Cristina Benitez Vendrame - Goloni

Estudo das Alterações Cariotípicas, do Rearranjo Gênico BCR/ABL e do Cromossomo 20 em Leucemias

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

1910001016

Cristina Benitez Vendrame-Goloni

Estudo das Alterações Cariotípicas, do Rearranjo Gênico *BCR/ABL* e do Cromossomo 20 em Leucemias

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto
T1016/01

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Genética, do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista - UNESP, para a obtenção do título de Mestre

São José do Rio Preto

2000

t 576.3:575:616
V453e

Patologia citogenética
Assunto CAPES:
2.02.05.00-7 - Genética Humana e Médica

Vendrame-Goloni, Cristina Benitez
Estudo das alterações cariotípicas, do rearranjo gênico *BCR/ABL* e do cromossomo 20 em leucemias / Cristina Benitez Vendrame Goloni. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2000.
154 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Agnes Cristina Fett Conte.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Leucemias. 2. Aberração Cromossômica. 3. Citogenética. 4. FISH. I. Fett-Conte, Agnes Cristina. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Estudo das alterações cariotípicas, do rearranjo gênico *BCR/ABL* e do cromossomo 20 em leucemias.

CDU : 576.3:575:616

Orientadora: Profa. Dra. Agnes Cristina Fett Conte

Departamento de Biologia Molecular

FAMERP - Faculdade de Medicina de Rio Preto

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética e no Laboratório de Citogenética Molecular do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro da CAPES (bolsa de Mestrado) e da FAMERP (bolsa de auxílio à pesquisa).

CRISTINA BENITEZ VENDRAME-GOLONI

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES CARIOTÍPICAS, DO REARRANJO GÊNICO *BCR/ABL* E DO CROMOSSO 20 EM LEUCEMIAS

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: .....

2° Examinador .....

3° Examinador .....

4° Examinador .....

5° Examinador .....

São José do Rio Preto, ____/_____/_____.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

"Para ser grande, sê inteiro:
Nada teu exagera ou exclui
Sê todo em cada coisa,
Põe quanto és no mínimo que fazes,
Assim em cada lago a lua toda brilha,
Porque alta vive..."

(Fernando Pessoa)

unesp

Dedico...

Aos meus pais, por tudo que sempre fizeram.

Ao Elmer, suporte e encorajamento dos meus sonhos.

À Louise, doce esperança...

Aos meus irmãos e cunhada, pela união e constante apoio.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Agnes Cristina Fett Conte, pela transmissão de conhecimentos e experiências profissionais, apoio e amizade demonstrados na orientação desse trabalho.

À Dra. Andréa Borduchi Carvalho Salles, pela colaboração e atenção no desenvolvimento desse trabalho.

Aos Profs. Drs. Ana Elizabete Silva e Spencer Luiz Marques Payão, pela análise da pró-forma e pelas sugestões apresentadas.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação Profa. Dra. Cláudia Márcia Carareto, pela seriedade e atenção.

Aos médicos do Banco de Sangue do Hospital de Base, Dr. Otávio Ricci Jr., Dr. Milton Ruiz, Dr. Paulo Zolla, Dra. Andréa Garcia e Dra. Leila N. B. Borin, pela colaboração e envio das amostras.

À Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo, pelo apoio, incentivo e atenção sempre dedicados.

À Dra. Marileila Varella Garcia, pelas informações e envio das sondas.

Às Biólogas Paula Maria Abdala Buassi e Valéria Cristina Ferrarese da Silva, à técnica Brasilina de Fátima Mafei Martins e à enfermeira Carina Tatiana Giunco, pelo companheirismo, amizade e ajuda no decorrer desse período.

À Pós-Graduanda Fátima M. Siqueira, pela amizade e troca de informações.

À todos os Professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pela atualização dos meus conhecimentos.

À todos os alunos do Curso de Pós-Graduação pela companhia e amizade.

Aos Funcionários Josué Rodrigues dos Santos e Maria Helena, pela dedicação e presteza na revelação das fotos.

Aos funcionários da Pós Graduação, em especial ao Oscar e Rosana, e à secretária do Departamento de Biologia, Simone, pela atenção que sempre me atenderam.

Ao Celso Pereira Reis Filho, pelo auxílio nas questões de informática.

À Deus, pela forte presença em minha vida.

À todos meus familiares e amigos que direta ou indiretamente ajudaram na concretização deste trabalho... meus sinceros agradecimentos.

Sumário

I - Introdução.....11
I.1. Considerações Gerais.....11
I.2. As Leucemias.....14
I.2.1. Leucemia Mielóide Crônica (LMC).....19
I.2.2. Leucemia Mielóide Aguda (LMA).....21
I.2.3. Leucemia Linfocítica Crônica (LLC).....23
I.2.4. Leucemia Linfocítica Aguda (LLA).....24
I.3. Alterações Cromossômicas e Leucemias.....25
I.4.Genes e Leucemias.....30
I.5. Transplante de Medula Óssea e Leucemia.....38
I.6. Objetivos.....40
II - Material e Métodos.....41
II.1. Casuística.....41
II.2. Métodos.....43
A. Obtenção de Células Metafásicas Neoplásicas de Sangue e Medula Óssea.....43
B. Bandamento GTG.....46
C. Hibridização *in situ* Fluorescente.....46
III - Resultados.....52
III.1. Citogenética Convencional.....54
III.2. Citogenética Molecular (FISH).....74
IV - Discussão.....85
V - Conclusões.....119
VI - Referências Bibliográficas.....120
VII - Anexos.....142
VIII - Resumo.....151
IX - Abstract.....153

I - Introdução

I.1. Considerações Gerais

O câncer, ou neoplasia maligna, pode ser definido genericamente como uma doença na qual há multiplicação e disseminação incontrolada, no organismo, de formas anormais das suas próprias células (RANG, 1997). Resulta de um processo anormal, não controlado, da diferenciação e proliferação celulares, inicialmente localizado, mas que pode se disseminar pelo corpo, ocasionando a formação de massas tumorais e levar à morte (CAMARGO, 1991). Envolve uma mudança pleiotrópica do estado celular à partir do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que desorganizam os eventos celulares normais (KAWAMURA, 1999).

As neoplasias, tanto malignas como benignas, são doenças genéticas (ROBBINS *et al.,* 1996). As mutações que lhe dão origem podem ser hereditariamente transmitidas pela linhagem germinativa ou adquiridas nos tecidos somáticos (ISSELBACHER, 1995). Tais alterações podem ser causadas por fatores internos, como os defeitos nos mecanismos de reparo ou replicação do DNA. Por exemplo, os indivíduos portadores das síndromes de instabilidade cromossômica, entre elas a Síndrome de Bloom, anemia de Fanconi e Ataxia Telangiectasia, têm uma chance maior de desenvolver neoplasias, principalmente hematopoéticas (SMITH, 1989; THOMPSON, 1993; MERTENS, *et al.*, 1998).



O início do processo maligno também pode ocorrer em função de alterações no DNA da célula, ocasionadas por agentes químicos, físicos ou biológicos. Os efeitos da radiação na predisposição às neoplasias malignas, incluindo as leucemias, são bem conhecidos, como também os da exposição ao benzeno e aos agentes alquilantes, que já foram comprovados em vários modelos animais (ROSENTHAL, 1995). Segundo SANDLER & ROSS (1997), colas, pesticidas, cigarro, tintas de cabelo, entre outros, também podem ser relacionados como fatores de risco para estas patologias.

Quando as alterações não são corrigidas pelo mecanismo de reparo do DNA ou não desencadeiam o processo de apoptose (morte celular programada), a célula inicia sua transformação. Durante o crescimento de um neoplasma existe um desequilíbrio entre proliferação e morte celulares, que são regulados por genes específicos (SIMÃO *et al*, 1999; BARCINSKI & DOS REIS, 1999). Sua evolução envolve as etapas de indução, promoção e progressão e, geralmente, é longa, aumentando as chances de exposição e interferência de fatores agravantes (CAMARGO, 1991; DRINKWATER & SUGDEN, 1996).

O processo neoplásico pode ser identificado desde o início, quando são detectadas alterações no DNA, que são sucedidas por alterações bioquímicas e morfológicas das células, numa seqüência de eventos em direção à malignidade e morte (CAMARGO, 1991). Portanto, a carcinogênese pode ser definida como um processo complexo, em que

uma alteração inicial não é o evento limite ou crucial e sim o acúmulo de mutações na mesma célula (TUBIANA, 1999).

Neste contexto, muitas evidências sugerem que a maioria dos neoplasmas são de natureza clonal, ou seja, surgem da expansão de uma única alteração celular inicial. Divisões celulares sucessivas produziriam subpopulações de células filhas com alterações genéticas adicionais, que poderiam fornecer vantagens seletivas e culminar na aquisição da malignidade. Algumas destas alterações poderiam dar às células, por exemplo, uma vantagem de crescimento, resultando em tumores com variantes clonais (HALL *et al.*, 1997). A carcinogênese também pode ser interpretada como um processo evolutivo: envolve mutações genéticas seguidas por seleção (BODMER, 1999), onde as células tumorais gradual e progressivamente adquirem um novo fenótipo característico, com um comportamento mais agressivo (PEJOVIC *et al.*, 1990).

Os avanços da genética molecular e da citogenética têm aumentado a capacidade de detecção das alterações das células neoplásicas, possibilitando a identificação de genes relacionados à etiologia e progressão da doença e a determinação dos mecanismos responsáveis pela patogênese do câncer, com implicações diretas no diagnóstico, prognóstico e terapia (VOGEL, 1997; HODGSON & MAHER, 1999). Entre tais avanços, a técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) tem se destacado e solucionado problemas que não podiam ser resolvidos pelas técnicas citogenéticas convencionais. Além de ser uma



alternativa rápida e simples, apresenta alta sensibilidade, total especificidade e possibilita a identificação de um gene ou região cromossômica específicos, mesmo em células interfásicas (ARKESTEIJN *et al.*,1996; ROBBINS *et al.*, 1996; PASKULIN *et al.*,1998).

I.2. Caracterização das Leucemias

Os cânceres são divididos em sólidos e não sólidos. Estes últimos incluem as leucemias, os linfomas, o mieloma múltiplo e a macroglobulinemia de Waldenström (RAPAPORT, 1990), neoplasias que acometem o tecido hematopoético (ROBBINS *et al.,* 1996). Os linfomas são tumores derivados do sistema linfóide periférico que envolvem os linfócitos B ou T (DE VITA & CANELLOS, 1999). O mieloma múltiplo, é uma proliferação maligna de plasmócitos primariamente aumentados dentro da medula óssea que, na sua distribuição difusa pela medula, lembra uma leucemia (RAPAPORT, 1990). A macroglobulinemia de Waldenström representa uma forma de linfoma e é definida como uma afecção proliferativa das células B que secretam uma imunoglobulina da classe IgM.

As leucemias são neoplasias malignas das células primordiais hematopoéticas, que se originam na medula óssea e se espalham no sangue periférico, podendo atingir diferentes tecidos e órgãos (ROBBINS *et al.*, 1996). São responsáveis por aproximadamente 2% de todos os casos de câncer, com uma incidência de cerca de 8:100.000 na

população geral. A incidência relacionada à idade mostra dois picos, um na infância e outro na velhice (HODGSON & MAHER, 1999).

A leucemia foi reconhecida como doença em 1845 por Craigie e Bennett e em 1846 por Virchow, quando faziam associações entre aumento do tamanho do fígado e alterações do sangue. Virchow propôs o nome de sangue branco ou leucemia em 1847 e, mais tarde, distinguiu duas formas, uma caracterizada por levar à esplenomegalia e outra por linfadenopatia (LEE *et al.*, 1993). As diferentes linhagens envolvidas foram então, sucessivamente sendo identificadas e caracterizadas por seus aspectos morfológicos, citoquímicos, imunológicos, citogenéticos e moleculares (GOASGUEN *et al.*, 1997).

A medula óssea contém células progenitoras (células tronco ou "stem cells") que são pluripotentes e possuem duas propriedades funcionais: de gerar novas células progenitoras (auto-renovação) e de diferenciar-se em qualquer uma das linhagens celulares do sangue (diferenciação). Com o início da diferenciação, a "stem cells" perde seu potencial pluripotente e direciona-se para a produção de uma ou mais linhagens celulares específicas. Perde também sua capacidade de auto-renovação, tornando-se uma célula progenitora (RAPAPORT, 1990) (Figura 1).

Basicamente, as leucemias são classificadas, de acordo com o tipo de célula envolvida, em mielóides (mielocíticas; granulocíticas; não-linfocíticas) e linfóides (linfocíticas) e, de acordo com o estado de

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

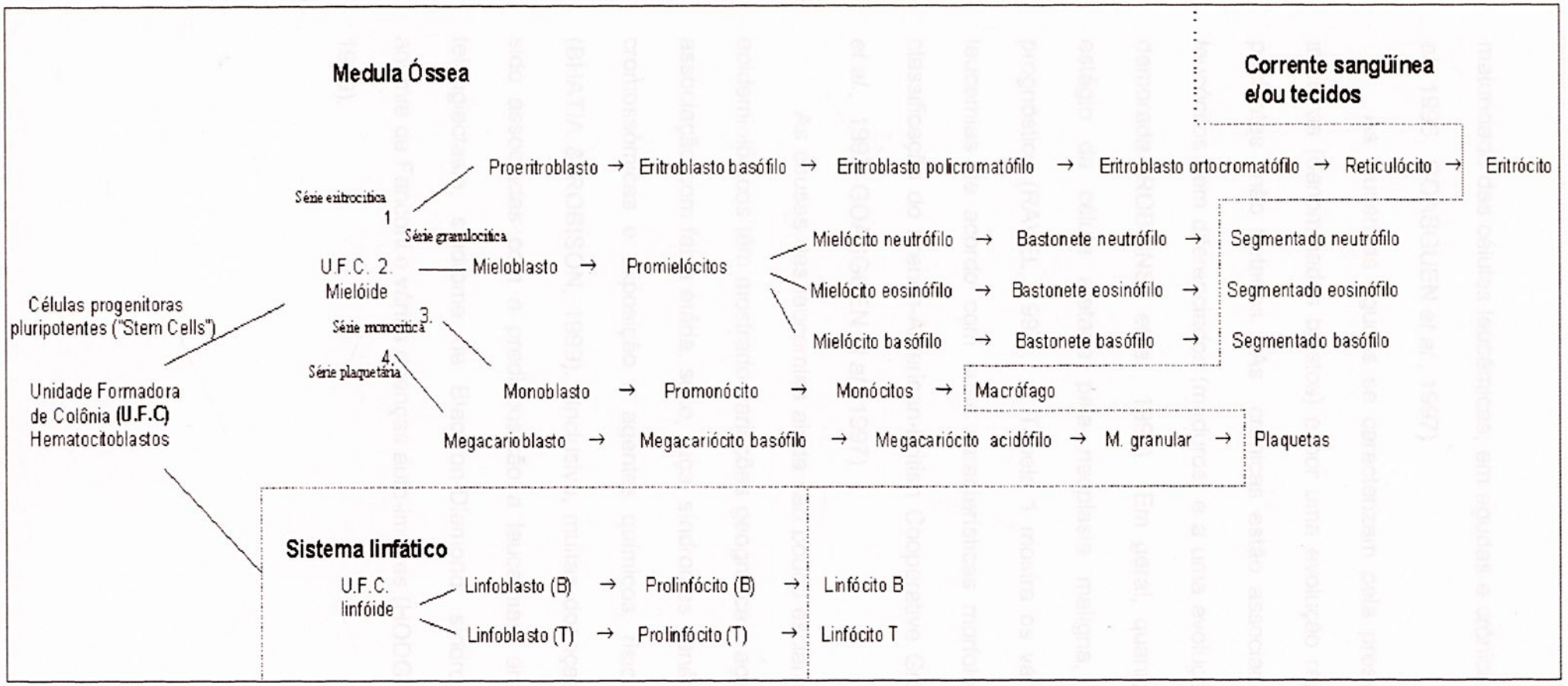


Figura 1. Esquema da hematopoese. Todas as células do sangue originam-se de células pluripotentes. A quantidade de proliferação e a direção da diferenciação é determinada pelo contato célula a célula no microdesenvolvimento da medula óssea e por proteínas reguladoras(citocinas) produzidas em resposta às necessidades.

maturidade das células leucêmicas, em agudas e crônicas (ROBBINS *et al.*, 1996; GOASGUEN *et al.*, 1997).

