A/PBX1^{+ve}$ (N = 4), $PML/RARA^{+ve}$ (N = 4), and $AML1/ETO^{+ve}$ (N = 2) cases (10). It is unlikely, however, that a single-chromosome translocation itself would be enough to cause overt leukemia. According to Greaves' hypothesis (28), genetic alterations that impair differentiation probably cooperate with a second class of mutations that alter the proliferation and survival of a malignant clone. The short latency and the high-concordance rate between twins with infant leukemia could suggest that the *MLL*-fusion gene should be sufficient to cause leukemia. Perhaps more likely, however, and accepting the same *TEL/AML1* minimal two-step model for childhood leukemia, the disruptive effect of the *MLL*-gene fusion on, for example, DNA repair or cell-cycle regulation could facilitate the rapid acquisition of additional, necessary genetic changes, particularly with continued exposure to a genotoxic chemical *in utero* (29,30).

The gathering of multiple, independent and complementary genetic lesions as a requirement for abnormal development of a hematopoietic progenitor supports studies that aim to investigate other genes in the pathogenesis of early acute leukemia, bearing in mind the cell type and the corresponding chromosomal lesions. Accordingly, secondary chromosomal or genetic alterations are detected at diagnosis in a significant number of *MLL*-positive cases. In children ≤3 years old, among whom it is believed that the first genetic alteration required to fully develop childhood ALL occurs *in utero*, the leukemic cells prevailingly exhibit fetal-type DJ_H junctions of the complementarily determining region 3 of the immunoglobulin H chain that lack the so-called N regions, which are added during DJ_H recombination events later in fetal development (31). Interestingly, N regions were later found to be present in 11 of 12 IAL cases with t(4;11) translocation (32), indicating that t(4;11)-positive IAL is initiated later in fetal development than most B-cell precursor ALL in children younger than 3 years and that they have a shorter latency period already *in utero*. Ultimately,

considering the *MLL* translocation to be the first genetic hit undoubtedly arising *in utero*, but yet displaying N region-positive DJ_H junctions, it is very likely that an exquisitely short latency period for only limited mutagenic events is further required (14,32). Furthermore, it was recently found that the receptor tyrosine kinase FLT3 is highly expressed in *MLL*-rearranged ALL as compared with other leukemias (6). Moreover, it was found that approximately 20% of *MLL*-rearranged ALL cases possess activating mutations in the activation loop region (33). These data provide evidence that leukemogenic fusion proteins such as MLL fusions cooperate with activated kinases to promote leukemogenesis. Thus, the conundrum of whether one or more secondary mutations are necessary for leukemia development in *MLL*-positive acute leukemias is a challenge that still needs to be fully elucidated. The combination of molecular and exploratory epidemiology methods is a good strategic model to test this hypothesis.

Molecular and exploratory epidemiology

What makes these leukemias so unique?

There is no doubt that the risks of developing early acute leukemia are modulated by complex interactions between inherited predispositions, environmental exposure to damaging agents and chance events (28,34). Despite the fact that such leukemias are very rare, their investigation is absolutely necessary for the study of leukemogenesis because they have a short latency period together with the known immune molecular markers. The molecular epidemiological approach to genetic studies has suggested the concept that most, if not all, childhood acute leukemia cases originate *in utero*. The evidence for this is based on the following considerations: first, studies of identical twins with *MLL*-rearranged leukemias, presenting the same fusion gene sequences, indicated that *MLL* rearrangements are acquired *in utero*. Such cases may be plausibly explained by the metastasis of a clonal event originating in one twin to the other twin via placental anastomoses (30); second, the fusion gene sequences have been retrospectively identified in archived neonatal heel blood spot cards of children in whom leukemia had subsequently developed (35). Finally, the same fetal origin has been established in older children through monozygotic twin studies or detection of other specific fusion gene sequences (e.g., *TEL/AML1* and *AML1/ETO*) in neonatal blood spots (25). These findings have led to the interpretation that many childhood leukemias originate prenatally during fetal hematopoiesis. The mechanisms of leukemogenesis in early infancy are related to the fact that the growing fetus and/or child is more sensitive to the effects of potential DNA damage insults during the early stage of pregnancy and/or first semester of life. Because reciprocal rearrangement of the *MLL* gene is the most common genetic feature, it is important to understand how these fusions could possibly result from the transplacental exposure to DNA-damaging substances. It has been well demonstrated that substances that target topo-II, inhibiting the re-sealing of a previously cleaved double-strand end by the same enzyme, trigger the most common mechanism in the formation of *MLL* rearrangement (model for therapy-related secondary AML (s-AML)) (22,36).

In s-AML, older children and adults are exposed to drugs that function as topo-II inhibitors, such as epipodophyllotoxins (e.g., etoposide) and anthracyclines. Therapy-related *MLL*-positive leukemia cases have been increasingly reported (37). It was then postulated that transplacental exposures to DNA-topo-II inhibitors, which form cleavable complexes, may be related to the etiology of IAL with *MLL* rearrangements (38). As discussed before, the same biased distribution of gene breakpoints within *MLL* bcr seen in treat-

ment-related leukemias has also been shown in IALs (24,38). Topo-II inhibitors include chemotherapeutic agents, benzene metabolites (such as benzoquinone), isoflavones, flavonoids, lignans, podophyllin resin, quinolone antibiotics, and some pesticides. Specific fruits and vegetables that contain quercetin, soybeans (genistein), tea, cocoa, wine (catechins), and caffeine have all been related to an increased risk of infant AML (36,38-40). Thus, to better understand the environmental exposures to damaging agents that give rise to these genetic changes *in utero*, infants represent a more accurate group than older children, since the window of exposure is limited and known (shortly before or during pregnancy). Although the epidemiological data are still limited to support correlations, several studies have shown maternal exposures that may give rise to these leukemogenic genetic changes (34,40-44). In a literature review consulting the MEDLINE databank, we retrieved published papers focusing on IAL (1990-2006), summarized them in Table 1, and briefly discussed their valuable results. These studies were searched through an intensive combination of both MeSH terms and part of the text words and titles. The following terms were used: infant acute leukemia, childhood

Table 1. Data concerning leukemias reported in epidemiological literature.

Study group	N	Risk factor, adjusted odds ratio, and 95%CI	Reference
Children's Cancer Group	1753 AL 2081 controls	ALL and AML diagnosed before 2 years of age, previous fetal loss was associated with a 5-fold increased risk ($P < 0.001$), whereas 2 or more fetal losses were associated with 12-fold increased risk ($P < 0.001$).	Yeazel et al., 1995 (47)
Children's Cancer Group	IAL: 203 ALL + 88 AML 558 controls	Maternal alcohol consumption during pregnancy (compared with no drinking) was associated with OR = 1.43 (95%CI = 1.00-2.04) for ALL and OR = 2.64 (95%CI = 1.36-5.06) for AML.	Shu et al., 1996 (43)
Children's Cancer Group	303 IAL 468 controls	The relationships between birthweight, prior fetal loss, and risk of infant leukemia appear to be complex, requiring studies that incorporate molecular analysis.	Ross et al., 1997 (48)
International Study Group. UK, 1994-1999	136 IAL 266 controls	DNA-damaging drugs: OR = 2.83 (95%CI = 1.15-6.99) $P < 0.03$. Mosquitocidals: OR = 5.14 (95%CI = 1.27-20.85) $P < 0.003$.	Alexander et al., 2001 (40)
Children's Cancer Group. USA, Canada and Australia	64 IAL 81 controls	Maternal exposure to mind-altering drugs: early pre-B ALL with OR = 1.8 (95%CI = 1.0-3.1) $P < 0.01$.	Wen et al., 2002 (44)
NDSHO. Denmark, Sweden, Norway, Iceland, 1984-1999	3812 AL 10,745 controls	Overall risk of ALL was associated with birth weight (OR = 1.26 per 1 kg increase in birth weight; 95%CI = 1.13-1.41). The association was similar for B- and T-ALL and across all diagnostic ages (0-14 years).	Hjalgrim et al., 2004 (41)
Children's Oncology Group. USA, 1996-2002	240 IAL 255 controls	Maternal consumption of dietary specific DNA topo-II inhibitors associated with AML (MLL^{+ve}): OR = 1.9 (95%CI = 0.5-7.0); 2.1 (0.6-7.7) and 3.2 (90.9-11.9) comparing 2nd to 4th quartiles.	Spector et al., 2005 (34)
Multicenter Study. France	280 AL 288 controls	Maternal alcohol consumption: LL: OR = 2.0 (95%CI = 1.4-3.0) and AML: OR = 2.6 (95%CI = 1.3-5.8).	Menegaux et al., 2005 (42)
Brazilian Collaborative Study Group of IAL. Brazil, 1999-2005	202 IAL 440 controls	Maternal exposure to estrogens. Dipyrone. Domestic pesticides.	Pombo-de-Oliveira et al., 2006 (45)

These studies were searched through an intensive combination of both MeSH terms and part of the text words and titles. The following terms were used: infant acute leukemia, childhood "leuk(a)emia", risk factor, and leukemia with *MLL* gene rearrangements. AL = acute leukemia; ALL = acute lymphoblastic leukemia; AML = acute myeloid leukemia; IAL = infant acute leukemia.

"leuk(a)emia", risk factor, and leukemia with *MLL* gene rearrangements.

Ross et al. (43) suggested that maternal alcohol consumption during pregnancy results in an increased risk for infant ALL (OR = 1.43; 95%CI = 1.00-2.04) and for infant AML (OR = 2.64; 95%CI = 1.36-5.06). The mechanism is explained by the ethanol induction of microsomal enzymes, such as cytochrome P450, which subsequently activate pre-carcinogens (43). The same study showed that paternal smoking one month prior to pregnancy was associated with an increased risk (OR = 1.56; 95%CI = 1.03-2.36) of infant ALL. High-birth weights were also shown to be correlated with higher rates of infant ALL and AML. Concordant results were observed within the Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia (BCSGIAL), using birth weight information obtained from the questionnaires of 202 IAL cases and 440 controls (45). Since insulin-like growth factor-1 is important in blood formation and regulation and has been shown to stimulate the growth of both myeloid and lymphoid cells in culture, it was postulated that high levels of insulin-like growth factor-1 might produce large babies and contribute to the development of leukemia (46). A maternal history of fetal loss has also been associated with a five- to 12-fold increased risk of developing ALL or AML (47). However, Ross et al. (48) later showed that the relationships between birth weight, prior fetal loss, and risk of infant leukemia appear to be complex, and that only high-birth weight was in fact a significant risk factor of developing childhood leukemia.

An international collaborative study involving patients in Japan, Italy, China and Hong Kong, Greece, Egypt, Chile, and Brazil found the selective link between pregnancy exposures to pesticides, in particular propoxur (a mosquitocidal compound, OR = 9.68; P = 0.003), or consumption during pregnancy of substances such as dipyrone (OR = 5.84; P = 0.001), and IALs with *MLL* gene rearrangements (40). However, in this international study about transplacental chemical exposure and risk of IAL with *MLL* gene fusion, there were a small number of cases molecularly classified and possible confounding factors related to selection of controls in the Brazilian settings. Hence, further analysis was required to confirm these apparent associations. More recently, the BCSGIAL conducted a molecular study combining epidemiological data obtained from interviews with mothers in order to re-evaluate the hypothesis that exposure to pharmaceutical drugs is associated with IAL. The results of that study confirmed reports that mothers exposed to dipyrone and pesticides had an increased chance to give birth to babies with IAL (OR = 1.48; 95%CI = 1.05-2.07 and OR = 2.27; 95%CI = 1.56-3.31, respectively) (45). Furthermore, significant associations with risks for IAL were found, a strong positive association with maternal hormone intake during pregnancy (OR = 9.08; 95%CI = 2.95-27.96). The strong and significant association between IAL and estrogen exposure observed in the BCSGIAL study deserves further investigation. Since a potential role of exogenous estrogens in other cancer was demonstrated in experimental models, and since the metabolite products in estrogen biosynthesis are semiquinones and quinines (49), we speculate that this high association found in the Brazilian series of early infancy acute leukemia could be explained by the same pathway as that of topo-II inhibition caused by metabolite products in estrogen metabolism. On a hopeful note, a recently reported study demonstrated that maternal consumption of fresh vegetables and fruits during pregnancy was associated with a decreased risk of IAL (34).

Gene-environment interaction

Epidemiological and genetic studies support the contention that the *in utero* origin of *MLL* fusion genes in IAL is the result of

transplacental chemical exposures (quinone-based chemicals) (38,40). The probability of the secondary event arising within a short time would be enhanced if the genetic background conferred greater susceptibility of the individual to chemical damage. In this context, constitutive genetic vulnerability may not only act as a predisposing factor for the induction of *MLL* gene fusion but may also increase the risk of the occurrence of further mutations. For most leukemias, and also IALs, multiple genetic polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes may interact with environmental, dietary, maternal, and other factors to modulate the development of acute leukemia. For example, quinones, which have been shown to cleave both the *MLL* gene and its frequent fusion partner *AF4* at topo-II cleavage sites (50), may be poorly detoxified depending on the activity of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), an enzyme that detoxifies chemicals with quinone rings including benzene metabolites and flavonoids. The *NQO1* gene is subject to polymorphisms that generate an NQO1 protein with a significantly decreased enzymatic activity. Studies of Caucasian and Japanese patients have shown that the occurrence of alleles conferring low-activity variants of NQO1 was associated with an increased risk of IAL, especially with *MLL/AF4* fusion genes (51,52). Sirma et al. (53) demonstrated that in pediatric ALL without *MLL* rearrangements, the null genotype of the *NQO1* gene is not associated with the etiology of the disease. Recently, in a series of Italian IAL cases, contradictory results were obtained, with this polymorphism appearing to be associated with infant ALL without *MLL* rearrangements, but not with *MLL*-positive infants (54). In the Brazilian series, preliminary results also did not show a significant increased risk (OR = 1.10; 95%CI = 0.62-1.95) of developing leukemia with rearrangements of the *MLL* gene in those individuals with low-activity variants of the NQO1 enzyme (Amorim MR, Silva FA, Emerenciano M, Pombo-de-Oliveira MS, unpublished data).

