

Amanda de Lourdes Nunes

Análise das alterações citogenéticas e sua associação com características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mieloide aguda

Belo Horizonte

2016

Amanda de Lourdes Nunes

Análise das alterações citogenéticas e sua associação com características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mieloide aguda

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Linha de Pesquisa: Distúrbios onco-hematológicos

Orientadora: Profa. Benigna Maria de Oliveira

Belo Horizonte

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora: Prof^a Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof^a. Denise Maria Trombert de Oliveira

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof^a. Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes.

Vice-Diretor: Prof. Humberto José Alves

Coordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof. Luiz Armando Cunha de Marco

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof^a Ana Cristina Côrtes Gama

Chefe do Departamento de Pediatria: Prof^a Claudia Regina Lindgren Alves

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente

Coordenador: Prof. Eduardo Araújo Oliveira

Subcoordenador: Prof. Jorge Andrade Pinto

DEDICO

A Deus, aos meus pais (Dirce e José), às minhas irmãs (Aline, Andressa, Elisângela), aos demais familiares e amigos (em especial Cybele, Aline e Rosinha) e aos pacientes do Serviço de Hematologia HC-UFMG que me fizeram enxergar a vida com outro olhar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus a oportunidade dada em ampliar meus conhecimentos dentro da área de trabalho que tanto gosto, a citogenética.

Agradeço a professora Benigna Maria de Oliveira por toda confiança depositada em mim, paciência, ensinamentos e dedicação durante este trabalho.

À Cybele por toda ajuda e contribuição na realização desse trabalho. Por toda dedicação, incentivo e companheirismo em todos os momentos. Por ser tão presente em minha vida e ter compartilhado comigo os seus conhecimentos.

Aos meus pais por sempre acreditarem em mim. Por todo amor, incentivo, conselhos e confiança. Por serem a base da minha vida e me mostrarem que com caráter, esforço, trabalho e dedicação tudo se torna possível.

Às minhas irmãs de sangue e coração e demais familiares por todo carinho e apoio.

Aos queridos amigos que colaboraram e tanto me encorajaram.

Aos colegas do laboratório de Citogenética do HC-UFMG e demais colegas do Laboratório Central do HC-UFMG por todos os ensinamentos.

À Maria Helena funcionária do SAME (HC-UFMG) por toda ajuda e generosidade.

Ao professor Marcos Borato Viana pela contribuição indispensável na análise estatística.

Aos médicos do Serviço de Hematologia por toda ajuda e disponibilidade durante o levantamento dos dados.

Aos pacientes e seus familiares, dos quais sem a colaboração nada disso teria sido possível.

*“Ninguém quer saber o que fomos,
o que possuíamos,
que cargo ocupávamos no mundo;
o que conta é a luz que cada um
já tenha conseguido fazer brilhar em si mesmo.”*

(Chico Xavier)

RESUMO

A LMA é rara em crianças, sendo responsável por aproximadamente 15-20% dos casos de leucemia na infância. Os rearranjos cromossômicos podem ser observados em mais de 70% dos casos, sendo reconhecidos como um importante fator prognóstico. Até o momento, existem poucos dados sobre a doença e a sobrevida das crianças por ela acometidas no Brasil.

Objetivo: Avaliar a associação das alterações citogenéticas com as características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mieloide aguda (LMA).

Pacientes e métodos: Foi realizado um estudo de coorte retrospectivo. A população estudada consistiu de 98 pacientes com idade até 16 anos, com diagnóstico de LMA, atendidas no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas - UFMG, no período de 2004 a 2015.

Resultados: No presente estudo 51% dos casos correspondiam a pacientes do sexo feminino. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 7,64 anos e a mediana da contagem global de leucócitos ao diagnóstico foi de $10.780/\text{mm}^3$. Em relação à classificação FAB houve predomínio dos subtipos M3 (33 pacientes - 34% dos casos) e M2 (21 pacientes - 21% dos casos). Entre os 80 pacientes para os quais foi possível a análise do cariótipo, 63 (78,6%) apresentavam alguma alteração cromossômica, sendo a mais frequente a $t(15;17)(q22;q21)$. Em relação à classificação da OMS-2008, de 86 pacientes, 45 (52%) foram classificados no grupo com anomalias genéticas recorrentes, 16 (18,6%) no grupo com alterações citogenéticas relacionadas com mielodisplasia, 19 (22%) no grupo “LMA sem outra especificação” (SOE) e seis pacientes (7%) apresentaram leucemia relacionada à síndrome de Down. A probabilidade estimada de sobrevida global (SGLO) aos cinco anos para todo o grupo foi de 49,7% ($\pm 5,2\%$). A probabilidade estimada de SGLO aos 5 anos para os pacientes com cariótipo normal foi de 56,6% ($\pm 12,7\%$), de 81,0% ($\pm 8,6\%$) para aqueles com $t(15;17)$, de 71,4% ($\pm 17,1\%$) para os pacientes com $t(8;21)$, de 20,5% ($\pm 12\%$) para pacientes com alterações citogenéticas relacionadas com mielodisplasia e de 46,9% ($\pm 13,4\%$) para o grupo com outras anormalidades ($p=0,028$). Em relação à classificação da OMS 2008, na análise uni e multivariada, os pacientes com alterações citogenéticas relacionadas com mielodisplasia e aqueles com “LMA sem outra especificação” (SOE) apresentaram prognóstico desfavorável quando comparados aos pacientes do grupo “LMA com anormalidades genéticas recorrentes” e “LMA relacionada à síndrome de Down”. Na análise multivariada foram incluídas as variáveis “classificação OMS-2008” e “contagem de leucócitos ao diagnóstico <100.000 ou ≥ 100.000 leucócitos/ mm^3 ”. Os pacientes com LMA com alterações citogenéticas relacionadas com mielodisplasia apresentaram chance de óbito 2,97 vezes maior do que os pacientes com anormalidades genéticas recorrentes, considerada a categoria de base. Os pacientes da categoria sem outra especificação (SOE), em relação à categoria de base, apresentaram 2,22 vezes mais chance de óbito. Os pacientes com LMA associada à síndrome de Down apresentaram chance de óbito 0,58 vezes maior do que a categoria de base, porém sem significância estatística ($p=0,601$). O efeito da leucometria (superior ou inferior a

100.000/mm³) não é independente ($p = 0,078$) da classificação OMS-2008, embora haja tendência para tal.

Conclusão: Apesar das limitações de um estudo retrospectivo e da casuística relativamente pequena, os resultados corroboram a importância das alterações citogenéticas como fator prognóstico para pacientes pediátricos com LMA.

Palavras-chave: leucemia mieloide aguda, citogenética, prognóstico

ABSTRACT

AML is rare in children, accounting for approximately 15-20% of cases of childhood leukemia. Chromosomal rearrangements can be observed in more than 70% of the cases, being recognized as an important prognostic factor. To date, there is little data on the disease and the survival of the children it affects in Brazil.

Objective: To evaluate the association of cytogenetic changes with the clinical characteristics and evolution of children and adolescents with acute myeloid leukemia (AML).

Patients and methods: A retrospective cohort study was performed. The study population consisted of 98 patients up to the age of 16 years, with diagnosis of AML, attended at the Hematology Service of Hospital of the Clinics - UFMG, from 2004 to 2015.

Results: In the present study, 51% of the cases corresponded to female patients. The median age at diagnosis was 7,64 years and the median global leukocyte count at diagnosis was $10.780 / \text{mm}^3$. Regarding FAB classification, M3 subtypes (33 patients - 34% of cases) and M2 (21 patients - 21% of cases) predominated. Among the 80 patients for whom it was possible to analyze the karyotype, 63 (78,6%) had some chromosomal alteration, the most frequent being t (15; 17) (q22; q21). In relation to the classification of WHO-2008, of 86 patients, 45 (52%) were classified in the group with recurrent genetic abnormalities, 16 (18,6%) in the group with cytogenetic changes related to myelodysplasia, 19 (22%) in the group "AML without further specification" (SOE) and six patients (7%) had Down syndrome-related leukemia. The estimated overall survival (OS) at five years for the whole group was 49,7% ($\pm 5.2\%$). The estimated probability of OS at 5 years for patients with normal karyotype was 56,6% ($\pm 12,7\%$), from 81,0% ($\pm 8,6\%$) for those with t (15; 17), of 71,4% ($\pm 17,1\%$) for patients with t (8; 21), of 20,5% ($\pm 12\%$) for patients with cytogenetic changes related to myelodysplasia and of 46,9% ($\pm 13,4\%$) for the group with other abnormalities ($p = 0,028$). Regarding the classification of WHO 2008, in the univariate and multivariate analysis, patients with cytogenetic alterations related to myelodysplasia and those with non-specific AML presented an unfavorable prognosis when compared to patients in the "AML with recurrent genetic abnormalities" and "Down syndrome AML". In the multivariate analysis, the variables "WHO-2008 classification" and "leukocyte count at diagnosis <100.000 or ≥ 100.000 leukocytes / mm^3 " were included. Patients with AML with "cytogenetic changes related to myelodysplasia" presented a 2,97 times greater chance of death than patients with recurrent genetic abnormalities, considered the base category. Patients of the category without other specification (SOE), compared to the base category, presented 2,22 times more chance of death. Patients with AML associated with Down syndrome presented a death rate 0,58 times greater than the baseline category, but without statistical significance ($p = 0,601$). The effect of leucometry (above or below $100.000 / \text{mm}^3$) is not independent ($p = 0,078$) from the WHO-2008 classification, although there is a tendency to do so.

Conclusion: Despite the limitations of a relatively small retrospective study, the results corroborate the importance of cytogenetic changes as a prognostic factor for pediatric patients with AML.

Key words: acute myeloid leukemia, cytogenetic, prognosis

LISTA DE ABREVIATURAS

ATRA- Ácido Transretinóico

BFM- Berlim-Frankfurt-Munique

Braço p- Braço Curto

Braço q- Braço Longo

COEP- Comitê de Ética em Pesquisa

del- deleção

DRM- Doença Residual Mínima

EGIL- European Group for the Immunological Characterization of Leukemias

FAB- Franco-Americano-Britânico

FISH- Hibridização in Situ Fluorescente

HC-UFMG- Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

idic- Isodicêntricos

ins- Inserção

iso- Isocromossomo

inv- Inversão

LLA- Leucemia Linfóide Aguda

LMA- Leucemia Mieloide Aguda

NOPHO- Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology

OMS- Organização Mundial de Saúde

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

SGLO- Sobrevida Global

SLE- Sobrevida Livre de Eventos

SMD- Síndrome Mielodisplásica

SOE- Sem Outra Especificação

t- Translocação

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Translocação entre os cromossomos 1 e 22; t(1;22)(p13;q13).....	30
Figura 2- Translocação entre os cromossomos 8 e 21; t(8;21)(q22;q22), além de outras anormalidades citogenéticas envolvendo os cromossomos 9, 11 e Y.....	32
Figura 3- Translocação entre os cromossomos 9 e 11; t(9;11)(p22;q23).....	34
Figura 4- Translocação entre os cromossomos 15 e 17; t(15;17)(q22;q21).....	35
Figura 5- Distribuição de acordo com a faixa etária dos 98 pacientes diagnosticados com LMA, no período de janeiro de 2004 a junho de 2015, no serviço de Hematologia do HC-UFMG.....	48
Figura 6- Leucometria inicial de 93 dos 98 pacientes diagnosticados com LMA no serviço de Hematologia do HC-UFMG no período de janeiro de 2004 a junho de 2015.....	49
Figura 7- Probabilidade estimada de sobrevida global para 86 crianças com leucemia mieloide aguda, de acordo com a classificação da OMS-2008 (WHO-2008).....	58
Tabela 1- Classificação do Grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) para a leucemia mieloide aguda.....	23
Tabela 2- Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS 2008) para a leucemia mieloide aguda.....	25
Tabela 3- Distribuição de acordo com a classificação FAB (Franco-Americana-Britânica) dos 98 pacientes diagnosticados com LMA no serviço de Hematologia do HC-UFMG.....	50
Tabela 4- Distribuição dos pacientes diagnosticados com LMA no serviço de Hematologia do HC-UFMG de acordo com a positividade para as mutações em genes específicos ou genes de fusão testados.....	51
Tabela 5- Características dos 86 pacientes diagnosticados com LMA no serviço de Hematologia do HC-UFMG, no período de janeiro de 2004 a junho de 2015, classificados segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS-2008).....	53
Tabela 6- Distribuição dos 98 pacientes diagnosticados com LMA no serviço de Hematologia do HC-UFMG, no período de janeiro de 2004 a junho de 2015, de acordo com os protocolos de tratamento utilizados.....	55
Tabela 7- Análise multivariada para o risco de óbito para 86 pacientes com leucemia mieloide aguda classificados de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (Classificação OMS-2008).....	60

Quadro 1- Classificação do Grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) para as leucemias agudas de linhagem mieloide.....	43
Quadro 2- Alterações citogenéticas relacionadas à leucemia mieloide aguda observadas nos pacientes do Serviço de Hematologia do HC-UFMG.....	44
Quadro 3- Codificação para a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS-2008) para a leucemia mieloide aguda (LMA).....	46

SUMÁRIO

1-Introdução.....	15
1.1-Revisão de literatura.....	18
1.1.1-Epidemiologia.....	18
1.1.1.1-Incidência da doença.....	18
1.1.1.2- Fatores de risco para o desenvolvimento da LMA.....	18
1.1.1.3-Biologia da doença.....	20
1.1.2-Quadro clínico.....	20
1.1.3-Diagnóstico.....	21
1.1.4-Classificação da LMA.....	23
1.1.5-Tratamento e prognóstico.....	26
1.1.6-Alterações citogenéticas.....	28
2-Objetivos.....	38
2.1-Objetivo geral.....	38
2.2-Objetivos específicos.....	38
3-Pacientes e métodos.....	38
3.1-Pacientes.....	39
3.2-Coleta dos dados laboratoriais e clínicos.....	39
3.3- Definição do diagnóstico de leucemia mieloide aguda.....	40
3.4- Classificação da leucemia mieloide aguda.....	42
3.4.1- Classificação do Grupo Franco-Americano-Britânico (FAB).....	42
3.4.2- Classificação de acordo com as alterações citogenéticas e moleculares.....	43
3.4.3- Classificação de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS-2008).....	44

3.5-Protocolo de tratamento.....	45
3.6-Métodos estatísticos.....	46
3.7-Aspectos éticos.....	47
4-Resultados.....	47
4.1-Characterização geral da casuística.....	47
4.2-Characterísticas clínicas e laboratoriais.....	48
4.2.1-Análise citogenética e classificação.....	51
4.3-Tratamento.....	55
4.4-Evolução dos pacientes.....	55
5-Discussão.....	61
6-Conclusões.....	72
Referências.....	74
Anexo 1-Pareceres.....	81
Apêndice 1-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	88
Folha de aprovação.....	92

Nunes, Amanda de Lourdes.
N972a Análise das alterações citogenéticas e sua associação com características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mieloide aguda [manuscrito]. / Amanda de Lourdes Nunes. -- Belo Horizonte: 2016.
92f.
Orientador: Benigna Maria de Oliveira.
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leucemia Mielóide Aguda. 2. Citogenética. 3. Prognóstico. 4. Estudos de Coortes. 5. Adolescente. 6. Criança. 7. Dissertações Acadêmicas. I. Oliveira, Benigna Maria de. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III Oliveira. Título.
NLM: WH 250



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA AMANDA DE LOURDES NUNES


Realizou-se, no dia 30 de junho de 2016, às 14:00 horas, sala 029, andar térreo da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada "ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EVOLUÇÃO DAS CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA", apresentada por AMANDA DE LOURDES NUNES, número de registro 2014652290, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente à seguinte Comissão Examinadora formada pelas Professoras Doutoradas: Benigna Maria de Oliveira - Orientadora (UFMG), Sandra Guerra Xavier (UFMG) e Karla Emília de Sa Rodrigues (UFMG).

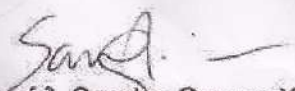
A Comissão considerou a dissertação:

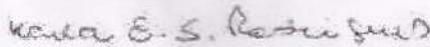
Aprovada

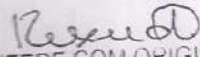
Reprovada

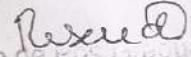
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 30 de junho de 2016.


Prof.^a Benigna Maria de Oliveira (Doutora)


Prof.^a Sandra Guerra Xavier (Doutora)


Prof.^a Karla Emília de Sa Rodrigues (Doutora)


CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UF


Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina-UFMG
Av. Prof. Alfredo Balena, 190- 5º Andar
CEP 30130-100-Funcionários - BH/MG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

UFMG

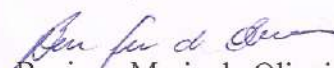
FOLHA DE APROVAÇÃO

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E SUA ASSOCIAÇÃO COM
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EVOLUÇÃO DAS CRIANÇAS E
ADOLESCENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**


AMANDA DE LOURDES NUNES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Ciências da Saúde.

Aprovada em 30 de junho de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Prof.^a Benigna Maria de Oliveira - Orientadora
UFMG


Prof.^a Sandra Guerra Xavier
UFMG


Prof.^a Karla Emília de Sa Rodrigues
UFMG

Belo Horizonte, 30 de junho de 2016.

1. INTRODUÇÃO

A leucemia é o câncer mais frequente na população pediátrica, correspondendo a cerca de 30% dos casos de neoplasias nessa faixa etária. Os dois tipos principais são: leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia mieloide aguda (LMA), que acometem as linhagens celulares linfóide e mieloide, respectivamente (PUUMALA *et al.*, 2013).

A LMA é rara em crianças, sendo responsável por aproximadamente 15-20% dos casos de leucemia na infância, diferentemente da LLA que representa 80% dos casos (METAYER *et al.*, 2013).

A LMA é uma doença complexa por ser clínica e geneticamente heterogênea, resultado de uma transformação clonal de precursores hematopoiéticos, através da aquisição de rearranjos cromossômicos (observados em mais de 70% dos pacientes pediátricos) e de múltiplas mutações gênicas (COENEN *et al.*, 2011; BALGOBIND *et al.*, 2011; RUBNITZ, 2008). A detecção de tais rearranjos e mutações é feita através das análises citogenética e molecular que, aliadas ao mielograma e à imunofenotipagem por citometria de fluxo (IMF), possibilitam maior precisão no diagnóstico e avaliação prognóstica dos pacientes.

A LMA possui vários subtipos e são utilizados para a sua classificação os critérios do Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (Classificação FAB) e da Organização Mundial de Saúde (Classificação OMS). Aliados às características morfológicas e imunofenotípicas da classificação FAB, na classificação da OMS foram incorporados critérios clínicos, alterações citogenéticas e moleculares. Os achados citogenéticos são relevantes no que diz respeito à definição de prognóstico, resposta à terapia de indução, incidência de recaída e sobrevida global (MANOLA, 2009; RUBNITZ *et al.*, 2007; PESSION *et al.*, 2013; DAVIS *et al.*, 2013).

A importância das alterações cariotípicas na LMA infantil tem sido reconhecida apenas recentemente devido à relativa raridade da doença. Alguns rearranjos cromossômicos específicos têm sido identificados e associados com subgrupos morfológicos distintos e reconhecidos como parâmetros importantes para fins de diagnóstico e acompanhamento. A identificação de rearranjos, com prognóstico conhecido, é importante para a correta classificação dos pacientes pediátricos, no momento do diagnóstico, de acordo com a

classificação da OMS, além da estratificação em grupos de risco favorável, desfavorável e intermediário e definição de protocolos de tratamento adequados (MANOLA, 2009).

As alterações cromossômicas que conferem prognóstico favorável são $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q21)$ e $inv(16)(p13q22)$. Prognóstico desfavorável está relacionado à monossomia do cromossomo 5, deleções no braço longo do cromossomo 5 ($del(5q)$), monossomia do cromossomo 7, anormalidades no braço longo do cromossomo 3 ($3q$) e cariótipos complexos. Outras anormalidades numéricas ou estruturais, incluindo alterações em $11q23$, trissomia dos cromossomos 8, 21 e 22, e deleções no braço longo do cromossomo 9 [$del(9q)$] e cromossomo 7 [$del(7q)$] conferem prognóstico intermediário (von NEUHOFF C, 2010).

A sobrevida nos pacientes pediátricos com LMA melhorou ao longo das últimas décadas. Atualmente, nos países desenvolvidos, os índices de sobrevida situam-se em torno de 60 a 70% (CREUTZIG *et al.*, 2012; TARLOCK e MESHINCHI, 2015). Esse avanço deve-se à utilização de novas abordagens terapêuticas, melhoria das terapias de suporte, possibilidade de transplante de medula óssea, monitoramento de doença residual mínima (DRM), além da classificação dos pacientes em grupos de risco para recidiva de acordo com resposta precoce ao tratamento (DRM) e alterações genéticas e moleculares (KRSTOVSKI *et al.*, 2010; MANOLA, 2009; RUBNITZ, 2008; KASPERS e ZWAAN, 2007; PESSION *et al.*, 2013).