As leucemias agudas se caracterizam pela presença de células imaturas (denominadas blastos) e por uma evolução rápida e fatal nos pacientes não tratados. As crônicas estão associadas, no início, a leucócitos bem diferenciados (maduros) e a uma evolução relativamente demorada (ROBBINS *et al.*, 1996). Em geral, quanto mais inicial o estágio da célula afetada pela neoplasia maligna, mais grave o prognóstico (RAVEL, 1997). A Tabela 1 mostra os vários subtipos de leucemias de acordo com suas características morfológicas, segundo classificação do French-American-British Cooperative Group (FAB) (LEE *et al.*, 1993; GOASGUEN *et al.*, 1997).

As causas das leucemias ainda são pouco esclarecidas. Estudos epidemiológicos têm mostrado variações geográficas, agregação familial, associação com faixa etária, sexo, raça, síndromes genéticas, anomalias cromossômicas e exposição a agentes químicos, físicos e biológicos (BHATIA & ROBISON, 1999). Inclusive, muitas doenças genéticas têm sido associadas com a predisposição a leucemias, entre elas, ataxia telangiectasia, síndrome de Blackfon-Diamond, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi e várias doenças auto-imunes (HODGSON & MAHER, 1999).



Tabela 1. Classificação das leucemias segundo o grupo FAB, modificada de LEE *et al.* (1993), GOASGUEN *et al.* (1997) e LEE *et al.* (1998).

LEUCEMIAS

I - Mielóide, granulocítica, mielocítica ou não linfocítica

A. Crônica (LMC)

1-variantes clínicas

LMC típica (cromossomo Philadelfia presente)
LMC atípica (cromossomo Philadelfia ausente)
LMC juvenil

2-variantes morfológicas

leucemia eosinofílica crônica
leucemia basofílica crônica
leucemia monocítica crônica
leucemia neutrofílica crônica

B. Aguda (LMA) ou não-linfocítica aguda (ANLL)

M0 - mielocítica ou mieloblástica sem diferenciação
M1 - mielocítica ou mieloblástica com diferenciação mínima
M2 - mielocítica ou mieloblástica com diferenciação significativa
M3 - promielocítica aguda (forma usual) – APL
M3v - APL forma hipogranular não usual
M4 - mielomonocítica aguda – AMML
M4eo - M4 com maturação eosinofílica
M4baso- M4 com maturação basofílica
M5a - monocítica aguda pobremente diferenciada – AmoL
M5b - monocítica aguda bem diferenciada
M6 - eritróide aguda – AEL
M7 - megacariocítica aguda
AMLL - linhagem mista aguda
mieloblástica com marcador linfóide
linfocítica com marcador mielóide
AUL - aguda indiferenciada

II – Linfóide ou linfocítica

A. Crônica (LLC)

B. Aguda (LLA)

L1 - células pequenas, morfologia homogênea
L2 - células grandes, morfologia heterogênea
L3 - células grandes, morfologia homogênea

I.2.1. Leucemia Mielóide Crônica (LMC)

A LMC é uma doença mieloproliferativa com expansão clonal de células progenitoras hematopoéticas primitivas e transformadas (FADERL *et al.*, 1999). Especificamente, é uma doença genética das células somáticas, que se caracteriza pela produção excessiva de células da série granulocítica e corresponde a um quarto de todos os casos de leucemias. É diagnosticada em um ou dois indivíduos por 100.000/ano, com ligeiro predomínio do sexo masculino (1,3:1) e a incidência aumenta com a idade. A idade média ao diagnóstico varia entre 45 e 50 anos, embora alguns autores relatem uma idade média acima de 67 anos (BENNETT & PLUM, 1997; KOBZEV *et al.*, 1998; FADERL *et al.*, 1999).

Uma leucocitose persistente e inexplicada e um aumento do tamanho do baço, sugerem o diagnóstico de LMC. Os sintomas iniciais incluem fadiga, fraqueza, tolerância reduzida a exercícios físicos, anemia, perda de apetite e peso, cefaléia, febre, frio, sudorese e dor óssea (WYNGAARDEN & SMITH, 1990; FADERL *et al.*, 1999). Se caracteriza por um curso clínico bifásico ou trifásico em que a fase inicial crônica é seguida por uma fase acelerada e uma fase terminal blástica (FADERL *et al.*, 1999).

A fase inicial da doença é relativamente benigna e dura cerca de três anos. É denominada fase crônica e se observa acúmulo de precursores da linhagem granulocítica e seus derivados celulares em diferentes estágios de maturação, na medula óssea e no sangue

periférico. Algumas vezes a quantidade de plaquetas também está elevada. Clinicamente, se manifesta por maior ou menor grau de anemia, esplenomegalia e hepatomegalia. A doença progride, então, para uma fase mais grave, a fase acelerada e, finalmente, depois de alguns anos, entra na fase terminal aguda ou crise blástica. A crise blástica é um processo altamente maligno que se torna indistinguível da leucemia mielóide aguda e responde muito mal ao tratamento. As células perdem a capacidade de diferenciação, de responder aos fatores reguladores da mielopoese e se desencadeia uma infiltração celular sistêmica, com tendência a hemorragias por trombocitopenia e a infecções por leucopenia (CAMACHO, 1988; AZIZ, 1996; HODGSON & MAHER, 1999; THIJSEN *et al.*, 1999).

Com base na presença ou ausência de um pequeno cromossomo derivado da t(9;22)(q34;q11), denominado cromossomo Philadelphia (Ph), a LMC pode ser dividida em dois subtipos: típica (Ph presente) e atípica (Ph ausente). Estas categorias apresentam diferenças na manifestação clínica, evolução e sobrevida. Por exemplo, a sobrevida dos pacientes com LMC típica é de cerca de oito a nove anos à partir do aparecimento da doença e estes respondem melhor ao tratamento. Os pacientes com LMC atípica, geralmente, respondem mal ao tratamento e apresentam uma sobrevida mais curta (ROWLEY, 1988, 1990; WYNGAARDEM & SMITH, 1990; AURICH *et al.*, 1997). Segundo LEE *et al.* (1993), uma minoria destes pacientes apresenta variações

morfológicas, onde pode predominar eosinofilia, basofilia, monocitose ou neutrofilia.

A expectativa média de vida dos pacientes com LMC é de cerca de quatro anos. Contudo, é observada grande variabilidade, dependente do tempo decorrido até a crise blástica. Cerca de 10% de todos os pacientes com LMC vive mais que oito anos após o diagnóstico da doença (THIJSEN *et al.*, 1999).

A maioria dos casos de LMC não apresenta história de exposição excessiva à radiação ionizante ou a leucemógenos químicos, mas qualquer agente capaz de causar mielotoxicidade ou lesão no DNA é suspeito de produzir LMC. A ocorrência familial é rara e as crianças nascidas de mães que apresentam a doença são freqüentemente normais (WYNGAARDEN & SMITH, 1990). Porém, LILLICRAP & STERNDALE (1984), relataram casos de LMC familial: uma família com três indivíduos afetados em três gerações.

I.2.2 - Leucemia Mielóide Aguda (LMA)

A leucemia mielóide aguda se caracteriza por um acúmulo excessivo de células precursoras não-linfocíticas imaturas, na própria medula óssea, no sangue periférico e também em outros tecidos. Isso ocorre devido ao aumento da atividade proliferativa ou redução da morte celular (mais provável), com um bloqueio na maturação, impedindo a passagem para uma das quatro formas de diferenciação das células

mielóides, ou seja, para granulócitos diferenciados (neutrófilo, eosinófilo ou basófilo), monócitos, eritrócitos ou megacariócitos (HEIM & MITELMAN, 1995).

Várias tentativas têm sido feitas para classificar este tipo de leucemia com base na similaridade entre células leucêmicas e nos precursores celulares, que podem ser identificados através dos diferentes estágios de desenvolvimento na hematopoese normal. Essa classificação em subgrupos facilita o prognóstico e a terapêutica e contribui para o entendimento dos processos biológicos desencadeadores da doença (HEIM & MITELMAN, 1995).

A incidência nos EUA é de cerca de 2,5:100.000 indivíduos e cerca de 9.000 pessoas são diagnosticadas todo ano. A incidência aumenta gradualmente com a idade, sem apresentar pico precoce, e há um leve predomínio do sexo masculino. Cerca de metade dos casos de LMA ocorre em pacientes com menos de 50 anos de idade (BENNETT & PLUM, 1997; DEVITA, 1997).

As doenças genéticas associadas com a predisposição a LMA incluem a síndrome de Down, anemia de Fanconi, Neurofibromatose tipo 1 (NF1) e a síndrome de Kostmann. Uma síndrome autossômica dominante de ataxia cerebelar, anemia hipoplástica e predisposição à LMA (associada com monossomia do cromossomo 7 em células da medula óssea) foi descrita em duas gerações de uma família por LI et al, (1981) e em uma outra família por DAGHISTANI et al, (1990).



Cerca de 10 a 30% dos casos de LMA ocorrem como uma malignidade secundária em sobreviventes de tumores não relacionados a mielodisplasias, tratados com irradiação e/ou drogas citotóxicas. Inclusive, o risco de desenvolver uma neoplasia secundária após 20 anos do diagnóstico de um câncer primário é estimado em cerca de 8 a 12%, e, nestes casos, a LMA é a neoplasia mais freqüente (LEONE *et al.*, 1999). O predomínio do sexo feminino entre os pacientes com LMA secundária (LMA-s), se deve à exposição a drogas citotóxicas preferencialmente usadas no tratamento dos cânceres de mama e ovário (SEYMOUR *et al.*, 1999).

I.2.3 - Leucemia Linfocítica Crônica (LLC)

A LLC é uma neoplasia monoclonal de linfócitos de vida longa e proliferação lenta, que são imunologicamente defeituosos. Na grande maioria dos casos resulta de uma proliferação monoclonal de linfócitos B e uma pequena porcentagem deriva de linfócitos T (WYNGAARDEN & SMITH, 1990). Contribui com 25% de todos os casos de leucemia e acomete indivíduos com mais de 50 anos de idade (ROBBINS *et al.*, 1996). É a forma mais comum de leucemia em adultos no ocidente (KALIL & CHESON, 2000).

Do ponto de vista clínico, no início da doença muitos pacientes são assintomáticos e uma linfadenopatia e/ou hepatoesplenomegalia são detectadas no exame físico de rotina. A ocorrência de doenças auto-

imunes associadas e de infecções por patógenos oportunistas são as maiores causas de morte (KALIL & CHESON, 2000).

A etiologia da LLC é desconhecida. A doença não tem sido associada a radiação ionizante ou a vírus, mas há hipóteses de que a exposição a herbicidas ou pesticidas seja um fator de risco (BENNETT & PLUM, 1997). Parece haver uma predisposição genética, pois já foram observados vários casos de recorrência familial (WYNGAARDEN & SMITH, 1990).

I.2.4 - Leucemia Linfocítica Aguda (LLA)

A LLA resulta de uma proliferação maligna de linfoblastos que são precursores de linfócitos B e T (HODGSON & MAHER, 1999). As células linfóides imaturas se acumulam rapidamente e substituem progressivamente as da medula óssea. Com o decorrer do tempo, os blastos leucêmicos passam para a corrente sangüínea e, posteriormente, para os linfonodos, baço e outros órgãos vitais. Se não for tratada, esta leucemia tem uma evolução rápida e fatal. Exceto a LLA da infância, na qual a maioria das crianças pode ser curada, a sobrevida para adultos permanece sombria (ROSENTHAL,1995; BENNETT & PLUM, 1997).

É uma doença basicamente de crianças e jovens. Afeta três a cada 100.000 crianças por ano, é um pouco mais freqüente em meninos e a incidência é maior por volta dos quatro anos de idade. Também

acomete duas vezes mais pessoas brancas do que não-brancas (COTRAN *et al.,* 1991; HEIM & MITELMAN, 1995).

Anomalias genéticas ocorrem em cerca de 3% dos casos e a exposição a radiação é observada em menos de 8%. Na maioria das vezes a etiologia não é conhecida, embora uma origem infecciosa, possivelmente viral, também seja considerada (HODGSON & MAHER, 1999).

Doenças genéticas específicas associadas com LLA incluem a síndrome de Down, ataxia telangiectasia, síndrome de Bloom, síndrome de Li-Fraumeni, agamaglobulinemia de Bruton e deficiência de adenosina desaminase (HODGSON & MAHER, 1999).

I.3 Alterações Cromossômicas e Leucemias

As alterações cromossômicas observadas em neoplasias podem ser divididas em primárias e secundárias. As primárias estão diretamente relacionadas com a origem do câncer e podem ser encontradas como a única anomalia presente nas células neoplásicas. São freqüentes e específicas de determinados tipos de neoplasias e ocorrem precocemente na tumorigênese. As aberrações secundárias, por sua vez, são eventos adicionais e são observadas em células que conservam a alteração primária ou não. Podem ser um epifenômeno ou determinar o comportamento biológico do tumor, incluindo a capacidade de invasão (metástase) e a resposta à terapia. Além disso, podem se tornar mais

freqüentes nos estágios mais avançados da doença e seu aparecimento depender da aberração primária e do tipo particular de neoplasia envolvida (HODGSON & MAHER, 1999).

Nas leucemias têm sido observadas alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais primárias ou secundárias altamente consistentes e específicas (POPESCU & ZIMONJIC, 1997). Inclusive, a primeira alteração cromossômica associada a uma malignidade humana foi encontrada em células de medula óssea de pacientes com LMC (NOWELL & HUNGERFORD, 1960). Os autores acreditaram se tratar de um cromossomo 21 deletado, que recebeu o nome de cromossomo Philadelphia, em homenagem à cidade onde foi primeiramente observado. Só em 1973, através da técnica de bandamento G, ROWLEY observou que o cromossomo Ph era, na verdade, resultante de uma translocação envolvendo os cromossomos 9 e 22, com pontos de quebra em 9q34 e 22q11 (IMPARATO, *et al.,* 1998). Posteriormente, PRAKASH & YUNIS (1984), localizaram os pontos de quebra nas subbandas 22q11.21 e 9q34.1.