Polymorphisms of folate-metabolizing enzymes have also been associated with the development of ALL. First, methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) 677C>T gene polymorphism has been linked to a decreased risk of pediatric ALL (55,56). This protective effect may be due to the greater availability of 5,10-methylenetetrahydrofolate and thymidine pools and to an increased fidelity of DNA synthesis. We recently demonstrated interesting effects of MTHFR 677C>T and 1298A>C polymorphisms in a Brazilian childhood series of cases including 62 infants. The results demonstrated a protective role of MTHFR 677C>T polymorphism, linked to a significant 2.18-fold decreased risk of developing ALL, whereas the 1298A>C polymorphism demonstrated a significant 2.01-fold increased risk for ALL in non-white children. It is possible that the opposite roles of 677C>T and 1298A>C polymorphisms in non-white children found in our study result from the different binding sites of MTHFR affected by the polymorphisms (57).

Another example is the inactivating polymorphisms of detoxifying enzymes involved in carcinogen metabolism, such as glutathione S-transferases (GST) that have been associated with the development of ALL (58). A similar study showed the possible role of GST gene polymorphisms in susceptibility to IAL, but the authors analyzed the genotypes of the diseased infants' parents. Surprisingly, they found that the deletion of both the *GSST1* and *GSTM1* genes in either parent might affect the risk of infant leukemia through a pathway independent of the *MLL* gene (59). To investigate whether these polymorphisms represent risk-modifying factors for childhood Brazilian ALL, a study was conducted involving 113 patients and 221 controls with similar ethnic backgrounds. The data revealed that carriers of the rare GSTP1 Val allele were at higher risk of ALL

(OR = 2.7; 95%CI = 1.1-6.8; P = 0.04) (60).

All of these findings need to be extended by larger studies with careful attention to ethnic and geographic diversity in the frequency of polymorphisms, and to socioeconomic status that directly influence the exposures and supplementation features.

Conclusions

Early childhood ALLs and AMLs consistently present *MLL* gene rearrangements, which, besides conferring an adverse outcome, have represented an important molecular diagnosis and monitoring marker, and have been of great importance to identify the unique molecular biological history of this disease. As reviewed here, many molecular features and environmental risk factors have been suggested to cooperate in the development of this malignancy. However, a combination of chances and interactions in the molecular-cellular differentiation pathways is necessary to produce the malignant phenotype. Therefore, continued molecular epidemiological studies are needed to better elucidate the biology of IAL, ultimately leading to an improvement in the present outcome situation.

Acknowledgments

Many of the results reviewed here were made available by the physicians of the Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia (BCSGIAL, see Appendix). The success of the BCSGIAL has depended on the help of many mothers who have given their time to contribute to the investigation. Therefore, we are very grateful to all involved.

References

1. Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui CH. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 2000; 96: 24-33.
2. Chessells JM, Eden OB, Bailey CC, Lilleyman JS, Richards SM. Acute lymphoblastic leukaemia in infancy: experience in MRC UKALL trials. Report from the Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. *Leukemia* 1994; 8: 1275-1279.
3. Ross JA, Davies SM, Potter JD, Robison LL. Epidemiology of childhood leukemia, with a focus on infants. *Epidemiol Rev* 1994; 16: 243-272.
4. Isaacs H Jr. Fetal and neonatal leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25: 348-361.
5. Magalhaes IQ, Splendore A, Emerenciano M, Figueiredo A, Ferrari I, Pombo-de-Oliveira MS. GATA1 mutations in acute leukemia in children with Down syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 166: 112-116.
6. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002; 30: 41-47.
7. Hu M, Krause D, Greaves M, Sharkis S, Dexter M, Heyworth C, et al. Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev* 1997; 11: 774-785.
8. Hotfilder M, Rottgers S, Rosemann A, Schrauder A, Schrappe M, Pieters R, et al. Leukemic stem cells in childhood high-risk ALL/t(9;22) and t(4;11) are present in primitive lymphoid-restricted CD34+. *Cancer Res* 2005; 65: 1442-1449.
9. Mendes WL, Coser VM, Ramos G, Pereira W, Lopes LF, de Oliveira MS. The apparent excess of acute promyelocytic leukemia in infant acute leukemias in Brazil. *Haematologica* 2004; 89: ELT16.
10. Emerenciano M, Agudelo Arias DP, Coser VM, de Brito GD, Macedo Silva ML, Pombo-de-Oliveira MS. Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 47: 549-554.
11. Meyer C, Schneider B, Jakob S, Strehl S, Attarbaschi A, Schnittger S, et al. The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 2006; 20: 777-784.
12. Pui CH, Kane JR, Crist WM. Biology and treatment of infant leukemias. *Leukemia* 1995; 9: 762-769.
13. Greaves MF. Infant leukaemia biology, aetiology and treatment. *Leukemia* 1996; 10: 372-377.
14. Stam RW, den Boer ML, Pieters R. Towards targeted therapy for infant acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2006; 132: 539-551.
15. Yu BD, Hanson RD, Hess JL, Horning SE, Korsmeyer SJ. MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 10632-10636.
16. Fidanza V, Melotti P, Yano T, Nakamura T, Bradley A, Canaani E, et al. Double knockout of the ALL-1 gene blocks hematopoietic differentiation *in vitro*. *Cancer Res* 1996; 56: 1179-1183.
17. Li ZY, Liu DP, Liang CC. New insight into the molecular mechanisms of MLL-associated leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 183-190.
18. Yano T, Nakamura T, Blechman J, Sorio C, Dang CV, Geiger B, et al. Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct

elements at the N terminus of the protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 7286-7291.
19. Daser A, Rabbitts TH. Extending the repertoire of the mixed-lineage leukemia gene MLL in leukemogenesis. *Genes Dev* 2004; 18: 965-974.
20. Broeker PL, Super HG, Thirman MJ, Pomykala H, Yonebayashi Y, Tanabe S, et al. Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in *de novo* acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites. *Blood* 1996; 87: 1912-1922.
21. Gu Y, Alder H, Nakamura T, Schichman SA, Prasad R, Canaani O, et al. Sequence analysis of the breakpoint cluster region in the ALL-1 gene involved in acute leukemia. *Cancer Res* 1994; 54: 2326-2330.
22. Ishii E, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Yoshida N, Oda M, Zaitsu M, et al. *In vitro* cleavage of the MLL gene by topoisomerase II inhibitor (etoposide) in normal cord and peripheral blood mononuclear cells. *Int J Hematol* 2002; 76: 74-79.
23. Strick R, Strissel PL, Borgers S, Smith SL, Rowley JD. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4790-4795.
24. Cimino G, Rapanotti MC, Biondi A, Elia L, Lo Coco F, Price C, et al. Infant acute leukemias show the same biased distribution of ALL1 gene breaks as topoisomerase II related secondary acute leukemias. *Cancer Res* 1997; 57: 2879-2883.
25. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* 1999; 354: 1499-1503.
26. Wiemels JL, Ford AM, Van Wering ER, Postma A, Greaves M. Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion *in utero*. *Blood* 1999; 94: 1057-1062.
27. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1535-1548.
28. Greaves MF. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukemia. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1941-1953.
29. Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Greaves M. Molecular pathogenesis of MLL-associated leukemias. *Int J Hematol* 2005; 82: 9-20.
30. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood* 2003; 102: 2321-2333.
31. Wasserman R, Galili N, Ito Y, Reichard BA, Shane S, Rovera G. Predominance of fetal type DJH joining in young children with B precursor lymphoblastic leukemia as evidence for an *in utero* transforming event. *J Exp Med* 1992; 176: 1577-1581.
32. Fasching K, Panzer S, Haas OA, Borkhardt A, Marschalek R, Griesinger F, et al. Presence of N regions in the clonotypic DJ rearrangements of the immunoglobulin heavy-chain genes indicates an exquisitely short latency in t(4;11)-positive infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001; 98: 2272-2274.
33. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002; 100: 1532-1542.
34. Spector LG, Xie Y, Robison LL, Heerema NA, Hilden JM, Lange B, et al. Maternal diet and infant leukemia: the DNA topoisomerase II inhibitor hypothesis: a report from the children's oncology group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 651-655.
35. Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB, et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 13950-13954.
36. Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1514-1521.
37. Andersen MK, Christiansen DH, Jensen BA, Ernst P, Hauge G, Pedersen-Bjergaard J. Therapy-related acute lymphoblastic leukaemia with MLL rearrangements following DNA topoisomerase II inhibitors, an increasing problem: report on two new cases and review of the literature since 1992. *Br J Haematol* 2001; 114: 539-543.
38. Ross JA. Maternal diet and infant leukemia: a role for DNA topoisomerase II inhibitors? *Int J Cancer Suppl* 1998; 11: 26-28.
39. Frantz CE, Chen H, Eastmond DA. Inhibition of human topoisomerase II *in vitro* by bioactive benzene metabolites. *Environ Health Perspect* 1996; 104 (Suppl 6): 1319-1323.
40. Alexander FE, Patheal SL, Biondi A, Brandalise S, Cabrera ME, Chan LC, et al. Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. *Cancer Res* 2001; 61: 2542-2546.
41. Hjalgrim LL, Rostgaard K, Hjalgrim H, Westergaard T, Thomassen H, Forestier E, et al. Birth weight and risk for childhood leukemia in Denmark, Sweden, Norway, and Iceland. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1549-1556.
42. Menegaux F, Steffen C, Bellec S, Baruchel A, Lescoeur B, Leverger G, et al. Maternal coffee and alcohol consumption during pregnancy, parental smoking and risk of childhood acute leukaemia. *Cancer Detect Prev* 2005; 29: 487-493.
43. Shu XO, Ross JA, Pendergrass TW, Reaman GH, Lampkin B, Robison LL. Parental alcohol consumption, cigarette smoking, and risk of infant leukemia: a Children's Cancer Group Study. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 24-31.
44. Wen W, Shu XO, Potter JD, Severson RK, Buckley JD, Reaman GH, et al. Parental medication use and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2002; 95: 1786-1794.
45. Pombo-de-Oliveira MS, Koifman S, Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia. Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 2336-2341.
46. Ross JA, Perentesis JP, Robison LL, Davies SM. Big babies and infant leukemia: a role for insulin-like growth factor-1? *Cancer Causes Control* 1996; 7: 553-559.
47. Yeazel MW, Buckley JD, Woods WG, Ruccione K, Robison LL. History of maternal fetal loss and increased risk of childhood acute leukemia at an early age. A report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 1995; 75: 1718-1727.
48. Ross JA, Potter JD, Shu XO, Reaman GH, Lampkin B, Robison LL. Evaluating the relationships among maternal reproductive history, birth characteristics, and infant leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Ann Epidemiol* 1997; 7: 172-179.
49. Cavalieri EL, Stack DE, Devanesan PD, Todorovic R, Dwivedy I, Higginbotham S, et al. Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 10937-10942.
50. Lovett BD, Lo Nigro L, Rappaport EF, Blair IA, Osheroff N, Zheng N, et al. Near-precise interchromosomal recombination and functional DNA topoisomerase II cleavage sites at MLL and AF-4 genomic breakpoints in treatment-related acute lymphoblastic leukemia with t(4;11) translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 9802-9807.
51. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ishii E, Knight D, Sadakane Y, Isoyama K, et al. The association of a distinctive allele of NAD(P)H: quinone oxidoreductase with pediatric acute lymphoblastic leukemias with MLL fusion genes in Japan. *Haematologica* 2005; 90: 1511-1515.
52. Wiemels JL, Pagnamenta A, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. A lack of a functional NAD(P)H:quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that

have MLL fusions. United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. *Cancer Res* 1999; 59: 4095-4099.
53. Sirma S, Agaoglu L, Yildiz I, Cayli D, Horgusluoglu E, Anak S, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 null genotype is not associated with pediatric *de novo* acute leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2004; 43: 568-570.
54. Lanciotti M, Dufour C, Corral L, Di Michele P, Pigullo S, De Rossi G, et al. Genetic polymorphism of NAD(P)H:quinone oxidoreductase is associated with an increased risk of infant acute lymphoblastic leukemia without MLL gene rearrangements. *Leukemia* 2005; 19: 214-216.
55. Franco RF, Simoes BP, Tone LG, Gabellini SM, Zago MA, Falcao RP. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 115: 616-618.
56. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 4004-4009.
57. Zanrosso CW, Hatagima A, Emerenciano M, Ramos F, Figueiredo A, Felix TM, et al. The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population. *Leuk Res* 2006; 30: 477-481.
58. Krajinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnett D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood* 1999; 93: 1496-1501.
59. Garte S, Taioli E, Crosti F, Sainati L, Barisone E, Luciani M, et al. Deletion of parental GST genes as a possible susceptibility factor in the etiology of infant leukemia. *Leuk Res* 2000; 24: 971-974.
60. Canalle R, Burim RV, Tone LG, Takahashi CS. Genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Environ Mol Mutagen* 2004; 43: 100-109.

Appendix

Members of the *Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia* (*BCSGIAL*)

Paulo Ivo C. Araújo[3], Dora Márcia Alencar[4], Silvia R. Brandalise[5], Eni Guimarães Carvalho[6], Virginia M. Coser[7], Imaruí Costa[7], José Carlos Córdoba[8], Mariana Emerenciano[1], Jane Dobbin[1], Maria Célia Moraes Guerra[3], Venâncio Gumes Lopes[4], Isis Q. Magalhães[8], Núbia Mendonça[4], Andrea Gadelha[9], Gilson Guedes[9], Sérgio Koifman[2], Flávia Pimenta[9], Vitória P. Pinheiro[5], Waldir Pereira[7], Maria S. Pombo-de-Oliveira[1], Gilberto Ramos[10], Terezinha J.M. Salles[11], Denise Bousfield da Silva[12], Marcelo P. Land[3], Elaine Sobral[3], Fernando Werneck[13], Carlos Scridelli[14], Luis Gonzaga Tone[14], Lincoln Vermondi[12], Luis Fernando Lopes[15], Wellington Mendes[15].