A LMA em crianças é uma doença pouco estudada no Brasil. Até o momento, existem poucos dados sobre a doença e a sobrevida das crianças por ela acometidas no país (POMBO DE OLIVEIRA *et al.*, 2009; VIANNA *et al.*, 2003).

O Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG) é referência para o tratamento da leucemia infantil no estado de Minas Gerais. Um dos principais estudos brasileiros, envolvendo 83 pacientes com diagnóstico de LMA, tratados no período de 1986 a 2000, foi realizado neste serviço. Esse trabalho teve como objetivo verificar a sobrevida de crianças com LMA e avaliar a influência de fatores prognósticos como idade, gênero, leucometria inicial, estado nutricional e esquema terapêutico (VIANNA *et al.*, 2003).

O presente estudo deu continuidade a essa linha de investigação, incluindo em seus objetivos a avaliação dos aspectos relativos às alterações citogenéticas, uma vez que constitui, atualmente, importante fator prognóstico.

A ênfase nos achados citogenéticos deveu-se à sua importância como parte fundamental do diagnóstico da LMA, com implicações na definição de prognóstico e estratégias terapêuticas, mas também à experiência da mestrandia, como bióloga, no Setor de Citogenética do HC-UFMG. Esse setor deu início à realização dos cariótipos em medula óssea para a detecção de doenças hematológicas no ano de 1994, atendendo ao Serviço de Hematologia do HC-UFMG, e tem ampliado e aprimorado suas atividades ao longo desses anos.

1.1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1. EPIDEMIOLOGIA

1.1.1.1. INCIDÊNCIA DA DOENÇA

A incidência da LMA na infância é estimada entre cinco a sete casos por milhão de indivíduos por ano, com um pico de incidência, de 11 casos por milhão, aos dois anos de idade (RUBNITZ *et al.*, 2010). De acordo com relatos do programa americano SEER, a incidência da LMA é de 1,5 por 100.000 indivíduos por ano, em pacientes com idade inferior a um ano. Essa incidência diminui para 0,9 por 100.000 indivíduos com idade entre 1 e 4 anos e 0,4 por 100.000 indivíduos com idade entre 5 e 9 anos. Após essa faixa etária, há um aumento progressivo no número de casos na idade adulta, atingindo incidência de 16,2 por 100.000 indivíduos com mais de 65 anos (PUUMALA, 2009). Não há relato de diferenças na incidência entre homens e mulheres e entre a população branca e negra. Os subtipos da classificação FAB estão igualmente representados entre os diferentes grupos étnicos e raciais, com exceção para a leucemia promielocítica aguda, que tem maior incidência entre as crianças de origem latina ou hispânica (RUBNITZ *et al.*, 2010).

1.1.1.2. FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DA LMA

A patogênese da LMA está relacionada a alterações genéticas e epigenéticas nas células progenitoras hematopoiéticas acarretando a desregulação de vias críticas de transdução de sinais e resultando no aumento de células mieloides indiferenciadas. A LMA pode ser dividida em duas categorias: LMA *de novo* e LMA secundária. A LMA *de novo* é definida como uma doença que evolui sem exposição prévia à terapia citotóxica, ao contrário da LMA secundária que ocorre posteriormente a essa exposição ou a uma insuficiência hematopoiética anterior como síndrome mielodisplásica (SMD) ou insuficiência medular (TARLOCK e MESHINCHI, 2015).

A análise de possíveis fatores de risco para o desenvolvimento da LMA infantil tem sido realizada em diversos estudos, levando-se em consideração, principalmente, a exposição

anterior à concepção e no período pré-natal ao álcool, cigarro, medicamentos, benzeno, pesticidas e radiação. Fatores como idade dos pais, perda fetal anterior, ordem de nascimento das crianças e peso ao nascimento também têm sido pesquisados. Entretanto, o estudo desses fatores se torna limitado, pois, além do número de pacientes pediátricos com LMA ser reduzido, estes podem ser agrupados inadequadamente com pacientes diagnosticados com LLA. Outro aspecto importante a ser citado é a dificuldade de se medir de forma exata a quantidade e tempo de exposição às condições citadas anteriormente. Com isso, somente a exposição intraútero à radiação é considerada como causa estabelecida para a LMA pediátrica *de novo* (PUUMALA *et al.*, 2013).

Condições genéticas como a trissomia do cromossomo 21 e outras síndromes menos comuns como anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, ataxia telangiectasia, síndrome de Shwachman-Diamond, disceratose congênita e síndrome de Kostmann estão, também, associadas à LMA (METAYER *et al.*, 2013; PUUMALA *et al.*, 2013; TARLOCK e MESHINCHI, 2015).

As crianças com síndrome de Down (SD) têm risco aumentado de desenvolver LMA na infância, principalmente o subtipo LMA-M7 (leucemia megacarioblástica aguda) (MANOLA, 2009; HEEREMA e RAIMONDI, 2013; CREUTZIG *et al.*, 2012). A doença é classificada à parte por ser clínica e geneticamente única (MANOLA, 2009). Alguns pacientes podem apresentar mutações somáticas no exon 2 do fator de transcrição hematológico *GATA1* presente no braço curto do cromossomo X (p11.23). Esses eventos resultam na perda do domínio de ativação e originam uma proteína truncada, *GATA1s*. A maioria dos pacientes pediátricos portadores de SD afetados pela doença tem idade inferior a cinco anos e apresentam bom prognóstico, já que essa mutação confere aumento de sensibilidade das células leucêmicas à quimioterapia (MANOLA, 2009; HEEREMA e RAIMONDI, 2013).

A anemia de Fanconi é uma doença autossômica recessiva associada a anomalias congênitas, pancitopenia progressiva e uma predisposição ao câncer. É uma síndrome de instabilidade genômica, onde as células cultivadas são caracteristicamente sensíveis à ruptura dos cromossomos por agentes de ligação cruzada de DNA (ROSENBERG *et al.*, 2003). A insuficiência medular decorrente da doença pode se apresentar em diferentes graus. Pacientes com anemia de Fanconi têm um risco aumentado em 500 vezes, se comparados à população em geral, de desenvolver LMA (ROCHOWSKI *et al.*, 2012).

Em crianças, é rara a ocorrência de LMA precedida por doenças mieloproliferativas como SMD e leucemia mielomonocítica juvenil. Também deve ser destacada a possibilidade de LMA secundária a tratamento radioterápico ou quimioterápico contendo agentes alquilantes ou epipodofilotoxinas (de ROOIJ *et al.*, 2015).

1.1.1.3 BIOLOGIA DA DOENÇA

A LMA é uma doença clínica e geneticamente heterogênea, resultado da transformação maligna de precursores mieloides e de uma variedade de eventos que contribuem para tal transformação. A maioria dos subtipos de LMA é caracterizada por subpopulações de células estaminais, ou células iniciadoras de leucemia que têm uma capacidade de autorrenovação ilimitada (RUBNITZ, 2012), além de proliferação e diferenciação em blastos malignos. Sabe-se que algumas dessas células podem persistir após o tratamento e são provavelmente responsáveis pela recidiva da doença (ROBOZ e GUZMAN, 2009).

Estudos indicam que o processo de transformação neoplásico ocorre em várias etapas, partindo de um evento inicial em uma célula-tronco que origina uma célula-tronco pré-leucêmica, que posteriormente passa por seguidas mutações levando à manifestação da doença (ROBOZ e GUZMAN, 2009). A patogênese da doença compreende uma ação sinérgica de mutações classe I (que conferem vantagem proliferativa) e mutações classe II (que bloqueiam a diferenciação) dentro da mesma célula-tronco hematopoiética, conduzindo à transformação em leucemia aguda (KRSTOVSKI *et al.*, 2010). As mutações que regulam a proliferação ou sobrevivência de células progenitoras hematopoiéticas incluem mutações de ativação em membros da família *RAS*, no receptor tirosina quinase *FLT3* e *KIT*, assim como nos genes de fusão *BCR/ABL* e *TEL/PDGFRB*. As mutações em genes que prejudicam a diferenciação e/ou apoptose incluem os genes de fusão *AML/ETO* e *PML/RARA*, mutações em *CEBPA*, *CBF*, e membros da família *HOX*, assim como *CBP/P300*, co-ativadores de *TIF* e rearranjos envolvendo *MLL* (KRSTOVSKI *et al.*, 2010).

1.1.2. QUADRO CLÍNICO

A sintomatologia associada à doença deve-se à infiltração da medula óssea e outros órgãos por células malignas e à insuficiência medular secundária (ROSE-INMAN e KUEHL, 2014). Dentre os principais sinais e sintomas estão: febre, palidez, dispneia, fadiga, anorexia, perda de peso, dor óssea. Também podem ser observados petéquias, hematomas ou sangramentos, como resultado da trombocitopenia. A coagulação intravascular disseminada pode ocorrer em todos os subtipos de LMA, sendo mais frequente na LMA-M3 (ROSE-INMAN e KUEHL, 2014; KRSTOVSKI *et al.*, 2010).

A infiltração de sítios extramedulares pode resultar em linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, tumores (mieloblastomas e sarcomas granulocíticos), doença na pele (leucemia cútis), órbita, e no espaço epidural e, raramente, envolvimento testicular (RUBNITZ *et al.*, 2010). O acometimento do sistema nervoso central (SNC) na leucemia mieloide aguda ocorre em apenas 5 a 10% dos pacientes, tanto no diagnóstico quanto na recidiva. Alguns fatores como hiperleucocitose, leucemia monocítica (subtipos M4 ou M5, incluindo M4eo com inv(16)), rearranjos envolvendo o gene *MLL* e pacientes mais jovens estão associados com infiltração do SNC (CREUTZIG *et al.*, 2012).

O sarcoma mieloide é uma rara manifestação de LMA, caracterizada pela presença de uma ou mais massas tumorais de células mieloides (ou infiltrações) em um sítio extramedular. Sua ocorrência se dá principalmente de maneira simultânea ao surgimento da LMA, podendo aparecer também como primeira manifestação, antecedendo o envolvimento medular. Geralmente, a pele é afetada (leucemia cútis), mas outros órgãos como órbita, linfonodos, ossos, tecidos moles, rins ou testículos podem estar envolvidos. O sarcoma mieloide é mais frequente em crianças mais jovens com uma média de idade de 5 anos e sua incidência diminui com a idade (CREUTZIG *et al.*, 2012).

1.1.3. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LMA é estabelecido com base em uma combinação de critérios morfológicos, imunofenotípicos, moleculares e citogenéticos (KRSTOVSKI *et al.*, 2010). Tal investigação é precedida de uma suspeita clínica associada a alterações no hemograma. O material biológico ideal para a realização do diagnóstico é o aspirado de medula óssea. Na impossibilidade de obtenção de amostra medular, o sangue periférico pode ser utilizado,

desde que contenha um número significativo de blastos circulantes (HEEREMA e RAIMONDI, 2013; CREUTZIG *et al.*, 2012).

O hemograma é ferramenta indispensável tanto no diagnóstico quanto no seguimento da doença. Os pacientes podem apresentar anemia normocítica e normocrômica, trombocitopenia, contagem de leucócitos normal ou alterada (aumentada ou diminuída), neutropenia, além de blastos circulantes no sangue periférico (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

O diagnóstico morfológico é estabelecido pelo exame da medula óssea (mielograma) ou por biópsia de crista ilíaca nos casos de punção seca. O estudo morfológico revela as porcentagens de blastos indiferenciados, com grânulos, atípicos, além da presença de estruturas intracelulares como bastonetes de Auer e sinais de mielodisplasia. A classificação morfológica da LMA é baseada no fenótipo associado à linhagem (indiferenciada, mieloide, monoblástica, eritroblástica ou megacarioblástica) e definida pela classificação FAB (CREUTZIG *et al.*, 2012).

A imunofenotipagem pela técnica de citometria de fluxo é um método rápido para determinar a linhagem celular e distinguir entre LMA e LLA, utilizando para tal um painel de anticorpos monoclonais. O painel mínimo preconizado pela OMS-2008 e classificação EGIL inclui os seguintes marcadores: CD34, CD117, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD64, CD65, IMPO, i-lisozima, CD41, e CD61; e para a leucemia aguda de linhagem ambígua (MPAL): CD19, iCD79a, iCD22, CD10, e iCD3. A IMF não costuma substituir a classificação morfológica de acordo com critérios FAB, mas é necessária para classificar o subtipo FAB-M0 (positivo para marcadores como mieloperoxidase, e/ou CD13, CD33, CD117) e o subtipo FAB-M7 (positivo para marcadores plaquetários como CD41e/ou CD61) (CREUTZIG *et al.*, 2012).

A análise citogenética convencional pode identificar rearranjos cromossômicos ao longo de todo o genoma, podendo servir consequentemente como ponto de partida para outras investigações. Rearranjos cromossômicos específicos têm sido reconhecidos como importantes eventos iniciadores do processo de leucemogênese (MANOLA, 2009). É um método que pode detectar anormalidades estruturais ou numéricas em aproximadamente 70% dos pacientes pediátricos (CREUTZIG *et al.*, 2012). O papel da citogenética no diagnóstico da LMA foi reconhecido pela OMS e o seu valor como indicador independente de prognóstico foi aceito já em 1984 (HARRISON *et al.*, 2010).

Diversas mutações gênicas e genes expressos de maneira aberrante foram reconhecidos na LMA pediátrica, contribuindo para a heterogeneidade da doença. A avaliação de rotina deve incluir o estudo de marcadores genéticos moleculares relevantes para estabelecimento de prognóstico, tais como *FLT3-ITD*, *WT1*, *C-KIT*, *CEBPA* (mutação dupla), *NPM1* e outras anormalidades específicas envolvendo o gene *MLL* (CREUTZIG *et al.*, 2012).

1.1.4. CLASSIFICAÇÃO DA LMA

A classificação da LMA baseia-se, principalmente, nos critérios do Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (classificação FAB) e da Organização Mundial de Saúde (classificação OMS). A classificação FAB foi introduzida no contexto clínico da LMA em 1976, baseando-se nos aspectos morfológicos e citoquímicos para categorização da mesma e estabelecendo para confirmação do diagnóstico a presença de 30% de blastos na medula óssea. Nessa classificação a LMA foi subdividida em seis grupos (M1 a M6). Estudos posteriores atualizaram a classificação FAB, incluindo a realização de estudos imunofenotípicos, possibilitando maior exatidão no diagnóstico e proporcionando, assim, a inclusão dos subtipos LMA-M0 e LMA-M7 conforme detalhado na Tabela 1 (KRSTOVSKI *et al.*, 2010; BACHER *et al.*, 2005, KASPERS e ZWAAN, 2007).

Tabela 1: Classificação do Grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) para a LMA

Subtipo	Descrição
MO	Leucemia mieloide aguda com mínima evidência de diferenciação mieloide
M1	Leucemia mieloide aguda sem maturação
M2	Leucemia mieloide aguda com maturação
M3	Leucemia promielocítica aguda
M4	Leucemia mielomonocítica aguda
M5	Leucemia aguda monoblástica e monocítica
M6	Leucemia mieloide aguda com diferenciação eritróide predominante
M7	Leucemia megacarioblástica aguda

A classificação da OMS foi proposta em 1999 e, desde então, passou por modificações. A versão utilizada atualmente, OMS-2008, integra fatores genéticos, imunofenotípicos, biológicos e clínicos para definir a doença e estabelece para o diagnóstico a presença de, no mínimo, 20% de blastos no sangue periférico ou medula óssea (KRSTOVSKI *et al.*, 2010). Outro aspecto importante é que a presença de rearranjos citogenéticos clonais recorrentes como $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q21)$, $inv(16)(p13q12)$ ou $t(16;16)(p13q12)$ são suficientes para definir o diagnóstico de LMA, independentemente de ser observada a quantidade mínima de blastos preconizada (KRSTOVSKI *et al.*, 2010).

De acordo com essa classificação, a LMA é subdividida em sete grupos, conforme detalhado na tabela 2.

Tabela 2: Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS-2008) para a leucemia mieloide aguda (LMA), adaptada (VARDIMAN *et al.*, 2009; ZERBINI *et al.*, 2011)

LMA com anormalidades genéticas recorrentes
LMA com t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1q22); <i>CBFB-MYH11</i>
LMA com t(15;17)(q22;q21); <i>PML-RARA</i>
LMA com t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>
LMA com t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
LMA com inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPNI-EVII</i>
LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKLI</i>
Entidade provisória: LMA com mutação <i>NPM1</i>
LMA com mutação <i>CEBPA</i>
LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia
Cariótipo complexo
Anormalidades não balanceadas: -7/del(7q), -5/del(5q), i(17q) ou t(17p), -13 ou del(13q), del(11q), del(12p) ou t(12p), del(9q), idic(X)(q13)
Anormalidades balanceadas: t(11;16)(q23;p13.3), t(3;21)(q26.2;q22.1) t(1;3)(p36.3;q21.1), t(2;11)(p21;q23) t(5;12)(q33;p12), t(5;7)(q33;q11.2) t(5;17)(q33;p13), t(5;10)(q33;q21) t(3;5)(q25;q34)
Neoplasias mieloides relacionadas com terapia
LMA sem outra especificação (SOE)
Leucemia mieloide aguda com mínima evidência de diferenciação mieloide
Leucemia mieloide aguda sem maturação
Leucemia mieloide aguda com maturação
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia aguda monoblástica e monocítica
Leucemia aguda eritróide : leucemia eritróide pura; eritroleucemia, eritróide/mieloide
Leucemia megacarioblástica aguda
Sarcoma mieloide
Proliferações mieloides associadas com síndrome de Down
Mielopoese anormal transitória
Leucemia mieloide associada à síndrome de Down
Neoplasia da célula dendrítica plasmocitoide blástica

A classificação da OMS assume grande importância na abordagem dos pacientes com LMA, pois os achados citogenéticos são, atualmente, considerados um dos mais expressivos fatores prognósticos (KRSTOVSKI *et al.*, 2010; MRÓZEC *et al.*, 2004; DAVIS *et al.*, 2013; VOUTIADOU *et al.*, 2013). Deve ser ressaltada a importância dessa classificação na definição de grupos de risco para recidiva, possibilitando a identificação de pacientes que necessitam de tratamento mais intensivo.

No entanto, esse sistema foi elaborado utilizando-se principalmente dados obtidos da experiência com pacientes adultos. A literatura sobre o uso da classificação OMS-2008 em crianças ainda é escassa (DAVIS *et al.*, 2013; SANDAHL *et al.*, 2015).

Em 2013, foi publicado estudo retrospectivo no qual a classificação OMS-2008 foi utilizada em uma coorte pediátrica envolvendo 115 crianças. Tratou-se de estudo pioneiro no qual foram destacadas as diferenças na epidemiologia da LMA entre pacientes pediátricos e adultos. Os autores consideraram que grande parte dos melhores resultados obtidos na população pediátrica poderia ser atribuída ao aumento da incidência de LMA caracterizada pela presença de anormalidades genéticas recorrentes que carregam um prognóstico favorável (DAVIS *et al.*, 2013).

Em 2015, estudo do grupo NOPHO envolvendo 639 pacientes dos países nórdicos e Hong Kong, com idade entre 1 e 18 anos, concluiu que existem limitações para o emprego dessa classificação na população pediátrica. Entre os achados que levaram a essa conclusão está o fato da maior parte dos pacientes (44%) ter sido classificada no grupo “LMA sem outra especificação” e 15% dos pacientes terem sido alocados no grupo com “LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia”, agrupando em uma mesma categoria entidades com evolução nitidamente diferente (SANDAHL *et al.*, 2015).

1.1.5. TRATAMENTO E PROGNÓSTICO

Ao longo das últimas três décadas, o prognóstico dos pacientes pediátricos com LMA tem melhorado de maneira significativa, alcançando índices de sobrevida próximos de 60% (RUBNITZ, 2012; TARLOCK e MESHINCHI, 2015). Esses avanços devem-se, principalmente, à abordagem terapêutica utilizada; à estratificação dos pacientes conduzindo o tratamento de acordo com os grupos de risco para recidiva; ao avanço das terapias de suporte;

à melhoria das estratégias para as fases de indução e pós-remissão com elevadas doses de citarabina; à realização de transplantes alogênicos de células-tronco hematopoéticas em pacientes de alto risco; e ao monitoramento de DRM (PESSION *et al.*, 2013; KRSTOVSKI *et al.*, 2010; CREUTZIG *et al.*, 2012).