A detecção das alterações cromossômicas consistentes e específicas, além de contribuir para a compreensão da base genética das leucemias, tem importância fundamental no diagnóstico e prognóstico dos pacientes (JOHANSSON *et al.*, 1997b). O diagnóstico preciso e a classificação celular exata, são essenciais para o sucesso do tratamento e para estudo dos processos biológicos destas doenças (ISSELBACHER,

1995; PUI, 1997; ROWLEY, 1999). Por exemplo, em 90% dos casos de LMC, na fase crônica, as células apresentam o cromossomo Philadelphia (Ph)(EIBL, *et al.*, 1997). Durante a progressão da doença podem surgir aberrações cromossômicas adicionais, com o envolvimento preferencial dos cromossomos 8, 17 e 22. É freqüente a ocorrência da trissomia do cromossomo 8, do isocromossomo i(17q) e de um cromossomo Ph extra. Embora em menor freqüência, são também encontradas trissomia do 19, monossomia do 7 e monossomia e trissomia do 17 (HEIM & MITELMAN, 1995). A trissomia do 8 é o achado citogenético mais comum durante a fase aguda da doença (FADERL *et al.*, 1999). Além disso, a presença do cromossomo Ph está relacionada a um prognóstico bom e, embora seja muito mais freqüente em LMC, a t(9;22) também é observada em outros tipos de leucemias e, geralmente, associada a um prognóstico ruim.

Translocações, deleções e inversões clonais são observadas em aproximadamente dois terços dos casos de LMA (CALIGUIRI *et al.*,1997). A t(8;21)(q22;q22) é uma alteração estrutural associada ao subtipo M2 e a um prognóstico favorável. Parece ser mais freqüente em jovens, rara em pacientes com mais de 50 anos e em 15% dos casos é encontrada como única anomalia (LANGABEER *et al.*, 1997; MELNICK *et al.*, 2000).

Alguns cromossomos, além de estarem envolvidos em alterações estruturais, também são observados em alterações numéricas. A trissomia do cromossomo 8, por exemplo, é a aberração numérica mais freqüentemente encontrada em LMA primária. É comum em M2, M4 e M5

e ocorre como única alteração em 5% de todas as anomalias citogenéticas encontradas nos subtipos FAB desta leucemia (HEIM & MITELMAN, 1995; ZHANG *et al.*, 1999).

Alterações cromossômicas constitucionais também podem estar relacionadas com a predisposição a leucemias. O exemplo típico é o da Síndrome de Down (SD) ou trissomia do cromossomo 21 cujos afetados, têm um risco seis vezes maior que o da população geral de ter câncer, especialmente leucemias. Se apenas estas forem consideradas, o risco destes pacientes é 10 a 20 vezes maior que o da população. A base desta predisposição ainda não é conhecida, embora, no cromossomo 21 já tenham sido identificados genes envolvidos na hematopoese (ZIPURSKY, 1997; KEMPSKI *et al*, 1997; SATGÉ *et al*, 1998).

Nos primeiros meses de vida, os pacientes com SD tendem a desenvolver uma desordem mieloproliferativa transitória, reconhecida como leucemia transitória ou mielopoese anormal transitória (MAT), que regride espontaneamente. Mas, cerca de 25% destes casos não regridem e desenvolvem leucemias agudas até os três anos de idade (CAUANI, 1998). A maioria das células na MAT não apresenta alterações cariotípicas adicionais à trissomia do 21, diferentemente daquelas das leucemias. Portanto, a proliferação anormal das células pode estar relacionada à cópia extra do 21. As alterações cariotípicas adicionais podem ser responsáveis pela evolução da doença, sugerindo, assim, que a trissomia é o fator predisponente e que outros eventos podem ser



requeridos antes do desenvolvimento leucêmico (KEMPSKI, 1997). É interessante que em indivíduos sem SD, portadores de LLA-L1 e L2, a trissomia do 21 pode ser observada como única anomalia ou como anomalia adicional em cerca de 3% dos casos e, naqueles com SD portadores de leucemias, pode ser a única alteração encontrada (HEIM & MITELMAN,1995).

Certas alterações como inversões, são mais raras, porém têm sido encontradas com freqüência em certos tipos de LMA. Por exemplo, a inversão paracêntrica do cromossomo 3, envolvendo as bandas 3q21 e 3q26, tem sido descrita em muitos casos. Pacientes com inv(3)(q21q26) têm prognóstico ruim, são mais resistentes à quimioterapia convencional e têm sobrevida curta (SHI *et al.*, 1997). SCHNITTGER *et al.* (1997), encontraram envolvimento das bandas 3q21 e q26 em todos os subtipos de LMA, exceto M3, na crise blástica de LMC e em outros.

A hiperdiploidia, com mais de 50 cromossomos, é a anomalia citogenética mais comum na LLA. É observada em 25 a 40% das crianças com idades superiores a um ano que sofrem dessa doença e está relacionada com um bom prognóstico (NORDGREN *et al.,* 1997).

Deleção intersticial ou terminal do braço longo do cromossomo 20, tem sido descrita como uma anomalia cariotípica presente em vários tipos de doenças hematológicas. Foi descrita primeiramente como uma anomalia de um cromossomo do grupo F em amostras de medula óssea de pacientes com policitemia vera e identificada como 20q- por REEVES

et al. em 1972. Entretanto, tais deleções têm sido observadas em outras doenças mieloproliferativas crônicas, incluindo metaplasia mielóide agnogênica e trombocitemia essencial, mas não em LMC Ph +. Também já foi encontrada como anomalia cariotípica clonal única em todos os subtipos de síndromes mielodisplásicas e é considerada uma anomalia cariotípica primária em LMA (DAVIS *et al.*, 1984; DEMORY *et al.*, 1988; NOWELL *et al.*, 1989; SESSAREGO *et al.*, 1989; MERTENS *et al.*, 1991; AATOLA *et al.*, 1992; MOREL *et al.*, 1993; CAMPBELL *et al.*, 1994). Porém, é difícil determinar exatamente o ponto de quebra usando técnicas citogenéticas convencionais, devido ao segmento envolvido ser extremamente pequeno e de tamanho variável (KURTIN *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 1998).

As manifestações citogenéticas de amplificação gênica como "double minutes" (dmin) e as regiões homogeneamente coradas (HSR), que são muito freqüentes em tumores sólidos, são pouco observadas em leucemias. Em LMA, os dmin são encontrados em 1% dos casos (CALIGIURI *et al.*, 1998; SAMBANI, *et al.*, 1998).

I.4 Genes e Leucemias

A citogenética convencional e, mais recentemente, a citogenética molecular, têm permitido o mapeamento de vários genes envolvidos nos processos leucêmicos (FEJZO *et al.*, 1998). A Hibridação *in situ* Fluorescente, (FISH) é um método rápido, sensível e confiável, que

permite a identificação de cromossomos inteiros ou partes destes, tanto em metáfases como em núcleos interfásicos (WILKINSON, 1994; SOTO-QUINTANA *et al.*, 1998). Seus avanços, associados às técnicas de biologia molecular, permitiram determinar quais genes, ou quais regiões estão envolvidos em translocações, deleções ou amplificações (ROWLEY, 1999) e verificar a existência de dois tipos de alterações moleculares: ativação gênica e fusão de genes (CALIGIURI *et al.*, 1997).

A ativação gênica ocorre quando os elementos reguladores da transcrição de um gene se justapõe a um outro gene e, assim, sob o controle de um novo promotor e/ou uma região "enhancer", a expressão do gene afetado se torna contínua, levando a leucemogênese. Por outro lado, a fusão gênica ocorre quando segmentos de dois genes diferentes se unem, originando um gene quimérico, formado pela porção 5' terminal de um deles com a porção 3' terminal do outro. A proteína quimérica resultante contém estrutura e domínios funcionais de diferentes proteínas selvagens e pode levar ao processo de leucemogênese (CALIGIURI *et al.*, 1997).

Entre os genes envolvidos nos processos leucêmicos, destacam-se os oncogenes, cujos produtos têm a propriedade de transformar as células normais em neoplásicas. Tais genes derivam de alterações em genes celulares normais denominados proto-oncogenes, que atuam no controle do crescimento e da diferenciação celulares (ROBBINS *et al.*, 1996; ARRUDA *et al.*,1997). Essa conversão pode decorrer de

unesp

translocações, inversões, deleções ou outras aberrações e a ativação, mesmo de um único alelo, pode induzir a transformação neoplásica (WEINBERG, 1989; POPESCU *et al.*, 1997).

Por exemplo, em LMC, na clássica t(9;22) o oncogene *c-ABL*, mapeado em 9q34, é translocado para uma pequena região de 6 kb do cromossomo 22, designada como região de ponto de quebra ou *BCR*. Essa translocação resulta na transcrição de um novo RNAm híbrido BCR/c-ABL, de 8,5 kb, e em um produto protéico de fusão, uma proteína quimérica timidina quinase bcr/abl, de 210KD. Estes são maiores que o RNAm c-ABL normal (6 a 7 kb) e que a proteína deste (145 KD) (WYNGAARDEN & SMITH, 1990; HEIM & MITELMAN,1995, AZIZ,1996). Esta proteína quimérica altera o ciclo celular, o processo de apoptose e induz a expressão de outros genes específicos, afetando a maioria dos pontos de controle e induzindo a proliferação, inclusive, por inibir o caminho apoptótico mediado pelo gene c-*MYC*, ativando assim a transcrição e levando ao crescimento celular descontrolado (PERALTA-ZARAGOZA *et al.*, 1997; SÁNCHES GARCIA, 1997).

Na anomalia mais freqüentemente envolvida na LMA-M2, a t(8;21), o gene quimérico resultante *AML1/ETO* produz um transcrito que, provavelmente, codifica um fator de transcrição capaz de induzir a transformação leucêmica alterando o ciclo celular e o processo de apoptose, através da interação com genes normalmente regulados pelo *AML1* (ARRUDA & FIGUEIREDO, 1997; LANGABEER *et al.*,1997;

unesp

PERALTA-ZARAGOZA *et al.*, 1997; PASKULIN *et al.*, 1998; RUBNITZ, 1998). Segundo GOVAERTS *et al.* (1998), a deficiência parcial ou total do cromossomo 8, é fundamental para o desenvolvimento da LMA, sugerindo a presença, neste cromossomo, de genes importantes relacionados ao processo leucêmico.

Na trissomia do cromossomo 21 a predisposição a leucemias, especialmente LLA, pode envolver a participação de alguns genes mapeados em 21q, como o *AML-1*, cujo produto parece atuar na hematopoese normal (KEMPSKI, 1997; RUBNITZ, 1998). Estudos realizados por SHIMADA *et al.* (1997), sugeriram que o segmento do gene *AML1* envolvido na t(16;21)(q24;q22), observada em LMA, se estende do exon 5 ao exon 6. Mutações submicroscópicas envolvendo estes genes poderiam explicar os casos de leucemia em SD sem alterações adicionais à trissomia do 21.

Na leucemia promielocítica aguda (LMA-M3), a t(15;17) que está relacionada a um bom prognóstico, une o gene *RARA* ou *RAR*α (receptor do ácido retinóico) do cromossomo 17, ao gene *PML* (promielocítico) do cromossomo 15 (*PML/RARA*), cujo produto quimérico é capaz de induzir a diferenciação celular nas células blásticas (ARRUDA *et al.*, 1997).

A inversão do cromossomo 16, freqüentemente encontrada nos casos de LMA-M4eo, permite a fusão *CBFB/MYH11* e parece ter um prognóstico favorável (ARRUDA *et al.*, 1997).

Uma outra classe de genes relacionados com o processo neoplásico é a dos genes supressores de tumor ou anti-oncogenes, que nas células normais controlam o crescimento e a diferenciação celulares. Alterações em homozigose nestes genes podem desencadear o processo maligno. Portanto, no desenvolvimento tumoral atuam como genes recessivos (ROBBINS *et al.,* 1996; ARRUDA *et al.*, 1997).

O gene *TP53* mapeado em 17p13.1, é um exemplo de supressor de tumor cujo produto, a proteína p53, funciona como um regulador negativo do ciclo celular (BOUKAMP *et al.*, 1997; PERALTA-ZARAGOZA *et al.*, 1997). Mutações neste gene têm sido observadas tanto nos estágios mais precoces como nos mais avançados do desenvolvimento tumoral (PELLER *et al.*, 1998). Em pacientes com LMC são encontradas em cerca 30% dos casos, especialmente naqueles em crise blástica. Estudos moleculares têm indicado que em cerca de 25% dos casos de LMC em progressão, ocorre inativação do gene *TP53* por perda da expressão, provocada por rearranjos ou mutações em ponto (HEIM & MITELMAN, 1995).

BROWN (1997), relatou o envolvimento de outros supressores de tumor envolvidos no processo leucêmico, como o gene *KIP1* mapeado em 12p13, o gene *DCC* mapeado em 18q21, o gene *Rb* localizado em 13q14 e o *NF1* mapeado em 17q1.2. A perda deste último, por exemplo, tem sido associada a LMC do tipo juvenil.



O envolvimento dos genes supressores de tumor na leucemogênese não está bem esclarecido e a perda não casual de material cromossômico, observada de maneira consistente em diversas leucemias, como 3p-, 5q-, 7q-, 17q- e 20q-, sugerem o envolvimento de outros supressores (JOHANSSON *et al.*, 1997a; STANLEY, 1997).

A Tabela 2 mostra alguns rearranjos cromossômicos e os genes envolvidos, consistentemente observados em diferentes tipos de leucemias.

Tabela 2. Algumas alterações cromossômicas comuns em leucemias e genes envolvidos, observados consistentemente em vários tipos de leucemias., segundo HEIM & MITELMAN (1995), SÁNCHEZ-GARCÍA (1997), VOGEL (1997), LEE *et al* (1998) e ROWLEY (1999) com modificações.

Doença	Anomalia cromossômica	Gene(s) envolvido(s)
LMC fase inicial	t(9;22)(q34;q11)	*ABL;BCR*
LMC fase blástica	t(9;22), +8, +Ph, +19, i(17q)	*ABL;BCR*
LMA-M1	t(1;3)(p36;q21)	*PAX7*; *RPM1*
LMA-M2	t(8;21)(q22;q22)	*ETO;AML1*
APL-M3,M3v	t(15;17)(q22;q11-12)	*PML;RARA*
LMA-M4eo	inv(16)(p13;q22), t(16;16)(p13;q22)	*MYH11;CBFB*
	del (16)(q22)	*CBFB*
LMA-M4/	t(9;11)(q22;q23)	*AF9;MLL*
LMA-M5	t(10;11)(p11-15;q23)	? ;*MLL*
	t(11;17)(q23;q25)	*MLL*; ?
	t(11;19)(q23;p13)	*MLL;ENL*
	Outras t (11q23)	*MLL*
	del(11)(q23)	*MLL*
LMA	t(6;9)(p23;q34)	*DEK;ABL*
	t(3;3)(q21;q26) ou inv(3)(q21;q26)	*RPM1* ;*EVI1*
	+21	*AML-1*(?)
	-7 ou del(7q)	?
	-5 ou del(5q)	?
	del(20q)	?
	t(12p) ou del(12p)	*TEL*, ? $P27^{KIP1}$
	-Y	?
LMA	-7, del(7q), -5, del(5q)	; *IRF1*
relacionada a .terapia	t(11q23)	*MLL1*
	t(3;21)(q26;22)	*EAP/MDS1/ EV-1; AML1*

Tabela 2. Continuação

	t(4;11)(q21;q23)	*AF4;MLL*
	t(9;11)(q21;q23)	*AF9;MLL*
	t(11;19)(q23;p13)	*MLL;ENL*
	t(12;21)(p13;q22)	*TEL;AML1*
LLA-B	t(9;22)(q34;q11)	*ABL;BCR*
	t(8;14)(q24;q32)	*c-MYC;IgH*
	t(2;8)(p12;q24)	*IgL-κ;c-MYC*
	t(8;22)(q24;q11)	*IgL-λ ; BCR*
	t(8;12)(q24;q22)	*c-MYC;BTG*
LLA-pré T	t(9p),del(9p)(p21-22)	
LLA-T	t(8;14)(q24;q11)	*c-MYC;TCR-α*
	t(7;19)(q35;p13)	*TCR-β ; LYL1*
	t(1;14)(p32;q11)	*TAL1/ SCL;TCR-α*
	t(7;9)(q35;q34)	*TCR-β ; TAL2*
	t(11;14)(p15;q11)	*LMO1 ; TCRδ*
	t(11;14)(p13;q11)	*LMO2;TCRδ/ TCR-α*

/ = separação entre nomes diferentes dados ao mesmo gene (sinônimos)

; = separação entre diferentes genes envolvidos no rearranjo

I.5. Transplante de Medula Óssea e Leucemia

Os primeiros ensaios de transplante de medula óssea datam de 1949, em modelos animais desenvolvidos por JACOBS *et al.* Grandes progressos foram necessários até a realização em humanos, em 1980 (THOMAS, 1999). O transplante alogênico de "stem cell", por exemplo, tem alterado o curso clínico da LMC, pois induz remissões prolongadas e, possivelmente, à cura. Contudo, poucos pacientes ainda são elegíveis para este tratamento, em função da disponibilidade de doador compatível, da restrição da idade para se submeter ao mesmo (menos de 50 anos) e da fase da doença (no primeiro ano após o diagnóstico) (FADERL, *et al.*, 1999).