[1]Centro de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
[2]Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
[3]Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
[4]Sociedade de Oncologia da Bahia, Salvador, BA, Brazil
[5]Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Boldrini, Campinas, SP, Brazil
[6]Hospital Martagão Gesteira, Salvador, BA, Brazil
[7]Departamento de Hematologia, Universidade de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil
[8]Hospital de Apoio Brasília, Unidade de Onco-Hematologia Pediátrica, Brasília, DF, Brazil
[9]Hospital Napoleão Laureano, João Pessoa, PB, Brazil
[10]Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil
[11]Hospital Oswaldo Cruz, CEON, Recife, PE, Brazil
[12]Serviço de Oncologia, Hospital Joana de Gusmão, Florianópolis, SC, Brazil
[13]Departamento de Pediatria, Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
[14]Departamento de Pediatria, Hospital das Clínicas, Ribeirão Preto, SP, Brazil
[15]Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brazil

Leukemia & Lymphoma, December 2008; 49(12): 2291–2297

informa
healthcare

ORIGINAL ARTICLE: CLINICAL

Clinical relevance of *FLT3* gene abnormalities in Brazilian patients with infant leukemia

MARIANA EMERENCIANO[1], JULIANE MENEZES[1], MARINA LIPKIN VASQUEZ[2], ILANA ZALCBERG[2], LUIZ CLAUDIO SANTOS THULER[3], MARIA S. POMBO-DE-OLIVEIRA[1], & THE BRAZILIAN COLLABORATIVE STUDY GROUP OF INFANT ACUTE LEUKEMIA

[1]*Pediatric Hematology–Oncology Program, Research Center, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil,* [2]*Bone Marrow Transplantation Center (CEMO), Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil, and* [3]*Instituto Nacional de Câncer (INCA) and Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro, Brazil*

(Received 19 June 2008; accepted 18 September 2008)

Abstract

Infant leukemia (IL) is characterised by the presence of *MLL* rearrangements and a poor outcome. *FLT3* gene is consistently highly expressed in *MLL*+ patients. To correlate the clinical aspects of IL with *FLT3* sequence alterations, we have analysed 159 children included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia. *FLT3*-D835 mutations and *FLT3*-ITD were detected by PCR-RFLP assay and standard PCR amplification, respectively. Mean age at diagnosis was 11.3 months. Overall, 7.5% (ITDs $n=6$ and D835 $n=6$) of patients contained *FLT3* mutations. *FLT3* mutated cases exhibited significantly higher white blood cells (WBC) than wild-type patients ($p=0.013$). Median overall survival time was 9.2 months (SE 3.3, 95% CI 2.8–15.6). Variables with significant poorer outcomes were age <6 months ($p=0.0043$), *MLL*+ ($p=0.0292$), AML subtype ($p=0.0008$), high WBC ($p=0.0179$) and *FLT3*-D835 mutation ($p=0.042$). The concomitant presence of *FLT3* and *MLL* abnormalities displayed the worst survival ($p=0.0032$). Cox regression analysis, with survival as endpoint, showed that leukemia subtype and WBC were independent prognostic factors. Although *FLT3* mutations were not a frequent genetic abnormality in this cohort, they might be prognostically important in IL, but this will need to be confirmed in the analyses of larger patient cohorts.

Keywords: *Acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, FLT3, hyperdiploid, infant acute leukemia, MLL*

Introduction

Infant leukemia (IL) is a rare disease, characterised by a pro-B (CD 10 negative) immunophenotype, a high frequency of *MLL* gene rearrangements and a remarkably poorer outcome when compared with older children [1]. Although translocations involving the *MLL* (or *ALL1*) gene on chromosome band 11q23 are very frequent (more than 80%) in IL, they are rarely present in non-infant acute leukemia (about 5%) [2]. The presence of *MLL* rearrangements is an independent prognostic factor for an adverse outcome [3,4]. Hence, the prognosis for infant acute lymphoblastic leukemia (ALL) is exceedingly poor [5–7] whereas the prognostic factors that define infant acute myeloid leukemia (AML) are not clearly defined [8,9].

Several studies have demonstrated that, based on the gene expression profile, the presence of *MLL* rearrangements specifies a unique type of leukemia. These studies showed, for example, *FLT3* as one of the genes most consistently highly expressed in patients with *MLL*+ [10,11]. FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) is a receptor tyrosine kinase (TK) with strong sequence similarities with other members of the class III receptor TK family. FLT3 is

Correspondence: Maria S. Pombo-de-Oliveira, MD, PhD, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti, 37 Rio de Janeiro-RJ 20231-050, Brazil. Tel: +55-21-3233-1324. Fax: +55-21-3233-1470. E-mail: mpombo@inca.gov.br

ISSN 1042-8194 print/ISSN 1029-2403 online © 2008 Informa Healthcare USA, Inc.
DOI: 10.1080/10428190802491698

expressed in various human cell lines of both myeloid and lymphoid lineage, and is known to be important for the development of hematopoietic stem cells [12]. Internal tandem duplications (ITD), length polymorphisms of the juxtamembrane domain of *FLT3* gene, result in constitutive TK activation, and have been first reported in patients with AML [13,14]. Point mutations in the activation loop of the second *FLT3* TK domain also induce its constitutive phosphorylation leading to a strong proliferative activity in hematopoietic cells, and are frequently involved in the genesis of leukemia [12,15].

The reported frequencies of *FLT3*-ITDs and *FLT3*-D835/I836 mutations varied widely according to AML and ALL, and *FLT3*-ITD is recognised as a prognostic factor in previous studies [16–20]. The frequency of *FLT3*-ITD appears to be very rare in IL [21]. In pediatric ALL, the occurrence of activating *FLT3* mutations seemed to be associated with *MLL*+ and hyperdiploid cases. Armstrong et al. [22,23] found ~16% (5 out of 30) of *MLL*+ and 25% (6 out of 25) of hyperdiploid ALL samples to possess activating mutations in the *FLT3* activation loop region. Taketani et al. [24] found that 18.2% (8 out of 44) of *MLL*+ infants and 21.5% (4 out of 19) of children with hyperdiploid possess *FLT3*-D835/I836 mutations. More recently, however, Stam RW et al. [25] after screening of the entire *FLT3* coding region provided data demonstrating that either *MLL*+ or hyperdiploid ALL children mostly carry wild-type (WT) *FLT3* genes, even though a small minority of samples carried a genetic alteration.

To evaluate the biological markers and in particularly the status of *FLT3* in IL, we have analysed specimens from 159 children included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia (BCSGIAL).

Materials and methods

Patient samples

Bone marrow (BM) aspirates from 159 children with acute leukemia (ALL or AML) from different regions of Brazil were analysed, before any treatment, as part of an epidemiological study of IL. The preliminary analyses with inclusion and exclusion criteria were described elsewhere [26]. A written consent was obtained for molecular analysis, and cases with previous history of myelodysplasia and Down syndrome were excluded. Peripheral blood (PB) cells from 20 non-leukemic controls were also included in the analysis. The biological characterisation with diagnostic classification and the *MLL* gene status were also described previously [27].

Treatment

Because the therapeutic regimens for acute leukemia treatment are still heterogeneous in different regions of Brazil, the majority of cases included in the BCSGIAL were treated according to adapted protocols from Berlin-Frankfurt-Munich and Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil study groups. Therefore, it was not possible to evaluate the biomarker according to each treatment protocol strategy.

Detection of FLT3-D835 point mutations

Genomic DNA was extracted from BM aspirate or PB leukemic cells after standard protocol [28]. *FLT3*-D835 mutations were detected by restriction fragment polymorphism-mediated polymerase chain reaction (PCR) assay, using primers previously reported [20]. PCR reactions for the amplification of *FLT3* exon 17 were run in a thermal cycler (PCR-System 9700 Gene Amp®, Applied Biosystems, EUA), as follows: 95°C for 7 min for initial melting, 35 cycles of 94°C for 30 s, 61°C for 30 s, 72°C for 45 s and final extension of 72°C for 10 min. After amplification, PCR products were digested using *EcoRV* enzyme at 37°C. PCR products were then separated by electrophoresis in agarose gels stained with ethidium bromide.

Screening of FLT3-ITDs

The *FLT3*-ITD was examined by the amplification of the JM domain in exons 11 and 12. Genomic DNA was purified using the same standard procedure [28]. Standard PCR DNA amplification was performed to detect *FLT3*-ITD using primers previously described [13]. The following cycle conditions were used: 95°C for 45 s, 56°C for 30 s and 72°C for 30 s for 35 cycles, followed by electrophoresis in 3% agarose gel stained with ethidium bromide.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the statistical Software SPSS Version 13.0 (SPSS, Chicago, IL, 2004). Analysis of the total study population was followed by relevant subset analysis. Univariate p values were calculated using Mann–Whitney test, Pearson chi-square test or Fisher exact test, when indicated. Two-sided p values with a significance limit of 0.05 were used throughout the study. The probability of overall survival (OS) was determined using the Kaplan–Meier method. A Cox proportional hazards model was applied for multivariate analyses using significant predictors from univariate tests.

Patients lost to follow-up were censored at their date of last known contact.

Results

In total, 159 samples (108 ALL, 48 AML and 3 Bi-AL) were screened for the presence of *FLT3* gene D835 and ITD mutations. Mean age at diagnosis in this study was 11.3 (SD = 6.46) months. Although different ALL and AML subtypes were included, there was a predominance of children younger than 13 months, with high white blood cell (WBC) counts, pro-B immunophenotypes and *MLL*+. Among AML, M4 and M5 phenotypes were responsible for 42% of cases followed by M7. There was no case with diagnosis of AML-M3 subtype. Other than *MLL*, chromosomal and genetic alterations included hyperdiploid ($n = 9$), *ETV6/RUNX1* ($n = 4$), *E2A/PBX1* ($n = 3$) (Table I).

Overall, 7.5% of patients contained *FLT3* abnormalities. No mutations were found in non-leukemic children. Among *MLL*+ patients, *FLT3* sequence alterations were present in 6% of them. Four point mutations in the *FLT3* activation loop were found amongst *MLL*+ infants, representing 5% of the cases, whereas two mutations were detected in germline *MLL* cases. After screening all cases, six *FLT3*-ITDs were identified (Table II). *MLL* rearrangement was found in only one of these patients, who presented high WBC count and AML-M5 subtype. In another patient, diagnosed with common-ALL, hyperdiploid has been detected besides the *FLT3*-ITD. Ages from patients who presented any type of *FLT3* alteration varied from 1 to 22 months, and most of them presented high WBC counts and blast cell percentage. No significant statistical difference was observed with respect to gender (five males and seven females).

Table III shows the main characteristics of patients harbouring *FLT3* mutations. Basic demographic data for the *FLT3* mutated patients did not differ from the rest of the patients. For example, patients with *FLT3* abnormalities were not significantly younger than those without *FLT3* abnormalities, the mean ages of mutated and WT cases were 10.94 and 12.08 months, respectively ($p = 0.572$). In contrast, *FLT3* mutated cases exhibited significantly higher WBC counts than WT patients ($p = 0.047$).

Median follow-up time from diagnosis was 6.3 (range 1–120) months. Of the 159 patients analysed in this study, 61 were alive (38.4%) and 98 died (61.6%). Median OS time was 9.2 months (SE 3.3, 95% CI 2.8–15.6). Variables with significant poorer outcomes on univariate analysis were age at diagnosis < 12 months ($p = 0.0043$), *MLL* rearrangement ($p = 0.0292$), AML subtype ($p = 0.0008$), high WBC count ($p = 0.0179$) and *FLT3*-D835 mutation ($p = 0.042$) (Figure 1). A stratified analysis of *FLT3*-D835 mutation in patients with AML showed that the median survival time was higher among WT patients with SE 3.9 months, 95% CI, (0.7–7.1), whereas patients with mutation were SE 0.2 months ($p = 0.0248$). However, this difference was not sustained in a multivariate analysis when adjusting by WBC count, *MLL* and age at diagnosis.

As expected, the presence of *MLL* rearrangements in children younger than 12 months ($p = 0.0243$) and

Table I. Clinical and laboratorial characterisation.

Variable	*n* (%)
Acute leukemia subtype	
ALL	108 (67.9)
AML	48 (30.1)
Bi-AL	3 (2)
Age (months)	
0–12	95 (59.7)
13–24	64 (40.3)
Sex	
Male	86 (54.1)
Female	73 (45.9)
WBC ($\times 10^9$/L)	
<50.0	72 (45.3)
≥50.0	87 (54.7)
ALL subtypes	
Pro-B	51 (47.2)
c-ALL	42 (38.9)
Pre-B	6 (5.6)
Pro-T	9 (8.3)
MLL status*	
Rearranged	82 (54.3)
Germline	69 (45.7)
Other acquired alteration	
Hyperdiploid	9 (47)
ETV6/RUNX1	4 (21)
E2A/PBX1	3 (16)
SIL/TAL1	1 (5.3)
CBFB/MYH11	1 (5.3)
AML1/ETO	1 (5.3)

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; Bi-AL, biphenotypic acute leukemia; WBC, white blood cell count; c-ALL, common ALL (CD10+).
**MLL* status could not be accessed in eight cases.

Table II. Association between *FLT3* and *MLL* genes molecular features.

	FLT3 wild-type	*FLT3*-D835	*p*	*FLT3*-ITD	*p*
MLL germline	67 (46.2)	2 (33.3)		5 (83.3)	
MLL rearranged	78 (53.8)	4 (66.7)	0.688	1 (16.7)	0.093
Total	145	6		6	

ITD, internal tandem duplication.

Table III. Clinical features of patients with *FLT3* genetic alterations.