Apesar da LMA ser classificada em vários subtipos, todos são tratados de maneira semelhante, exceto a LMA-M3, variante associada a t(15;17), que tem como particularidade a utilização de ácido transretinóico (ATRA) ou ácido arsênico associado a quimioterápicos.

Diversos autores preconizam que crianças com síndrome de Down sejam tratadas com esquemas terapêuticos menos intensivos, já que existe um risco considerável de mortalidade precoce, além do fato desses pacientes apresentarem boa resposta à terapia de indução (KRSTOVSKI *et al.*, 2010).

O tratamento da LMA é fundamentado na utilização de poliquimioterapia. Com a utilização de tratamentos baseados em estratificação de riscos e os bons resultados alcançados atualmente, o transplante autólogo na primeira remissão é indicado atualmente para pacientes com alto risco de recidiva (CREUTZIG *et al.*, 2012; TARLOCK e MESHINCHI, 2015).

Aproximadamente 80% a 90% dos pacientes alcançam a remissão completa após a indução, baseada no uso de citarabina, daunorrubicina e etoposídeo, que tem como objetivo reduzir rapidamente a quantidade de blastos, promovendo assim a restauração da hematopoese normal, com conseqüente desaparecimento de toda a sintomatologia clínica associada (KRSTOVSKI *et al.*, 2010; TARLOCK e MESHINCHI, 2015).

A consolidação ou intensificação é uma fase de tratamento intensivo, com a finalidade de evitar o aparecimento de clones resistentes às drogas, aumentando as chances de remissões mais prolongadas e maior porcentagem de cura. Nesta fase do tratamento, podem ser utilizadas altas doses de citarabina, associada ou não a outros quimioterápicos (KRSTOVSKI *et al.*, 2010; MANOLA, 2009; RUBNITZ, 2008; RUBNITZ, 2012; RUBNITZ *et al.*, 2007; PESSION *et al.*, 2013).

A recidiva em SNC não é comum e a profilaxia é feita com dose única de citarabina intratecal em cada ciclo de quimioterapia (TARLOCK e MESHINCHI, 2015).

Contudo, mesmo com o aumento das taxas de remissão, os esquemas quimioterápicos empregados estão associados à citopenias significativas, cardiotoxicidade e outras complicações

que podem elevar a mortalidade relacionada ao tratamento. Neutropenia prolongada é comum com a terapia padrão de LMA e necessita de cuidados de suporte intensivo para reduzir a morbidade por bactérias e infecções fúngicas (TARLOCK e MESHINCHI, 2015).

Também deve ser ressaltada a importância crescente da estratificação dos pacientes em grupos de risco para definição de prognóstico e intensidade do tratamento. A presença de alterações citogenéticas e moleculares e o estudo da DRM após a fase de indução da quimioterapia têm sido os principais indicadores utilizados para essa avaliação de risco (TARLOCK e MESHINCHI, 2015; KAROL *et al.*, 2015).

A avaliação de resposta ao tratamento antes do segundo curso de indução e o tempo de remissão completa são fatores prognósticos importantes identificados, tradicionalmente, por meio de análise morfológica e exame citogenético da medula óssea. Porém, essas técnicas não são capazes de detectar níveis de células leucêmicas inferiores a 1%. Por isso, métodos mais sensíveis, como a citometria de fluxo e a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido utilizados para caracterização da DRM (CREUTZIG *et al.*, 2012; KRSTOVSKI *et al.*, 2010).

Ainda que o prognóstico da LMA tenha melhorado significativamente nas últimas décadas, o índice de recidiva ainda é relevante, atingindo cerca de um terço dos pacientes pediátricos, conferindo a estes um prognóstico desfavorável (KASPERS, 2014). Segundo Kaspers, a probabilidade de sobrevida a longo prazo a partir da recaída é de 35% (KASPERS, 2014).

Também merecem destaque os avanços nas investigações a respeito de novas drogas como os inibidores de tirosina quinase, o Gentuzumabe (Ozogamicina) (anti CD33) e outras, que poderão contribuir para o aumento dos efeitos anti-leucêmicos com redução na morbidade e mortalidade relacionadas ao tratamento (de ROOIJ *et al.*, 2015).

1.1.6. PRINCIPAIS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS NA LMA PEDIÁTRICA

Para se realizar uma avaliação citogenética é necessária a análise cromossômica de pelo menos 20 metáfases, sendo que as alterações devem ter pelo menos 2Mb para serem detectadas (HEEREMA e RAIMONDI, 2013). As anormalidades cromossômicas clonais são aquelas em que as alterações são idênticas e para que sejam assim designadas devem ser

observadas em pelo menos duas metáfases. No que diz respeito a ganhos e perdas de cromossomos inteiros, estes devem ser observados em no mínimo três células.

Segundo MRÓZEC *et al.*, aproximadamente 200 alterações estruturais e numéricas como translocações recíprocas (t), inversões (inv), inserções (ins), deleções (del), translocações não balanceadas (der), isocromossomos (iso), cromossomos isodicêntricos (idic), trissomias isoladas e monossomias têm sido observadas como anormalidades recorrentes em LMA. Algumas alterações são mais raras, enquanto outras ocorrem em maior frequência (MRÓZEC *et al.*, 2004).

A citogenética convencional pode detectar alterações citogenéticas estruturais e numéricas em 70 a 80% das crianças com LMA. No entanto, alguns genes de fusão, produtos de translocações crípticas ou perda de material cromossômico, só podem ser identificados usando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). As anormalidades cromossômicas mais frequentemente identificadas nas crianças incluem a t(8;21)(q22;q22), a inv(16)(p13.1q22), a t(15;17)(q22;q21)/PML-RARA, e os rearranjos 11q23/MLL, que respondem no total por 50% dos casos de LMA pediátrica, frequência muito superior àquela observada nos adultos (CREUTZIG *et al.*, 2012).

A seguir são descritos alguns rearranjos citogenéticos e sua incidência na população pediátrica.

t(1;22)(p13;q13)/RBM15(OTT)-MKL1(MAL)

A translocação entre o braço curto (p) do cromossomo 1 na região p13 e o braço longo (q) do cromossomo 22 na região q13 está restrita a pacientes com LMA megacarioblástica, ocorrendo em aproximadamente 33% dos pacientes neste subgrupo, sendo mais frequente em crianças jovens e recém-nascidos. Através dessa translocação ocorre a união dos genes *OTT* (*RBM15*) localizado no cromossomo 1 e *MAL* (*MLK1*) localizado no cromossomo 22. Essa translocação é rara em crianças com síndrome de Down (MANOLA, 2009). A translocação t(1;22)(p13;q13) está representada na Figura 1.

Os pacientes que apresentam essa translocação eram considerados, no passado, como de alto risco para recidiva, mas o uso de terapia intensiva tem melhorado consideravelmente seu prognóstico (HEEREMA e RAIMONDI, 2013).

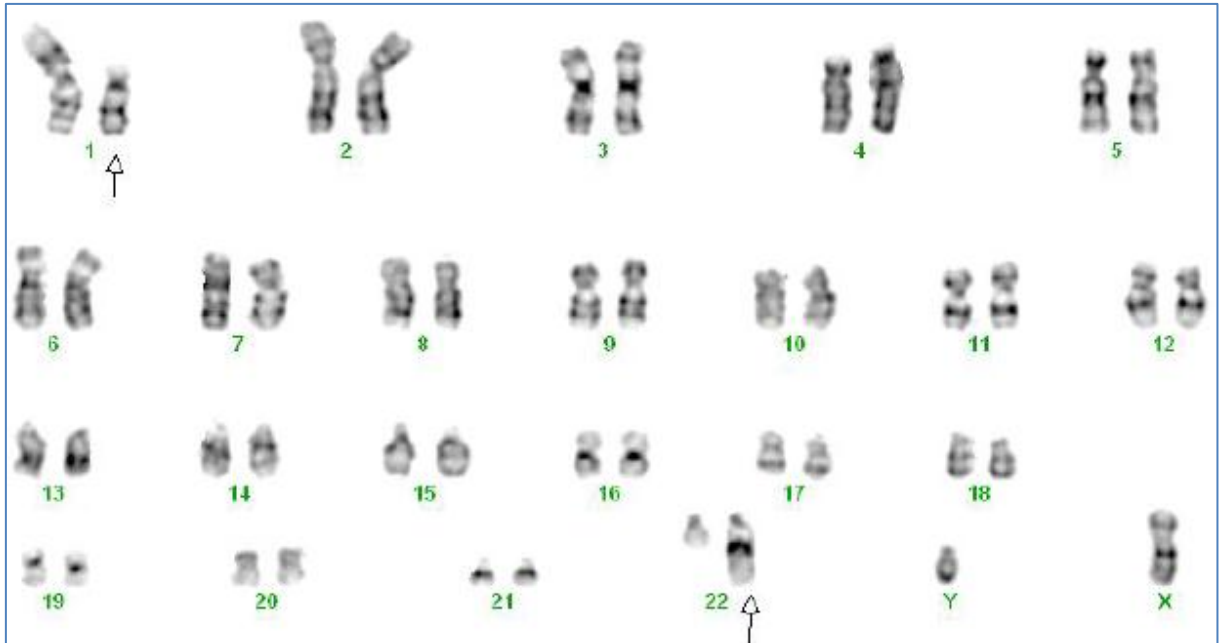


Figura 1: Translocação entre os cromossomos 1 e 22; $t(1;22)(p13;q13)$. Este cariótipo pertence ao paciente de número 45 da casuística deste estudo.

Anormalidades do cromossomo 3

Anormalidades do cromossomo 3, especialmente no braço longo (3q), foram identificadas como alterações de alto risco, sendo raras em crianças. Os rearranjos envolvendo o cromossomo 3 entre as regiões q21-q26 em pacientes pediátricos são associados principalmente ao subtipo M7. A LMA em pacientes com anemia de Fanconi está fortemente envolvida com ganhos no braço longo do cromossomo 3, especialmente entre as regiões q26-q29, representando um fator de risco adverso (MANOLA,2009).

-5/del(5q)

A monossomia (-5) ou deleções no braço longo do cromossomo 5 (5q) são eventos raros (0% a 2,5%) na LMA infantil e são característicos de prognóstico ruim. Uma proporção maior de anormalidades de 5q pode ocorrer em pacientes pediátricos após quimioterapia com agentes alquilantes, ou seja, incluídos no grupo “LMA relacionadas à terapia” (MANOLA, 2009).

-7/del(7q)

A monossomia (-7) ou deleções no braço longo do cromossomo 7 (7q) ocorrem em uma frequência de 2% a 7% na população pediátrica com LMA. Essas alterações estão associadas a todos os subtipos de LMA e, geralmente, indicam prognóstico desfavorável.

Estudos recentes mostraram que pacientes com deleção no braço longo do cromossomo 7 apresentaram prognóstico intermediário, enquanto pacientes com -7 apresentaram prognóstico ruim, indicando, portanto, que pacientes com -7 e del (7q) não deveriam ser classificados como um subgrupo citogenético único (MANOLA, 2009; SANDAHL *et al.*, 2015).

A del(7q), comumente, pode ser encontrada como única anormalidade cromossômica na LMA secundária a síndrome mielodisplásica e LMA em pacientes portadores de desordens constitucionais como anemia de Fanconi, neutropenia congênita e neurofibromatose tipo 1 (BRAOUDAKI e TZORTZATOU-STATHOPOULOU, 2012).

t(8;21)(q22;q22)/*RUNX1-RUNX1T1*

A t(8;21) é uma das anormalidades citogenéticas mais frequentes, ocorrendo em aproximadamente 12% dos pacientes pediátricos com LMA e geralmente correlacionada ao subtipo FAB M2 (HEEREMA e RAIMONDI, 2013; LAFIURA *et al.*, 2008; BRAOUDAKI e TZORTZATOU-STATHOPOULOU, 2012). É caracterizada por uma translocação balanceada entre os cromossomos 8 onde está localizado o gene *AML1 (RUNX1)* e 21 *ETO (RUNX1T1)* originando o gene de fusão *AML1(RUNX1)/ETO(RUNX1T1)* (LAFIURA *et al.*, 2008).

Alguns estudos têm demonstrado que o prognóstico favorável conferido por esta translocação não se torna desfavorável na presença de cariótipos complexos, sugerindo que a presença de translocações específicas, e não o número de anormalidades pode definir a evolução clínica (MESHINCHI e ARCECI 2007; MANOLA, 2009).

Aproximadamente 50% dos pacientes com t(8;21) sofrem recaída da doença. A presença de mutações nos genes *KIT* ou *FLT3* (duplicação interna em tandem) em pacientes com t(8;21) parece conferir prognóstico desfavorável a esses pacientes (MANOLA, 2009).

As anormalidades secundárias à t(8;21) mais frequentes são a perda do cromossomo Y no sexo masculino e do cromossomo X inativo no sexo feminino, além da deleção no braço longo do cromossomo 9 (del 9q) (BAIN, 2010).

A perda do cromossomo Y nos homens é mais frequente do que a perda do cromossomo X nas mulheres (HEEREMA e RAIMONDI, 2013). A perda do cromossomo sexual como anormalidade cromossômica adicional não confere prognóstico adverso e tem sido relatado que a perda de um cromossomo sexual no grupo de pacientes com t(8;21) determina um

subgrupo com evolução excepcionalmente favorável (MANOLA, 2009). A figura 2 representa a translocação entre os cromossomos 8 e 21, além de uma deleção no braço longo do cromossomo 9, deleção no braço longo do cromossomo 11 e perda do cromossomo sexual Y.

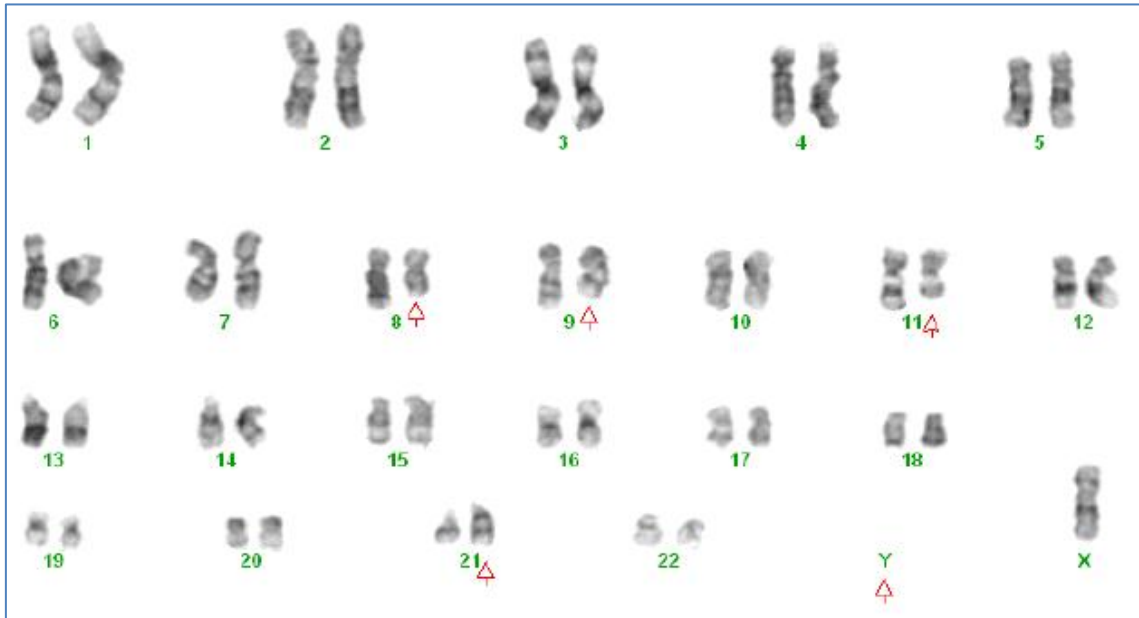


Figura 2: Translocação entre os cromossomos 8 e 21; $t(8;21)(q22;q22)$, além de outras anormalidades citogenéticas envolvendo os cromossomos 9, 11 e Y. Este cariótipo pertence ao paciente de número 28 da casuística deste estudo.

Trissomia do cromossomo 8 (+8)

A trissomia do cromossomo 8 (+8) é encontrada em aproximadamente 5% a 10% das crianças com LMA, com maior incidência em pacientes portadores de síndrome de Down. O significado prognóstico desta alteração numérica é controverso, tendo sido relatado que +8 só possui valor prognóstico quando encontrado como alteração secundária em casos agressivos. Outros autores demonstraram que +8 é marcador de mau prognóstico, independentemente de aparecer como alteração primária ou não (MANOLA, 2009).

del(9q)

A deleção no braço longo do cromossomo 9 (9q), ocorre em uma frequência inferior a 4,6%, envolvendo principalmente as regiões q21.32–q21.33. Essa alteração tem sido observada nos subtipos FAB M2 e M4 representando, fator de prognóstico desfavorável, quando encontrada como a única alteração existente no cariótipo (MANOLA, 2009).

Rearranjos em 11q23

As translocações envolvendo a região q23 (do braço longo do cromossomo 11) resultam no rearranjo do gene *MLL*, ocorrendo em aproximadamente 14% a 22% dos pacientes pediátricos com LMA, principalmente nos subtipos M4 e M5. Entretanto, o significado prognóstico desta alteração ainda não está claro (MANOLA, 2009).

Os rearranjos cromossômicos envolvendo o gene *MLL* incluem translocações balanceadas e não balanceadas, inversões, inserções, entre outros. Tais mecanismos genéticos convertem *MLL* em um fator de transcrição quimérico com propriedades leucemogênicas. A duplicação parcial em tandem de *MLL* (*MLL-PDT*) ocorre em aproximadamente 10% dos casos pediátricos, particularmente em pacientes com trissomia do cromossomo 11 ou cariótipo normal, sendo indicadora de mau prognóstico (HEEREMA e RAIMONDI, 2013).

Estudo com 208 pacientes pediátricos demonstrou que, excluída a t(9;11), a identificação de anormalidades em 11q23 [t(6;11) e t(10;11)] aumentou o risco de recaída, mesmo em pacientes com excelente resposta inicial ao tratamento (KAROL *et al.*, 2015).

t(9;11)(p22;q23)/*MLL-AF9*

A t(9;11) é a mais frequente translocação envolvendo o cromossomo 11 na região q23 em pacientes pediátricos (6% a 11%), sendo mais comumente observada no subtipo FAB M5. Nessa alteração, ocorre a fusão dos genes *MLL*, situado no braço longo do cromossomo 11 (11q23) e *AF9* localizado no braço curto do cromossomo 9 (9p22), estando ainda em discussão o valor prognóstico desse rearranjo. A maioria dos estudos considera a t(9;11) como indicadora de prognóstico favorável, quando esta é encontrada como única alteração. Entretanto, se estiver associada a outras anormalidades cromossômicas e/ou a um subtipo diferente de FAB M5, o prognóstico é considerado adverso. A alteração adicional mais comum é a presença de um cromossomo 8 extra (+8) (MANOLA, 2009; CREUTZIG *et al.*, 2012; KAROL SE *et al.*, 2015). A Figura 3 representa a translocação entre o braço curto do cromossomo 9 e o braço longo do cromossomo 11.



Figura 3: translocação entre os cromossomos 9 e 11; t(9;11)(p22;q23). Este cariótipo pertence ao paciente de número 14 da casuística deste estudo.

t(15;17)(q22;q21)/PML/RARA

A translocação entre os cromossomos 15 e 17 é característica do subtipo M3 (leucemia promielocítica aguda). O gene de fusão resultante dessa translocação é denominado *PML/RARA*, caracterizado por uma translocação balanceada entre os cromossomos 15 (região q22) onde está localizado o gene *PML* e 17 onde está localizado o gene *RARA* (região q11-q21) (MANOLA, 2009). Essa alteração pode ser detectada por citogenética convencional em mais de 90% dos casos de LMA- M3 (HEEREMA e RAIMONDI, 2013; BAIN, 2010). A LMA-M3 ocorre em uma frequência de 2% a 10% dos pacientes pediátricos (predominantemente em crianças mais velhas), é um pouco mais frequente no sexo feminino e foi observada em uma proporção maior em países da América Central, América do Sul e Itália (MANOLA, 2009). Outras translocações menos comuns envolvendo o gene *RARA* podem resultar também na leucemia promielocítica aguda, ocorrendo em aproximadamente 1% dos pacientes. A translocação variante mais frequente é a t(11;17)(q23;q21)/*PLZF-RARA*, resultando em uma resistência parcial ao ATRA nestes pacientes (HEEREMA e RAIMONDI, 2013).