As células transplantadas conservam o genótipo do doador. Pode-se, portanto, considerar o transplante como uma forma de terapia gênica, pois resulta na modificação do genoma somático do receptor, que se torna uma quimera (THOMPSON & THOMPSON, 1993).

Após o transplante, é importante acompanhar a conversão da hematopoese do receptor na do doador. Inicialmente, acreditava-se em uma conversão completa, evento conhecido como quimerismo completo. Atualmente, as evidências de persistência ou reaparecimento da hematopoese do receptor vêem aumentando, e não se trata de um evento raro. A coexistência de células do doador e receptor na medula óssea e/ou sangue periférico é conhecida como quimerismo misto, que pode ser estável, quando detectado durante um período mínimo de um ano, ou

unesp

transitório, quando detectado por um período de tempo curto (HOKAMA *et al.*, 1999).

O acompanhamento traduz o sucesso ou não do transplante. Por exemplo, o *status* quimérico do receptor após TMO pode ser possível através da técnica de FISH (SMITH *et al.*, 1999a).

I.6. Objetivos

De acordo com o exposto e considerando a importância da investigação de anomalias cromossômicas para o diagnóstico, prognóstico, tratamento e entendimento dos mecanismos biológicos das leucemias, o presente trabalho teve como objetivos:

1 - Estudar as alterações cariotípicas de células da medula óssea e/ou do sangue periférico, de pacientes portadores de leucemias, através das técnicas de citogenética convencional.

2 - Investigar a presença do rearranjo gênico *BCR/ABL* e de alterações do cromossomo 20 nestes mesmos tecidos, através da técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH).

II - Material e Métodos

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo CONEP (Comitê Nacional de Ética em Pesquisa) (processo nº 07/98) em conformidade com as normas regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/96 do Ministério da Saúde.

II.1 - Casuística

Foram estudadas amostras de sangue e/ou de medula óssea de vinte e oito pacientes, quatorze do sexo masculino e quatorze do sexo feminino, portadores de diferentes tipos de leucemias, com idades variando de nove a setenta e seis anos ($\overline{x} \pm s = 59,9$), não submetidos a tratamento quimio ou radioterápico, atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME).

Foram excluídos do estudo pacientes com outro diagnóstico hematológico que não leucemia, aqueles em tratamento quimio e/ou radioterápico e aqueles que se recusaram de participar do mesmo. A Tabela 3 apresenta o sexo, a idade, o diagnóstico da leucemia e o tipo de amostra recebida (sangue e/ou medula óssea) em cada caso.

Os hematologistas foram os responsáveis pela obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I) em função do seu contato direto com os pacientes. Os resultados foram entregues diretamente para estes profissionais e sua aplicação clínica ou não seguiu os critérios da equipe médica.



Tabela 3. Sexo, idade, diagnóstico da leucemia e tipo de amostra recebida de cada caso.

Caso	Sexo	Idade	Diagnóstico	Amostra
2486	F	24	LMC	S
2500	F	47	LMC	S
2532	M	39	LMC	S
2556	M	16	LMC	S
2588	F	39	LMC	MO
2594	F	54	LMC	S, MO
2624	M	45	LMC	MO
2628	F	76	LMC	MO
2673	F	55	LMC	S, MO
2692	F	60	LMC	S, MO
2723	F	19	LMC	S
2741	M	59	LMC	S, MO
2766	F	31	LMC	S, MO
2809	M	31	LMC	S
2855	M	19	LMC	S, MO
2642	M	73	LMA-M7	S, MO
2661	F	39	LMA	S, MO
2699	F	41	LMA-M1	S, MO
2710	M	33	LMA-M1	S, MO
2724	F	36	LMA-M1	S, MO
2744	F	32	LMA-M6	S, MO
2776	M	57	LMA	S, MO
2777	M	69	LMA-M3	S, MO
2787	M	70	LMA-M6	S, MO
2817	M	36	LMA-M5	S, MO
2822	F	18	LMA-M2	S, MO
2743	M	12	LLA	S, MO
2765	M	09	LLA	S, MO

LMA = leucemia mielóide aguda
LMC = leucemia mielóide crônica
LLA = leucemia linfocítica aguda
S = sangue
MO = medula óssea

A coleta de informações gerais sobre os pacientes também foi realizada pelos médicos, de acordo com um protocolo padrão (Anexo II), fornecido pelos pesquisadores responsáveis, que foi encaminhado para o laboratório juntamente com as amostras.

II.2 - Métodos

A. Obtenção de Células Neoplásicas do Sangue e da Medula Óssea

A coleta do material foi realizada pela própria equipe médica, de acordo com seus critérios, em procedimento de rotina realizado para diagnóstico hematológico. Uma parte das amostras coletadas foi enviada para o Laboratório de Genética para o estudo citogenético.

Foram realizadas culturas de células de sangue periférico e de células da medula óssea (osso esterno ou ilíaco), obtidos por punção aspirativa com seringa heparinizada, de acordo com o procedimento médico.

Para cada paciente foram realizadas culturas de curta duração (24 horas) de sangue e de medula óssea (MO) e parte da quantidade de medula recebida foi submetida a uma preparação direta, todas sem estimulação mitogênica (fito-hemaglutinina - PHA).

Assim que recebidas, as amostras de MO foram transferidas para tubos de centrífuga estéreis com tampa e foram lavadas duas vezes com 5mL de meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab) ou com solução de Hanks (Cultilab) e centrifugadas por sete minutos a 1.000 rpm.



Para as culturas de sangue e de MO, foram montados, pelo menos, dois frascos de cada amostra, cada um contendo 5,0 mL de meio RPMI 1640, 2mL de soro fetal bovino, 2 gotas de estreptomicina (100U/mL), 4 gotas de penicilina (100U/mL) e 3 a 10 gotas do material de acordo com a concentração de leucócitos por mm^3 no material recebido. Quando a quantidade de leucócitos foi inferior a 2.000 e da amostra recebida foi cerca de 1mL a 3mL, o material foi dividido igualmente entre os frascos de cultura. Quando a quantidade de leucócitos esteve entre 2.000 e 4.000, foram adicionadas 5 a 10 gotas da amostra da seringa (sem agulha) para cada tubo. De 5.000 a 10.000 leucócitos, foram adicionadas 3 a 7 gotas; de 10.000 a 25.000 leucócitos, 2 a 4 gotas e para contagens superiores a 25.000 foram adicionadas 1 a 3 gotas.

Os frascos foram, então, mantidos em estufa a 37°C por cerca de 24 horas e, aproximadamente, 20 minutos antes do término deste tempo, foram adicionados 100μL de Colchicina (5μL/mL) (Cultilab).

Após o cultivo, o material foi centrifugado por oito minutos a 1.000rpm e o sobrenadante retirado. Em seguida, foi realizada a hipotonização com a adição lenta de 10mL de solução hipotônica de KCl (0,075M) a 37°C. Após 20 minutos, o material foi novamente centrifugado, o sobrenadante removido e, então, realizada a fixação com metanol:ácido acético (3:1) em três etapas de 20, 10 e de 5 minutos. Na primeira etapa foram adicionados 10mL de fixador e nas demais 5mL, alternadas com centrifugações a 1000 rpm por 7 minutos.

Parte do material foi gotejado em lâminas úmidas e geladas, que foram envelhecidas por 20 minutos em estufa a 87°C e, posteriormente, submetidas à técnica de bandamento GTG segundo GROUCHY & TURLEAU (1977), com modificações. Outra parte foi gotejada em lâminas secas que foram, após um envelhecimento natural que variou entre 4 e 8 dias, estocadas em freezer a cerca de –20°C até o momento da realização da técnica de FISH.

Para preparação direta das células da medula óssea, foram utilizados, pelo menos, dois tubos cônicos de 15mL previamente aquecidos a 37°C, contendo 9mL de KCl (0,075M), 1mL de tripsina/ EDTA (250mg%) e 0,16 mL de Colchicina. Cerca de 3 a 10 gotas da camada intermediária do precipitado de MO foi adicionada a cada tubo, que permaneceu em banho-Maria a 37°C por vinte minutos. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 minutos, a 1000rpm e o sobrenadante foi retirado. Logo após, foi realizada a fixação com metanol:ácido acético em quatro etapas de 20, 10, 20 e 10 minutos, com adição de 10mL, 5mL, 10mL e 5mL de fixador, respectivamente, com centrifugações alternadas. O material obtido foi gotejado conforme os procedimentos já descritos para bandamento GTG e para FISH.

B. Bandamento GTG

Para o bandamento GTG, o material fixado nas lâminas foi tratado em solução de tripsina (60mL de PBS e, aproximadamente, 0,12g de tripsina) a 27°C por um tempo variável de 2 a 15 segundos. Em seguida, foi lavado em PBS por um minuto, corado com solução tamponada de Giemsa à 2% por 5 minutos e lavado em água destilada.

As metáfases foram analisadas em microscópio da marca Hund Wetzlar, modelo H 500, em aumento de 1.200x.

A classificação dos achados e os critérios para a determinação de clone seguiram as recomendações do ISCN (1995). Assim, as perdas cromossômicas que ocorreram em pelo menos três células e os ganhos ou aberrações estruturais que ocorreram em pelo menos duas células, foram considerados clonais.

C. Hibridação *in situ* Fluorescente

A técnica de FISH foi realizada de acordo com o protocolo de rotina utilizado no Medical Oncology Division Cancer Center, Denver, Colorado, adaptado às condições do Laboratório de Genética da FAMERP. Em Anexo III são apresentadas, em detalhes, as soluções utilizadas neste procedimento.

As lâminas foram pré-tratadas em uma série sucessiva de banhos de etanol a 70, 85 e 100%, à temperatura ambiente, por 2 minutos cada. Em seguida, foram colocadas em ácido acético a 70% por 1 minuto.

Imediatamente após este pré-tratamento, foram submetidas a três banhos consecutivos de PBS por 3 minutos cada, também à temperatura ambiente. Após nova desidratação, foram incubadas em solução de RNAase (100μg/mL em 2xSSC) por cerca de 30 a 45 minutos, a 37°C, em câmara úmida. Então, receberam mais três banhos de 2xSSC (pH 7.0-7.4) de 3 minutos cada e uma nova desidratação em etanol. Em seguida, de acordo com a idade e condições de cada lâmina, em alguns casos, foi realizado o tratamento com pepsina (0,008% em HCl 0,001M) por 1 a 5 minutos. As lâminas foram, então, transferidas para um borel contendo formaldeído (4% em PBS), a 37°C por 5 minutos, foram submetidas aos banhos de PBS à temperatura ambiente por 5 minutos e novamente desidratadas.

A desnaturação foi realizada em solução de formamida a 72°C por 3 minutos, seguida por uma desidratação a frio com nova série de etanol (70, 85 e 100%), a -20°C.

Para hibridação foram utilizadas as sondas "LSI *BCR/ABL* Dual Color Translocation" (mapeadas em 9q34 e 22q11), para detecção da t(9;22)(q34;q11), a sonda WCP (Whole Chromosome Painting) 20, para investigação de alterações envolvendo o cromossomo 20, e as sondas CEP X Spectrum Orange/Y Spectrum Green Chromosome Enumeration, para identificação dos cromossomos X e Y, todas da marca VYSIS. Estas duas últimas foram utilizadas apenas no caso 2556 que, após o estudo citogenético inicial foi submetido a transplante de MO (TMO) e necessitou

de monitoramento por FISH, como estratégia para investigação do sucesso do mesmo. Como o estudo citogenético após tal procedimento terapêutico era extremamente importante e, pelo fato de tratar-se do primeiro transplante de MO (TMO) alogênico com sucesso realizado no Hospital de Base de São José do Rio Preto, o estudo citogenético deste paciente pós TMO também foi incluído neste trabalho.

Para elucidação das alterações numéricas do cromossomo 20 dos casos 2486, 2661, 2741 e 2743, também foi utilizada a sonda α-centromérica do cromossomo 20, clonada e gentilmente fornecida pela Dra. Marileila Varella Garcia do Câncer Center da University of Colorado Heath Sciences Center.

A sonda para detectar a translocação *BCR/ABL* (cromossomo Ph) utilizada constituiu numa mistura de sonda bcr marcada diretamente com fluorocromos do espectro verde (Spectrum Green ™), e de uma sonda abl, diretamente marcada com fluorocromos do espectro vermelho (Spectrum Orange™). A sonda bcr, medindo aproximadamente 300 Kb, se inicia entre os exons 13 e 14 do gene *BCR* (exon 2 e 3 do M-bcr) e se estende até o centrômero do cromossomo 22, abrangendo a região m-bcr. A sonda abl, medindo aproximadamente 200 Kb começa entre os exons 4 e 5 do gene *ABL* e se estende até o telômero do cromossomo 9.

A sonda WCP 20 constituiu numa biblioteca de DNA do cromossomo 20 marcada diretamente com fluorocromos do espectro verde (Spectrum Green ™).

As sondas foram inicialmente homogeneizadas e diluídas na proporção de 1μL de sonda, 2μL de água deionizada e 7μL de LSI Hybridization Buffer, em tubo tipo "eppendorf". Cada tubo após rápida homogeneização foi mantido por 5 minutos em banho-Maria a cerca de 73°C, para desnaturação, e em seguida, mantido em gelo por cerca de 3 minutos.

Cada área da lâmina a ser hibridada recebeu 5 a 10μL de solução de sonda, foi então coberta imediatamente com lamínula, vedada com selante e incubada em câmara úmida a 37°C por, aproximadamente, 29 horas.

Após esse período, foi realizada a lavagem pós-hibridação rápida. Para isso, as lâminas foram colocadas em uma solução de 0,4X SSC/0,3% NP-40 a 73°C, por 2 minutos e lavadas em 2X SSC/0,1% NP-40, por 1 minuto. Após a secagem das mesmas, foi adicionado o contracorante DAPI (10μL por campo) e a área de hibridação foi coberta com lamínula de vidro com 22 x 22mm.

A análise do material foi realizada por dois investigadores, que analisaram, individualmente, cerca de 200 núcleos e/ou 20 metáfases por caso, em microscópio de fluorescência Olympus BX60, equipado com filtros para DAPI, FITC, rodamina e filtro triplo, com lâmpada HBO 100W. Para documentação dos resultados foi utilizado o Filme Ektachrome 400 ASA (KODAK).