Patient	Age (months)	Sex	WBC ($\times 10^9$/L)	% Blasts	AL subtype	*FLT3* mutation	*MLL*
1	2	M	192.1	92	Pro-B	D835	R
2	12	F	80.1	80	M1	D835	R
3	5	F	155.1	95	Pro-B	D835	R*
4	21	F	107.1	90	M7	D835	R†
5	11	M	55.0	91	c-ALL	D835	GL
6	21	F	157.0	63	M1	D835	GL
7	17	F	354.1	94	M5	ITD (340 bp)	R
8	5	M	220.1	60	c-ALL	ITD (340 bp)	GL
9	1	F	58.7	35	Bi-AL	ITD (400 bp)	GL
10	22	M	380.1	96	Pró-T	ITD (400 bp)	GL§
11	15	F	4.4	28	AML	ITD (340 bp)	GL
12	14	M	75	83	c-ALL	ITD (340 bp)	GL¶

WBC, white blood cell count; AL, acute leukemia; c-ALL, common ALL (CD10+); Bi-AL, biphenotypic acute leukemia; R, rearranged; GL, germline.
*t(4;11)(q21;q23).
†t(11;19)(q23;p13.3).
§*SIL/TAL1*(+).
¶Hyperdiploid.

with high WBC count ($p = 0.0179$) presented statistically significant poorer OS. We then correlated the *FLT3* and *MLL* genes status to OS. As seen in Figure 1(F), there was a statistically significant difference between the groups ($p = 0.0032$), with the concomitant presence of *FLT3* abnormalities and *MLL* rearrangements displaying the worst survival.

Finally, Cox regression analysis, with survival as endpoint, showed that leukemia subtype and WBC count were independent prognostic factors (Table IV). In our cohort, a patient with AML was two times at higher death risk than those with ALL, and a WBC count higher than 50×10^9/L increased 60% this chance.

Discussion

In infant ALL, among other prognostic factors (very high WBC count, age at diagnosis younger than 6 months and a poor response to the prednisone prophase), the presence of *MLL* rearrangements is independently associated with inferior outcomes [7,8]. Although AML is significantly less frequent than ALL in childhood, it is significantly more deadly with only half as many children likely to be cured with standard therapy [18].

In this study, we characterised *FLT3* gene sequence alterations regarding its clinical significance, and focussing in ILs included in the BCSGIAL [26]. This is a unique study group not only because it comprises infants with ALL and AML but also because it is very representative of the Brazilian IL cases, free from any selection bias, as these cases are part of an epidemiological study [26]. The material analysed was not selected; however, the series of cases depended on the availability of biological material to perform the analysis of *FLT3* status.

Herein, the presence of *FLT3* mutations has been searched in a total of 159 patients, and mutations in the *FLT3* activation loop were found in 5% of the *MLL*+ cases. Thus, our results differ from the previous ones that reported a higher frequency [22,24], but on the other hand, similarly show that most of the mutations found were present in *MLL*+ samples. Previous literature on *FLT3* mutations found in pediatric ALL with hyperdiploid is discordant. Although the first reports have suggested a high frequency of children with *FLT3* mutated ALL and hyperdiploid [23,24], the most recent one showed that the majority of these patients carry WT *FLT3* genes [25]. Our results are in agreement with Stam et al., as we have found only one case mutated with hyperdiploid associated.

In AML, it is clear that the biology and prognostic impact of TK domain mutations differ from ITDs. Although the *FLT3*-ITDs are frequently found in AML [18,19,29], they are rarely observed in pediatric ALL [19,21]. Interestingly, among the six *FLT3*-ITDs found in the present study, one was detected in a pro-T and two were detected in B precursor CD10+ ALL without *MLL* rearrangements. Our study also confirms the previous results that *FLT3* mutations are rare in young AML patients.

Although neither the AL immunophenotypic subtype nor the age range were exclusively associated with *FLT3* mutations, *FLT3* mutated cases presented higher WBC, which is frequently reported as a poor prognostic factor in IL [7,8].

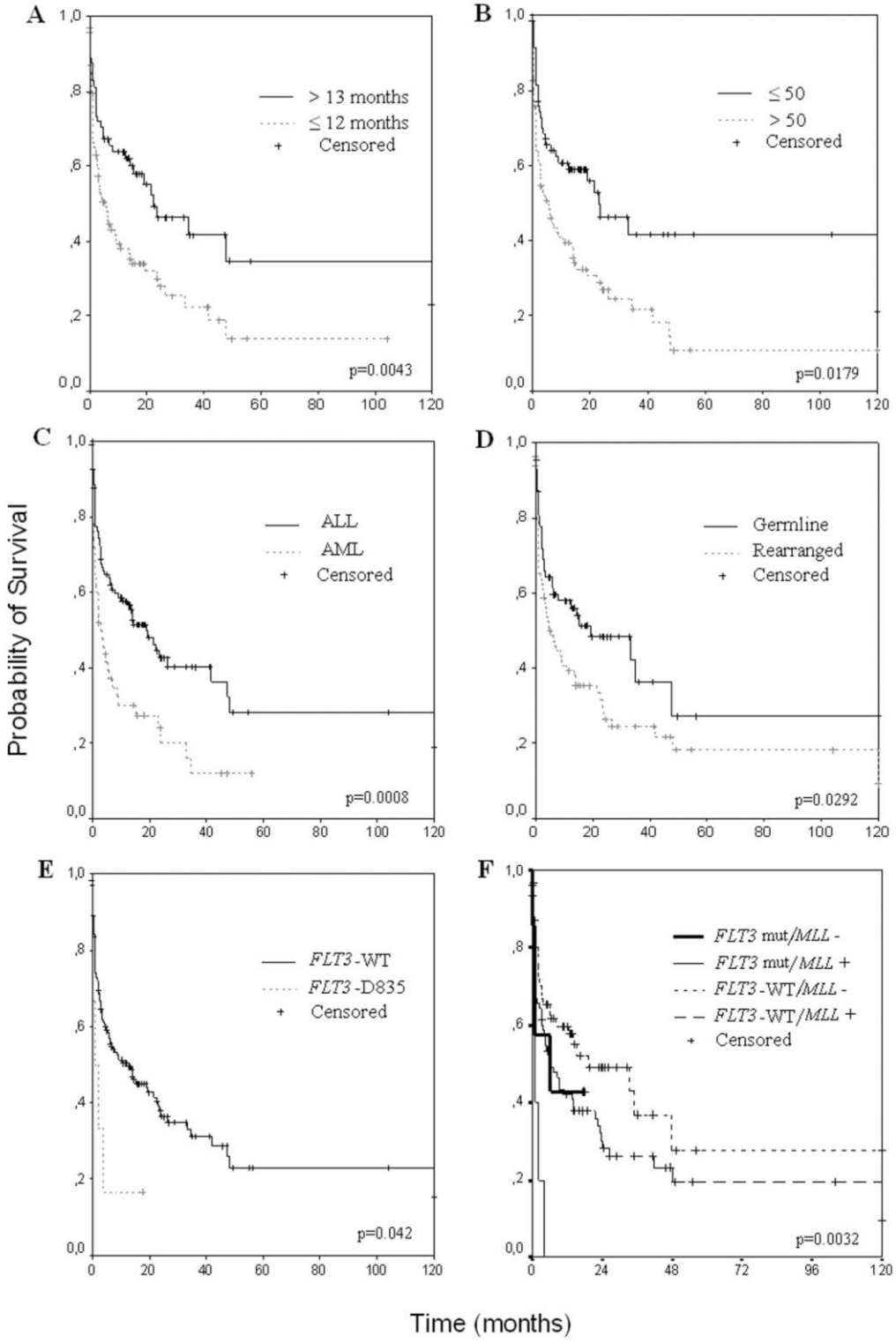

Figure 1. Outcomes by (A) age at diagnosis, (B) white blood cell count ($\times 10^9$ cells per litre at diagnosis), (C) leukemia subtype, (D) *MLL* status, (E) *FLT3*-D835, (F) *FLT3* and *MLL* status. ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; WT, wild-type; mut, mutated.

Table IV. Multivariate analysis of prognostic factors.

	Cox regression model	
	Estimated hazard ratio	*p*
Sex		
Male	1*	–
Female	1.302 (0.826–1.905)	0.282
Age at diagnosis (months)		
≤12	1*	–
>13	0.969 (0.935–1.005)	0.088
WBC count ($\times 10^9$/L)		
≤50.0	1*	–
>50.0	1.615 (1.006–2.591)	0.047
Subtype		
ALL	1*	–
AML	2.194 (1.401–3.436)	0.001
MLL		
Germline	1*	–
Rearranged	1.311 (0.956–2.108)	0.214
FLT3		
Wild-type	1*	–
Mutated	0.617 (0.296–1.287)	0.198

WBC, white blood cells count; ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia.
*Reference.

We found that the group with *FLT3* abnormalities and *MLL* rearrangements displayed a dismal OS, and that on univariate analysis, the *FLT3*-D835 but not *FLT3*-ITD was associated with poorer outcome. The *MLL* rearrangements have been shown to be a negative prognostic factor by several groups [3,4,7], whereas data on prognostic significance of *FLT3* mutations in pediatric AML [17,18] and ALL [24] leukemia are still to be clearly established, especially regarding infant cohorts.

Although *FLT3* mutations were not found to be an independent prognostic factor in this cohort, the results showed that *FLT3*-D835 might have a negative impact on survival, and that the co-occurrence of *FLT3* and *MLL* abnormalities confers an extremely high risk of treatment failure. Furthermore, *FLT3* gene mutations do not constitute a frequent genetic abnormality in *MLL*+ ILs. Then, it is very likely that the importance of *FLT3* in childhood, including IL, is associated to therapeutic aspects, as it is highly expressed and may be targeted through inhibitors [30].

The extremely poor survival observed in this series of IL cases raises serious concern. Certainly, the impact of these results will be the focus of future efforts. For instance, the changes in the pediatric oncology programme in Recife (province where the annual income is very low), with the use of uniform protocol-based therapy and prevention of toxicity side-effects, improved survival of ALL children [31]. Although childhood leukemia mortality has declined substantially in developed countries, the resource-poor areas are still moving slowly. We believe that the impact of social inequalities on mortality trends observed in childhood leukemia in Brazil [32] may reflect the mortality rates found herein. Higher decreases in mortality are accomplished with a systematic multidisciplinary approach in health care.

Acknowledgments

This work was supported in part by a grant-in-aid from the CNPq (No. 309091/2007-1) and INCA-FAF/Swiss Bridge Foundation (No. 230150-4). M.E. has a FAPERJ scholarship (No. E-26/100.705/2008). Members of BCSGIAL included with authorship are: Dora Márcia Alencar, Jozina Aquino, Paulo Ivo C. Araújo, Silvia R. Brandalise, Lilian Burlemaqui, Eni Guimarães Carvalho, José Carlos Córdoba, Virginia Maria Coser, Imaruí Costa, Maria Lydia D'Andrea, Dolores Dorea, Andrea Gadelha, Gilson Guedes, Maria Célia Moraes Guerra, Monica Lankszner, Maria Lúcia M. Lee, Isis Quezado Magalhães, Carmen M. Mendonça, Núbia Mendonça, Flávia Nogueira, Flávia Pimenta, Vitória P. Pinheiro, Gilberto Ramos, Terezinha J. M. Salles, E. Sobral, José Andrea Yunes, Fernando Werneck.

References

1. Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui CH. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. Blood 2000;96:24–33.
2. Pui CH, Chessells JM, Camitta B, Baruchel A, Biondi A, Boyett JM, et al. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. Leukemia 2003;17:700–706.
3. Cimino G, Rapanotti MC, Rivolta A, Lo CF, D'Arcangelo E, Rondelli R, et al. Prognostic relevance of ALL-1 gene rearrangement in infant acute leukemias. Leukemia 1995;9:391–395.
4. Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, Chessells JM, Baruchel A, Kamps W, et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. Lancet 2002;359:1909–1915.
5. Biondi A, Rizzari C, Valsecchi MG, de LP, Arico M, Basso G, et al. Role of treatment intensification in infants with acute lymphoblastic leukemia: results of two consecutive AIEOP studies. Haematologica 2006;91:534–537.
6. Chessells JM, Harrison CJ, Watson SL, Vora AJ, Richards SM. Treatment of infants with lymphoblastic leukaemia: results of the UK Infant Protocols 1987–1999. Br J Haematol 2002;117:306–314.
7. Pieters R, Schrappe M, de LP, Hann I, De RG, Felice M, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. Lancet 2007;370:240–250.

8. Pui CH, Ribeiro RC, Campana D, Raimondi SC, Hancock ML, Behm FG, et al. Prognostic factors in the acute lymphoid and myeloid leukemias of infants. Leukemia 1996;10:952–956.
9. Satake N, Maseki N, Nishiyama M, Kobayashi H, Sakurai M, Inaba H, et al. Chromosome abnormalities and MLL rearrangements in acute myeloid leukemia of infants. Leukemia 1999;13:1013–1017.
10. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. Nat Genet 2002;30:41–47.
11. Fine BM, Stanulla M, Schrappe M, Ho M, Viehmann S, Harbott J, et al. Gene expression patterns associated with recurrent chromosomal translocations in acute lymphoblastic leukemia. Blood 2004;103:1043–1049.
12. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood 2002;100:1532–1542.
13. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. Leukemia 1996;10:1911–1918.
14. Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. Leukemia 1998;12: 1333–1337.
15. Scheijen B, Griffin JD. Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. Oncogene 2002; 21:3314–3333.
16. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2001;113:983–988.
17. Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL, Zwaan M, Zimmerman M, Reinhardt D, et al. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. Blood 2006;108:3654–3661.
18. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Blood 2002;99:4326–4335.
19. Xu F, Taki T, Yang HW, Hanada R, Hongo T, Ohnishi H, et al. Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. Br J Haematol 1999;105:155–162.
20. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood 2001;97:2434–2439.
21. Xu F, Taki T, Eguchi M, Kamada N, Ishii E, Endo M, et al. Tandem duplication of the FLT3 gene is infrequent in infant acute leukemia. Japan Infant Leukemia Study Group. Leukemia 2000;14:945–947.
22. Armstrong SA, Kung AL, Mabon ME, Silverman LB, Stam RW, den Boer ML, et al. Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. Cancer Cell 2003;3:173–183.
23. Armstrong SA, Mabon ME, Silverman LB, Li A, Gribben JG, Fox EA, et al. FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2004;103: 3544–3546.
24. Taketani T, Taki T, Sugita K, Furuichi Y, Ishii E, Hanada R, et al. FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. Blood 2004;103:1085–1088.
25. Stam RW, den Boer ML, Schneider P, Meier M, Beverloo HB, Pieters R. D-HPLC analysis of the entire FLT3 gene in MLL rearranged and hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 2007;92: 1565–1568.
26. Pombo-de-Oliveira MS, Koifman S. Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15:2336–2341.
27. Emerenciano M, Agudelo Arias DP, Coser VM, Brito GD, Macedo Silva ML, Pombo-de-Oliveira MS. Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia. Pediatr Blood Cancer 2006;47:549–554.
28. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988;16:1215.
29. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. Blood 2002;100:59–66.
30. Stam RW, den Boer ML, Schneider P, Nollau P, Horstmann M, Beverloo HB, et al. Targeting FLT3 in primary MLL-gene-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. Blood 2005;106:2484–2490.
31. Howard SC, Pedrosa M, Lins M, Pedrosa A, Pui CH, Ribeiro RC, et al. Establishment of a pediatric oncology program and outcomes of childhood acute lymphoblastic leukemia in a resource-poor area. JAMA 2004;26:2471–2475.
32. Ribeiro KB, Lopes LF, de Camargo B. Trends in childhood leukemia mortality in Brazil and correlation with social inequalities. Cancer 2007;110:1823–1831.