Com relação às alterações adicionais, a mais comum é a presença de um cromossomo 8 adicional e, menos frequente, o isocromossomo de 17, i(17q) (MANOLA, 2009). Mutações em *FLT3* (tanto duplicação interna em tandem, quanto no domínio quinase) têm sido

observadas em até 40% dos pacientes, estando associadas com contagens altas de glóbulos brancos. Entretanto, não existe nenhuma ligação clara entre a presença de mutações em *FLT3* e o desfecho da doença (HEEREMA e RAIMONDI, 2013). A Figura 4 representa a translocação entre os braços longos dos cromossomos 15 e 17.

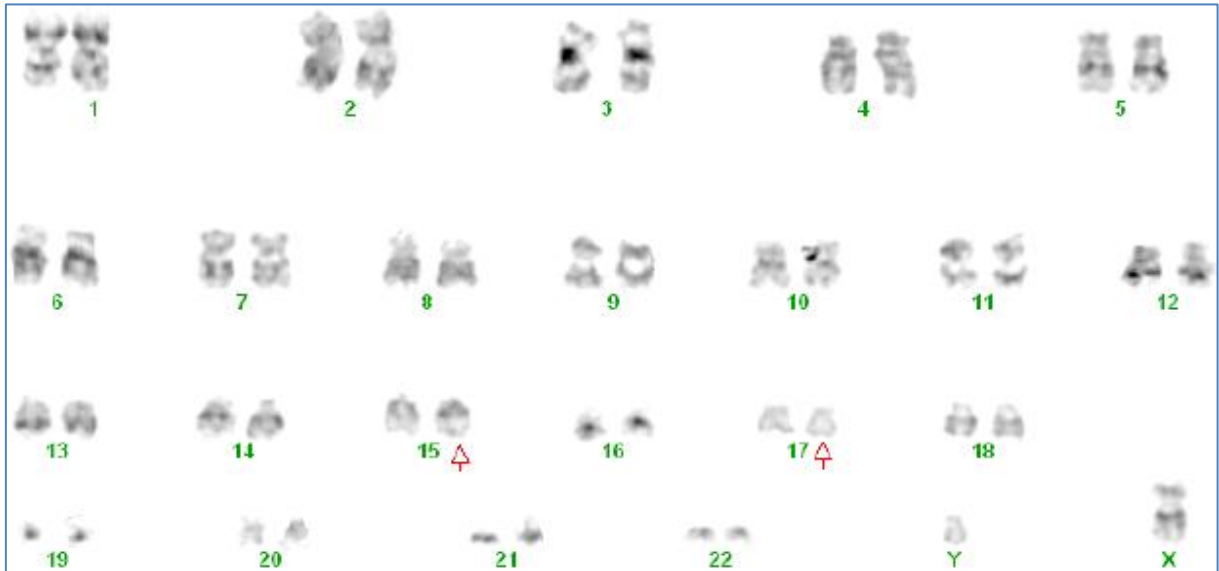


Figura 4: Translocação entre os cromossomos 15 e 17; $t(15;17)(q22;q21)$. Este cariótipo pertence ao paciente de número 59 da casuística deste estudo.

inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)/CBFB-MYH11

A inversão/ translocação do cromossomo 16 é mais característica na LMA M4Eo, mas também podem ocorrer nos subtipos M0, M1, M2 e M5. Esses eventos resultam no gene de fusão *CBFB-MYH11*. O gene *CBFB* se localiza no braço longo do cromossomo 16 na região q22, enquanto o gene *MYH11* se localiza no mesmo cromossomo, porém no braço curto na região p13 (MANOLA, 2009).

A frequência dessas anormalidades na população pediátrica varia entre 3% a 8%, caracterizando bom prognóstico, com uma taxa de remissão na indução significativamente melhor e maior taxa de sobrevivência global se comparados a pacientes com cariótipo normal (MANOLA, 2009; CREUTZIG *et al.*, 2012).

É uma alteração para a qual se observa maior dificuldade de detecção pela citogenética convencional em metáfases de baixa qualidade, podendo ser utilizados, para tal, métodos de citogenética molecular (FISH) e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (MANOLA, 2009).

Os rearranjos adicionais que ocorrem mais comumente envolvem o braço longo do cromossomo 7(7q), e cromossomos adicionais como +22 e +8 (MANOLA, 2009). A detecção da trissomia do cromossomo 22 em um paciente em que a inversão do cromossomo 16 parece estar ausente se torna indicativo para análise molecular do gene de fusão *CBFB-MYH11* que pode estar presente. No que diz respeito a alterações moleculares secundárias a esta inversão, podemos encontrar mutações no gene *KIT* em um número considerável de pacientes (BAIN, 2010).

Trissomia do cromossomo 21 adquirida (+21)

A trissomia do cromossomo 21 (+21) adquirida como única alteração ocorre em aproximadamente 1,5% a 4,6% dos casos de LMA infantil, sendo mais frequente no subtipo M7 (23% a 43%) em pacientes não portadores da síndrome de Down. Pode ser observada associada com rearranjos citogenéticos recorrentes tais como t(8;21) e t(15;17), representando prognóstico intermediário (MANOLA, 2009).

Cariótipo normal

A frequência do cariótipo normal em pacientes pediátricos com LMA varia entre 15% e 30%, sendo considerada pequena se comparada à observada em pacientes adultos, que apresentam cerca de 40% a 47% dos casos com cariótipo normal (MANOLA, 2009; CREUTZIG *et al.*, 2012).

Os pacientes que apresentam cariótipo normal apresentam prognóstico variável e são alocados no grupo de risco intermediário. Apesar da citogenética convencional não detectar qualquer rearranjo cromossômico, estes pacientes podem apresentar alterações moleculares como mutações nos genes *FLT3-ITD*, encontradas em aproximadamente 20% a 25% dos pacientes pediátricos, indicando mau prognóstico; nos genes *MLL-PDT*, que confere pior prognóstico com diminuição da sobrevida global e sobrevida livre de eventos; e mutações no gene *NPM1*, que podem ser encontradas em cerca de 20% a 30% dos pacientes pediátricos, conferindo bom prognóstico. O impacto favorável causado pela mutação no gene *NPM1* pode ser comparado ao impacto favorável da t(8;21) e inv(16), desde que esta não venha associada à mutação no gene *FLT3* (MANOLA, 2009).

Cariótipos complexos

Os cariótipos complexos podem ser definidos pela presença de três ou mais alterações citogenéticas. Esse tipo de alteração é mais frequente nos pacientes adultos do que nos pediátricos e tem sido considerado como indicador de prognóstico desfavorável (MANOLA, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação das alterações citogenéticas com as características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mielóide aguda (LMA) atendidas no Serviço de Hematologia do HC-UFMG.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as alterações citogenéticas observadas nas crianças e adolescentes com LMA atendidas no Serviço de Hematologia do HC-UFMG;
- Classificar a LMA de acordo com as classificações FAB e OMS-2008;
- Avaliar o prognóstico das crianças e adolescentes com LMA de acordo com as características clínicas e as alterações citogenéticas.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. PACIENTES

A população estudada consistiu de pacientes com idade entre zero e 16 anos, com diagnóstico de LMA, atendidos no HC-UFMG (Hospital das Clínicas-UFMG), no período de janeiro de 2004 a março de 2015.

Critérios de inclusão:

- Pacientes com até 16 anos de idade no momento do diagnóstico de LMA.
- Pacientes que apresentassem diagnóstico de LMA estabelecido pelo mielograma, realizado em laboratório do HC-UFMG.

Critérios de exclusão:

- Pacientes que não concordassem em participar do estudo.
- Pacientes cuja ausência de dados em prontuário médico ou arquivos laboratoriais impedisse as análises previstas no estudo.

3.2. COLETA DOS DADOS LABORATORIAIS E CLÍNICOS

Os pacientes foram identificados inicialmente por meio de busca nos registros dos arquivos de laudos de mielograma do Setor de Hematologia do Laboratório Central do HC-UFMG. Para os pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram consultados os laudos dos exames de imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular disponíveis nos arquivos referentes aos respectivos setores.

Os dados relativos aos mielogramas e imunofenotipagem, realizados entre 2004 e 2010, foram obtidos por meio da pesquisa de seus laudos arquivados no Setor de Hematologia do Laboratório Central do HC-UFMG. Para pacientes diagnosticados a partir de 2011, os dados foram acessados no programa Matrix, utilizado no Laboratório Central para registro e arquivo digital de resultados de exames laboratoriais.

Os dados de citogenética e biologia molecular foram obtidos nos programas Matrix e Citogen.

Os dados clínicos e laboratoriais foram extraídos dos prontuários médicos.

Foram avaliados os seguintes dados demográficos, clínicos e laboratoriais referentes ao momento do diagnóstico: idade, gênero, classificação morfológica da doença, leucometria inicial, imunofenótipo, citogenética, exames moleculares, protocolo de tratamento utilizado.

Os dados referentes à evolução dos pacientes foram: data e local da primeira recidiva, data e causa do óbito, situação da criança no momento da análise dos dados (vivo e em remissão, nova recidiva ou óbito).

Todas as informações foram organizadas em um banco de dados específico utilizando-se os programas Excel e SPSS, versão 17.0.

3.3. DEFINIÇÃO DO DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

De acordo com a rotina do Serviço de Hematologia do HC-UFMG, o diagnóstico de LMA é estabelecido inicialmente por meio de análise morfológica dos blastos presentes na medula óssea (mielograma) ou sangue periférico, complementada por exames de imunofenotipagem por citometria de fluxo, cariotipagem e biologia molecular.

Os exames relatados na metodologia têm protocolos padronizados por cada setor do Laboratório Central do HC-UFMG e fazem parte da rotina de acompanhamento dos pacientes do Serviço de Hematologia.

Mielograma: O procedimento foi realizado pela equipe do Serviço de Hematologia do HC-UFMG, sob sedação, em bloco cirúrgico, ou usando-se anestesia local. Após a

realização da punção óssea, seguida de aspiração, foram feitos esfregaços, posteriormente, corados com May-Grünwald-Giemsa e observados ao microscópio óptico. Este exame tem como finalidade a análise quantitativa e qualitativa das diversas linhagens hematopoiéticas.

Imunofenotipagem por citometria de fluxo: Para realização da imunofenotipagem (IMF) foi utilizado o material obtido pela punção aspirativa da medula óssea. Na impossibilidade de obtenção desse material, a IMF foi realizada utilizando-se sangue periférico, caso houvesse presença de blastos no mesmo. Os exames foram executados pela equipe de citometria de fluxo do Serviço de Hematologia do HC-UFMG. A combinação de diversos anticorpos monoclonais para antígenos celulares (membrana e citoplasma), definidos de acordo com os protocolos do serviço, permitiu a identificação de populações celulares específicas.

Citogenética: A citogenética clássica, utilizada no diagnóstico dos pacientes deste estudo, é caracterizada pela obtenção de cromossomos através de cultura celular, sendo a metáfase a fase do ciclo celular ideal para análise, pois os cromossomos se encontram mais condensados. O exame tem como finalidade detectar possíveis alterações estruturais e/ou numéricas nos cromossomos. Para a pesquisa de células neoplásicas foram utilizados, como material para cultura, medula óssea ou sangue periférico, caso houvesse blastos no mesmo. O tempo de cultura variou de 3,5 horas (protocolo de cultura direta) a 24 horas, em estufa de CO₂, a 37°C. Após a cultura, o material passou por processo de fixação citológica, preparação das lâminas, bandeamento e coloração e, finalmente, análise em microscópio óptico com imersão. Para análise do cariótipo foi utilizado a coloração por bandeamento G. Para tal utiliza-se tripsina e, para coloração, Giemsa. Este bandeamento produz bandas longitudinais claras e escuras permitindo a identificação de cada par cromossômico, já que esses possuem um padrão de bandas específico.

A nomenclatura utilizada para elaboração dos cariótipos seguiu as regras do Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (ISCN 1995 - 2013).

Em caso de cariótipo normal, foram analisadas trinta metáfases. Quando o cariótipo apresentava alguma alteração estrutural e/ou numérica, vinte metáfases foram analisadas para definição dos clones. Um clone, do ponto de vista citogenético, é definido como a observação da mesma alteração estrutural em pelo menos duas metáfases ou da mesma alteração numérica em pelo menos três metáfases. Excepcionalmente, quando o

crescimento celular não foi satisfatório, mas foram identificadas alterações bem definidas ou ausência dessas, os resultados foram liberados mesmo com número inferior de metáfases analisadas em relação ao preconizado. Os exames foram executados pela equipe do Setor de Citogenética do Laboratório Central do HC-UFMG.

A mestranda participou da execução dos exames de citogenética, como bióloga do setor de citogenética do laboratório Central do HC-UFMG, no período de 2013 a 2015.

Biologia Molecular: Os testes moleculares foram realizados pela equipe do Setor de Hematologia molecular do Laboratório Central do HC-UFMG, utilizando a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). Para tal, foram utilizadas amostras de medula óssea ou sangue periférico, com o objetivo de identificar a presença de genes de fusão (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *BCR-ABL* e *PML-RARA*) e a duplicação interna em tandem do gene *FLT3(DIT-FLT3)*.

3.4.CLASSIFICAÇÃO DA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

3.4.1. CLASSIFICAÇÃO DO GRUPO FRANCO-AMERICANO-BRITÂNICO (FAB)

Para definição do diagnóstico de LMA e classificação morfológica, o Serviço de Hematologia do HC-UFMG adota os critérios do Grupo Franco-Britânico-Americano (FAB). De acordo com essa classificação, o diagnóstico de LMA é caracterizado pela presença, em medula óssea, de pelo menos 30% de blastos mieloides. A classificação FAB inclui oito subtipos, conforme detalhado no Quadro 1 (KASPERS e ZWAAN, 2007).

Quadro 1: Classificação do Grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) para as leucemias agudas de linhagem mieloide

Subtipo	Descrição
M0	Leucemia mieloide aguda com mínima evidência de diferenciação mieloide
M1	Leucemia mieloide aguda sem maturação
M2	Leucemia mieloide aguda com maturação
M3	Leucemia promielocítica aguda
M4	Leucemia mielomonocítica aguda
M5	Leucemia aguda monoblástica e monocítica
M6	Leucemia mieloide aguda com diferenciação eritróide predominante
M7	Leucemia megacarioblástica aguda

Os pacientes com diagnóstico de LMA para os quais não foi identificada a classificação FAB, devido à ausência dessa informação nos laudos ou indisponibilidade dos prontuários, tiveram como código de identificação no banco de dados o número 9.

3.4.2. CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM AS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E MOLECULARES

Para fins da classificação de acordo com a citogenética clássica, os pacientes com cariótipo complexo, ou seja, com presença de três ou mais alterações, que apresentavam anormalidades recorrentes ou relacionadas com mielodisplasia foram classificados nas categorias específicas para essas alterações (códigos 3,4,5,6,7,8,9). Pacientes com cariótipo complexo, mas sem essas anormalidades específicas, foram incluídos no grupo com código 9 (outras alterações cromossômicas). As alterações citogenéticas foram descritas e codificadas no banco de dados, conforme relacionadas no Quadro 2.

Quadro 2: Alterações citogenéticas relacionadas à leucemia mieloide aguda observadas nos pacientes do Serviço de Hematologia do HC-UFMG

Código	Descrição
1	Ausência de crescimento celular
2	Cariótipo normal
3	t(15;17)(q22;q21)
4	t(8;21)(q22;q22)
5	inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)
6	t(9;11)(p22;q23)
7	LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13)
8	Alterações cromossômicas relacionadas com mielodisplasia: -5/del (5q), -7/del (7q), del (11q), del (12p)/t(12p), del (13q)
9	Outras alterações cromossômicas
10	Sem cariótipo

As alterações moleculares foram inseridas no banco de dados de acordo com a positividade para as alterações testadas, ou seja, a presença de genes de fusão (*AML1-ETO*, *CBFB-MYH11*, *BCR-ABL*, *PML-RARA*) e a *DIT-FLT3*.

3.4.3. CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS-2008)

Os pacientes foram classificados, retrospectivamente, de acordo com a Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS-2008), que utiliza como critérios o imunofenótipo, alterações cromossômicas, alterações moleculares e dados clínicos, conforme a seguinte codificação, detalhada no quadro 3.

Conforme preconizado na classificação OMS-2008, foram considerados cariótipos complexos aqueles com mais de três alterações não relacionadas, nenhuma das quais incluídas no subgrupo “LMA com alterações genéticas recorrentes”. Os casos com presença de cariótipos complexos, de acordo com essa definição, foram alocados no grupo com “alterações relacionadas com mielodisplasia”, de acordo com os critérios estabelecidos na referida classificação (VARDIMAN *et al.*, 2009; SANDAHL *et al.*, 2015).

Os pacientes com cariótipo normal e com exames moleculares não disponíveis ou avaliáveis ou que não apresentaram resultado positivo para as alterações moleculares testadas foram classificados segundo a classificação OMS-2008 no grupo “sem outra especificação” (SOE).

A presença de *DIT-FLT3* não foi utilizada para classificação dos pacientes, em conformidade com os critérios da classificação OMS-2008. Pacientes com translocações recorrentes em associação à *DIT-FLT3* foram classificados de acordo com essas translocações (VARDIMAN *et al.*, 2009 ; SANDAHL *et al.*, 2015).

Não foram classificados os pacientes que não dispunham do exame de citogenética convencional porque o mesmo não foi realizado no momento do diagnóstico ou porque não houve crescimento celular e para os quais também não havia resultado de exames moleculares. Esses pacientes foram agrupados na categoria “sem classificação” (código 8).

3.5.PROTOCOLO DE TRATAMENTO

O Serviço de Hematologia adotou diferentes protocolos para tratamento da LMA ao longo dos anos, sendo que, no período de 2004 a novembro de 2007, foi utilizado o protocolo BFM-83 modificado (GMTLMAI) baseado no protocolo do grupo cooperativo alemão Berlim-Frankfurt-Munich de 1983 (CREUTZIG U *et al.*, 1990, VIANA *et al.*, 2003). Em dezembro de 2007 foi implementado o uso do protocolo NOPHO-93 (Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology) (LIE *et al.*, 2005).

Para o tratamento da leucemia promielocítica aguda (LMA-M3), até agosto de 2007 não havia protocolo padronizado, no entanto, conforme preconizado na literatura, os regimes terapêuticos incluíam o uso do ATRA, citarabina e antracíclico (daunomicina). A partir de setembro de 2007, foi implementado o protocolo ICP-LPA/APL2006 (REGO *et al.*, 2013).

Quadro 3: Codificação para a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS-2008) para a leucemia mieloide aguda (LMA)

Código	Descrição
1	LMA com anormalidades genéticas recorrentes
2	LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia**
3	Neoplasias mieloides relacionadas com terapia
4	LMA sem outra especificação (SOE)
5	Leucemia Aguda de linhagem Ambígua
6	Sarcoma mieloide
7	LMA associada à síndrome de Down
8	Sem classificação por ausência de dados que permitissem realizá-la

* As alterações genéticas e moleculares que integram cada entidade da classificação OMS-2008 para LMA estão detalhadas na tabela 2 (adaptada de VARDIMAN *et al.*, 2009 e ZERBINI *et al.*, 2011).

**As alterações relacionadas com mielodisplasia consideradas neste estudo foram somente as anormalidades citogenéticas relacionadas com mielodisplasia. Não foram avaliados critérios morfológicos.

3.6.MÉTODOS ESTATÍSTICOS

A estatística descritiva foi obtida pela avaliação das frequências absolutas e relativas, médias e desvios padrão.

O método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar a sobrevida global (SGLO) e a sobrevida livre de eventos (SLE). Para estimar a SGLO, foi considerado evento o óbito, independente da causa. Para estimar a SLE, foram considerados eventos o óbito ou a recidiva da doença. Foram censurados na data da análise dos resultados os pacientes que não sofreram qualquer evento. Os pacientes que abandonaram o tratamento ou acompanhamento, sem relato de recidiva da doença ou óbito, foram censurados na data da última consulta no serviço de hematologia. O teste de logrank foi utilizado para comparação entre as curvas de sobrevida.

O modelo de Cox foi utilizado na análise multivariada. Os resultados foram apresentados como razão de risco, sendo fornecidos os intervalos de confiança a 95%. Os testes de significância basearam-se na estatística de verossimilhança (teste de Wald).

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa SPSS, versão 17.0. Foi considerado como estatisticamente significativo o valor de $p \leq 0,05$.

3.7.ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pela Câmara do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG (Parecer nº81/2013), pela Diretoria de Ensino e Pesquisa do Hospital das Clínicas da UFMG e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP – UFMG/Parecer nº CAAE-31579014.3.0000.5149).

Mesmo tratando-se de estudo retrospectivo, os pacientes que ainda estavam em acompanhamento no Serviço de Hematologia do HC-UFMG foram admitidos no estudo após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, elaborado de acordo com a faixa etária dos pacientes.

Os exames relatados na metodologia têm protocolos padronizados por cada laboratório e fazem parte da rotina de acompanhamento dos pacientes do Serviço de Hematologia. Não houve modificações, por motivo da pesquisa, no esquema terapêutico utilizado.