A hibridação foi considerada eficiente quando as áreas hibridadas apresentaram mais de 60% dos núcleos ou metáfases marcados (HARRIS *et al.*, 1995). Foram selecionados para análise diferentes quadrantes da mesma, para minimizar os problemas resultantes da variação e eficiência de hibridação. Foram analisados somente núcleos ou metáfases íntegros e sem sobreposições. Sinais bilobados que não estavam completamente separados foram contados como único e aqueles cujo diâmetro era o dobro do observado na maioria dos sinais, foram considerados como dois sobrepostos. Sinais muito próximos foram considerados independentes quando a distância entre eles era o dobro do tamanho de um dos sinais (EASTMOND *et al.*, 1995). Núcleos e metáfases sem sinais foram excluídos.

Como controles, foram utilizadas lâminas provenientes de cultura de sangue periférico de indivíduos normais, doadores de sangue selecionados pelo Hemocentro do Hospital de Base (FUNFARME).

Para a padronização dos critérios de corte para a sonda "LSI *BCR/ABL* Dual Color Translocation" foram seguidos os mesmos critérios utilizados no Câncer Center of University of Colorado Heath Sciences Center, que consistiu, no início do desenvolvimento do projeto, na análise de seis lâminas de controles diferentes. A média de fusão *BCR/ABL* encontrada foi 3,21, com desvio padrão de 1,40. Assim, foi estabelecida em 5% a possibilidade máxima de fusão casual. Freqüências superiores a 5% foram interpretadas como presença não casual de fusão *BCR/ABL*.



Além disso, em cada procedimento de hibridação, um caso controle foi utilizado.

As porcentagens médias de núcleos com diferentes números de sinais nas amostras controles para a sonda α-centromérica do 20 foi considerada de acordo com CARVALHO-SALLES (1998). O critério de corte para aneuploidias foi estabelecido pela média acrescida de 4 desvios padrões, a partir da freqüência média de núcleos com um, dois, três ou mais sinais nas amostras controle. Assim, a monossomia foi diagnosticada quando mais que 32,4% dos núcleos apresentaram somente um sinal e a trissomia quando mais que 5,1% dos núcleos apresentaram três sinais.

V. Conclusões

Os resultados obtidos através deste trabalho:

a) Reforçaram a importância da análise cariotípica para o conhecimento dos mecanismos biológicos envolvidos nos processos leucêmicos;

b) Permitiram a confirmação e revisão dos diagnósticos e deram subsídios para o prognóstico e terapia dos doentes;

c) Possibilitaram a liberação do medicamento interferon-α junto aos órgãos governamentais de saúde para os pacientes, que foram todos atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS);

d) Permitiram a identificação de alterações cariotípicas ainda não descritas na literatura como a trissomia do cromossomo 2 e a translocação envolvendo os cromossomos 5 e 16;

e) Possibilitaram a implantação das técnicas de obtenção de células da medula óssea para estudo citogenético e implantação da técnica de FISH, como técnica complementar fundamental, no Serviço de Genética da FAMERP, com a criação do Laboratório de Citogenética Molecular.

unesp

III - Resultados

Foram testados vários protocolos de técnicas de cultivo e preparação direta de células da medula óssea, tendo sido implantadas com este projeto as técnicas, descritas em II.2.A. Também foram realizados vários testes com as sondas selecionadas para este estudo e implantada a técnica de FISH, que possibilitou a criação do Laboratório de Citogenética Molecular junto ao Serviço de Genética do Hospital de Base da FAMERP.

Com a implantação destas técnicas, hoje realizadas rotineiramente pelo Serviço de Genética, foi possível estabelecer uma rotina de diagnóstico genético de leucemias, em colaboração com o Serviço de Hematologia.

Foram recebidas amostras de sangue e/ou medula óssea de trinta e oito indivíduos, dos quais foram analisados total ou parcialmente vinte e oito (74%). Quinze eram portadores de leucemia mielóide crônica (LMC), onze de leucemia mielóide aguda (LMA) e dois de leucemia linfocítica aguda (LLA).

A Tabela 4 apresenta o número de casos estudados de acordo com o diagnóstico e o sexo e a Tabela 5, o número de pacientes por faixa etária e diagnóstico. As queixas clinicas e os dados laboratoriais ao diagnóstico, apresentados por cada paciente, estão apresentados nos Anexos IV e V.

Tabela 4. Número de casos de acordo com o diagnóstico e o sexo dos pacientes.

Diagnóstico	Sexo		Total	
	Masculino	Feminino	Nº	%
LMC	6	9	15	53,6
LMA	6	5	11	39,3
LLA	2	_	2	7,1
Total	14	14	28	

Tabela 5. Caracterização da casuística de acordo com diagnóstico e faixa etária

Diagnóstico	Idade					
	< 10	11-20	21-30	31-40	41-60	> 60
LMC	_	3	1	4	6	1
LMA	_	1		5	2	3
LLA	1	1	_	_	_	_
Total	1	5	1	9	8	4

A possibilidade da coleta do sangue e/ou da medula óssea seguiu os critérios do médico responsável por cada paciente. Desta maneira, por motivos clínicos diversos, em alguns casos não foi possível a obtenção dos dois tipos de amostras.

Muitas amostras foram recebidas coaguladas, o que dificultou ou impossibilitou a obtenção de material em condições de análise citogenética. Outras não apresentaram células em divisão, mesmo após preparação direta.

Com relação à exposição a agentes tóxicos, 53% dos casos eram fumantes, 36% etilistas e 18% lidaram com agrotóxicos (Anexo VI).

Apenas um dos pacientes referiu a presença de outros casos de leucemias na família, embora 23% tenham referido casos de neoplasias entre seus familiares (Anexo VI).

Em alguns casos tais informações não constavam na ficha de avaliação, nem no prontuário do paciente.

III. 1 - Citogenética Convencional

Em vinte casos (71%) foi possível realizar a análise citogenética através da técnica de bandamento GTG (Tabela 6). Em oito, ou não foram obtidas células em metáfase (casos 2692, 2723, 2766, 2855, 2724, 2743, 2744, 2777) ou as mesmas não responderam ao tratamento com tripsina, apresentando grau extremo de condensação cromossômica.

Tabela 6. Número de células observadas (visualizadas), de células analisadas e número modal de cada caso

Caso	Nº céls. observadas	Nº céls. analisadas	Nº Modal
2486	60	14	44
2500	231	40	46
2532	99	17	46
2556	72	15	46
2588	169	32	46
2594	76	17	46
2624	262	32	46
2628	153	19	46
2673	494	34	46
2741	35	8	46
2809	29	3	46
2642	371	11	45
2661	432	2	46
2699	50	2	46
2710	366	16	46
2776	371	44	hipotriplóide
2787	94	4	46
2817	200	14	46
2822	120	14	46
2765	174	66	hipotetraplóide

A Tabela 7 mostra o tipo de material analisado (sangue ou medula óssea) em bandamento GTG, em cada caso. Dos 20 analisados, seis (30%) apresentaram células do sangue em condições de análise, em cinco (25%) as células da medula óssea obtidas por preparação direta foram analisadas e em 13 casos (65%) pôde ser realizada a análise nas células cultivadas da medula óssea.

O número cromossômico das amostras variou de 29 a 95 e a maioria das células apresentou número cromossômico normal (46,XX ou 46,XY).

Dos 20 casos analisados em bandamento GTG, 15 (75%) apresentaram aberrações cromossômicas clonais (2486, 2500, 2532, 2556, 2594, 2624, 2673, 2741, 2809, 2642, 2710, 2776, 2817, 2822, 2765), que incluíram translocações, inversão, cromossomos marcadores, monossomias, trissomias e poliploidias (Tabela 8). Também foram encontradas alterações cariotípicas não clonais, que compreenderam translocações, trissomias, monossomias totais ou parciais e cromossomos marcadores. Cinco casos apresentaram em todas as células analisadas cariótipos normais no nível de resolução das técnicas utilizadas. Dois eram portadores de LMC (casos 2588 e 2628) e três de LMA (casos 2661, 2699 e 2787).

Nenhum dos casos apresentou manifestações citogenéticas de amplificação gênica (dmin ou HSR).

Os resultados detalhados da análise citogenética realizada

Tabela 7. Tipo de material analisado citogeneticamente em cada caso.

Caso	Sangue	Medula Óssea	
		Direta	Cultura
2486	X		
2500	X		
2532	X		
2556	X		
2588		X	X
2594		X	X
2624			X
2628			X
2673	X		
2741			X
2809	X		
2642			X
2661			X
2699		X	
2710			X
2776		X	X
2787			X
2817		X	X
2822			X
2765			X

Tabela 8. Cariótipos dos casos normais e com aberrações cromossômicas clonais observadas na análise convencional em bandamento GTG.

Caso	Cariótipo
2486	**36~45,XX,t(9;22)(q34;q11)**
2500	**33~47,XX,t(9;22)(q34;q11),+2;-5;-7;-8;+mar[cp40]**
2532	**34~46,XY,t(9;22)(q34;q11)**
2556	**40~46,XY,t(9;22)(q34;q11)**
2588	36~46,XX
2594	**46~47,XX,t(9;22)(q34;q11)**
2624	**36~49,XY,t(9;22)(q34;q11)[29]/ 41~43,X,-Y,t(9;22)(q34;q11)[3]**
2628	45~46,XX
2673	**39~47,XX,t(9;22)(q34;q11)**
2741	**40~46,XY,t(9;22)(q34;q11)**
2809	**42~46,XY,t(9;22)(q34;q11)**
2642	**43~45,X,-Y**
2661	43~46,XX
2699	45~46,XX
2710	**43~47,XY,inv(16),+22)[cp7]**
2776	29~66,X_Y
2787	35~46,XY
2817	**34~46,XY,-4**
2822	**43~46,XX,t(5;16)(q13;q22)[7]**
2765	**29~95,X_Y_**

(negrito) = aberrações cromossômicas clonais

através do bandamento GTG, de cada caso, são apresentados a seguir. A variação do número de cromossomos foi considerada de acordo com as metáfases observadas e as analisadas. A Figura 2 apresenta cromossomos Ph detectados em vários dos casos estudados.

Caso nº 2486 - LMC

- Nº de metáfases observadas: 60
- O número cromossômico variou de 36 a 45
- Número modal: 44
- Número total de células analisadas: 14
- Cariótipos:

  36 ~ 45,XX,t(9;22)(q34;q11) [12]

  41,XX,-6,t(9;22)(q34;q11),-11,-17,-18,-19

  44,X,-X,-7,t(9;22)(q34;q11)

Caso nº 2500 - LMC

- Nº de metáfases observadas: 231
- O número cromossômico variou de 32 a 47
- Número modal: 46
- Número total de células analisadas: 40
- Cariótipos:

  32 ~ 47,XX,t(9;22)(q34;q11) [30]

  40,X,-X,+2,-3,-5,-8,add(9q),-13,-21,-22,-22,+mar (Figura 3)

  42,XX,-5,-6,-7,t(9;22)(q34;q11),-18,-20,+21

  43,XX,-5,-8,t(9;22)(q34;q11),-17

  43,XX,+2,-5,-7,t(9;22)(q34;q11),-16,-17

  44,XX,-4,-6,t(9;22)(q34;q11)

  45,XX,+2,-4,-5,-7,t(9;22)(q34;q11),+mar

  45,XX,+2,-8,t(9;22)(q34;q11),-18

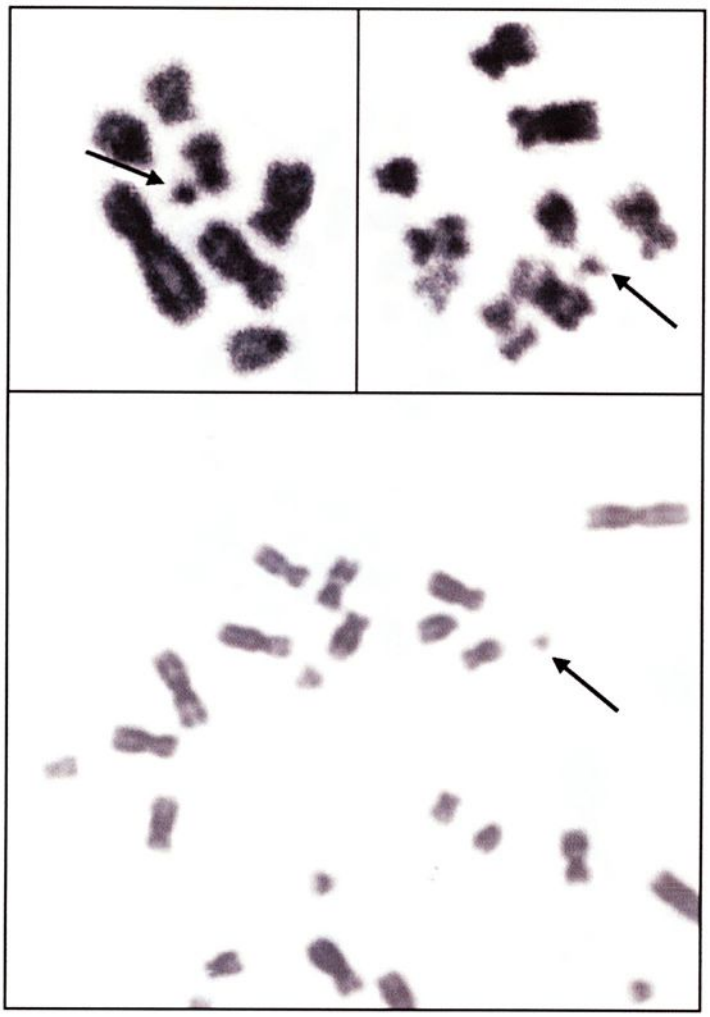


Figura 2. Metáfases parciais dos casos 2500, 2532 e 2441 mostrando a presença do cromossomo Ph.

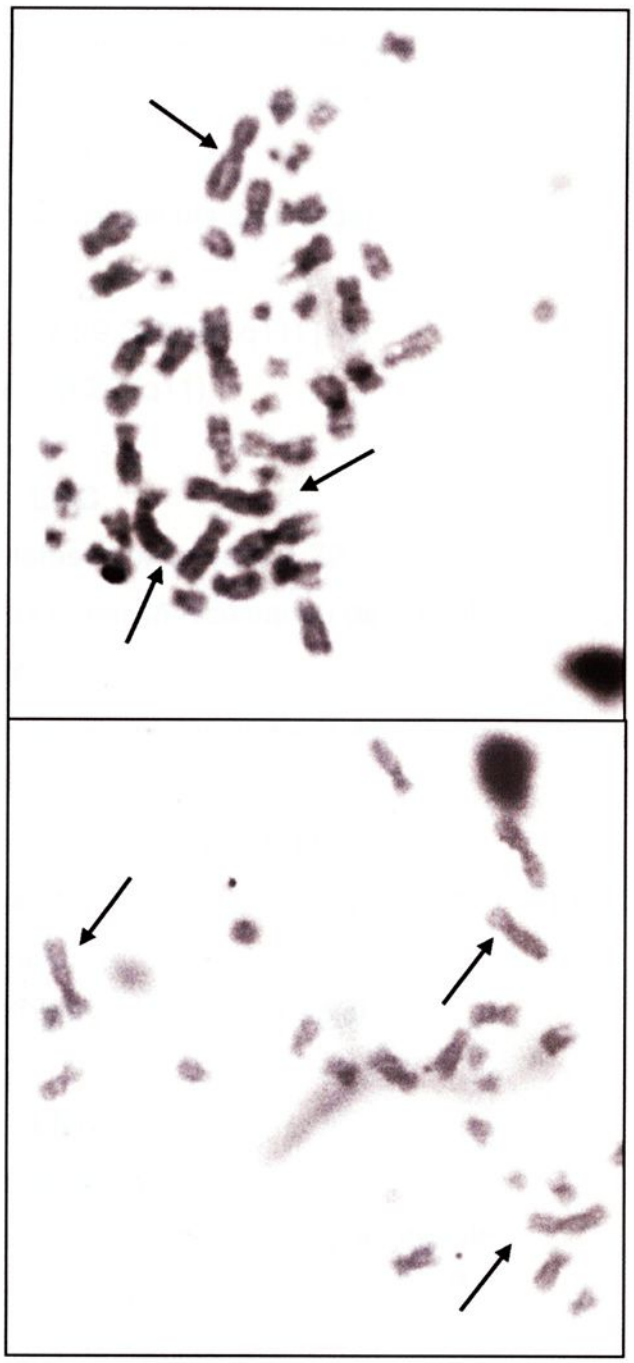


Figura 3. Metáfases parciais do caso 2500 mostrando a trissomia do cromossomo 2.