Copyright of Leukemia & Lymphoma is the property of Taylor & Francis Ltd and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

British Journal of Cancer (2008) 98, 664–667
© 2008 Cancer Research UK All rights reserved 0007–0920/08 $30.00
www.bjcancer.com

High birth weight as an important risk factor for infant leukemia

S Koifman[1], MS Pombo-de-Oliveira*[,2] and The Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia[3]

[1]National School of Public Health/FIOCRUZ, Rua Leopoldo Bulhões, 1480, Rio de Janeiro, RJ 21041-210, Brazil; [2]Divisão de Medicina Experimental, Centro de Pesquisa – Instituto Nacional De Câncer, Rio de Janeiro, Rua André Cavalcanti, 37, CEP, Rio de Janeiro, RJ 20231-050, Brazil

In this paper, we compared the birth weight distribution among 201 infant leukaemia (IL) cases with that of 440 noncancer controls enrolled in Brazil in 1999–2005. Compared with the general population and the stratum 2500–2999 g as reference, IL cases weighing 3000–3999 g presented an odds ratio (OR) of 1.68 (95% CI: 1.03–2.76), and those of 4000 g or more, an OR of 2.28 (95% CI: 1.08–4.75), $P_{trend} < 0.01$. Using hospital-based controls, the OR for 4000 g or more, compared to 2500–2999 g, was 1.30 (95% CI: 1.02–1.43) after adjusting for confounders (gender, income, maternal age, pesticide and hormonal exposure during pregnancy). The results suggest that high birth weight is associated with increased risk of IL.
British Journal of Cancer (2008) **98,** 664–667. doi:10.1038/sj.bjc.6604202 www.bjcancer.com
Published online 29 January 2008
© 2008 Cancer Research UK

Keywords: infant acute leukaemia; intrauterine factors; birth weight; *MLL* rearrangements

The positive association between birth weight and increased risk of childhood leukaemia has been reported in industrialised countries (Westergaard *et al*, 1997; Hjalgrim *et al*, 2003). Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) or acute myeloblastic leukaemia (AML) affecting infants (under 12 months), which have been little studied, often contain a chromosome break following the recombination of the *MLL* gene with other genes (Felix and Lange, 1999). It has been hypothesised that malignant clones, which will promote acute leukaemias in early infancy would result from maternal exposures to such environmental agents as dietary items and chemicals inhibitors of DNA topoisomerase II activity (Ross *et al*, 1996b; Alexander *et al*, 2001).

In a recent molecular case–control study in Brazil of infant leukaemia (IL) with *MLL* gene rearrangements, a strong and significant association between maternal use of hormones during pregnancy and IL was observed (Pombo-de-Oliveira *et al*, 2006). Also of relevance, oestriol, progesterone and prolactin measured during pregnancy are reported as positively associated with birth weight and cancer risk in offspring (Mucci *et al*, 2003; Nagata *et al*, 2006). We have therefore examined IL risk in relation to birth weight using an existing database constructed by the Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukaemia (BCSGIAL).

MATERIALS AND METHODS

The BCSGIAL is a cooperative study group in different states of Brazil running a hospital-based case–control study to evaluate associations with IL maternal exposures to environmental risk factors during pregnancy. Details regarding case definition, control selection, exclusion criteria and data collection have been published previously (Emerenciano *et al*, 2006; Pombo-de-Oliveira *et al*, 2006).

In this report, IL cases were included whenever birth weight data were available. Controls were children, matched for age strata and gender, with life-threatening conditions in the same hospitals as the cases, excluding malignancy. Data on birth weight were obtained from the health-care cards, regulated by the Brazilian National Health System.

Birth weight data from IL cases were either compared with hospital-based controls, or with population-based data relating to all births in the general population of Brazil in the year 2000, and consolidated by the Brazilian National Health System (Ministério da Saúde, 2007). We ascertained birth weight by gender, leukaemia type (ALL and AML) and *MLL* status. Crude and adjusted odds ratios (ORs), and their 95% confidence intervals, were ascertained for the birth weight strata (2500 g or less; 2500–2999 g; 3000–3499 g; 3500–3999 g; and 4000 g or more) adjusted for selected confounders (gender, income, maternal age, hormonal intake and pesticide exposure during pregnancy). The available national data on birth weight merged 3000–3499 g and 3500–3999 g strata, and this was followed with IL birth weight to allow the relevant comparisons. Statistical analyses were performed using unconditional logistic regression models, as described elsewhere (Pombo-de-Oliveira *et al*, 2006) and using the packages SSPS, version 13.5 (SPSS, Chicago, IL, USA). All collaborating institutions approved the BCSGIAL Study, and written consent was obtained for diagnostics procedures and for interviews with the mothers.

RESULTS

A total of 641 subjects, 201 cases (148 ALL and 53 AML) and 440 controls, stratified by age at diagnosis (0–12 *versus* 13–21 months), were enrolled in 1999–2005. The numbers of the main

Epidemiology

*Correspondence: Dr MS Pombo-de-Oliveira;
E-mail: mpombo@inca.gov.br
[3] Members and affiliations of the Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia (BCSGIAL) are listed in the appendix as co-authors.
Received 26 September 2007; revised 30 November 2007; accepted 2 January 2008; published online 29 January 2008

clinical and laboratory data were same as described previously (Emerenciano *et al*, 2006), but eight AML cases were excluded due to lack of birth weight records. Eight cases, which were misclassified in the previous report as biphenotypic leukaemia with aberrant phenotype, were then categorized as ALL in the present analysis.

Low birth weight (<2500 g) was found in 16 (8.0%) cases and in 74 (16.8%) controls. The comparison between IL and controls birth weight distributions showed that both ALL and AML weighed on average 3488 g at birth, compared with 3226 g among controls ($P=0.0002$); median birth weights were 3310 and 3226 g for ALL and AML, respectively. Children with ALL had slightly higher birth weights than AML, while male infants were slightly heavier than female infants. The birth weight for male IL infants was 3349.2 g (s.d. = 49.6), with 95% CI: 3250.9–3447.5; for female IL infants, the birth weight was 3262.8 g (s.d. = 48.8), 95% CI: 3166.0–3359.7. Further stratification by age revealed minimal differences between the strata before or after 12 months of age at diagnosis of IL (data not shown). It should, however, be remarked that *MLL* status in the current study was unknown for a larger proportion of children with low birth weight.

Data were stratified according to *MLL* gene status (positive, negative and unknown). Mean birth weight in MLL^{+ve} cases ($n=68$) was 3340 g (s.d. = 64.85), while in MLL^{-ve} cases ($n=80$), it was 3310 g (s.d. = 51.2); the medians were 3310 and 3300 g, respectively.

The magnitude of the association with birth weight IL was also explored in increasing weight strata (Tables 1 and 2). Compared to birth weights 2500–2999 g, higher weights showed increased ORs for either ALL or AML regardless of the control, population or being hospital-based. Compared with the general population, ALL cases weighing 3000–3999 g showed an OR of 1.68 (95% CI: 1.03–2.76), and those weighing 4000 g or more, an OR of 2.28(95% CI: 1.08–4.75, $P<0.01$, Table 1). The cases that were MLL^{+ve} showed a higher birth weight than MLL^{-ve} cases at ages 12–21 months, and an inverse relationship in the first year of life was observed (figures available online).

DISCUSSION

Despite the many studies on childhood leukaemia and birth weight, few have focused on IL exclusively (Ross *et al*, 1997; Yeazel *et al*, 1997), which is in spite of the value of risk factors specifying the age group and the childhood leukaemia subtypes (Ma *et al*, 2005). The main strength of our study is probably the almost complete ascertainment of IL in all Brazil except the North region, Amazon.

In a population-based cohort, a positive linear relation was reported between birth weight, and childhood ALL and AML (Paltiel *et al*, 2004; Mclaughlin *et al*, 2006), more marked in AML among infants (hazard ratio = 8.14, 95% CI: 1.8–38.9 at age 0–1 years), being particularly strong among female infants ($P=0.001$) (Paltiel *et al*, 2004). Among the variables included in this study, including maternal origin, socioeconomic status, birth weight of sibling higher than 3500 g and family size, only birth weight retained borderline significance (Paltiel *et al*, 2004). This association has been explored in the present study using different approaches, for IL ALL, AML and *MLL* status: according to a single weight cut-point, and also exploring the magnitude of association among subsequent birth weight strata. All approaches yielded results that suggested an association between high birth weight and IL.

In our study, low birth weight was more common among controls (16.8%) than IL cases (8.0%), which may have estimates of the magnitude of the association with birth weight (Figure 1). Comparisons with the general population were therefore important to control for bias in our hospital-based controls. In this connection, three different OR estimates with birth weight were obtained with the general population, providing unbiased estimates but without adjusting confounders, crude ORs using hospital controls and adjusted ORs using hospital controls.

Comparisons with the general population revealed an insignificantly increased trend in ORs between ALL and birth weight (Table 1) compared with children weighing 2500–2999 g at birth. Those weighing 3000–3999 g showed an OR of 1.69

Table 1 Birth weight distribution, ALL, AML, *MLL* status (1999–2005) and all births in Brazil (general population), 2000

Birth weight (in g)	General population (all births)	IL		ALL		AML		MLL^{+ve}		MLL^{-ve}	
		n	OR (95% CI)	*n*	OR (95% CI)	*n*	OR (95% CI)	*n*	OR (95% CI)	*n*	OR (95% CI)
<2500	243 835	16	1.52 (0.80–2.89)	11	1.50 (0.72–3.11)	5	1.59 (0.46–5.16)	6	1.56 (0.51–4.54)	3	0.61 (0.14–2.26)
2500–2999	696 925	30	1.00	21	1.00	9	1.00	11	1.00	14	1.00
3000–3999	2 036 925	143	1.63 (1.08–2.47)	103	1.68 (1.03–2.76)	39	1.48 (0.64–3.28)	43	1.34 (0.67–2.75)	58	1.42 (0.77–2.66)
>3999	189 476	13	1.59 (0.79–3.17)[a]	13	2.28 (1.08–4.75)[b]	0	—	8	2.68 (0.99–7.15)[c]	5	1.31 (0.41–3.89)[d]

ALL = acute lymphoblastic leukaemia; AML = acute myeloblastic leukaemia; CI = confidence interval; IL = infant leukaemia; OR = odds ratio. [a]χ^2 for trend = 4.60, $P=0.03$. [b]χ^2 for trend = 6.66, $P<0.01$. [c]χ^2 for trend = 3.56, $P=0.059$. [d]χ^2 for trend = 0.91, $P=0.34$.

Table 2 Birth weight distribution by weight strata, IL and hospital-based controls, Brazil, 1999–2005

Birth weight (in g)	Hospital-based controls	All IL			ALL			AML		
		n	Crude OR (95% CI)	Adjusted[a] OR (95% CI)	*n*	Crude OR (95% CI)	Adjusted[a] OR (95% CI)	*n*	Crude OR (95% CI)	Adjusted[a] OR (95% CI)
<2500	74	16	0.87 (0.42–1.79)	0.88 (0.41–1.86)	11	0.86 (0.36–1.99)	0.99 (0.41–2.42)	5	0.91 (0.25–3.12)	0.74 (0.21–2.55)
2500–2999	121	30	1.00	1.00	21	1.00	1.00	9	1.00	1.00
3000–3499	150	81	2.18 (1.31–3.63)	1.23 (1.04–1.46)	57	2.19 (1.18–2.93)	1.24 (1.02–1.50)	24	2.15 (0.91–5.20)	1.20 (0.91–1.58)
3500–3999	72	62	3.47 (1.00–6.08)	1.29 (1.12–1.48)	46	3.68 (1.96–6.96)	1.30 (1.11–1.52)	15	2.80 (1.08–7.36)	1.23 (0.98–1.55)[b]
>3999	23	13	2.28 (0.96–5.37)	1.20 (1.02–1.43)[c]	13	3.26 (1.32–8.01)	1.31 (1.09–1.57)[d]	—		

ALL = acute lymphoblastic leukaemia; AML = acute myeloblastic leukaemia; CI = confidence interval; IL = infant leukaemia; OR = odds ratio. [a]Adjusted for sex, income, maternal age, pesticide exposure and hormonal intake during pregnancy. [b]χ^2 for trend = 5.51, $P=0.018$. [c]χ^2 for trend = 16.70, $P=0.00004$. [d]χ^2 for trend = 18.14, $P=0.00002$.

Epidemiology

© 2008 Cancer Research UK

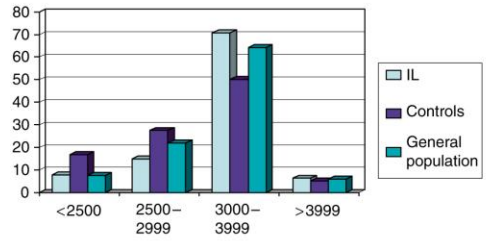

Figure 1 Birth weights (in g) strata distribution, IL cases, controls and the general population, Brazil.