4. RESULTADOS

4.1.CARACTERIZAÇÃO GERAL DA CASUÍSTICA

No período de janeiro de 2004 a junho de 2015, 99 pacientes com idades entre 0 e 16 anos foram diagnosticados com LMA no Serviço de Hematologia do HC-UFMG. Apenas um paciente foi excluído do estudo, pois era proveniente de outro serviço, com tratamento já iniciado e tendo dois exames morfológicos realizados, porém com resultados discordantes.

Todos os demais pacientes atendiam aos critérios de inclusão no estudo, totalizando então 98 pacientes incluídos no mesmo. A caracterização geral da casuística está representada na Tabela 8.

O tempo de seguimento variou de um dia a 12,2 anos (mediana -2,3 anos).

Na população estudada 51% dos casos correspondiam a pacientes do sexo feminino (50/98). A idade ao diagnóstico variou de 2 meses a 16 anos (mediana de 7,64 anos). A distribuição dos pacientes quanto à faixa etária está representada na Figura 5.

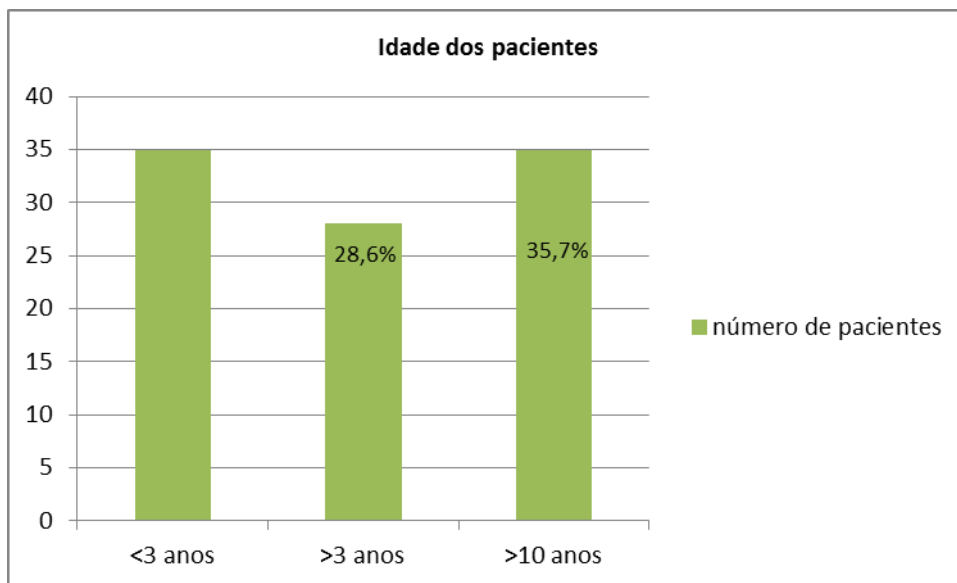


Figura 5: Distribuição de acordo com a faixa etária dos 98 pacientes diagnosticados com LMA, no período de janeiro de 2004 a junho de 2015, no serviço de Hematologia do HC-UFMG

4.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS

Os resultados referentes à contagem global de leucócitos ao diagnóstico foram obtidos para 93 dos 98 pacientes, não estavam disponíveis para cinco pacientes devido a problemas relacionados aos prontuários médicos. A leucometria inicial variou de $740/\text{mm}^3$ a $218.000/\text{mm}^3$ (média de $3.440/\text{mm}^3$ e mediana de $10.780/\text{mm}^3$). A distribuição dos pacientes quanto à leucometria inicial está representada na Figura 6.

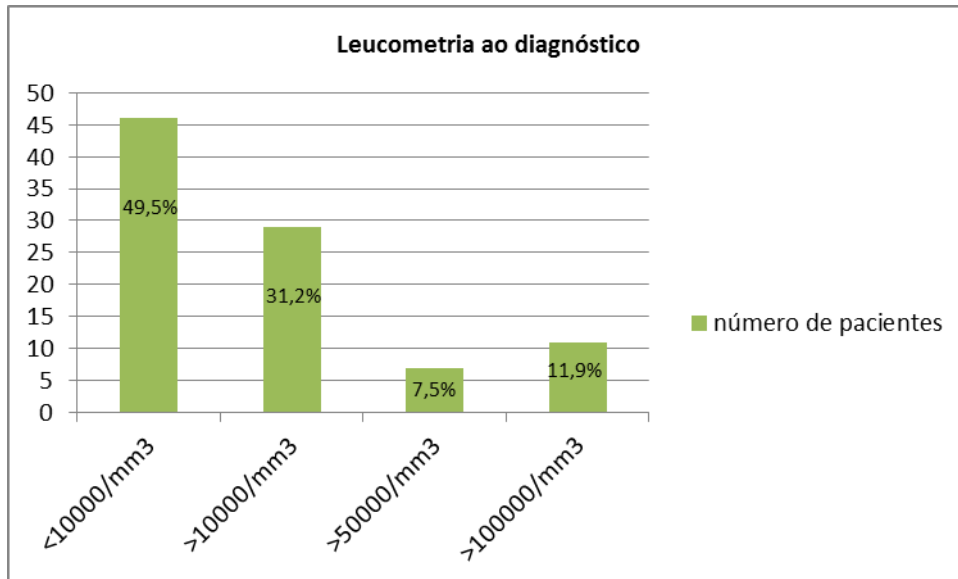


Figura 6: Leucometria inicial de 93 dos 98 pacientes diagnosticados com LMA no serviço de Hematologia do HC-UFMG no período de janeiro de 2004 a junho de 2015

Para o diagnóstico foi realizada, inicialmente, análise morfológica, que permitiu a classificação da leucemia segundo critérios da classificação FAB (Franco-Americana-Britânica). Foram obtidos os dados, referentes a essa classificação, para 96 dos 98 pacientes, conforme distribuição apresentada na Tabela 3. Para dois pacientes essa informação não foi encontrada devido a problemas com os prontuários médicos.

Tabela 3: Distribuição de acordo com a classificação FAB (Franco-Americana-Britânica) dos 98 pacientes diagnosticados com LMA no serviço de Hematologia do HC-UFMG entre janeiro de 2004 e junho de 2015

Classificação FAB (subtipos)	Número de pacientes (%)
MO	4 (4,1)
M1	6 (6,1)
M2	21 (21,4)
M3	33 (33,7)
M4	12 (12,3)
M5	8 (8,2)
M6	2 (2,0)
M7	10 (10,2)
Sem dados	2 (2,0)
Total	98(100)

Com relação à imunofenotipagem por citometria de fluxo, para três dos 98 pacientes estudados, o exame não foi realizado e para nove pacientes esses dados não foram encontrados nos registros consultados. Portanto, dados imunofenotípicos foram obtidos para 86 casos, corroborando em todos eles o diagnóstico citomorfológico de LMA.

Dos quatro casos de LMA-M0, dois foram confirmados pela imunofenotipagem. Nos outros dois casos a imunofenotipagem por citometria de fluxo diagnosticou a LMA, mas a informação com relação ao subtipo não foi encontrada nos prontuários. Os dois casos com diagnóstico de LMA-M6 apresentaram imunofenotipagem compatível com o diagnóstico citomorfológico. Dos 10 pacientes diagnosticados com LMA-M7, oito foram confirmados pela imunofenotipagem, em um caso essa informação não foi encontrada e, em outro, de um paciente com síndrome de Down, a imunofenotipagem não permitiu a confirmação, pois não houve marcação para CD61 e não foram testados CD41a e CD42b.

No que diz respeito ao estudo molecular, do total de 98 pacientes, 16 (16,3%) não possuíam exame molecular ao diagnóstico e três (3,1%), foram considerados não avaliáveis, devido à impossibilidade de amplificar o DNA/cDNA. Portanto, foram obtidos resultados para 79 (80,6%) pacientes. Em 43 destes casos, não foram detectados/ observados os genes de fusão testados, nem a *DIT-FLT3* (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição dos pacientes diagnosticados com LMA no serviço de Hematologia do HC-UFMG de acordo com a presença da *DIT-FLT3* e dos genes de fusão testados no período de janeiro de 2004 a junho de 2015

Genes de fusão e mutações em genes específicos (+)	Número de pacientes
<i>PML-RARA</i>	25
<i>CBFB-MYH11</i>	3
<i>AML1-ETO</i>	3
<i>BCR-ABL</i>	0
<i>DIT-FLT3</i>	3
<i>PML-RARA e DIT-FLT3</i>	2
Total	36

4.2. ANÁLISE CITOGENÉTICA E CLASSIFICAÇÃO

Os resultados relativos aos exames de citogenética foram encontrados para 90 dos 98 pacientes, pois oito destes casos não possuíam cariótipo ao diagnóstico. Quando avaliados os 90 pacientes com resultados dos exames de citogenética, em 10 casos (11,1%) não houve crescimento celular, impossibilitando, portanto, a obtenção de metáfases para análise cromossômica. Dessa forma, os cariótipos puderam ser avaliados em 80 (88,9%) dos pacientes incluídos no estudo.

Destes 80 pacientes, 17 (21,3%) apresentaram cariótipo normal e 63 (78,6%) apresentaram alguma alteração cromossômica.

No que diz respeito aos 63 pacientes com rearranjos cromossômicos, destes, 17 (27%) apresentaram cariótipos complexos, e 46 (73%) pacientes apresentaram uma única alteração cromossômica ou até duas alterações em seus cariótipos.

Com relação aos pacientes com cariótipos normais, um apresentou mutação em *FLT3*, quatro não possuíam exame molecular, cinco apresentaram o gene de fusão *PML-RARA* e sete pacientes não apresentaram positividade para nenhuma mutação e genes de fusão testados.

Para 86 dos 98 casos incluídos neste estudo foi possível a obtenção de dados que permitiram a sua classificação de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS-2008). Em 12 casos não havia disponibilidade de dados relativos ao estudo citogenético ou molecular que possibilitassem essa classificação.

Na Tabela 5, estão detalhadas as características dos 86 pacientes classificados de acordo com os critérios da OMS-2008.

Quatorze pacientes preencheram os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS-2008) para definição de cariótipo complexo. Destes 14 pacientes, 13 foram categorizados no grupo “LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia”, conforme preconizado na classificação da OMS-2008, e um paciente foi incluído no grupo “LMA relacionada à síndrome de Down”.

Três pacientes que possuíam cariótipos complexos, de acordo com a definição tradicional, mas que apresentavam anormalidades genéticas recorrentes, foram alocados no grupo com alterações genéticas recorrentes, dois destes pacientes apresentaram em seus cariótipos a $t(8;21)(q22;q22)$ e um paciente apresentou a $t(15;17)$.

Tabela 5: Características dos 86 pacientes diagnosticados com LMA no serviço de Hematologia do HC-UFMG, no período de janeiro de 2004 a junho de 2015, classificados segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS-2008) (VARDIMAN *et al.*, 2009)

OMS-2008	nº de pacientes (%)	idade(variação)	leucometria(variação)	FAB: M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	S/C
LMA com anormalidades genéticas recorrentes 45 (52,3)												
t(8;21)(q22;q22) ou <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	9	12,39 (5,49-15,9)	12645 (1200-38070)			9						
inv(16)(p13.1q22)/ <i>CBFB-MYH11</i>	3	8,21 (3,34-14,48)	44635 (2060-87210)					3				
t(15;17)(q22;q21); <i>PML-RARA</i>	29	8,99 (1,32-16,06)	4420 (740-192170)				29					
t(9;11)(p22;q23)	2	1,34 (1,18-1,5)	102355 (4090-200620)					1	1			
LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13)	2	0,65 (0,49-0,82)	10790 (9920-11660)									2
LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia 16 (18,6)												
-7/del(7q)	4	7,24 (4,33-11,62)	9585(2260-35500)	1				3				
-5/del(5q)	2	13,42 (13,16-13,68)	3400 (1250-5550)	1								1
del(11q)	5	1,25 (0,34-1,91)	39200 (19200-198000)			1		1	3			
-13/del(13q)	1	1,66	24850						1			
del(12p) ou t(12p)	1	1,97	4500						1			
LMA secundária a SMD	1	2,38	23000									1
Cariótipo complexo	2	3,74 (0,3-7,17)	7010 (1310-12710)			1						1

OMS-2008	nº de pacientes (%)	idade(variação)	leucometria(variação)	FAB: M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	S/C
SOE (sem outra especificação)	19 (22)											
Cariótipo normal	11	9,3 (0,21-15,74)	32875 (800-144900)	1	1	3	2*	2			2	
Alterações diversas	8	1,85 (0,19-13,45)	11600 (1150-180000)		3	2	1**				1	1
LMA relacionada à síndrome de Down	6 (7)											
Cariótipo normal	1	1,5	21200									1
Alterações cromossômicas numéricas ***	2	2,04 (1,58-2,5)	8245 (7690-8800)								1	1
Sem cariótipo ao diagnóstico	1	1,67	31300			1						
Ausência de crescimento celular	1	2,56	40540									1
Alteração cromossômica estrutural****	1	1,68	11200					1				

Idade (variação): mediana da idade ao diagnóstico (variação da idade ao diagnóstico em anos) Leucócitos (variação): Mediana da contagem de leucócitos ao diagnóstico (variação da contagem de leucócitos ao diagnóstico em mm³).

*pacientes classificados de acordo com a classificação FAB com o subtipo M3, sendo agrupados em (SOE), pois, um paciente apresentou cariótipo normal e não possuía exame molecular e o outro paciente apresentou cariótipo normal e exame molecular (*PML-RARA*) negativo.

**paciente classificado de acordo com a classificação FAB com o subtipo M3, apresentou cariótipo tetraploide e exame molecular não avaliável.

*** dois pacientes apresentaram além do cromossomo 21 adicional de origem constitucional, cromossomos extras. Um paciente apresentou, +8,+21 e o outro +19, +21 e +22.

**** paciente com der(22)t(1;22)(q25;q13), além do cromossomo 21 adicional de origem constitucional.

4.3. TRATAMENTO

A distribuição dos pacientes, conforme os protocolos de tratamento utilizados, está detalhada na Tabela 6.

Tabela 6: Distribuição dos 98 pacientes diagnosticados com LMA no serviço de Hematologia do HC-UFG, no período de janeiro de 2004 a junho de 2015, de acordo com os protocolos de tratamento utilizados

Protocolos de tratamento	Número de pacientes (%)
BFM-83	21 (21,5)
NOPHO-93	39 (39,8)
LMA-M3 sem protocolo definido	9 (9,2)
ICP-LPA/APL2006	23 (23,5)
Sem tempo para tratamento *	2 (2,0)
Sem proposta terapêutica **	2 (2,0)
Ausência de dados	2 (2,0)
Total	98 (100)

*Pacientes cujo óbito se deu antes do início do tratamento.

**Pacientes com diagnóstico de anemia de Fanconi – cuidados paliativos.

4.4. EVOLUÇÃO DOS PACIENTES

Até o momento da análise dos dados, ocorreram 51 óbitos (41 relacionados à doença e 10, em remissão). Dos dez óbitos em remissão, seis ocorreram em pacientes submetidos a tratamento com o protocolo NOPHO, correspondendo a 15,3% dos pacientes tratados por esse protocolo. Três óbitos ocorreram em pacientes submetidos ao protocolo BFM modificado, correspondendo a 14,2% desses pacientes. Um óbito de paciente com diagnóstico de leucemia

promielocítica aguda, tratado com o protocolo ICP-LPA/APL2006, foi causado por choque cardiogênico, após a consolidação.

Dos 98 pacientes estudados, seis pacientes eram portadores de síndrome de Down. Destes dois casos foram classificados como LMA-M2, um caso como LMA-M6 e três casos foram classificados de acordo com a classificação FAB como LMA-M7. Em relação a estes três pacientes, em um caso houve confirmação do subtipo M7 por meio da imunofenotipagem por citometria de fluxo, em um paciente o exame foi realizado, mas o registro do laudo não foi encontrado e em um paciente a imunofenotipagem não permitiu a confirmação desse subtipo, dois casos foram classificados como LMA-M2 e um caso como LMA-M6. As alterações observadas nos exames de citogenética dos pacientes com Síndrome de Down estão detalhadas na tabela 5. Uma paciente não possuía cariótipo ao diagnóstico de LMA-M2, mas possuía cariótipo anterior, do momento em que foi diagnosticada com síndrome mielodisplásica, apresentando uma alteração estrutural no braço curto (p) do cromossomo 5. Essa foi a única paciente com síndrome de Down que faleceu.

Três crianças apresentaram leucemia secundária à síndrome mielodisplásica, incluindo aquela que apresentava síndrome de Down, cujas características já foram descritas. Em relação aos outros dois pacientes, um desses pacientes foi classificado como LMA-M6 e o outro como LMA-M2. No que diz respeito a estes dois casos, um apresentou cariótipo complexo com alterações cromossômicas estruturais e numéricas, este paciente faleceu, e o outro possuía a $t(8;21)(q22;q22)$, estando atualmente em acompanhamento no serviço de hematologia do HC-UFMG.

Dois pacientes eram portadores de anemia de Fanconi, ambos classificados, segundo a classificação FAB, com o subtipo LMA-M4. Com relação aos cariótipos, em um dos casos não houve crescimento celular e o outro paciente apresentou em seu cariótipo alteração estrutural nos cromossomos 16, 17, presença de um cromossomo marcador e monossomia do cromossomo 7. Esses pacientes não foram submetidos a protocolos quimioterápicos, sendo realizado tratamento paliativo. Os dois pacientes faleceram.

Um paciente tinha histórico de diagnóstico de histiocitose de células de Langerhans, foi submetido a tratamento quimioterápico com etoposídeo para tratamento de episódio de reativação da doença e desenvolveu leucemia promielocítica aguda, apresentando em seu cariótipo a $t(15;17)(q22;q21)$ e positividade para o gene de fusão *PML-RARA*. Esse paciente encontra-se em remissão e em acompanhamento no Serviço de Hematologia do HC-UFMG.

Em relação a outras comorbidades, um paciente era portador de neutropenia congênita, um paciente tinha diagnóstico de esferocitose e um paciente fazia acompanhamento no Serviço de Cardiologia.

A probabilidade estimada de sobrevida global (SGLO) aos cinco anos para todo o grupo foi de 49,7% ($\pm 5,2\%$).

Não houve diferença estatisticamente significativa na probabilidade de SGLO quanto ao gênero ($p=0,98$).

Para análise da probabilidade de SGLO em relação às alterações citogenéticas observadas, foram excluídos os subtipos constatados em menos de cinco pacientes, o que torna inadequada a realização de curvas de sobrevida. Dessa forma, não foram avaliados os pacientes com $inv(16)$, $t(9;11)$ e $t(1;22)$. A probabilidade estimada de SGLO aos 5 anos para os pacientes com cariótipo normal foi de 56,6% ($\pm 12,7\%$), de 81,0% ($\pm 8,6\%$) para aqueles com $t(15;17)$, de 71,4% ($\pm 17,1\%$) para os pacientes com $t(8;21)$, de 20,5% ($\pm 12\%$) para pacientes com alterações relacionadas com mielodisplasia e de 46,9% ($\pm 13,4\%$) para o grupo com outras anormalidades ($p=0,028$).

Quando os pacientes foram analisados de acordo com a classificação da OMS-2008, a probabilidade estimada de SGLO aos cinco anos para o grupo de pacientes com anormalidades genéticas recorrentes foi de 71% ($\pm 5,8\%$), de 28,1% ($\pm 12,2\%$) para aqueles com LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia, de 36,1% ($\pm 11,2\%$) para o grupo de pacientes com LMA sem outra especificação (SOE) e de 83,3% ($\pm 15,2\%$) para os pacientes com LMA associada à síndrome de Down ($p=0,011$). Foram excluídos dessa análise os 12 pacientes que não puderam ser classificados de acordo com a classificação da OMS-2008. A classificação OMS-2008 está representada pela Figura 7.