46,XX,+2,-5,-7,t(9;22)(q34;q11),+17

46,XX,+2,-5,-10,-14,-21,t(9;22)(q34;q11),+3mar

47,X,-X,+2,t(9;22)(q34;q11),+mar

Caso nº 2532 - LMC

- Nº de metáfases observadas: 99
- O número cromossômico variou de 34 a 46
- Número modal: 46
- Número total de células analisadas: 17
- Cariótipos:

  34 ~ 46,XY,t(9;22)(q34;q11),[16]

  45,XY,-7,t(9;22)(q11)

Caso nº 2556 - LMC

- Nº de metáfases observadas: 72
- O número cromossômico variou de 40 a 46
- Número modal: 46
- Número total de células analisadas: 15
- Cariótipos:

  40 ~ 46XY,(9;22)(q34;q11),[13]

  41,XY,del(5)(p?),-7,t(9;22)(q34;q11),-11,-13,-13,-17,-18,-18,
  -20,+3mar

  46,XY,t(9;22)(q34;q11),-18,+mar

Caso nº 2588 - LMC

- Nº de metáfases observadas: 169
- O número cromossômico variou de 36 a 46
- Número modal: 44
- Número total de células analisadas: 32

- Cariótipos:

  36 ~ 46,XX [32]

Caso nº 2594 - LMC

- Nº de metáfases observadas: 76
- O número cromossômico variou de 44 a 47
- Número modal: 46
- Número total de células analisadas: 17
- Cariótipos:

  46 ~ 47,XX,t(9;22)(q34;q11)[17]

Caso nº 2624 - LMC

- Nº de metáfases observadas: 262
- O número cromossômico variou de 36 a 49
- Número modal: 46
- Número total de células analisadas: 32
- Cariótipos:

  36 ~ 49,XY,t(9;22)(q34;q11) [26]

  41,X,-Y,-6,-8,t(9;22)(q34;q11),-11,-16 (Figura 4)

  42,X,-Y,t(9;22)(q34;q11),-11,-19,-21

  43,XY,-6,-9,t(9;22)(q11),-14

  43,X,-Y,-1,-7,t(9;22)(q34;q11)

  46,XY,t(9;22)(q34;q11),-14,+16

  46,XY,t(9;22)(q34;q11),del(19)(p32→pter)

Caso nº 2628 - LMC

- Nº de metáfases observadas: 153
- O número de cromossômico variou de 39 a 46
- Número modal: 46
- Número total de células analisadas: 19



Figura 4. Metáfase do caso 2624, em bandamento GTG, apresentando nulissomia do cromossomo Y, no cariótipo 41,X,-Y,-6,-8,t(9;22)(q34;q11),-11,-16 e destacando os cromossomos 9 e 22 envolvidos na translocação.

- Cariótipos:

  45,XX,-9

  45,XX,-10

  46,XX [17]

Caso nº 2673 - LMC

- Nº de metáfases observadas: 494
- O número cromossômico variou de 39 a 47
- Número modal: 46
- Número total de células analisadas: 34
- Cariótipos:

  39~47,XX,t(9;22)(q34;q11)[34]

Caso nº 2741 - LMC

- Nº de metáfases observadas: 35
- O número cromossômico variou de 34 a 46
- Número modal: 46
- Número total de células analisadas: 8
- Cariótipos:

  40~46,XY,t(9;22)(q34;q11)[6]

  45,XY,t(9;22)(q34;q11),-10

  46,XY

Caso nº 2809 - LMC

- Nº de metáfases observadas: 29
- O número cromossômico variou de 42 a 46
- Número modal: 46
- Número total de células analisadas: 3
- Cariótipos:

  42~46,XY,t(9;22)(q34;q11)[3]



Caso nº 2642 - LMA-M7

- Nº de metáfases observadas: 371
- O número de cromossômico variou de 38 a 46
- Número modal: 45
- Número total de células analisadas: 11
- Cariótipos:

  43,-X,-Y,-20

  44,X,-Y,-17

  44,X,-Y,-7,del 20

  45,X,-Y,del(17)(q23→ter)

  45,X,-Y [7]

Caso nº 2661 - LMA

- Nº de metáfases observadas: 432
- O número cromossômico variou de 39 a 49
- Número modal: 46
- Número total de células analisadas: 2
- Cariótipos:

  43,XX,-3,-8,-11

  46,XX

Caso nº 2699 - LMA-M1

- Nº de metáfases observadas: 50
- O número cromossômico variou de 36 a 46
- Número modal: 46
- Número total de células analisadas: 2
- Cariótipos:

  45,XX,-22

  46,XX

Caso nº 2710 - LMA-M1

- Nº de metáfases observadas: 366
- O número cromossômico variou de 41 a 48
- Número modal: 46
- Número total de células analisadas: 16
- Cariótipos:

  42,XY,-3,-5,-12,-17

  42,XY,-4,-19,-20,-21

  42,XY,-8,-9,-16,-18

  43,XY,-6,-13,-14

  43,XY,-3,-12,-15

  43,-X,-Y,del(1)(q32 → qter),-16,-20,+22

  44,XY,-6,-14, inv(16)

  45,XY,del(7)(q31→ qter),-21

  45,X,-Y,-13,+mar

  46,XY

  46,XY,-7,+13

  47,XY,inv(16),+22

  47,XY,+22

  47,XY,+22

  47,XY,+22

  47,XY,+22

A Figura 5 mostra a inversão pericêntrica do cromossomo 16 e a Figura 6 mostra a trissomia do cromossomo 22.



Figura. 5 Inversão pericêntrica do cromossomo 16 inv(16)(p13q22) observada no caso 2710. Os cromossomos normais são apresentados à esquerda

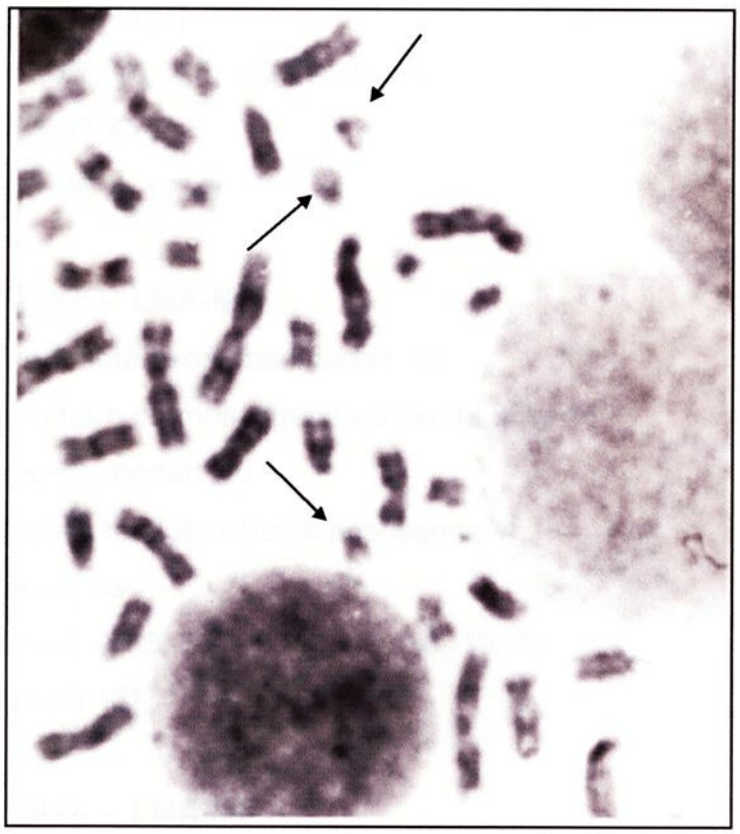


Figura 6. Metáfase parcial do caso 2710 com trissomia do cromossomo 22.

Caso nº 2776 - LMA

- Nº de metáfases observadas: 371
- O número cromossômico variou de 29 a 66
- Número modal: 60 hipotriploidia
- Número total de células analisadas: 44
- Cariótipos:

  29~37,XY[2]

  40,XY,-10, -15,-16,-20,-21,-22

  40~47,XY[7]

  50~66,X_Y[34]

Caso nº 2787 - LMA-M6

- Nº de metáfases observadas: 94
- O número cromossômico variou de 35 a 46
- Número modal: 46
- Número total de células analisadas: 4
- Cariótipos:

  35,-X,-Y,-3,-7,-7,-8,-11,-16,-18,-19,-19

  46,XY [3]

Caso nº 2817 - LMA-M5

- Nº de metáfases observadas: 200
- O número cromossômico variou de 34 a 59
- Número modal: 46
- Número total de células analisadas: 14
- Cariótipos:

  34,XY,-4,-7,-8,-9,-11,-12,-14,-16,-16,-17,-17,-20

  40,-X,Y,-4,-13,-16,-16,-21

  42,XY,-3,-4,-8,-20

  43,XY,-19,-21,-22

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

45,XY,+ace,+ace,-17

46,XY [9]

Caso nº 2822 - LMA-M2

- Nº de metáfases observadas: 120
- O número cromossômico variou de 42 a 47
- Número modal: 46
- Número total de células analisadas: 14
- Cariótipos:

  43,XX,t(5;16)(q13;q22),-19,-22

  45,XX,t(5;16)(q13;q22),-6

  45,XX,-10

  45,XX,-18

  45,XX,-22

  45,XX,t(5;16)(q13;q22),-21

  46,XX,t(5;16)(q13;q22)[4]

  46,XX[3]

  47,XX,+22

  A Figura 7 mostra a translocação entre os cromossomos 5 e 16.

Caso nº 2765 - LLA

- Nº de metáfases observadas: 174
- O número cromossômico variou de 29 a 95
- Número modal: 90
- Número total de células analisadas: 66
- Cariótipos:

  29~38,XY[5]

  40~60,X_Y[10]

  61~95,X_Y_[51] (Figura 8)

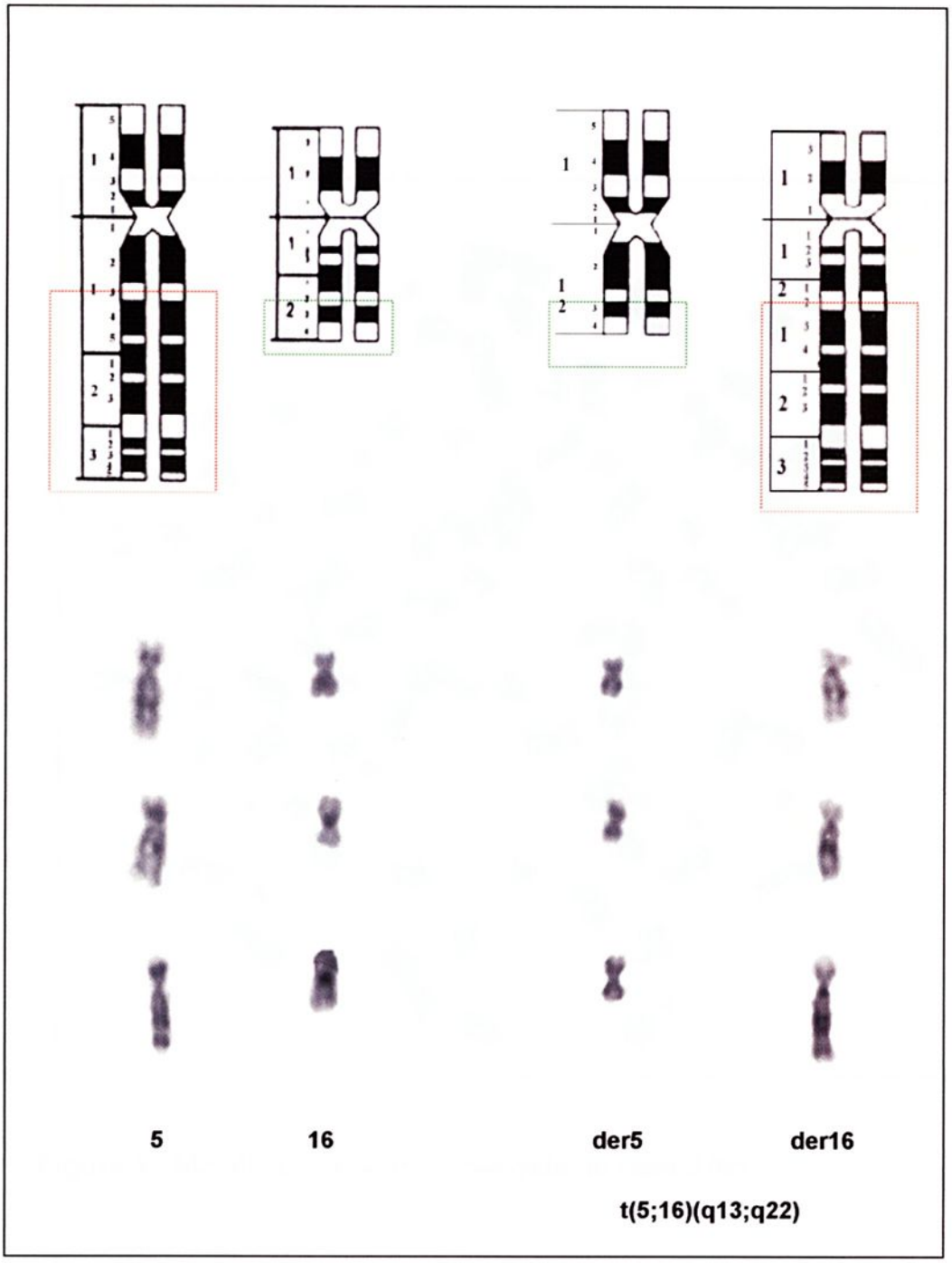


Figura 7. Translocação t(5;16)(q13;q22) encontrada no caso 2822



Figura 8. Metáfase poliplóide observada no caso 2765.

III. 2 - Citogenética Molecular (FISH)

Em 23 casos (82%) foi possível a análise citogenética molecular pela técnica de FISH com a utilização da sonda para o rearranjo gênico *BCR/ABL*, e em doze casos (43%) com a sonda WCP 20.

Nos casos em que a análise não foi possível, isso ocorreu porque o material não respondeu à técnica, apesar de várias tentativas.