(95% CI: 1.03–2.76), and those born with 4000 g or more, an OR of 2.28 (95% CI: 1.08–4.75), suggesting a dose–response effect ($P<0.01$). A quite similar trend with a borderline statistical significance was also observed for MLL^{+ve} cases (Table 1; $P=0.059$).

Birth weight strata of hospital controls suggested a dose–response effect for IL, and also for ALL and AML subtypes after adjusting for certain confounders. For AML, discordant results have been reported with birth weight (Ross *et al*, 1997; Westergaard *et al*, 1997; Yeazel *et al*, 1997; Hjalgrim *et al*, 2003). Despite no AML infants weighed more than 4000 g, suggestive dose–response trend was indeed observed.

With respect to the biological mechanisms underlying birth weight and IL development, one of the factor is hormone intake during pregnancy to induce abortion to the index pregnancy (Ou *et al*, 2002). In a previous report, we observed a high association between hormone intake during pregnancy and IL with an OR of 8.76, 95% CI: 2.85–26.93 (Pombo-de-Oliveira *et al*, 2006). Women used oral contraceptive pills in the belief that they caused miscarriage, because abortion is illegal in Brazil. Although it could be hypothesised that the association with birth weight was partly due to such hormonal intake during the pregnancy, inducing an increase in birth weight.

Although our results seem to point to an independent effect of birth weight, it has been suggested that rather than birth weight *per se*, the accelerated growth during pregnancy is the main process leading to IL (Milne *et al*, 2007). On the other hand, the United Kingdom Childhood Cancer Study has reported that babies who developed leukaemia were heavier at birth (>4000 g, OR of 1.2, 95% CI: 1.0–1.4), as were their older siblings (>4000 g, OR of 1.4, 95% CI: 1.0–1.9) (Roman *et al*, 2005). Other mechanisms suggested for the association with birth weight include the supposition that IL is initiated by aberrant gene fusions, mainly with *MLL* rearrangements (Ross *et al*, 1996a; Alexander *et al*, 2001). Interactions between high birth weight, prenatal oestrogen exposure and leukaemia risks have also been suggested (Ross *et al*, 1996a; Baik *et al*, 2005; Ross, 2006).

An association has recently been reported between ALL and birth weight among MLL^{+ve} cases, but not among MLL^{-ve} ones (Spector *et al*, 2007). In our study, a similar pattern was observed, with a borderline linear trend suggestive of a causal relationship.

It has been suggested that insulin-like growth factor-1 (IGF-1) promotes a proliferative advantage to damaged cells (Ross *et al*, 1996a; Ross, 2006). The link between birth weight, steroid hormones in intrauterine life such as IGF-1 and cancer risk indicates that such hormones tend to increase the number of stem cells and, by extension, more proliferating immature cells are exposed to harmful events, and consequently become more susceptible to malignant transformation (Cavalieri *et al*, 1997; Boyne *et al*, 2003). Whether enhanced cell proliferation and genotoxic metabolites act jointly in an additive or synergistic fashion, resulting in expansion of clonal cells with gene fusion rearrangements, and clinical IL in high birth weight babies, warrants further investigation in experimental models.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq), Instituto Nacional de Câncer-Fundação Ary Frauzino and the Swiss Bridge Foundation no. 2301504. SK and MSPO have scholarships from CNPq, Grants no. 307645/2004-5 and no. 308532/2003-1, respectively.

Conflict of interest

All authors disclose no financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence this study.

REFERENCES

Alexander FE, Patheal AE, Sherry L, Biondi A, Brandalise S, Cabrera MH, Chan LC, Chen Z, Cimino G, Córdoba JC, Gu LG, Hussein H, Ishi E, Kamel AM, Labra S, Magalhães IQ, Mizutani S, Petridou E, Pombo-de-Oliveira M, Yveu P, Wiemels J, Greaves MF (2001) Transplacental chemical exposure and risk of infant leukaemia with *MLL* gene fusion. *Cancer Res* **61:** 2542–2546

Baik I, Devito WJ, Ballen K, Becker PS, Okulicz W, Liu Q, Delpapa E, Lagiou P, Sturgeon S, Trichopoulos D, Quesenberry PJ, Hsieh CC (2005) Association of foetal hormones levels life roots of human cancer. *Cancer Res* **65:** 358–363

Boyne MS, Thame M, Bennett FI, Osmond C, Mielli JP, Forrester TE (2003) The relationship among circulating insulin-like growth factor (IGF-1), IGF binding proteins-1 and -2, and birth anthropometry: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* **88:** 1687–1691

Cavalieri EL, Stack DE, Devanesan PD, Todorovic R, Dwivedy I, Higginbotham S, Johansson SL, Patil KD, Gross ML, Gooden JK, Ramanathan R, Cerny RL, Rogan EG (1997) Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumour initiators. *Proc Natl Acad Sci USA* **94:** 10937–10942

Emerenciano M, Arias DPA, Coser VM, Dantas G, Silva MLM, Pombo-de-Oliveira MS (2006) The molecular-cytogenetics findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia. *Pediatr Blood Cancer* **47:** 549–554

Felix CA, Lange BJ (1999) Leukemia in infants. *Oncologist* **4:** 225–240

Hjalgrim LL, Westergaard T, Rostgaard K, Schmiegelow K, Melbye M, Hjalgrim H, Engels EA (2003) Birth weight as a risk factor for childhood leukemia: a meta-analysis of 18 epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* **158:** 724–735

Ma X, Metayer C, Does MB, Buffler PA (2005) Maternal pregnancy loss, birth characteristics, and childhood leukemia. *Cancer Causes Control* **16:** 1075–1083

McLaughlin CC, Baptiste MS, Schymura MJ, Nasca PC, Zdeb MS (2006) Birth weight, maternal weight and childhood leukaemia. *Br J Cancer* **94:** 1738–1744

Milne E, Laurwick CL, Blair E, Bower C, de Klerk N (2007) Fetal growth and acute childhood leukemia: looking beyond birth weight. *Am J Epidemiol* **166:** 151–159

Ministério da Saúde (2007) DATASUS. http://www.datasus.gov.br

Mucci LA, Lagiou P, Tamimi RM, Hsieh CC, Adami HO, Trichopoulos D (2003) Pregnancy estriol, estradiol, progesterone and prolactin in relation to birth weight and other birth size variables. *Cancer Causes Control* **14:** 311–318

Nagata C, Iwasa S, Shiraki M, Shimizu H (2006) Estrogen and alpha-fetoprotein levels in maternal and umbilical cord blood samples in relation to birth weight. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15:** 1469–1472

Ou SX, Han D, Severson RK, Chen Z, Neglia JP, Reaman GH, Buckley JD, Robinson LL (2002) Birth characteristics, maternal reproductive history, hormone use during pregnancy, and risk of childhood acute childhood

Epidemiology

© 2008 Cancer Research UK

acute lymphocytic leukemia by immunophenotype (United States). *Cancer Causes Control* **13:** 15 – 25

Paltiel O, Harlap S, Deutsch L, Knaanie A, Massalha S, Tiram E, Barchana M, Friedlander Y (2004) Birth weight and other risk factors for acute leukemia in Jerusalém Perinatal Study cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13:** 1057 – 1064

Pombo-de-Oliveira MS, Koifman S, The Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia (2006) Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15:** 2336 – 2341

Roman E, Simpson J, Ansell P, Lightfoot T, Mitchell C, Eden TOB, on behalf of the UKCC study investigator (2005) Perinatal and reproductive factors: a report on haematological malignancies from UKCCS. *Eur J Cancer* **41:** 749 – 759

Ross JA (2006) High birthweight and cancer: evidence and implications. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15:** 1 – 2

Ross JA, Perentesis JP, Robison LL, Davies SM (1996a) Big babies and infant leukaemia a role for insulin-like growth factor-1. *Cancer Causes Control* **7:** 553 – 559

Ross JA, Potter JD, Reaman GH, Pendergrass TW, Robison LL (1996b) Maternal exposure to potential inhibitors of DNA topoisomerase II and infant leukemia (United States): a report from the Children's Cancer Group. *Cancer Causes Control* **7:** 581 – 590

Ross AJ, Potter JD, Shu XO, Reaman GH, Lampkin B, Robson LL (1997) Evaluating the relationships among maternal reproductive history, birth characteristics, and infant leukaemia: a report from the Children's Cancer group. *Ann Epidemiol* **7:** 172 – 179

Spector LG, Davies SM, Robinson LL, Hilden JM, Rosler M, Ross JA (2007) Birth characteristics, maternal reproductive history, and the risk of infant leukemia: a report from Children's Oncology Group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16:** 128 – 134

Westergaard T, Andersen PK, Pedersen JB, Olsen JH, Fresch M, Sorensen HT, Wohlfahrt J, Melbye M (1997) Birth characteristics, siblings' patterns, and acute leukaemia risk in childhood: a population-based cohort study. *J Natl Cancer Inst* **89:** 939 – 947

Yeazel MW, Ross JÁ, Buckley J, Woods WG, Ruccione K, Robison LL (1997) High birth weight and risk of specific childhood cancers: a report from the Children's Cancer Group. *J Pediatr* **131:** 671 – 677

APPENDIX

Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia

Paulo Ivo C Araújo[1], Jozina Aquino[2], Jose Andréa Yunes[3], Reinaldo Del Belo[4], Ricardo Bigni[4], Lilian Burlemaqui[2], Tereza Cristina Cardoso, Maurício Dumond[2], Fernando Augusto de Freitas[3], Eni Guimarães Carvalho[5], Virginia M Coser[6], Maria Célia Moraes Guerra[1], Maria Lucia Lee, Núbia Mendonça[2], Isis Q Magalhães[7], Flávia Pimenta[8], Gilberto Ramos[9], Terezinha JM Salles[10], Ednalva Leite[10], Carmen M Mendonça[11], Flávia Nogueira[2] and Fernando Werneck[12]

[1]Instituto de Pediátria e Puericultura Martagão Gesteira, UFRJ, Rio de Janeiro;

[2]Sociedade de Oncologia da Bahia, Salvador-Bahia;

[3]Centro Infantil de Investigações Hematológicas D Boldrini, Campinas, São Paulo;

[4]Centro de Pesquisa and Serviço de Hematologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro;

[5]Hospital Martagão Gesteira, Salvador-Bahia;

[6]Departamento de Hematologia, Universidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul;

[7]Hospital de Apoio Brasília, Unidade de Onco-Hematologia Pediátrica, Brasília, DF;

[8]Hospital Napoleão Laureano, João Pessoa, Paraiba;

[9]Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, UFMG, Belo Horizonte, MG;

[10]Hospital Oswaldo Cruz, CEON, Recife, Pernambuco;

[11]Serviço de Oncologia do Hospital Joana de Gusmão Florianópolis, Santa Catarina;

[12]Departamento de Pediatria, Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro

© 2008 Cancer Research UK

Blood Cells, Molecules, and Diseases 42 (2009) 121–125

Contents lists available at ScienceDirect

Blood Cells, Molecules, and Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybcmd

Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia

Maria S. Pombo de Oliveira [a,*], Sergio Koifman [b], Gisele M. Vasconcelos [a], Mariana Emerenciano [a], Cristiane de Oliveira Novaes [a,b]
Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia [1]

[a] Hematology–Oncology Pediatric Program, Research Center, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil
[b] National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Ministry of Health of Brazil, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Submitted 16 October 2008
Available online 7 December 2008

(Communicated by M. Lichtman, M.D., 18 October 2008)

Keywords:
Childhood leukemia
Genetic polymorphisms
Environmental risk factors
Transplacental exposure
Risk

ABSTRACT

In this concise report, we describe the history and evolution of childhood acute leukemia studies in Brazil, and the application if key biomarkers for clinical trials and epidemiological studies over the past 8 years. Highlights of each ongoing study are summarized. A Brazilian network integrating hospitals and scientific institutions from all country regions has been established. This organization is made possible through informatics and computer networking, and the standardization of pathological reviews including immunophenotyping and molecular characterization of childhood leukemias. The unique characteristics of the Brazilian population combined with a large clinical and epidemiologic framework for patient ascertainment has enabled large-scale epidemiological studies on childhood leukemia in Brazil.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Over the past three decades, great progress has been achieved in raising the cure rates of pediatric leukemia in several industrialized countries, along with incremental knowledge of the pathogenesis of the leukemias which are a group of diseases with common described subtypes. International data comparing the relative frequencies of the different subtypes of acute leukemia according to age strata, sex, ethnicity and social conditions, has demonstrated consistent differences observed in children living in different parts of the world [1,2]. These data seems to suggest that the risks of developing different diseases are due to the complex interaction of different environmental and/or lifestyle risk factors. Epidemiological studies have attempted to gain some understanding of the different rates by analyzing associations with genetic, infections and other environmental factors in an attempt to clarify the etiology of childhood leukemia [3].

Worldwide, a clear picture of the combined effects of environmental factors would be compromised by the effects of locally unstable data, incomplete or inadequate data ascertainment, random variation, economic factors, etc. In this scenario, little is known regarding the epidemiology and the distribution of biological markers of childhood leukemia in South America.

Until 1997, very few medical institutions in Brazil provided immunophenotyping, cytogenetic and/or molecular markers enabling appropriate oncological care to children with leukemia. The few well-equipped centers were located in the Southeast region of the country.

* Corresponding author. Instituto Nacional de Câncer, Centro de Pesquisa, Divisão de Medicina Experimental, Rua André Cavalcanti, 37; CEP: 20231-050-Rio de Janeiro, Brazil.
E-mail address: mpombo@inca.gov.br (M.S. Pombo de Oliveira).