Figura 7: Probabilidade estimada de sobrevida global para 86 crianças com leucemia mieloide aguda, de acordo com a classificação da OMS-2008 (WHO-2008)

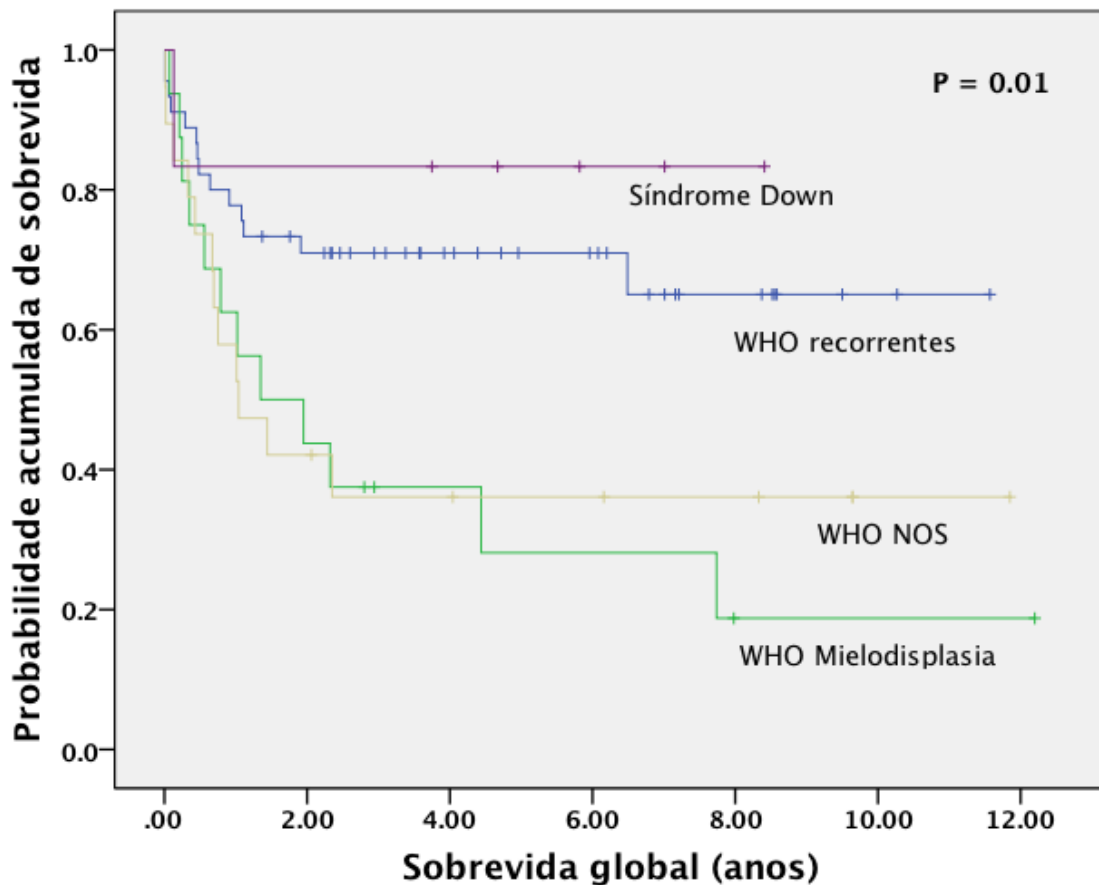


Figura 7: Pacientes analisados de acordo com a classificação da OMS-2008 (WHO-2008)

WHO recorrentes: LMA com alterações genéticas recorrentes

WHO NOS (SOE): pacientes categorizados como LMA sem outra especificação (SOE)

WHO Mielodisplasia: LMA com alterações citogenéticas relacionadas com mielodisplasia

Síndrome de Down: LMA associada à síndrome de Down

Em relação ao protocolo de tratamento empregado, foram avaliados separadamente os pacientes com diagnóstico de leucemia promielocítica aguda. A probabilidade estimada de SGLO aos cinco anos para os pacientes tratados no período anterior a agosto de 2007, quando não havia protocolo padronizado, foi de 44,4% ($\pm 16,6\%$) e de 95,7% ($\pm 4,3\%$) para os pacientes tratados com o protocolo ICP-LPA/APL2006 ($p=0,02$). Quando avaliados os demais pacientes, excluídos aqueles com leucemia promielocítica aguda, a probabilidade estimada de

SGLO aos cinco anos para os pacientes tratados com protocolo BFM modificado foi de 33,3% ($\pm 10,3\%$) e de 40,7% ($\pm 7,9\%$) para os pacientes tratados com o protocolo NOPHO ($p=0,86$).

Na categorização da variável “contagem de leucócitos ao diagnóstico”, os 86 pacientes classificados de acordo com a classificação da OMS-2008 foram divididos em dois grupos. As probabilidades estimadas de SGLO aos cinco anos para o grupo de pacientes com leucometria inicial abaixo de $100.000/\text{mm}^3$ foram de 61,9% ($\pm 5,9\%$) e de 25% ($\pm 15,3\%$) para o grupo com leucometria superior a $100.000/\text{mm}^3$ ($p=0,012$).

Na análise multivariada foram incluídas as variáveis “classificação OMS-2008” e “contagem de leucócitos ao diagnóstico <100.000 ou ≥ 100.000 leucócitos/ mm^3 ”. O modelo final dessa análise está representado na Tabela 7.

Os pacientes com LMA com “alterações relacionadas com mielodisplasia” apresentaram chance de óbito 2,97 vezes maior do que os pacientes com anormalidades recorrentes ($p=0,008$). Os pacientes da categoria sem outra especificação (SOE), em relação à categoria de base, apresentaram 2,22 vezes mais chance de óbito, porém sem significância estatística ($p=0,069$), mas com tendência para tal. Os pacientes com síndrome de Down apresentaram chance de óbito 0,58 vezes maior do que a categoria de base, porém sem significância estatística ($p=0,601$). O efeito da leucometria (superior ou inferior a $100.000/\text{mm}^3$) não é independente ($p=0,078$) da classificação OMS-2008, embora haja tendência para tal.

Tabela 7: Análise multivariada para o risco de óbito para 86 pacientes com leucemia mieloide aguda classificados de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (classificação OMS-2008)

Variável	Risco de óbito	Limite inferior*	Limite superior*	P
OMS-2008/anormalidades genéticas recorrentes**	1	–	–	–
OMS-2008/associada com mielodisplasia	2,97	1,33	6,69	0,008
OMS-2008/sem outra especificação (SOE)	2,22	0,94	5,24	0,069
OMS/síndrome de Down (sim em relação a não)	0,58	0,075	4,47	0,601
Leucócitos duas categorias (≥ 100.000 em relação à $< 100.000/\text{mm}^3$)	2,26	0,91	5,59	0,078

* Os limites inferior e superior referem-se ao intervalo de confiança de 95% para o valor de risco de óbito

** A categoria de referência no modelo multivariado foi “OMS-2008 com anormalidades genéticas recorrentes”.

A obtenção de dados que permitissem o cálculo adequado da probabilidade estimada de sobrevida livre de eventos (SLE) só foi possível para os pacientes com diagnóstico de leucemia promielocítica aguda tratados pelo protocolo ICP-LPA/APL2006. Nos demais grupos, houve grande número de pacientes classificados como refratários ao primeiro protocolo quimioterápico empregado, o que dificultou a definição do momento da recidiva. Também houve dificuldade em identificar data e local da recidiva em determinados prontuários.

Dessa forma, a probabilidade de SLE aos cinco anos para os pacientes com diagnóstico de leucemia promielocítica aguda tratados pelo protocolo ICP-LPA/APL2006 foi de 79,3% ($\pm 9,6\%$). Foram observadas quatro recidivas. Todos esses pacientes encontravam-se vivos no momento da análise dos dados. Ocorreu um óbito em remissão, após a fase de consolidação da quimioterapia, em decorrência de choque cardiogênico.

DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo contribuir para ampliação dos conhecimentos relativos ao comportamento da LMA na população pediátrica, principalmente no que diz respeito aos achados citogenéticos e ao emprego da classificação OMS-2008, já que a maioria dos estudos da literatura nacional e internacional é baseada em adultos. A importância das alterações cariotípicas como indicador prognóstico na LMA infantil tem sido reconhecida apenas recentemente devido à relativa raridade da doença (MANOLA, 2009; KAROL *et al.*, 2015).

No presente estudo foram incluídos 98 pacientes com idade ao diagnóstico até 16 anos. Apesar de relativamente pequena, essa casuística representa a experiência de 12 anos de uma instituição de referência no país para tratamento da LMA e inclui exclusivamente crianças e adolescentes. Os estudos com casuísticas mais representativas, em sua maioria, são multicêntricos e incluem também pacientes com idade superior a 18 anos (CAMPOS *et al.*, 2015; KAROL *et al.*, 2015; SANDAHAL *et al.*; 2015).

Quando este estudo é comparado a outras duas pesquisas, que tiveram como objetivo avaliar a aplicabilidade da classificação OMS-2008 em pacientes pediátricos com LMA, observa-se que um dos trabalhos era multicêntrico e incluiu 639 pacientes, provenientes de instituições dos países nórdicos e de Hong Kong, com até 18 anos de idade (SANDAHAL *et al.*; 2015). No outro estudo, realizado em um único centro de referência americano, o total de 115 pacientes é semelhante ao do presente estudo, mas a faixa etária estudada estendeu-se até 24 anos e o período de observação foi de 17 anos (DAVIS *et al.*, 2013). Também deve ser citado estudo prospectivo, multicêntrico, do grupo japonês para estudo da leucemia/linfoma na população pediátrica, que teve como objetivo esclarecer o significado clínico e prognóstico da categoria “LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia”. Para tal, foram avaliados 443 pacientes com diagnóstico de LMA e, destes, 93 foram classificados na referida categoria da classificação OMS-2008 (KINOSHITA *et al.*; 2014).

A distribuição por faixa etária no presente estudo foi semelhante à descrita na literatura, mas a mediana de idade ao diagnóstico foi inferior à relatada por DAVIS e colaboradores e outros autores, pois nestes trabalhos foram incluídos pacientes com idade igual ou superior a 18 anos (KRSTOVSKI *et al.*, 2010; DAVIS *et al.*, 2013, ROOIJ *et al.*, 2015).

Em relação à classificação FAB, houve predomínio do subtipo M3, seguido do subtipo M2. O subtipo M3 foi observado em 33,9% dos casos. A LMA-M3 ocorre em uma frequência de 2% a 10% dos pacientes pediátricos, mas há descrição de que, em pacientes de origem latina, essa frequência é mais elevada, sendo descrita em proporções de até 37,5% dos casos, em conformidade com o observado nesta casuística (REGO e JÁCOMO, 2011; ZHANG *et al.*, 2015).

No presente estudo, a avaliação do cariótipo foi possível em 80 pacientes e alguma anormalidade citogenética foi observada em 78,7% desses casos. Essa frequência foi semelhante aos relatos da literatura que descrevem presença de rearranjos cromossômicos em 70% a 80% dos casos de LMA pediátrica (CREUTZIG *et al.*, 2012; ROOIJ *et al.*, 2015).

A frequência de cariótipos normais encontrada neste estudo foi de 21,3%, (17/80 pacientes), em acordo com a frequência descrita na literatura. Pacientes com cariótipo normal podem apresentar alterações moleculares como mutações nos genes *DIT-FLT3*, *MLL-PTD* ou *NPM1* (MANOLA, 2009). Dessas alterações, apenas a presença de mutação em *DIT-FLT3* foi pesquisada nesta casuística e somente em parte dos pacientes, o que representa uma limitação do estudo.

Em relação ao estudo molecular, dos 82 pacientes testados, apenas 36 pacientes tiveram exames positivos para as alterações pesquisadas. A presença de mutação no gene *FLT3* foi identificada em cinco casos, sendo associada ao gene de fusão *PML-RARA* em dois casos. A pesquisa da *DIT-FLT3* é considerada muito importante para definição de prognóstico em pacientes com LMA. Em pacientes pediátricos, essa mutação é identificada em aproximadamente 10 a 15% dos casos, percentuais inferiores aos 20 a 30% observados em pacientes adultos (ZWAAN *et al.*, 2003). Na maioria dos estudos, são descritas implicações negativas dessa mutação no prognóstico da LMA porque contribuiria para maiores índices de recaída e menor sobrevida livre de doença (ZWAAN *et al.*, 2003; SCHECHTER *et al.*, 2015).

Chama a atenção que o estudo molecular permitiu a confirmação do diagnóstico de leucemia promielocítica aguda e classificação de acordo com os critérios da OMS em cinco pacientes com cariótipo normal, nos quais foi identificado o gene de fusão *PML-RARA*.

As alterações citogenéticas mais comuns em pacientes pediátricos com LMA, identificadas em aproximadamente metade dos casos de LMA nessa faixa etária, são t(8;21)(q22;q22); inv(16) (p13.1q22); t(15;17)(q22;q21) e 11q23/*MLL* (CREUTZIG *et al.*, 2012; ROOIJ *et al.*,

2015). Esse padrão, com frequência muito superior à encontrada em pacientes adultos, também foi observado no presente estudo.

Algumas das alterações citogenéticas observadas nesta casuística serão comentadas a seguir.

A anormalidade citogenética mais frequente no presente estudo foi a $t(15;17)(q22;q21)$. A presença dessa translocação é característica da leucemia promielocítica aguda (LMA- FAB M3) e é reconhecidamente associada a bom prognóstico (BUGA *et al.*, 2014, REGO e JÁCOMO, 2011). Em 18 pacientes a $t(15;17)(q22;q21)$ ocorreu como única alteração cromossômica, um paciente apresentou, além desse rearranjo, um cromossomo adicional 8 (+8) e outro paciente apresentou um isocromossomo de 17q [i(17q)], que são as alterações adicionais mais frequentemente relatadas nesses casos (MANOLA, 2009).

A translocação entre os braços longos dos cromossomos 8 e 21 [$t(8;21)(q22;q22)$] foi a segunda alteração mais frequente nesta casuística. É um dos rearranjos cromossômicos mais frequentes na LMA pediátrica, ocorrendo em 7% a 16% dos casos, frequência semelhante à observada neste estudo (11,2%). Está, geralmente, correlacionada com o subtipo FAB M2 (MANOLA, 2009). Em cinco pacientes deste estudo, a $t(8;21)(q22;q22)$ foi encontrada como única alteração no cariótipo. Entre os pacientes nos quais esteve associada a outras alterações, um apresentou, além dessa translocação, a ausência do cromossomo Y e outro apresentou a translocação como parte de um cariótipo complexo, com anormalidades cromossômicas como del (9q), del (11q) e ausência do cromossomo Y. A perda dos cromossomos sexuais é a alteração mais frequentemente associada a $t(8;21)(q22;q22)$ e a perda do cromossomo Y nos homens é mais frequente se comparada a perda do cromossomo X nas mulheres (MANOLA, 2009; HEEREMA e RAIMONDI, 2013). Alguns estudos têm demonstrado que o prognóstico favorável associado à presença da translocação $t(8;21)(q22;q22)$ não se modifica mesmo na presença de cariótipos complexos (MANOLA, 2009). No presente estudo, o paciente que apresentou cariótipo complexo com presença dessa translocação teve boa resposta ao tratamento e encontrava-se em acompanhamento no Serviço de Hematologia do HC-UFMG no momento da análise dos dados.

A $t(1;22)(p13;q13)$, típica de pacientes pediátricos com leucemia megacarioblástica, menores de um ano de idade, ocorre em uma frequência de 0% a 3% (MANOLA, 2009; HEEREMA e RAIMONDI, 2013). Neste estudo, foi observada em 2 casos (2,5%), ambos classificados segundo a classificação FAB no subtipo M7 e com idade inferior a um ano de idade, conforme descrito na literatura.

A monossomia do cromossomo 5 (-5) e a deleção [del(5q)] no braço longo do cromossomo 5 são anormalidades citogenéticas raras em crianças e estão associadas a mau prognóstico (MANOLA,2009). No presente estudo, foram identificados dois pacientes que apresentaram deleção no braço longo do cromossomo 5, que nestes casos não era a única anormalidade presente no cariótipo, tratavam-se de cariótipos complexos com o envolvimento de outras alterações adicionais. Ambos os pacientes faleceram.

Nesta casuística, a monossomia do cromossomo 7 e a deleção do cromossomo 7 [del(7q)] foram encontradas em uma frequência de 6,25%. Essas alterações podem ocorrer em todos os subtipos da classificação FAB e são encontrados na população pediátrica em uma frequência de 2% a 7% (MANOLA, 2009; BRAOUDAKI E TZORTZATOU-STATHOPOULOUA, 2012). Estudos recentes verificaram que essas duas alterações cromossômicas não deveriam ser agrupadas, pois apresentam implicações diferentes no prognóstico da LMA. A deleção no braço longo do cromossomo 7 estaria relacionada com prognóstico intermediário, em pacientes adultos, mas em pacientes pediátricos a evolução parece ser dependente de outras anormalidades citogenéticas identificadas na célula leucêmica (MANOLA, 2009; ROOIJ *et al.*, 2015).

A monossomia do cromossomo 7, por sua vez, tem sido relacionada com prognóstico desfavorável (MANOLA, 2009, SANDAHL, *et al.*, 2015). Neste estudo, os três pacientes, nos quais foi visualizada a monossomia do cromossomo 7, faleceram. Um desses pacientes foi diagnosticado com LMA secundária a anemia de Fanconi. Nesse paciente, a monossomia do cromossomo 7, anormalidade cromossômica adquirida frequente em pacientes com anemia de Fanconi, foi identificada como parte de cariótipo complexo (MANOLA,2009).

Dos cinco pacientes que apresentaram em seus cariótipos a deleção no braço longo do cromossomo 11, em apenas um caso essa deleção não ocorreu na região 11q23. A deleção de 11q não foi visualizada nenhuma vez como alteração cromossômica isolada. A contribuição dos rearranjos 11q23/*MLL* para o prognóstico dos pacientes pediátricos com LMA é variável e depende do tipo de translocação, podendo contribuir para evolução favorável, como nos casos com t(9;11)(q21;q23), ou desfavorável como na presença de t(6;11)(q27;q23) e t(10;11)(p12;q23) (MANOLA, 2009; CREUTZIG *et al.*, 2012; ROOIJ *et al.*, 2015). Nesta casuística, apenas um paciente encontra-se em acompanhamento no Serviço de Hematologia do HC-UFMG, os demais faleceram.

O Serviço de Hematologia do HC-UFMG não utiliza, até o momento, a classificação OMS-2008 em seus protocolos para diagnóstico e tratamento de pacientes pediátricos com LMA. Neste estudo, foi possível classificar, retrospectivamente, 86 dos 98 pacientes, de acordo com os critérios da classificação OMS-2008 (VARDIMAN *et al.*, 2009).

A classificação OMS-2008 é baseada, primariamente, em dados provenientes de experiências com pacientes adultos e inclui fatores genéticos, morfológicos e prognósticos num único sistema. Essa classificação contempla a maioria, mas não todos os subgrupos de alterações citogenéticas específicas da faixa etária pediátrica (CREUTZIG *et al.*, 2012; DAVIS *et al.*, 2013). Segundo DAVIS e colaboradores (2013), observa-se distribuição diferente entre diversos de seus subgrupos, quando comparados pacientes adultos e pediátricos com LMA. Diante disso, ainda não há consenso a respeito da relevância e aplicabilidade da classificação OMS-2008 para pacientes pediátricos com LMA.

No presente estudo, a distribuição dos pacientes de acordo com a classificação OMS-2008, foi semelhante à observada por DAVIS e colaboradores (2013) e SANDAHL e colaboradores (2015). Nos três estudos houve predomínio de pacientes classificados no grupo com anormalidades genéticas recorrentes (52,3%, 45,9% e 41%, respectivamente). A frequência mais elevada desse subgrupo nesta casuística pode ter sido influenciada pelo maior número de pacientes com $t(15;17)(q22;q21)$, já descrito anteriormente.

A categoria heterogênea denominada “sem outra especificação” (SOE) foi a segunda mais frequente neste estudo (22%), com percentual superior ao observado por DAVIS e colaboradores (2013), que incluíram nessa categoria 16,2% dos pacientes. No estudo de SANDAHL e colaboradores (2015), 44% dos pacientes foram classificados no grupo “SOE”. Os autores aventaram como hipótese para o maior número de pacientes incluídos nesta categoria a ausência de informações sobre alterações morfológicas características de mielodisplasia que, se disponíveis, poderiam modificar esse percentual.

De acordo com VARDIMAN e colaboradores, referindo-se a dados de pacientes adultos, a categoria “SOE” representa apenas 25% a 30% de todos os casos de LMA e essa frequência deverá diminuir na medida em que mais subgrupos genéticos forem reconhecidos (VARDIMAN *et al.*, 2009). No presente estudo, onze pacientes, alocados no grupo SOE, apresentavam cariótipo normal. As limitações referentes aos estudos moleculares e ao uso de outras técnicas que permitissem melhor caracterização destes pacientes podem ter contribuído para a presença de maior número de casos no grupo SOE. Assim como no estudo SANDAHL

e colaboradores (2015), na presente casuística não foi realizada revisão dos achados morfológicos, o que poderia auxiliar na identificação de displasias em pacientes sem anormalidades citogenéticas, possibilitando sua alocação em outra categoria.