A sonda para os genes *BCR/ABL* foi usada para localizar esses genes nos núcleos interfásicos. A sonda correspondente ao bcr está mapeada no cromossomo 22, proximal ao ponto de quebra m-bcr da translocação t(9;22)(q34;q11), e a sonda abl está mapeada no cromossomo 9, distal ao ponto de quebra da translocação. Em células normais, a sonda bcr resulta, portanto, em dois sinais verdes correspondentes à banda 22q11 dos dois cromossomo 22 e a sonda abl em dois sinais vermelhos da banda 9q34 dos cromossomos 9. Células com a translocação e, portanto, com gene híbrido *BCR/ABL* apresentam um sinal verde e um vermelho, além de um sinal amarelado ou esbranquiçado, correspondente à fusão (Figura 9).

No caso 2809, a técnica de FISH possibilitou a detecção de células com a presença de dois cromossomos Ph, que não foram observados na análise citogenética convencional (Figura 10).

A Tabela 9 mostra a freqüência relativa de núcleos interfásicos com o rearranjo *BCR/ABL* detectados através da técnica de FISH em cada caso.

unesp

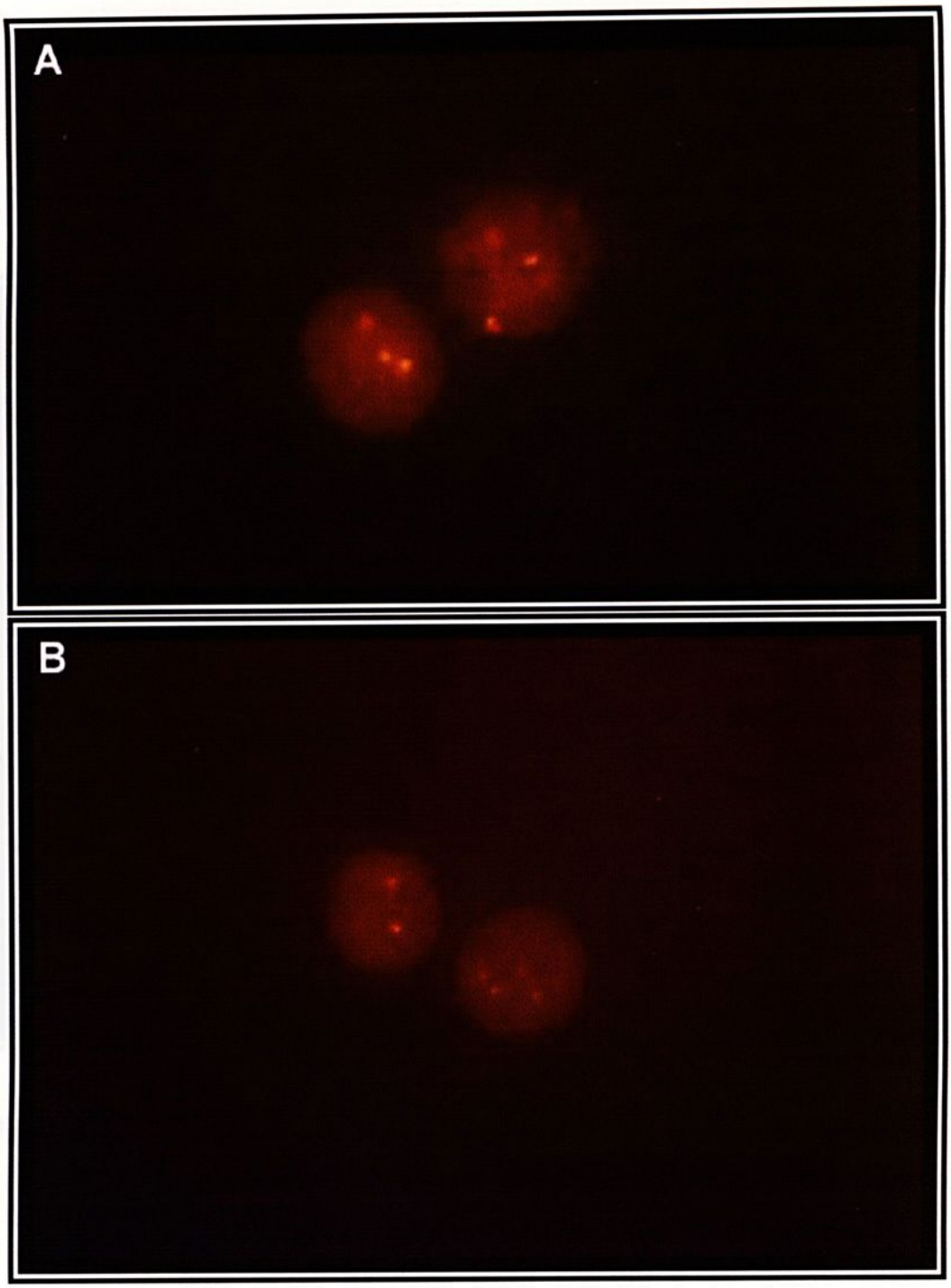


Figura 9. Núcleos submetidos à técnica de FISH, hibridados com a sonda "LSI BCR/ABL Dual Color Translocation", mostrando um sinal fundido amarelado (rearranjo dos genes BCR/ABL) dois sinais normais (A) e os quatro sinais normais (B à direita)

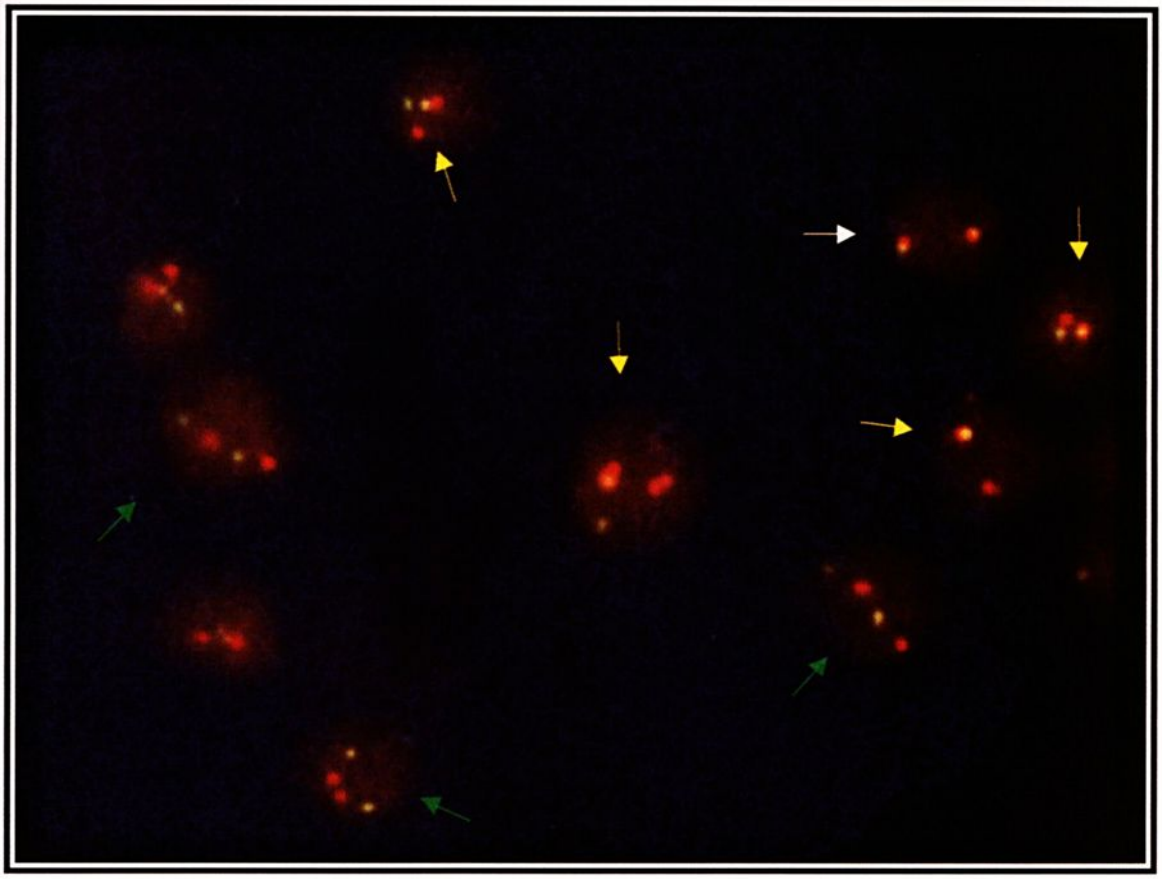


Figura 10. Núcleos do caso 2809 submetidos à técnica de FISH, hibridados com a sonda "LSI BCR/ABL Dual Color Translocation", mostrando um sinal fundido (seta amarela), dois sinais fundidos (seta branca) e os quatro sinais normais (seta verde).

Tabela 9. Achados em FISH com o uso da sonda para o rearranjo gênico *BCR/ABL* de cada paciente.

Caso	FISH	
	BCR/ABL	Freqüência (%)
2588	-	—
2594	+	25,7
2624	+	97,0
2628	-	—
2673	+	70,2
2692	+	75,7
2723	+	34,5
2741	+	34,7
2766	+	25,1
2809	+	83,2
	++	5,0
2855	+	66,5
2642	-	—
2661	-	—
2699	-	—
2710	-	—
2724	+	7,2
2744	+	11,8
2777	+	8,3
2817	-	—
2822	-	—
2743	-	—
2765	-	—

\+ = nuc ish 9q34(ABLx2),22q11(BCRx2)(ABL con BCRx1)

++ = nuc ish 9q34(ABLx3),22q11(BCRx3)(ABL con BCRx2)

\- = ausência de fusão

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados do estudo por FISH da fusão *BCR/ABL* do caso 2556, 23 e 270 dias (09 meses) após o mesmo ter sido submetido a um transplante alogênico de medula óssea. A freqüência de cromossomo Ph detectada antes do transplante, nas células em bandamento GTG, foi de 100%.

Tabela 10. Freqüências relativas (%) de células do paciente 2556, submetidas à técnica de FISH, com rearranjo *BCR/ABL*, cariótipo XY e XX, em dois períodos diferentes após o TMO.

Tempo Após Transplante (dias)	*BCR/ABL* %	XY %	XX %
23	4	5	95
270	2,4	0,3	99,7

Vinte e três dias após o transplante foram observadas 4% de células com a t(9,22), 95% de células XX (da doadora) e 5% de células XY (do paciente) o que foi interpretado como transplante bem sucedido ("pega") pela equipe de hematologistas (Figura 11). Nove meses após o TMO, em função de suspeita clínica de recaída e avaliação hematológica laboratorial não conclusiva, foi realizada nova análise que mostrou 2,4% de células com a t(9;22), 99,7% de células XX e 0,3% XY, confirmando o sucesso do transplante.

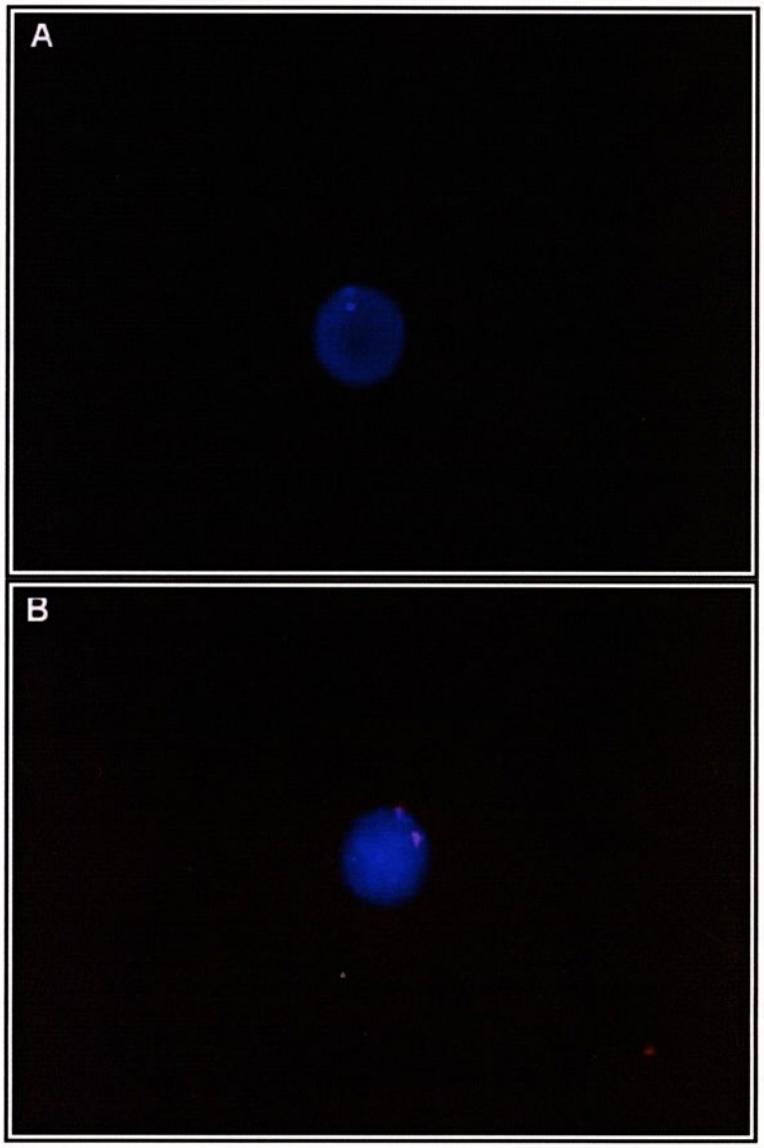


Figura 11. Núcleos do caso 2556 pós-transplante de medula óssea, submetidos à técnica de FISH, hibridados com a sonda CEP X Spectrum Orange/Y Spectrum Green Chromossome Enumeration, apresentando um sinal referente ao cromossomo X (vermelho) e um sinal referente ao cromossomo Y (verde) do receptor (A) e dois sinais referentes aos cromossomos X da doadora (B).

Este foi o segundo transplante alogênico de medula óssea realizado pelo Serviço de Hematologia do Hospital de Base de S. J. Rio Preto e o primeiro que pôde ser acompanhado citogeneticamente, quanto ao sucesso ou não do transplante.

A Tabela 11 apresenta os resultados da investigação de alterações do cromossomo 20 em metáfases, com o uso da sonda WCP 20 (Figura 12). Estes achados foram corroborados pela análise de núcleos interfásicos nos casos 2661 e 2743 com o uso da sonda α-centromérica do 20 (Figura 13), cujas freqüências estão apresentadas na Tabela 12. A monossomia do 20 nos casos 2486 e 2741 observada com a sonda WCP 20 não foi confirmada com a sonda α-centromérica. Isso pode significar uma perda casual desse cromossomo nas metáfases analisadas.

Para os casos 2776 e 2765 não foi realizado o estudo com a sonda α-centromérica do cromossomo 20 porque os mesmos apresentaram poliploidia na análise citogenética convencional, o que foi responsável pelo achado de trissomia e/ou tetrassomia do 20, referidos na Tabela 8.

Tabela 11. Achados em FISH com o uso da sonda WCP 20 de cada paciente.