[1] Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia. Dora Márcia Alencar[1], Alexandre Apa[2], Jozina Aquino[1], Alejandro Mauricio Arancibia[12], Flávia Nogueira Araújo[1], Paulo Ivo C Araújo[2], Rosania Maria Basegio[16], Silvia R. Brandalise[3], Lilian Burlemaqui[1], Eni Guimarães Carvalho[4], Synara No Seara Cordeiro[2], José Carlos Córdoba[5], Virginia M. Coser[6], Imaruí Costa[6], Maria Lydia D'Andrea[14], Tereza Cristina Cardoso Fonseca[17], Fernando Augusto de Freitas[3], Maria Célia Moraes Guerra[7], Mônica Lankszner[15], Maria Lucia de Marino Lee[8], Luis Fernando Lopes[10], Isis Q. Magalhães[5], Carmen M. Mendonça[10], Núbia Mendonça[1], Flávia Nogueira[1], Waldir Pereira[7], Vitória P. Pinheiro[5], Gilberto Ramos[11], Elisângela Ribeiro[13], Terezinha J M Salles[9], Elaine Sobral[7], Jose Andréa Yunes[5]. Affiliations: 1. Sociedade de Oncologia da Bahia, Salvador-Bahia; 2. Centro de Pesquisa e Serviço de Hematologia-Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro; 3. Centro Infantil de Investigações Hematológicas D. Boldrini, Campinas, São Paulo; 4. Hospital Martagão Gesteira, Salvador-Bahia; 5. Hospital de Apoio Brasília, Unidade de Onco-Hematologia Pediátrica, Brasília, DF; 6. Departamento de Hematologia, Universidade Federal de Santa Maria-Rio Grande do Sul; 7. Instituto de Pediátria e Puericultura Martagão Gesteira, UFRJ, Rio de Janeiro; 8. Instituto de Oncologia Pediátrica-GRAAC, São Paulo, São Paulo; 9. Hospital Oswaldo Cruz, CEON, Recife, Pernambuco; 10.Hospital de Câncer, AC Camargo, São Paulo, São Paulo; 11. Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina- UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais; 12. Hospital Santa Marcelina, São Paulo, São Paulo; 13. Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Hospital Araújo Jorge, Goiás, Goiânia; 14. Hospital Infantil Darcy Vargas, São Paulo, São Paulo; 15. Hospital Bom Jesus-ISPON, Ponta Grossa, Paraná; 16. Hospital Regional de Mato Grosso do Sul Rosa Pedrossian, Campo Grande, Mato Grosso do Sul; 17. Santa Casa de Misericordia- Hospital Manoel Novaes, Itabuna, Bahia.

1079-9796/$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bcmd.2008.10.012

The national public health system reorganized to allow uniform data collection and treatments, and to facilitate the study of the impact of malignancies within the pediatric population. A partnership between the Bank of Brazil Foundation and the Ministry of Health made possible a project proposal entitled *Programa Criança e Vida* [PCV-Child and Life Program]. The project was supported with a US*$8.5 million, 8 year grant from the Foundation. The first step of the PCV was to evaluate regional patient recruitments in order to set up a new center for pediatric oncological treatment. Three basic treatment tenants were established: (i) the recognition of neoplasia during childhood with better diagnostic procedures; (ii) universal adhesion to treatment protocols; and, (iii) extensive pediatric oncology training. Thirty-six health institutions were identified as care providers throughout the country, and case recruitment by medical centers in each region was evaluated. From this beginning, a portrait of the actual childhood leukemia distribution was established. Eight central reference laboratories in different regions of the country were equipped to perform immunophenotyping, cytogenetics, and molecular tests. Their location was rather chosen according to the geographical region of the country with deficit of these services. After 8 years, the PCV has brought a more specialized health care approach toward pediatric cancer in remote areas of the country, along with the gathering of professionals into a network of pediatric cancer studies. The challenge now is performing a meaningful analysis of data generated by this program to explore the complex interplay of different risk factors of childhood leukemia.

Establishment of a network linking patient ascertainment, diagnostic biomarkers, and epidemiological data analysis in Brazil

When the PCV was initiated in 1999, the incidence rates of childhood leukemia by age revealed some regional differences in Brazil. According to the population-based cancer registries, Goiania and São Paulo showed the highest rates for acute lymphoblastic leukemia (ALL) among males 0–4 years, respectively, 7.83 and 6.16/100,000, comparatively to Recife, with 2.47/100,000 (Table 1). The observed variability among women was lower for ALL in the same age strata, with incidence rates ranging from 4.99 in Belém, Amazon region and, to 2.19/100,000 in Campinas, São Paulo. On the other hand, acute myeloid leukemia (AML) incidence rates showed a higher homogeneity across the country for all age groups [4]. After the PCV was completely organized and functional, we proposed a multicenter large-scale project in order to explore the complex interaction of biological markers, life style and environment.

Specific meetings were called to address the involvement of clinical groups located in distinct regions of the country, the design of case-control studies, and the manipulation and collection of biological samples. Technical issues were discussed in a biannual meeting held for all members. Participating clinical groups were included according to their need for diagnostic procedures (i.e., their lack of internal infrastructure for biological analysis and accurate diagnosis), and centers that answered the initial call to join the study.

A computerized system was created with a common language to facilitate the interaction between epidemiology, clinical and molecular groups (http://imunomolecular.redecancer.org.br/). Queries within the system are initiated with the physician's reporting new patients, and allow their interaction until test results are released. The access to the examinations is controlled by institution level and was developed using a JAVA computer language and a PostGreSQL database.

The referring physicians provide demographic and clinical information through a direct data entry method. The information from a given hospital have unrestricted access to the tests of their own patients, pediatricians can see all tests performed including consolidated quantitative data regarding clinical morphology and immunomolecular results.

Data such as child's age, mother's name and age, skin color, sex, place of birth, genetic syndromes, white blood cell count, medication use, siblings with malignancies and other epidemiological information are also provided. Computer assistance personnel check all the information to guarantee data quality and efficiency of the biospecimen analysis. The collected samples vary according to clinical features of the sick children and the age range. In general, amounts of samples have been collected with enough biological material to allow the widest possible range of assays. Plasma samples and mononuclear pellet cells were stored either within −80 °C or−180 °C freezers. DNA, RNA and cDNA were prepared for current molecular tests and also for storage. The integrity of RNA and cDNA was examined by amplifying a fragment of the *GAPDH* constitutive gene. The standardized procedures how the samples would be collected, transported and processed for different tests were described in a manual book [5]. All steps from data collection, patient mothers' interview and laboratorial procedures have been evaluated and approved by the Ethics Committee of all Hospitals included. Consent Forms were obtained from mothers or relatives responsible for the enrolled children. The recruitment of patients for case-control studies began in the first semester of 2000 and should continue according to the requirements for different study analyses. Morphology, immunophenotying and molecular cytogenetics tests were standardized according to international criteria [6–9]. All patients' leukemia phenotypes were classified into different categories according to cell origin: B cell precursor ALL (BpALL) pro-B-cell, common B and pre-B ALL; B-ALL; T-ALL and acute myeloid leukemia (AML).

Current studies and preliminary results

Four multi-disciplinary projects have been running at the Hematology–Oncology Pediatric Program of Research Center-INCA :

Table 1
Incidence rates (per 100,000) of childhood leukemia by age, selected population-based cancer registries in Brazil, 1991–2000

Population-based cancer registry	0–4 years	5–9 years	10–14 years	15–18 years
ALL, male				
São Paulo (SE)	6.16	6.56	4.09	4.43
Campinas (SE)	4.18	3.90	0.00	1.49
Porto Alegre (S)	3.63	4.22	4.11	1.02
Recife (NE)	2.47	3.43	2.87	0.72
Brasília (W)	5.26	4.00	5.54	1.99
Goiania (W)	7.83	2.07	3.08	1.80
Belem (N)	4.79	3.01	1.60	2.55
ALL, female				
São Paulo (SE)	3.95	4.80	3.34	1.23
Campinas (SE)	2.18	1.51	0.00	0.40
Porto Alegre (S)	3.77	2.80	4.25	1.34
Recife (NE)	2.95	3.52	2.16	0.34
Brasília (W)	2.89	1.85	1.04	0.00
Goiania (W)	2.69	1.29	1.52	1.64
Belem (N)	4.99	3.05	2.54	1.33
AML, male				
São Paulo (SE)	1.48	1.41	0.86	2.91
Campinas (SE)	1.57	1.46	1.41	0.50
Porto Alegre (S)	0.40	0.77	1.03	1.02
Recife (NE)	0.41	0.00	1.08	0.00
Brasília (W)	0.35	1.09	2.42	2.66
Goiania (W)	0.87	0.83	1.16	2.15
Belem (N)	0.60	0.00	1.06	0.51
AML, female				
São Paulo (SE)	1.02	0.84	2.48	1.23
Campinas (SE)	1.09	2.02	0.96	0.00
Porto Alegre (S)	0.84	0.80	0.35	1.00
Recife (NE)	0.84	0.78	1.08	1.02
Brasília (W)	1.81	0.74	0.60	2.73
Goiania (W)	0.45	0.86	0.00	0.33
Belem (N)	0.00	1.22	0.51	0.89

Abbreviations: S – South Region; SE – Southeast Region; W–Western Region; N–North Region; NE – Northeast Region. Data reference: São Paulo, 1997–98; Campinas, 1991–95; Porto Alegre, 1993–97; Goiânia, 1996–98; Brasília, 1996–98; Recife (1995–98); Belém (1996–98); Source: Ministério da Saúde (2003).

Table 2
Diagnostic classification of samples from children according to morphology and immunophenotyping in two periods, Brazil 1990–2007

	Total		1990–1999		2000–2007	
	N	%	*N*	%	*N*	%
Cases without malignancies[a]	844	19.1	17	1.7	827	22.9
Pediatric malignancies other than acute leukemia[b]	373	5.0	41	4.1	332	9.2
Bp-ALL	1966	43.5	541	53.9	1425	39.4
T-ALL	402	9.1	137	13.7	265	7.3
AML	910	20.6	236	23.5	674	18.6
Inconclusive[c]	126	2.7	31	3.1	95	2.6
Total	4502	100.0	1003	100.0	3618	100.0

[a] Samples from children with clinical suspicion of malignancies, in which, the morphological and immunomolecular analysis excluded the diagnosis of acute leukemia or non-hematological tumors;
[b] Non-Hodgkin lymphoma, embryonic tumors, and chronic myeloid leukemia;
[c] Severe aplastic anemia, myelodysplasia, trombocytopenia, and/or lack of information.

(i) Immunophenotyping–genotyping study of acute childhood leukemia; (ii) Epidemiology and molecular studies of infant acute leukemia; (iii) Genetic polymorphisms of childhood leukemia (folate cycle); *GATA-1* mutations in Down syndrome children. Preliminary data of these projects are described as following:

Immunophenotyping–genotyping study of childhood acute leukemia

The main goals of this project were to evaluate whether the prevalence of distinct leukemia immunophenotypes and fusions genes/translocations would differ according to age, ethnicity (skin color), and regional distribution. Preliminary results demonstrated a great increase in the ascertainment rate and identification of childhood leukemias over time, with a profound improvement of diagnosis. The amount of biological samples sent for diagnosis increased 3-fold in 2000–2007 (n=3618), compared to 1990–1999 (n=1003) as shown in Table 2.

Immunophenotypic characterization was performed in 90.8% of samples. Among the ALLs, Bp-ALL and T-ALL were 58.7% and 12.1%, respectively, whereas AML represents 27.7% of the total series. The distribution of subtypes were similar in each region (Fig. 1). The excess of AML incidence reported in other series of Latino children [10,11] was also found in our study.

Seasonality was also analyzed, taking account of the frequency of newly diagnosed cases per month during the period of 2000–2007. There was no significant correlation between the two variables BpALL and T-ALL regarding seasonality for any Brazilian region, considered independently.

The comparisons of the demographic and epidemiology profiles of acute leukemia were hampered by the complexity of clinical diagnoses of local infectious diseases which can mimic some features of leukemia. A differential diagnosis among local parasitic disease is under evaluation. For instance, Kala-zar is a local infectious disease caused by *Leishmania chagasi*, an important medical problem mainly in the Northeast and Central plateau regions with 1.310–7.616 cases/year [12,13]. Children affected are usually under 6 years of age, with a predominance of boys. Clinically, they present splenomegaly and hematological alterations such as anemia, pancytopenia and increased abnormal lymphocytes. Diagnosis is carried out in bone marrow aspiration showing the presence of amastigotes forms in histiocytes and/or neutrophils [14].

The preliminary results of this study disclosed a particular feature of 2.4% of referred cases with unspecified imunophenotyping profile. These were predominantly children affected by Kala-zar, in which BM aspirations revealed a range of 25–35% of immature cells characterized by CD38/CD19/CD10+ by flow cytometry.

A particular topic under exploration on this childhood leukemia study is whether a possible role of Kala-zar or its treatment would be associated with mutation hits in the development of acute leukemia. A study to evaluate the distribution of lymphocyte subtypes sets with normal and aberrant markers is in development. The understanding on how local infectious diseases would promote lymphoid differentiation and proliferation toward acute leukemia is one of the future challenges. To evaluate the role of parasitic infections as a risk factor associated with acute leukemia should be explored with genomic signature analysis.