O grupo com anormalidades relacionadas com mielodisplasia recebeu 18,6% dos pacientes desta casuística, frequência discretamente superior à observada por DAVIS e colaboradores (2013) e SANDAHL e colaboradores (2015), 16% e 14,7%, respectivamente. No entanto, estudo do grupo japonês, direcionado para avaliação dessa categoria, relatou que 21% dos casos estudados foram incluídos nesse grupo. Essa categoria é motivo de diversas controvérsias na literatura direcionada a pacientes pediátricos com LMA (KINOSHITA *et al.*, 2014).

A classificação OMS-2008 incorporou modificações que ampliaram a categoria anteriormente denominada “LMA relacionada à displasia de múltiplas linhagens”. De acordo com DAVIS e colaboradores (2013), esta categoria era considerada rara na população pediátrica, mas, com a utilização dos critérios da classificação OMS-2008, um maior número de pacientes pôde ser alocado na nova categoria denominada “LMA com anormalidades relacionadas com mielodisplasia”. Esses autores consideraram não haver elementos suficientes para definirem se a frequência encontrada em seu estudo foi superior à esperada para populações pediátricas, ressaltando que são necessários estudos cooperativos, incluindo casuísticas mais expressivas, para avaliação da real incidência dessa condição.

No estudo japonês, apoiados nos achados de seu estudo e no de DAVIS e colaboradores, os autores concluíram que a LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia não é rara em crianças (KINOSHITA *et al.*; 2014). Os resultados desses estudos sugerem também que, em crianças, as alterações citogenéticas relacionadas com mielodisplasia não estão necessariamente associadas a alterações morfológicas (KINOSHITA *et al.*; 2014).

Outro aspecto importante em relação ao grupo com “LMA com anormalidades relacionadas com mielodisplasia” é o fato de estarem incluídas, nesta categoria, alterações citogenéticas com implicações muito diversas no prognóstico da LMA infantil (KINOSHITA *et al.*; 2014). SANDAHL e colaboradores (2015), assim com outros autores, verificaram, por exemplo, que os pacientes com monossomia do cromossomo 7 apresentavam evolução significativamente desfavorável quando comparados com pacientes com del(7q).

Em relação à categoria “LMA relacionada à síndrome de Down”, seis pacientes (7%) desta casuística foram incluídos nesse grupo, achado semelhante aos 10,8% observados por DAVIS e colaboradores (2013), que atribuíram essa alta frequência à faixa etária da população do estudo. Crianças com síndrome de Down têm um risco aumentado de desenvolverem LMA, considerada, nesses pacientes, uma entidade distinta, clínica e geneticamente (KASPERS e ZWAAN, 2007; MANOLA, 2009). Esse risco pode ser até 500 vezes maior para o subtipo FAB M7 (PUUMALA *et al.*, 2013). Algumas características da doença em pacientes com síndrome de Down incluem baixa contagem de leucócitos ao diagnóstico, predominância dos subtipos FAB M0, M6 e M7, e início da doença antes dos cinco anos de idade. Todos os pacientes com síndrome de Down, incluídos neste estudo, apresentaram idade inferior a cinco anos, com mediana de 1,67 anos. A leucometria inicial variou entre 7690/mm³ e 40540/mm³, com mediana de 16200/mm³. No que diz respeito aos subtipos FAB, três casos foram classificados como LMA-M7.

A probabilidade de sobrevida global (SGLO) aos cinco anos, observada neste estudo (49,7% ± 5,2%) foi inferior aos relatos da literatura, que descrevem, para a LMA na faixa etária pediátrica, SGLO próxima a 70% (CREUTZIG *et al.*, 2012; KAROL *et al.*, 2015; WENNSTRÖM *et al.*, 2016). Por se tratar de estudo retrospectivo com limitações na coleta de dados referentes à evolução dos pacientes, principalmente, no que diz respeito à resposta precoce ao tratamento, refratariedade, características e tratamento das recidivas, procedimentos para indicação e execução de transplante de medula óssea, torna-se difícil avaliar de forma adequada os fatores que contribuíram para o resultado desfavorável obtido nesta casuística.

No entanto, algumas hipóteses podem ser aventadas, como o elevado percentual de óbitos em remissão (19,6%). Esse valor é muito superior ao descrito em estudo do grupo NOPHO, que observou 5% de óbitos em remissão em toda coorte, envolvendo adultos e crianças, e 3% quando avaliada apenas a população pediátrica (WENNSTRÖM *et al.*, 2016). ROOIJ e colaboradores (2015) avaliam que 5 a 10% dos pacientes com LMA irão morrer em consequência de complicações da doença ou efeitos adversos do tratamento. Diversos estudos ressaltam a alta incidência, nesses pacientes, de infecções fúngicas e bacterianas, relacionada à intensidade dos protocolos terapêuticos utilizados, o que demanda maior atenção às medidas de suporte, de forma a evitar a mortalidade precoce (CREUTZIG *et al.*, 2012).

Também deve ser destacado que os pacientes incluídos neste estudo utilizaram diversos protocolos terapêuticos e que, apenas no protocolo ICP-APL, direcionado a pacientes com leucemia promielocítica aguda, o tratamento foi planejado com estratificação dos pacientes em grupos de risco para recidiva. Também deve ser mencionado que os pacientes tratados de acordo com esse protocolo, são monitorados para identificação precoce de ausência de remissão molecular ou possível recidiva molecular. Para os demais tipos de LMA, ainda não foi estabelecido, no Serviço de Hematologia do HC-UFMG, protocolo para monitoramento de doença residual mínima, como tem sido preconizado na literatura (RUBNITZ, 2012; KAROL *et al*, 2015).

Quando a SGLO foi avaliada de acordo com as anormalidades citogenéticas observadas, confirmou-se o prognóstico favorável dos pacientes com t(15;17) e t(8;21), que apresentaram probabilidade de SGLO próximas às descritas na literatura internacional (ABLA E RIBEIRO, 2013; DAVIS *et al*, 2014; WENNSTRÖM *et al.*, 2016).

O grupo de pacientes com alterações relacionadas com mielodisplasia, que incluiu anormalidades associadas a prognóstico desfavorável, como monossomia do 7 e anormalidades de 5q (ROOIJ *et al*, 2015), foi o que apresentou menor probabilidade de sobrevida global aos cinco anos.

Em relação às análises de sobrevida considerando o agrupamento dos pacientes de acordo com a classificação OMS-2008, na análise univariada foi observado que o grupo de pacientes com anormalidades genéticas recorrentes apresentou SGLO (71%) compatível com o prognóstico favorável descrito na literatura (DAVIS *et al.*, 2014).

O grupo de pacientes com LMA relacionada à síndrome de Down também apresentou prognóstico favorável, com SGLO de 83,3% aos cinco e oito anos de seguimento, resultado semelhante ao do estudo de DAVIS e colaboradores (2014) que demonstrou SGLO de 90% aos 10 anos. Em geral, a LMA associada à síndrome de Down é considerada como um subgrupo favorável (KASPERS e ZWAAN, 2007; MANOLA, 2009; HEEREMA e RAIMONDI, 2013). Estudos *in vitro* demonstraram que os blastos de crianças com LMA associada à síndrome de Down têm maior sensibilidade às drogas antineoplásicas (KASPERS e ZWAAN, 2007; MANOLA, 2009).

Crianças com síndrome de Down têm um risco aumentado de mortalidade relacionada ao tratamento, por isso a intensidade do mesmo deve ser cuidadosamente equilibrada em relação

à toxicidade. Atualmente, excelentes resultados têm sido obtidos com protocolos de tratamento com intensidade moderada e sem transplante de células de tronco (KASPERS e ZWAAN, 2007).

No presente estudo, a categoria SOE apresentou SGLO inferior à observada em estudo do grupo japonês, 36,1% aos 5 anos versus 68,9% aos 3 anos (KINOSHITA *et al.*; 2014). Deve ser ressaltada a heterogeneidade dessa categoria, o que dificulta comparações. O grupo com pior prognóstico foi o que incluiu os pacientes com alterações relacionadas à mielodisplasia (SGLO - 28,1%). Para este grupo, o resultado observado nesta casuística também foi pior do que a SGLO (56,8%, aos três anos) observada, por KINOSHITA e colaboradores (2014). Os resultados desfavoráveis observados na casuística total, provavelmente, estão relacionados ao insucesso obtido nessas duas categorias.

Pesquisadores americanos verificaram que anormalidades genéticas incluídas, de acordo com os critérios da classificação OMS-2008, na categoria com alterações relacionadas com mielodisplasia poderiam influenciar, de maneira diferenciada, o prognóstico das crianças com LMA. Esses autores verificaram, conforme comentado anteriormente, que pacientes com monossomia do cromossomo 7 tinham evolução desfavorável quando comparados com pacientes com del(7q). A SGLO relatada foi de 51% versus 90%, respectivamente, ambas superiores à SGLO descrita, no presente estudo, para o grupo com alterações relacionadas com mielodisplasia (SANDAHL, *et al.*, 2015).

Para os grupos SOE e com alterações relacionadas com mielodisplasia não foi possível realizar comparações de SGLO com o estudo de DAVIS e colaboradores (2014), pois neste estudo, os pacientes dessas categorias foram distribuídos, para as análises de sobrevida, em categorias de risco “intermediário” e “desfavorável” sem que houvesse correspondência com a classificação OMS-2008.

No presente estudo, na análise univariada, também foi observada pior SGLO para os pacientes com contagem inicial de leucócitos acima de $100.000/\text{mm}^3$ ($p= 0,012$). De acordo com diversos autores, contagens de blastos muito elevadas, no momento do diagnóstico, estão associadas a um risco aumentado de morte precoce e ausência de resposta ao tratamento, mas não estão, necessariamente, associadas a pior sobrevida livre de doença (KRSTOVSKI *et al.*, 2010; CREUTZIG *et al.*, 2012; KINOSHITA *et al.*; 2014). Estudo desenvolvido por pesquisadores do *St. Jude Children's Research Hospital* demonstrou que os avanços na abordagem inicial, incluindo medidas de suporte, podem diminuir significativamente a

mortalidade precoce em pacientes com LMA e hiperleucocitose. No entanto, segundo os autores, esses pacientes podem apresentar pior prognóstico, no que diz respeito à sobrevida em longo prazo, necessitando de melhorias no tratamento pós-remissão (INABA *et al.*, 2008).

Diante do exposto, foram incluídas, na análise multivariada, as variáveis “classificação OMS-2008” e “contagem de leucócitos $<$ ou \geq 100.000/mm³”. Essa análise confirmou o bom prognóstico dos pacientes com “LMA com alterações genéticas recorrentes” e com “LMA relacionada à síndrome de Down” e a evolução desfavorável dos pacientes com “LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia” e da categoria “SOE”. O efeito da leucometria na SGLO não foi independente da classificação OMS-2008.

A avaliação detalhada dos resultados relativos aos diferentes protocolos de tratamento utilizados neste estudo não foi possível, pelas limitações já expostas, e não era objetivo específico do mesmo.

No entanto, foi possível observar que os resultados obtidos com o protocolo NOPHO (SGLO: 40,7%) foram inferiores aos relatados na literatura. A SGLO, relatada no estudo de LIE e colaboradores (2005), para o protocolo NOPHO-AML-93, no qual foi baseado o esquema terapêutico utilizado no Serviço de Hematologia do HC-UFMG, foi de 65% aos cinco anos. A SGLO alcançada com o protocolo NOPHO foi superior à obtida com o protocolo BFM-83 modificado (VIANA *et al.*, 2003), porém, sem significância estatística. Esses resultados demonstram que há necessidade de reavaliação das estratégias adotadas no Serviço de Hematologia do HC-UFMG para tratamento dos pacientes com LMA incluindo atenção para a elevada frequência de óbitos em remissão.

No que diz respeito aos pacientes com leucemia promielocítica aguda, houve melhora significativa na SGLO com a introdução do protocolo ICP-LPA ($p=0,02$). Os resultados alcançados com esse protocolo, em relação à SGLO e SLE, são semelhantes aos resultados descritos na literatura (ABLA e RIBEIRO, 2013; REGO *et al.*, 2013) e demonstram que a adoção de um protocolo terapêutico unificado contribuiu para a acentuada elevação dos índices de sobrevida nesse grupo de pacientes.

Para adequada interpretação das conclusões deste trabalho, devem ser consideradas as limitações relativas ao seu caráter retrospectivo, ao tamanho relativamente pequeno da casuística e à falta de padronização das anotações dos dados em prontuários médicos, o que

contribuiu para dificuldades na obtenção de certos dados, especialmente daqueles relativos à evolução dos pacientes, impedindo análises sobre a sobrevida livre de doença.

Também devem ser mencionadas as limitações relativas ao estudo das alterações moleculares e a não utilização de técnicas complementares, como a técnica de Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH), que pode ser útil na caracterização de anormalidades cromossômicas não identificadas previamente ou daquelas mais “sutis” como a *inv*(16), *t*(11q23) e *t*(7;12). Alguns autores relatam que o uso de técnicas de citogenética molecular tem valor limitado no diagnóstico inicial da LMA pediátrica, uma vez que a citogenética convencional detecta de maneira confiável a maioria das anormalidades nessa população (MANOLA, 2009). No entanto, deve ser destacada a crescente importância da detecção das alterações moleculares para classificações de risco mais refinadas, uma vez que a LMA na população pediátrica apresenta características diversas das observadas em pacientes adultos (DAVIS *et al*, 2014; KINOSHITA *et al.*; 2014; SANDAHL *et al.*; 2015).

Mesmo com as limitações apresentadas, os resultados corroboram a importância das alterações citogenéticas como fator prognóstico para pacientes pediátricos com LMA e indicam a necessidade de estudos cooperativos e prospectivos com o objetivo de se conhecer melhor a doença em nosso meio, com o intuito de aperfeiçoar o tratamento desses pacientes, contribuindo para aumentar sua chance de cura.

CONCLUSÕES

- Anormalidades citogenéticas foram observadas em 78,7% dos 80 pacientes cujos cariótipos puderam ser avaliados. Essa frequência está de acordo com os relatos da literatura que descrevem a presença de rearranjos cromossômicos em 70% a 80% dos casos de LMA pediátrica.
- A alteração cromossômica mais frequente foi a $t(15;17)(q22;q21)$, seguida da $t(8;21)(q22;q22)$. Em relação à classificação FAB, houve predomínio dos subtipos M3 e M2. A elevada porcentagem de casos de leucemia promielocítica aguda, detectados pelos achados morfológicos, citogenéticos ou moleculares, foi compatível com aquela descrita na literatura para populações de origem latina.
- Em relação à classificação OMS-2008, a categoria com maior frequência, na casuística estudada, foi aquela denominada “LMA com anormalidades genéticas recorrentes”, seguida dos pacientes agrupados na categoria “LMA sem outra especificação” (SOE) e daqueles com “LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia”. Esses achados são semelhantes aos de outros estudos que avaliaram a aplicabilidade da classificação OMS-2008 em crianças e adolescentes.
- A probabilidade estimada de sobrevida global (SGLO) aos cinco anos para todo o grupo foi inferior à observada na literatura internacional.
- Nas análises univariada e multivariada, os pacientes com alterações citogenéticas relacionadas à mielodisplasia apresentaram prognóstico desfavorável quando comparados aos pacientes dos grupos “LMA com anormalidades genéticas recorrentes”. O grupo “LMA com anormalidades genéticas recorrentes” incluiu pacientes com $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q21)$, $inv16(p13.1q22)$, que são alterações citogenéticas relacionadas a prognóstico favorável. Esses achados são compatíveis com os relatos da literatura.
- Na análise univariada foi observada pior SGLO para os pacientes com contagem inicial de leucócitos acima de $100.000/mm^3$. Na análise multivariada, o efeito da leucometria na SGLO não foi independente da classificação OMS-2008.

- Apesar das limitações de um estudo retrospectivo e da casuística relativamente pequena, os resultados corroboram a importância das alterações citogenéticas como fator prognóstico para pacientes pediátricos com LMA.

REFERÊNCIAS

Bacher U, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Schoch C, Haferlach T. Further correlations of morphology according to FAB and WHO classification to cytogenetics in de novo acute myeloid leukemia: a study on 2.235 patients. *Ann Hematol.* 2005 Nov; 84(12): 785-91

Bain, BJ. *Leukaemia Diagnosis*. 4 th ed. John Wiley e Sons, 2010

Balgobind BV, Zwaan CM, Pieters R, Van den Heuvel-Heibrink MM. The heterogeneity of pediatric MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2011 Aug; 25(8): 1239-48

Braoudaki M, Tzortzatou-Stathopoulou F. Clinical cytogenetics in pediatric acute leukemia: an update. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012 Aug; 12(4): 230-7

Buga CV, Glück A, Arion C. Actual biological diagnosis of acute myeloblastic leukemia in children. *J Med Life.* 2014 Jun 15; 7(2): 291-5

Campos CA, Melo CPS, Duarte SM, Neto JCA, Dutra AP, Atalla A, et al. Molecular genetics and Cytogenetics data of 317 patients With de novo acute leukemia. *Open Journal of Hematology.* 2015 May; 6(1): 6-3

Coenen EA, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, et al. Prognostic significance of additional cytogenetic aberrations in 733 de novo pediatric 11q23/MLL-rearranged AML patients: results of an international study. *Blood.* 2011 Jun 30; 117(26): 7102-11

Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, de Bont E. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2012 Oct 18; 120 (16): 3187-205

Creutzig U, Ritter J, Schellong G. Identification of two risk groups in childhood acute myelogenous leukemia after therapy intensification in study AML-BFM-83 as compared with study AML-BFM-78. AML-BFM Study Group. *Blood*. 1990 May 15;75(10): 1932-40

Davis KL, Marina N, Arber DA, Ma L, Cherry A, Dahl GV. Pediatric acute myeloid leukemia as classified using 2008 WHO criteria: a single-center experience. *Am J ClinPathol*. 2013 Jun; 139(6): 818-25

de Rooij JDE, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink M. Pediatric AML: from biology to clinical management. *J. Clin. Med*. 2015 Jan 9; 4(1): 127-49

Faulk K, Gore L, Cooper T. Overview of therapy and strategies for optimizing outcomes in de novo pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Pediatr Drugs*. 2014 Jun; 16 (3): 213–27

Harrison CJ, Hills RK, Moorman AV, Grimwade DJ, Hann I, Webb DKH, et al. Cytogenetics of childhood Acute Myeloid Leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment Trials AML 10 and 12. *J ClinOncol*. 2010 Jun 1; 28(16): 2674-81

Heerema NA, Raimondi SC. Cytogenetics of Acute Leukemia. *Neoplastic Diseases of the Blood*. Springer New York. 2012 Jul 27; 285-303

Inaba H, Fan Y, Pounds S, Geiger TL, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Pui CH, Razzouk BI. Clinical and biologic features and treatment outcome of children with newly diagnosed acute myeloid leukemia and hyperleukocytosis. *Cancer*. 2008 Aug 1;113(3): 522-9

Karol SE, Coustan-Smith E, Cao X, Shurtleff SA, Raimondi SC, Choi JK, et al. Prognostic factors in children with acute myeloid leukaemia and excellent response to remission induction therapy. *Br J Haematol*. 2015 Jan; 168(1): 94–101

Karpers GJ, Zwaan CM. Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients. *Haematologica*. 2007 Nov; 92(11): 1519-32

Kaspers G. How I treat paediatric relapsed acute myeloid leukaemia. *Br J of Haematol*. 2014 Sep; 166(5): 636–45

Kinoshita A, Miyachi H, Matsushita H, Yabe M, Taki T, Watanabe T, et al. Acute myeloid leukaemia with myelodysplastic features in children: a report of Japanese PaediatricLeukaemia/Lymphoma Study Group. *Br J Haematol*. 2014 Oct;167(1):80-6

Krstovski N, Janic D, Dokmanovic L. Childhood acute myeloid leukaemia. *Journal of Pediatric Sciences* 2010; 2(3): 23

LaFiura KM, Edwards H, Taub JW, Matherly LH, Fontana JA, Mohamed AN, et al. Identification and characterization of novel AML1-ETO fusion transcripts in pediatric t(8;21) acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Oncogene*. 2008 Aug 21; 27(36): 4933-42

Lie SO, Abrahamsson J, Clausen N, Forestier E, Hasle H, Hovi L, et al. Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO); AML study group. Long-term results in children with AML: NOPHO-AML study group – report of three consecutive trials. *Leukemia*. 2005 Dec; 19(12): 2090–100

Manola KN. Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2009 Nov; 83(5): 391-405

Meshinchi S, Arceci RJ. Prognostic factors and risk-based therapy in pediatric acute myeloid leukemia. *Oncologist*. 2007 Mar; 12(3): 341-55

Metayer C, Milne E, Clavel J, Infante-Rivard C, Petridou E, Taylor M, et al. The childhood leukemia international consortium. *Cancer Epidemiol*. 2013 Jun; 37(3): 336–47