Epidemiology and molecular studies of infant acute leukemia

Infant acute leukemia (IAL) has a unique profile characterized by the high incidence of translocations involving *MLL* gene located at 11q23 region. Since June 1999 a non-population based registry was created with the following aims: *i*) to conduct an immunophenotypic and molecular study in children less than 2 years of age with acute leukemia, in order to determine the associations with selected risk factors in IAL; *ii*) to characterize chromosomal abnormalities and molecular markers in IAL. Leukemia genotypes were characterized by cytogenetics and molecular analysis with well-established techniques such as RT-PCR and FISH. In a preliminary evaluation of the dataset, a high prevalence of *MLL* rearrangements was found as expected; however, an unusually frequency of *TEL/AML1* (11 cases) was found amongst other chromosomal abnormalities [15]. Two rare cases of T-ALL with MLL^{+ve} were also found. The mean age of the IAL cases with *MLL* rearrangements was 14 months (range of 1 to 21 months). The effect of certain exposures during pregnancy and *MLL* rearrangements was tested, and interaction odds ratio for maternal exposure to dipyrone (OR 1.45, 95% CI 0.75–2.86), metronidazole (OR 1.72, 95% CI 0.64–4.58), quinolones (OR 2.25, 95% CI 0.70–25.70) and hormones (OR 1.88, 95% CI 0.50–7.01) were observed. A statistically significant association between maternal use of hormones during pregnancy, mainly oral contraceptives reported to be used aiming to induce

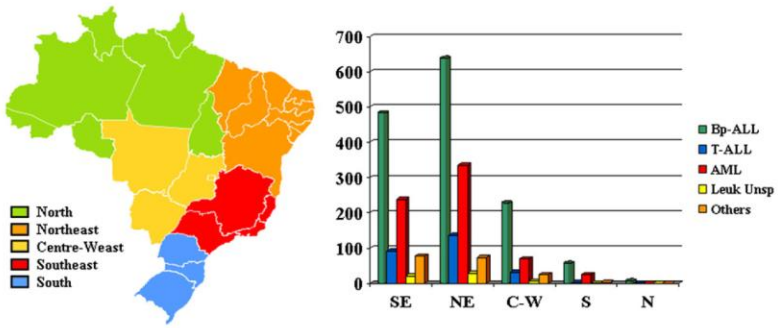

Fig. 1. Distribution of acute leukemia subtypes by different regions. Samples 2000–2007 (n=3618). Abbreviations: SE=Southeast; NE=Northeast; C-W=Central-west, S=South regions; BpALL=B precursor acute lymphoblastic leukemia, T-ALL=T-cell acute lymphoblastic leukemia, AML=acute myeloid leukemia.

abortion, and IAL was observed (OR=8.76, 95% CI 2.85–26.93). Despite the lack of statistical significance, the interaction between such maternal exposures should be re-tested in order to further evaluate the mechanisms of IAL development.

Another analysis was carried out with the same data to explore the role of birth weight, *MLL* status and IAL [16]. A dose response effect was either observed to MLL^+ or MLL^- cases comparatively to population-based and hospital-based controls. Comparisons with the general population using the stratum 2500–2999 g as reference, showed that children born 3000–3999 g presented an OR=1.68 (95% CI: 1.03–2.76) for ALL, and OR=2.28 (95% CI: 1.08–4.75) for those born 4000 g or more (p-trend<0.01). The authors' hypothesis is that the joint effect of enhanced cell proliferation and some genotoxic metabolites acting in an additive or synergistic fashion, would lead to expansion of clonal cells with gene fusion rearrangements resulting in IAL clinical phenotype in high birth weight babies.

Genetic polymorphisms associated with childhood leukemia (folate cycle)

The presence of polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene *MTHFR* has been linked to the pathogenesis of acute leukemia [17]. The rational for this is based in evidence that acute leukemias commonly arise as result of DNA damage and/or DNA translocations, and the polymorphism of (*MTHFR)* has been associated to reduce enzyme activity altering the distribution of cellular folate metabolite which are involved in DNA synthesis and integrity [18]. We used the polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism method to genotyping 176 children with ALL and 182 AML and 514 healthy individuals. There was no association between the 677C>T or 1298A>C and risk of ALL in total case-control sample. However, 677T allele was linked to a decreased risk of ALL [OR, 0.43; 95% CI, 0.22–0.86] whereas, the 1298A>C polymorphism presents an elevated risk factor [OR, 2.01; 95% CI, 1.01–3.99] in non-white children. In AML, the genotype 677 CT was also associated with decreased risk [OR, 0.37; IC 95%, 0.14–0.92], whereas 1298 AC genotype was linked with an increased risk [OR, 2.90; IC 95%, 1.26–6.71] in non-white children [19,20].

GATA-1 mutations in Down syndrome children

Infants with Down syndrome (DS) have a specific feature in acute leukemia characterized by a specific age range of onset of disease, and leukemia cell type origin. Children with DS have a 10- to 20-fold elevated risk of developing leukemia, particularly acute megakaryoblastic leukemia (AMKL), and a reversible form of megakaryoblastic disease known as transient leukemia (TL), considered a pre-leukemic condition [21,22]. Approximately 20% of TL patients will develop AMKL within 3 years. Somatic mutations in the X-linked *GATA1* gene are present in these hematological clonal disorders [23]. An epidemiological investigation was established in June 2004. The inclusion criteria were newborns with trisomy 21 (age 0–48 months) with or without TL and DS children with clinical and laboratory signs of acute leukemia (AL) and/or myelodysplasia (MDS), without previous treatment. A total of 127 samples were subjected to *GATA1* mutation screening. Of these, 75 were DS children with hematological disorders and 52 were DS without hematological didorders. The majority of *GATA1* alterations were found in exon 2 (1 in exon 3) and were found exclusively in AMKL (75%) and TL disorders (66%) [24].

Concluding remarks and future directions

The evaluation of childhood leukemia distribution in Brazil and its contributory mechanisms currently present a unique scenario. Both centralized immune-molecular characterization and epidemiological analysis of such datasets are carried out in a partnership basis with leadership at INCA, a national reference cancer center. This link between clinical reference laboratory with a distinct epidemiologic focus is unusual. The organization of this network was created with only clinical and academic purposes, rather than originating with an official vertical bureaucratic structure. This has resulted in a high degree of voluntary ascertainment with representative centers providing oncological care to childhood leukemia, and has created particular conditions favoring to explore the natural history of childhood leukemia in Brazil.

The Brazilian population demonstrates distinctive features because of its ethnic background, in the sense that an intense admixture process since colonial times has occurred, and still is in progress. Hence, from a molecular perspective, the wide variety of genetic mixing has produced an unusual situation seldom observed in a single population in other countries. Moreover, as a quite recently industrialized country, a wide diversity of environmental conditions has been observed. The intense income concentration within the last 30 years or more has intensified a massive migration from rural to urban areas. As a result, Brazil is now a country with an eminently urban population reaching around 80%. The industrialization process produced a wide range of new environment exposures, including several chemicals, metals, dietary patterns and other lifestyle changes. The vast enrollment of women in the labor force also produced a massive fecundity decline in the country, being one of the few known situations worldwide in which such a trend was produced without a nationally induced birth control program.

Nevertheless, the epidemiological transition linked to this "new environmental set", has been introduced without the complete replacement of the pre-industrialized conditions. In this sense, poor housing conditions for large parcels of population in the majority of big cities, including deficient sanitation and overcrowding, malnutrition, and unsatisfactory results obtained by vectors control programs, has allowed the persistence of the "ancient" pattern of epidemiological risk factors. Therefore, it either includes infectious agents usually unseen in industrialized countries, leading to high incidence rates of dengue fever and other viral related illnesses, visceral leishmaniasis, among others, to mention few examples of the diverse nosological framework observed in the country.

As a result, the current epidemiological pattern of the Brazilian population either includes diseases of affluence, usually observed in industrialized countries, or poverty, as seen in developing countries. According to cancer distribution, this overlapping pattern amongst the most common incident cancers has also been verified in Brazil [25], either including those tumors usually showing high incidence rates in affluent populations, such as breast and colon cancer, or those commonly observed in lower income populations, such as cervical, stomach and oral cancers.

To conclude, the substantial diversity of genetic and environmental conditions observed in the Brazilian population, including a recent massive population displacement within the country, changing family patterns including size and lifestyle profiles, new occupational and environmental exposures, among other changes, creates a special framework allowing the exploration of the natural history of cancer in general, and of childhood leukemia in particular.

Acknowledgments

We are grateful to our colleagues from different regions of Brazil for entering the project sending general and clinical data. This work was supported by the Instituto Nacional de Câncer, Fundação Ary Frauzino, Swiss Bridge Foundation, # 2301504; Bank of Brazil Foundation-*Programa Criança e Vida*; MSPO and SK are scholars supported by the Brazilian National Research Council (CNPq #55.0891/2001-3 and, # 308532/2003-1;); SK is partially supported by a research fellowship from Fogarty Foundation/Mount Sinai School of Medicine, New York, USA. This paper is based on a presentation at a Focused Workshop on "Immunity and Infection in the Etiology of Leukemia: A Workshop" sponsored by The Leukemia & Lymphoma Society and held in Sausalito, CA, Nov. 14–16, 2007.

References

[1] M.S. Linet, S.S. Devesa, Descriptive epidemiology of childhood leukemia, Br. J. Cancer 63 (1991) 424–429.
[2] M.F. Greaves, S.M. Colman, M.E. Beard, K. Bradstock, M.E. Cabrera, P.M. Chen', P. Jacobs, P.R. Lam-Po-Tang, L.G. MacDougall, C.K. Williams, Geographical distribution of acute lymphoblastic leukaemia subtypes: second report of the collaborative group study, Leukemia 7 (1993) 27–34.
[3] M. Belson, B. Kingsley, A. Holmes, Risk factors for acute leukemia in children: a review, Environ. Health Perspect. 115 (2007) 138–145.
[4] Ministério da Saúde, Câncer no Brasil: dados dos registros de câncer de base populacional, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2003.
[5] M.S. Pombo-de-Oliveira, Leucemias Agudas: Abordagem Imunomolecular no Diagnóstico e na Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer, MS, Rio de Janeiro, 2008.
[6] B.J. Bain, Leukemia Diagnosis, Blackwell Science, London, 1997.
[7] M.C. Bene, G. Castoldi, W. Knapp, W.D. Ludwig, E. Matutes, A. Orfao, M.B. van't Veer, Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL), Leukemia 9 (1995) 1783–1786.
[8] J.J. van Dongen, E.A. Macintyre, J.A. Gabert, E. Delabesse, V. Rossi, G. Saglio, E. Gottardi, A. Rambaldi, G. Dotti, F. Griesinger, A. Parreira, P. Gameiro, M.G. Diaz, M. Malec, A.W. Langerak, J.F. San Miguel, A. Biondi, Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia, Leukemia 13 (1999) 1901–1928.
[9] H. Gadner, G. Masera, M. Schrappe, T. Eden, Y. Benoit, C. Harrison, J. Nachman, C.H. Pui, The Eighth International Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Workshop ('Ponte di legno meeting') report: Vienna, Austria, April 27–28, 2005, Leukemia 20 (2006) 9–17.
[10] A. Biondi, A. Rovelli, A. Cantu-Rajnoldi, S. Fenu, G. Basso, A. Luciano, R. Rondelli, F. Mandelli, G. Masera, A.M. Testi, Acute promyelocytic leukemia in children: experience of the Italian Pediatric Hematology and Oncology Group (AIEOP), Leukemia 8 (1994) 1264–1268.
[11] G.J. Ruiz-Argüelles, J. Garcés-Eisele, V. Reyes-Núñez, J.D. Gómez-Rangel, G.J. Ruiz-Delgado, More on geographic hematology: the breakpoint cluster regions of the PML/RARalpha fusion gene in Mexican mestizo patients with promyelocytic leukemia are different from those in Caucasians, Leuk. Lymphoma 45 (2004) 1365–1368.
[12] S. Passos, L.P. Carvalho, G. Orge, S.M. Jeronimo, G. Bezerra, M. Soto, C. Alonso, E.M. Carvalho, Recombinant Leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis, Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12 (2005) 1164–1167.
[13] F. Dantas-Torres, S.P. Brandão-Filho, Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control, Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 48 (2006) 151–156.
[14] R.D. Pearson, S.A. Queiroz, Clinical spectrum of leishmaniasis, Clin. Infect. Dis. 22 (1996) 1–13.
[15] M. Emerenciano, D.P. Agudelo Arias, V.M. Coser, G.D. de Brito, M.L. Macedo Silva, M.S. Pombo-de-Oliveira, Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia, Pediatr. Blood Cancer 47 (2006) 549–554.
[16] S. Koifman, M.S. Pombo-de-Oliveira, High birth weight as an important risk factor for infant leukemia, Br. J. Cancer 98 (2008) 664–667.
[17] S.J. Duthie, S. Narayanan, G.M. Brand, L. Pirie, G. Grant, Impact of folate deficiency on DNA stability, J. Nutr. 132 (2002) 2444–2449.
[18] J.L. Wiemels, R.N. Smith, G.M. Taylor, O.B. Eden, F.E. Alexander, M.F. Greaves, Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 (2001) 4004–4009.
[19] F.J. da Costa Ramos, M.T. Cartaxo Muniz, V.C. Silva, M. Araújo, E.P. Leite, E.M. Freitas, C.W. Zanrosso, A. Hatagima, M.P. de Mello, J.A. Yunes, T.J. Marques-Salles, N. Santos, S.R. Brandalise, M.S. Pombo-de-Oliveira, Association between the MTHFR A1298C polymorphism and increased risk of acute myeloid leukemia in Brazilian children, Leuk. Lymphoma 47 (2006) 2070–2075.
[20] C.W. Zanrosso, A. Hatagima, M. Emerenciano, F. Ramos, A. Figueiredo, T.M. Felix, S. L. Segal, R. Guigliani, M.T. Muniz, M.S. Pombo-de-Oliveira, The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population, Leuk. Res. 30 (2006) 477–481.
[21] J. Wechsler, M. Greene, M.A. McDevitt, J. Anastasi, J.E. Karp, M.M. Le Beau, J.D. Crispino, Acquired mutations in GATA-1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome, Nat. Genet. 32 (2002) 148–152.
[22] J.K. Hitzler, Acute megakaryoblastic leukemia in Down syndrome, Pediatr. Blood Cancer 49 (2007) 1066–1069.
[23] P. Vyas, J.D. Crispino, Molecular insights into Down syndrome-associated leukemia, Curr. Opin. Pediatr. 19 (2007) 9–14.
[24] I.Q. Magalhães, A. Splendore, M. Emerenciano, A. Figueiredo, I. Ferrari, M.S. Pombo-de-Oliveira, GATA1 mutations in acute leukemia in children with Down syndrome, Cancer Genet. Cytogenet. 166 (2006) 112–116.
[25] S. Koifman, R.J. Koifman, Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective, Mutat. Res. 544 (2003) 305–311.