Mrózec K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Reviews* 2004; 18(2): 115-136

Oliveira BM, Diniz MS, Vianna MB. Leucemias agudas na infância. *Revmed Minas Gerais*. 2004. 14(1) supl.1: 33-9

Pession A, Masseti R, Rizzari C, Putti MC, Casale F, Fagioli F. Results of the AIEOP AML 2002-01 multicenter prospective trial for the treatment of children with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013 Jul 11; 122(2): 170-8

Pombo de Oliveira MS, Koifman S, Vasconcelos GM, Emerenciano M, de Oliveira Novaes C, BrazilianCollaborativeStudyGroupofInfantAcuteLeukemia. Development and perspective

of current Brazilian studies on the Epidemiology of Childhood leukemia. *BloodCells Mol Dis*. 2009 Mar-Apr; 42(2): 121-5

Puumala SE, Ross JA, Aplenc R, Spector LG. Epidemiology of childhood acute myeloid leukemia. *PediatrBloodCancer*. 2013 May; 60(5): 728-33

Rego EM, Kim HT, Ruiz-Argüelles GJ, Undurraga MS, UriarteMdel R, Jacomo RH, et al. Improving acute promyelocytic leukemia (APL) outcome in developing countries through networking, results of the International Consortium on APL. *Blood*. 2013 Mar 14; 121(11): 1935-43

Rego EM, Jácomo RH. Epidemiology and treatment of acute promyelocytic leukemia in latinamerica. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2011; 3(1): 2011049

Roboz GJ, Gusman M. Acute Myeloid Leukemia stem cells: seek and destroy. *Expert RevHematol*. 2009 Dec; 2(6): 663-72

Rochowski A, Olson SB, Alonzo TA, Gerbing RB, Lange BJ, Alter BP. Patients with Fanconi anemia and AML have different cytogenetic clones than de novo cases of AML. *Pediatr Blood Cancer*. 2012 Nov; 59(5): 922-4

Rosenberg PS, Greene MH, Alter PB. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood*. 2003 feb 1; 101(3): 822-6

Rose-Inman H, Kuehl D. Acute Leukemia. *Emerg Med Clin North Am*. 2014 Aug; 32(3): 579-96

Rubnitz JE, Razzouk BI, Lensing S, Pounds S, Pui CH, Ribeiro SC. Prognostic factors and outcome of recurrence in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2007 Jan 1; 109(1): 157-63

Rubnitz JE. Childhood acute myeloid leukemia. *Pediatric Malignancies* 2008; 9(1): 95-105

Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO. Acute Myeloid Leukemia. *HematolOncolClin North Am*. 2010 Feb; 24(1): 35–63

Rubnitz JE. How I treat pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012 Jun 21; 119(25): 5980-8

Sandahl JD, Kjeldsen E, Abrahamsson J, Ha SY, Heldrup J, Jahnukainen K, et al. The applicability of the WHO classification in paediatric AML. A NOPHO-AML study. *Br J Haematol*. 2015 Jun; 169(6): 859-67

Tarlock K, Meshinchi S. Pediatric Acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications of genomic variants. *PediatrClin North Am*. 2015 Feb; 62(1): 75–93

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30; 114(5): 937-51

Vianna MB, Cunha KC, Ramos G, Murao M. Leucemia mielóide aguda na criança: experiência de 15 anos em uma única instituição. *J Pediatr (Rio J)*. 2003 Nov–Dec; 79(6): 489-96

von Neuhoff C, Reinhardt D, Sander A, Zimmermann M, Bradtke J, Betts DR, et al. Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98. *J Clin Oncol*. 2010 Jun 1; 28(16): 2682-9

Voutiadou G, Papaioannou G, Gaitatzi M, Lalayanni C, Syrigou A, Vadikoliou C, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia defines a distinct subgroup within the adverse cytogenetic risk category. *Cancer Genet*. 2013 Jan-Feb; 206(1-2): 32-6

Wennström L, Edslev PW, Abrahamsson J, Nørgaard JM, Fløisand Y, Forestier E, et al. Acute Myeloid Leukemia in Adolescents and Young Adults Treated in Pediatric and Adult Departments in the Nordic Countries. *Pediatr Blood Cancer*. 2016 Jan; 63(1): 83-92

Zerbini MCN, Soares FA, Morais JC, Vassallo J, Velloso EDRP, Chauffaille MLLF, et al. Classificação dos tumores hematopoéticos e linfóides de acordo com a OMS: padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4ª edição. *J Bras Patol Med Lab*. 2011 Dez; 47(6): 643-48

Zhang L, Samad A, Pombo-de-Oliveira MS, Scelo G, Smith MT, Feusner J, Wiemels JL, Metayer C. Global characteristics of childhood acute promyelocytic leukemia. *Blood Rev*. 2015 Mar; 29(2): 101-25

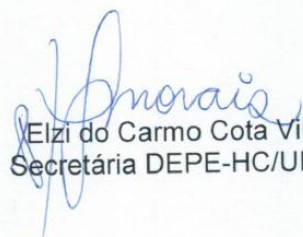
ANEXO 1 (pareceres)

*Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão*

DECLARAÇÃO

Declaramos para fins de comprovação no Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos – COEP/UFMG que o projeto de pesquisa intitulado, “**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EVOLUÇÃO DAS CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**” de responsabilidade do Prof^ª. Benigna Maria de Oliveira foi recebido na Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão/HC-UFMG para registro e avaliação.

Belo Horizonte, 20 de maio de 2014..

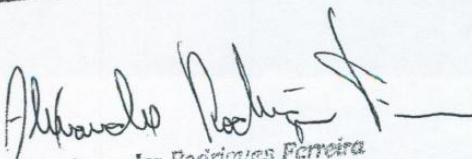

Elzi do Carmo Cota Vilela
Secretária DEPE-HC/UFMG

Faculdade de Medicina da UFMG**Departamento de Pediatria****Parecer - N. 81/2013****Pesquisador:** Benigna Maria de Oliveira e Amanda de Lourdes Nunes**Título do Projeto:** Análise das alterações citogenéticas e sua associação com características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mieloide aguda.**Mérito:**

Essa investigação sobre a leucemia mieloide aguda, doença rara em crianças, justifica-se pela falta de dados clínicos e de sobrevida em nosso meio, além de sua potencial contribuição para uma melhor fundamentação dos aspectos diagnósticos e terapêuticos, considerando-se sua realização em um dos principais centros de referência nacional com grande número de atendimentos. Trata-se de estudo transversal — desfecho primário: sobrevida global e sobrevida livre de eventos — com coleta retrospectiva de dados clínicos em prontuários médicos e arquivo de laudos laboratoriais (Programas Matrix e Cytogen), utilizado no Laboratório Central do HC-UFMG. Considerando-se o papel das alterações citogenéticas na definição prognóstica, este estudo objetiva investigar a associação dessas alterações com as características clínicas e evolutivas da doença, além da classificação dos seus subtipos e análise descritiva dos achados citogenéticos. A população a ser investigada incluirá crianças e adolescentes — idade < 16 anos — com tamanho amostral de 70 indivíduos. O desenho metodológico está em concordância com os objetivos e há seleção apropriada de variáveis para as análises. O TCLE será solicitado para inclusão de pacientes ainda em acompanhamento no Serviço e os modelos, adequados às faixas etárias, encontram-se anexados ao projeto.

Voto: Sou, SMJ, pela aprovação do projeto.

APROVADO EM REUNIÃO DE
CÂMARA DEPARTAMENTAL
12/12/13


Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira
Subchefe do Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG



Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas
Unidade Funcional Hematologia / Oncologia

UFMG

Belo Horizonte, 03 de março de 2014

Parecer:

Vimos por meio deste, fornecer parecer sobre o projeto de pesquisa:

“Análise das alterações citogenéticas e sua associação com características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mielóide aguda”, trabalho referente ao projeto de mestrado da aluna Amanda de Lourdes Nunes. Os objetivos deste trabalho consistem em avaliar a associação das alterações citogenéticas com as características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mielóide aguda (LMA) atendidas no Serviço de Hematologia do HC-UFMG.

Nosso parecer é de que o projeto de pesquisa é relevante para a Unidade Funcional de Hematologia/Oncologia, proporcionando benefícios ao atendimento dos pacientes. Somos, assim, favoráveis à aprovação do mesmo.



Rachel A. F. Fernandes
Prof^a. Rachel Aparecida Ferreira
Fernandes
Coordenadora do Grupo de
Hematologia Pediátrica

Marciana Carvalho Pereira de Souza
Gerente da Unidade Funcional de
Hematologia

Marciana C.P. Souza
Gerente UF Onco/Hemato
COREN-MG 79.986 - ENF
INSC. UFMG 173711



**UNIDADE FUNCIONAL
PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL**

PARECER

Referência:

Projeto de Pesquisa encaminhado para avaliação do Núcleo de Ensino e Pesquisa da Unidade Funcional Patologia e Medicina Laboratorial do HC/UFMG, de interesse da Prof^a. Benigna Maria de Oliveira e da mestranda Amanda Nunes.

Título do Projeto:

"Análise das alterações citogenéticas e sua associação com características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mielóide aguda"

Descrição da Pesquisa:

Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo que objetiva avaliar a associação das alterações citogenéticas com as características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mielóide aguda (LMA) atendidas no Serviço de Hematologia do HC-UFMG.

A população a ser estudada consistirá de pacientes com idade até 16 anos, com diagnóstico de LMA, atendidas no HC-UFMG, no período de 2004 a 2015.

A interface com o Laboratório Central do HC-UFMG se dará na coleta e resultados laboratoriais dos setores de Hematologia, Biologia Molecular e Citogenética, via programas Matrix® e Citogen®, utilizados no Serviço de Medicina Laboratorial da UFPML do HC-UFMG. O acesso a esses dados será feita por funcionários dos setores, em dia e horário previamente agendados com os pesquisadores.

Período estimado para início: após aprovação da DEPE
Duração estimada da pesquisa: 02 (dois) anos

Considerações:

Quanto ao ponto de vista técnico, o presente projeto é perfeitamente exequível, no que tange a Unidade Funcional Patologia e Medicina Laboratorial. Do ponto de vista financeiro, não caberá ressarcimento, haja vista que se trata de estudo retrospectivo, com busca de resultados já liberados na rotina assistencial do laboratório.

Orientamos que o mesmo só se inicie após a aprovação da DEPE e que o acesso aos resultados dos pacientes seja feita em dia e horário previamente agendados com os funcionários dos setores.

Diante do exposto, somos favoráveis à realização da referida pesquisa.

Belo Horizonte, 11 de março de 2014.


 Prof. Leonardo de Souza Vasconcellos
 Coord. Núcleo de Ensino e Pesquisa
 UFPML - HC/UFMG

Leonardo de Souza Vasconcellos
 Prof. Adjunto – Departamento de Propeidética Complementar – FM/UFMG
 Coord. Núcleo de Ensino e Pesquisa – Unidade Funcional Patologia e Medicina Laboratorial – HC/UFMG



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 31579014.3.0000.5149

**Interessado(a): Profa. Benigna Maria de Oliveira
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 27 de agosto de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "**Análise das alterações citogenéticas e sua associação com características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mieloide aguda**" bem como os documentos:

- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Termo de Assentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in blue ink, reading "Telma Campos Medeiros Lorentz".

**Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG**



MEMORANDO

Belo Horizonte, 24 de março de 2015.

DE: GEP-HC/UFMG

PARA: Coordenação Administrativa/Arquivo SAME

PESQUISA GEP

Projeto: 71/14 "ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EVOLUÇÃO DAS CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA"

De ordem do Gerente de Ensino e Pesquisa do HC/UFMG, a pesquisa citada de autoria da Prof.^a Benigna Maria de Oliveira, está aprovada nesta Diretoria, ficando autorizada a colaboradora da pesquisa, Amanda de Lourdes Nuens, a consultar prontuários para coleta de dados, no SAME com agendamento prévio.

Atenciosamente,

Elzi Cota Vilela

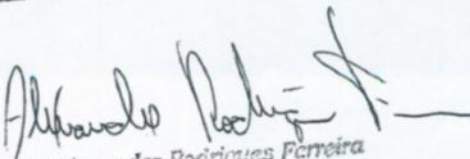
Secretária – Diretoria HC/UFMG

Faculdade de Medicina da UFMG**Departamento de Pediatria****Parecer - N. 81/2013****Pesquisador:** Benigna Maria de Oliveira e Amanda de Lourdes Nunes**Título do Projeto:** Análise das alterações citogenéticas e sua associação com características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mieloide aguda.**Mérito:**

Essa investigação sobre a leucemia mieloide aguda, doença rara em crianças, justifica-se pela falta de dados clínicos e de sobrevida em nosso meio, além de sua potencial contribuição para uma melhor fundamentação dos aspectos diagnósticos e terapêuticos, considerando-se sua realização em um dos principais centros de referência nacional com grande número de atendimentos. Trata-se de estudo transversal — desfecho primário: sobrevida global e sobrevida livre de eventos — com coleta retrospectiva de dados clínicos em prontuários médicos e arquivo de laudos laboratoriais (Programas Matrix e Cytogen), utilizado no Laboratório Central do HC-UFMG. Considerando-se o papel das alterações citogenéticas na definição prognóstica, este estudo objetiva investigar a associação dessas alterações com as características clínicas e evolutivas da doença, além da classificação dos seus subtipos e análise descritiva dos achados citogenéticos. A população a ser investigada incluirá crianças e adolescentes — idade < 16 anos — com tamanho amostral de 70 indivíduos. O desenho metodológico está em concordância com os objetivos e há seleção apropriada de variáveis para as análises. O TCLE será solicitado para inclusão de pacientes ainda em acompanhamento no Serviço e os modelos, adequados às faixas etárias, encontram-se anexados ao projeto.

Voto: Sou, SMJ, pela aprovação do projeto.

APROVADO EM REUNIÃO DE
CÂMARA DEPARTAMENTAL
12/12/13


Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira
Subchefe do Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG

APÊNDICE 1 (termos de consentimento livre e esclarecido)

TCLE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO INFORMAÇÕES DOS PESQUISADORES AOS REPRESENTANTES LEGAIS

Título da pesquisa: Análise das alterações citogenéticas e sua associação com características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mieloide aguda.

Seu filho ou o paciente pelo qual você é responsável está sendo convidado a participar dessa pesquisa porque ele tem o diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA). As pesquisadoras responsáveis pelo estudo são a Professora Benigna Maria de Oliveira e a bióloga Amanda de Lourdes Nunes.

Antes de você aceitar participar desta pesquisa é necessário que você compreenda as explicações a seguir. Esta declaração esclarece o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e cuidados durante o estudo. Também estabelece o seu direito de desistir de sua participação a qualquer momento.

A LMA é uma doença rara em crianças e existem poucos estudos sobre as características e evolução desta doença realizados com crianças e adolescentes brasileiros. O objetivo deste estudo é avaliar a associação das alterações citogenéticas com as características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com LMA atendidas no Serviço de Hematologia do HC-UFMG.

Alterações citogenéticas são modificações que ocorrem nas células doentes (blastos) e fazem com que sejam diferentes das células normais. Existem várias alterações citogenéticas. Algumas contribuem para que o paciente responda melhor ao tratamento e outras contribuem para que o paciente tenha doença mais agressiva com pior resposta ao tratamento. As pesquisadoras acreditam que conhecer melhor essas alterações em um grupo de crianças e adolescentes brasileiros poderá contribuir para um melhor planejamento do tratamento desses pacientes.

Caso concorde com a participação de seu filho na pesquisa você estará dando o seu consentimento para que os prontuários médicos do paciente e os arquivos do laboratório do hospital sejam consultados pelas pesquisadoras para obtenção de dados clínicos (diagnóstico, tipo de tratamento, resposta ao tratamento) e laboratoriais (resultados de exames de citogenética e outros).

O tratamento e o acompanhamento do paciente não serão alterados em função da pesquisa. Não serão feitos exames de laboratório em função da pesquisa. Os exames de citogenética já fazem parte da rotina de exames realizados no momento do diagnóstico dos pacientes com LMA.

Os dados coletados neste trabalho serão confidenciais. O nome do paciente não aparecerá em nenhum momento. Apenas os responsáveis pela pesquisa terão acesso aos dados coletados.

O paciente continuará a ser atendido no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG, sem prejuízo ao seu cuidado, mesmo que não concorde com a sua inclusão no estudo ou, ainda, que desista de participar em qualquer momento. Você e seu filho não receberão remuneração por participar do estudo.

Apesar de não haver nenhum benefício imediato para o paciente, sua participação é muito importante. Esperamos que os resultados dessa pesquisa ajudem a melhorar o tratamento e as chances de cura dos pacientes com LMA.

Nós responderemos a qualquer questão relativa ao estudo, agora ou em qualquer momento que for necessário. Os telefones de contato do Serviço de Hematologia para contato com as pesquisadoras são os seguintes: 34099397 e 34099207. Você também

poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2o andar, sala 2005. Telefone 34094592).

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que após ter sido convenientemente esclarecido sobre a pesquisa “Análise das alterações citogenéticas e sua associação com características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mieloide aguda”, consinto em participar na qualidade de responsável pelo paciente-----
-----, até que eu decida em contrário.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20__

Assinatura do responsável: _____

Assinatura do paciente (crianças de 7 a 12 anos): _____

Assinatura do pesquisador: _____

TCLE 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INFORMAÇÕES DOS PESQUISADORES AO PACIENTE com idade de 13 anos a 17 anos

Título da pesquisa: Análise das alterações citogenéticas e sua associação com características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mieloide aguda.

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa porque tem o diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA). As pesquisadoras responsáveis pelo estudo são a Professora Benigna Maria de Oliveira e a bióloga Amanda de Lourdes Nunes.

Antes de você aceitar participar desta pesquisa é necessário que você compreenda as explicações a seguir. Esta declaração esclarece o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e cuidados durante o estudo. Também estabelece o seu direito de desistir de sua participação a qualquer momento.

A LMA é uma doença rara em crianças e existem poucos estudos sobre as características e evolução desta doença realizados com crianças e adolescentes brasileiros. O objetivo deste estudo é avaliar a associação das alterações citogenéticas com as características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com LMA atendidas no Serviço de Hematologia do HC-UFMG.

Alterações citogenéticas são modificações que ocorrem nas células doentes (blastos) e fazem com que sejam diferentes das células normais. Existem várias alterações citogenéticas. Algumas contribuem para que o paciente responda melhor ao tratamento e outras contribuem para que o paciente tenha doença mais agressiva com pior resposta ao tratamento. As pesquisadoras acreditam que conhecer melhor essas alterações em um grupo de crianças e adolescentes brasileiros poderá contribuir para um melhor planejamento do tratamento desses pacientes.

Caso concorde com sua participação na pesquisa você estará dando o seu consentimento para que o seu prontuário médico e os arquivos do laboratório do hospital sejam consultados pelas pesquisadoras para obtenção de dados clínicos (diagnóstico, tipo de tratamento, resposta ao tratamento) e laboratoriais (resultados de exames de citogenética e outros).

O seu tratamento e o acompanhamento não serão alterados em função da pesquisa. Não serão feitos exames de laboratório em função da pesquisa. Os dados coletados neste trabalho serão confidenciais. O seu nome não aparecerá em nenhum momento. Apenas os responsáveis pela pesquisa terão acesso aos dados coletados.

Você continuará a ser atendido no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG, sem prejuízo ao seu cuidado, mesmo que não concorde com a sua inclusão no estudo ou, ainda, que desista de participar em qualquer momento. Você não receberá remuneração por participar do estudo.

Apesar de não haver nenhum benefício imediato para você, sua participação é muito importante. Esperamos que os resultados dessa pesquisa ajudem a melhorar o tratamento e as chances de cura dos pacientes com LMA.

Nós responderemos a qualquer questão relativa ao estudo, agora ou em qualquer momento que for necessário. Os telefones de contato do Serviço de Hematologia para contato com as pesquisadoras são os seguintes: 34099397 e 34099207. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2o andar, sala 2005. Telefone 34094592).

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que após ter sido convenientemente esclarecido sobre a pesquisa “Análise das alterações citogenéticas e sua associação com características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mieloide aguda”, consinto em participar na qualidade de paciente até que eu decida em contrário.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 200__

Assinatura do paciente (idade 13 anos – 17 anos): _____

Assinatura do pesquisador: _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E SUA ASSOCIAÇÃO COM
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EVOLUÇÃO DAS CRIANÇAS E
ADOLESCENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**


AMANDA DE LOURDES NUNES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Ciências da Saúde.

Aprovada em 30 de junho de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Prof.^a Benigna Maria de Oliveira - Orientadora
UFMG


Prof.^a Sandra Guerra Xavier
UFMG


Prof.^a Karla Emília de Sa Rodrigues
UFMG

Belo Horizonte, 30 de junho de 2016.