Caso	FISH	
	WCP 20	Freqüência (%)
2486	- 20	14,3
2500	—	—
2673	—	—
2741	- 20	13,6
2642	—	—
2661	+ 20	15,0
2710	—	—
2743	+ 20	18,2
2776	+ 20	16,2
	++ 20	16,2
2777	—	—
2787	—	—
2765	+ 20	33,3
	++ 20	66,6

- 20 = monossomia do cromossomo 20

+ 20 = trissomia do cromossomo 20

++ 20 = tetrassomia do cromossomo 20

— = ausência de alteração

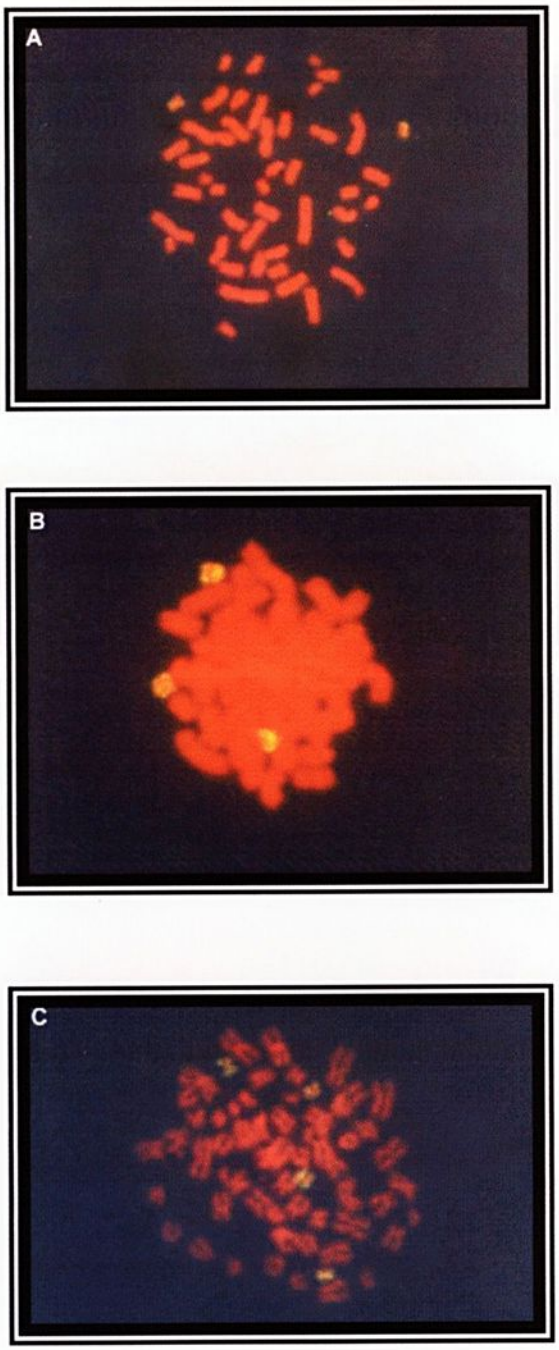


Figura 12. Metáfases submetidas à técnica de FISH, hibridadas com a sonda WCP 20 apresentando os dois cromossomos 20 normais (A), três cromossomos 20 (caso 2743) (B) e quatro cromossomos 20 (caso 2765) (C).

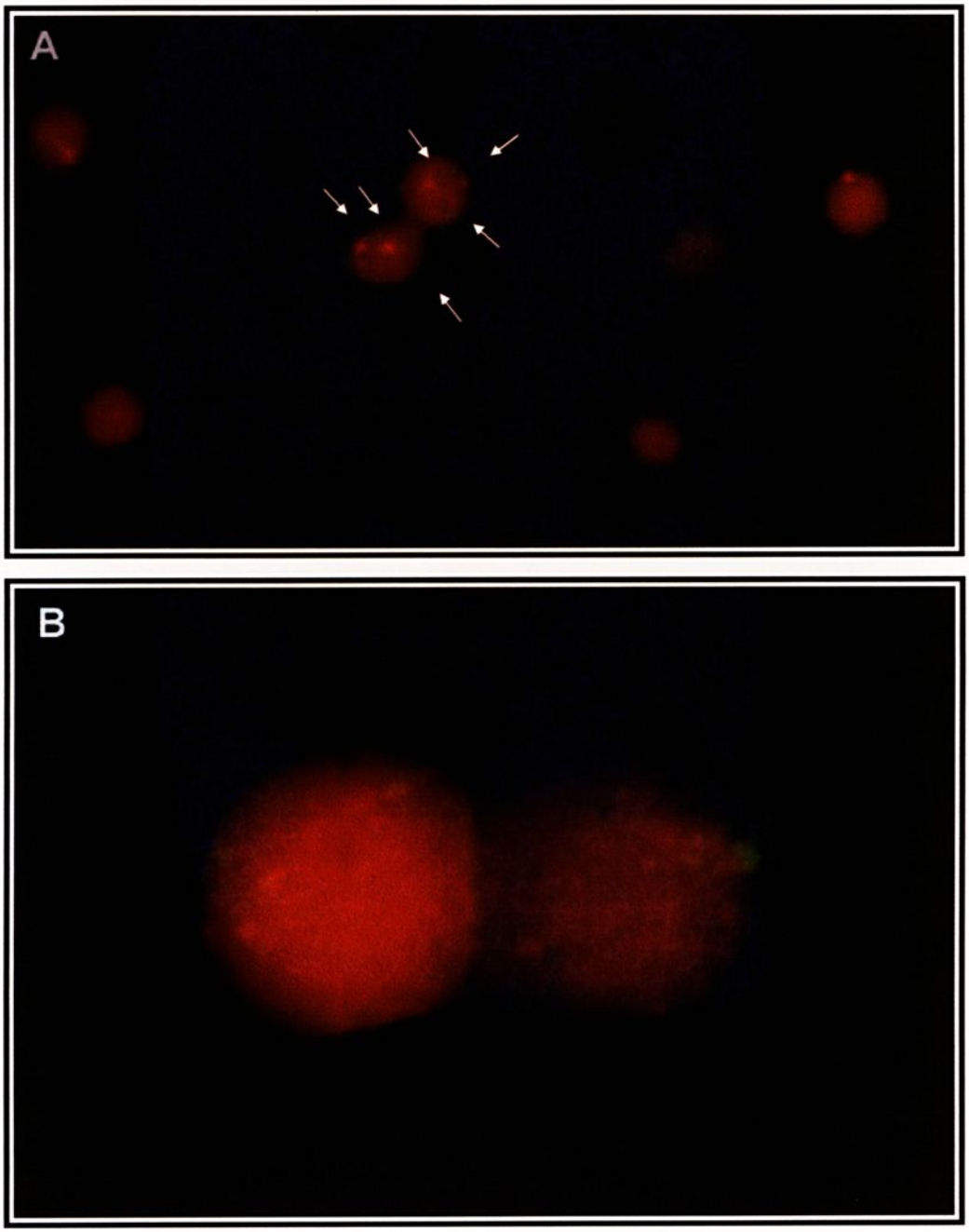


Figura 13. Núcleos do caso 2661 submetidos à técnica de FISH, hibridados com a sonda α-centromérica do cromossomo 20, apresentando três sinais hibridados (trissomia do cromossomo 20)(A) e hibridação com a sonda WCP20 apresentando três sinais(B)

Tabela 12. Freqüência relativa de núcleos apresentando diferentes números de sinais hibridados com a sonda centromérica do cromossomo 20.

Caso	Freqüência de núcleos com diferentes sinais (%)			
	1	2	3	4
Controle	5,5	92	2,5	–
2486	1,5	98,5	–	–
2661	–	64,4	35,6	–
2741	4,2	93,3	1,7	0,8
2743	1,9	82,9	15,1	0,3

IV. Discussão

Neste estudo, a análise pela técnica de bandamento GTG foi possível em 20 casos (71%). O número de metáfases obtidas foi superior ao das analisadas, porque estas só foram selecionadas quando apresentavam condições de análise citogenética total ou parcial.

Realmente, a maior dificuldade no exame de leucemias encontra-se na análise cromossômica. Mesmo quando há extremo cuidado no cultivo e preparo das amostras, seja de sangue ou de medula óssea, o índice mitótico pode ser muito baixo e as metáfases em boas condições de análise serem raras. A morfologia cromossômica freqüentemente é ruim, com cromossomos muito condensados ou muito "abertos", que não respondem ao bandamento GTG (FADERL *et al.*, 1999; MARK *et al.*, 1999).

Com relação ao tipo de material estudado (sangue periférico ou medula óssea) deve ser considerado que as células da medula, geralmente, revelam mais alterações cariotípicas do que as do sangue e que este também pode conter células não representativas da linhagem leucêmica.

Comparando-se a qualidade e a quantidade do material após preparação, as metáfases resultantes de cultura de curta duração de medula óssea, neste estudo, apresentaram melhor condição de análise do que aquelas obtidas a partir de preparação direta de MO ou cultura de

sangue periférico. Portanto, cultura de curta duração de MO pode ser sugerido como o melhor procedimento para obtenção de células para o estudo citogenético de leucemias, embora, o cultivo de sangue periférico possa ser realizado quando não for possível a coleta de medula óssea ou mesmo para comparação dos achados.

A maior parte dos pacientes com LMC aqui estudados, tinham entre 40 e 60 anos de idade. Nos casos de LMA, a incidência aumenta com a idade e o predomínio ocorre antes dos 50 anos. Neste estudo, a maior parte dos casos de LMA (45%), tinha entre 30 e 40 anos, o que foi compatível com a literatura. Contudo, não foi observado predomínio do sexo masculino como referido na literatura. Segundo alguns autores, esse predomínio está relacionado a exposição ocupacional, que nesta casuística foi baixa (BENNETT & PLUM, 1997; DE VITA, 1997; SANDLER & ROSS, 1997; FADERL *et al.*, 1999).

Dentre os pacientes em que foram obtidas informações sobre o estilo de vida, a maioria eram fumantes, etilistas e dois foram ocupacionalmente expostos a agrotóxicos. SANDLER & ROSS (1997), relataram uma relação direta entre o fumo e o aumento no risco para desenvolver leucemia mielóide. Esse risco também está aumentado em lavradores e outros trabalhadores rurais expostos a herbicidas, pesticidas e infecção viral (SANDLER & ROSS ,1997). Portanto, a participação

destes agentes na etiopatogenia dos casos aqui estudados não pode ser descartada.

Outros mecanismos, contudo podem estar envolvidos nos eventos múltiplos que levam a leucemogênese. Com relação aos mecanismos genéticos, a instabilidade genética é fundamental nesse processo, pois alterações no DNA, como deleções e translocações, podem afetar genes que quando em atividade normal estão envolvidos na diferenciação e morte celular programada (STASS & MIXSON, 1997). As mutações podem afetar proto-oncogenes, supressores de tumor e genes responsáveis pelo mecanismo de reparo do DNA (KAWAMURA,1999).

As translocações são as anomalias cromossômicas estruturais mais freqüentemente observadas nas neoplasias hematopoéticas e também podem ativar um oncogene ou inativar um gene supressor de tumor. Mutações oncogênicas resultantes de translocações podem ativar proteínas quinases e, mais freqüentemente, fatores de transcrição (REEDY, 1998; RUBNITZ & LOOK, 1998). O ganho e a perda de material cromossômico podem promover a proliferação celular por amplificação de um oncogene, levar à perda da heterozigozidade e inativar um supressor ou interferir no desenvolvimento da célula por efeito de dosagem gênica (HODGSON & MAHER, 1999).

A detecção destas alterações com o uso das técnicas de citogenética clássica e molecular é muito importante, pois, pode confirmar

o diagnóstico clínico e laboratorial, fornecer o subtipo de leucemia, o prognóstico e orientar a decisão terapêutica (JOHANSSON *et al.*, 1997b; MARK *et al.*, 1998).

Por exemplo, o paciente com LMC e cromossomo Ph, apresenta evolução clínica melhor, sobrevida maior e prognóstico mais favorável do que aquele sem o Ph que, geralmente, responde mal ao tratamento e apresenta uma sobrevida mais curta (ROWLEY, 1988, 1990; WYNGAARDEM, 1990; AURICH *et al.*, 1997). Em LLA, a presença do cromossomo Ph está associada a um prognóstico ruim (TCHIRKOV *et al.*, 1998; FADERL *et al.*,2000). Nas crianças com LLA, este cromossomo está associado com a leucemia manifesta em idades mais avançadas, alta quantidade de leucócitos e envolvimento mais freqüente do SNC ao diagnóstico. Esse grupo de indivíduos deve ser identificado precocemente para ser submetido a uma terapia mais agressiva ou ao transplante de medula óssea na primeira remissão (RUBNITZ & LOOK, 1998).

O cromossomo Ph, é observado em 90-95% dos casos de LMC (ROWLEY, 1973; ESTOP *et al.*,1997; MÜHLMANN *et al.*,1998). Neste estudo, este cromossomo derivado apareceu em 86,7% dos casos de LMC, o que foi compatível com a literatura.

Embora muito mais freqüente em LMC, a t(9;22) é também observada em muitos tipos de leucemias e de outras neoplasias (HEIM &

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

MITELMAN, 1995). Sua participação efetiva na patogênese dos casos de LMC aqui estudados é certa e sua presença pôde confirmar o diagnóstico hematológico e sugerir um prognóstico mais favorável para os seus portadores.

Essa translocação, que molecularmente, resulta na fusão dos genes *BCR/ABL*, pôde ser evidenciada através da técnica de FISH em cinco casos de LMC. Inclusive, no caso 2809, pôde ser evidenciada em duplicata revelando um achado não identificado através da técnica de citogenética convencional, sugerindo, portanto, uma fase mais avançada da doença. Também, apareceu em três casos de LMA (2724, 2744 e 2777) com freqüências de 7,25%, 11,84% e 8,3%, respectivamente. Embora essas freqüências sejam consideradas baixas, os resultados foram considerados positivos para presença do Ph, uma vez que a sensibilidade da técnica é de 95% (DEWALD *et al.*, 1998). Esse rearranjo ocorre em cerca de 2% dos pacientes adultos com LMA, nos subgrupos M1, M2, M4 e M6 e está associado a um prognóstico ruim (HODGSON & MAHER, 1999). O paciente 2777 foi encaminhado com hipótese diagnóstica de LMA-M3, e a presença do Ph sugeriu tratar-se de M1, M2, M4 ou M6.

A translocação t(9;22)(q34;q11) resulta em uma nova proteína quimérica com atividade de tirosina quinase, que afeta o controle da proliferação celular e tem propriedade transformante (WYNGAARDEN,



1990; HEIM & MITELMAN,1995; AZIZ,1997; PERALTA-ZARAGOZA *et al.*, 1997; SÁNCHES GARCIA, 1997; WLODARSKA *et al.*, 1997).

Embora no nível citogenético todos os cromossomos Ph pareçam iguais, eles podem estar associados a diferentes fenótipos de leucemias. Esse fato pode ser atribuído à variabilidade do rearranjo molecular entre os genes *BCR* e *ABL* (COLLEONI *et al.*, 1998).

O *c-ABL* localizado no cromossomo 9 é composto de 11 exons. O ponto de quebra na translocação com o 22 ocorre freqüentemente no sentido 5' do exon 2 (no 1° ou 2° íntron) e esporadicamente no exon 3. É expresso em níveis altos no baço, timo e testículo. A proteína codificada por este gene tem uma função na regulação do ciclo celular. Em Go, a proteína abl está ligada ao DNA, formando um complexo com a proteína pRb, do retinoblastoma, que a inibe. Durante a transição de G1 para S, a proteína pRb é fosforilada e dissociada da abl, levando à ativação da propriedade de tirosina quinase dessa proteína. Ela é fosforilada pela cdc2 quinase após sua dissociação do DNA, assim a célula progride para a fase S. A proteína abl ativada pode, subseqüentemente, alterar a transição. A super expressão do gene *c-ABL* não resulta em transformação maligna mas, na interrupção do ciclo celular. Tal comportamento é semelhante ao dos genes supressores de tumor, como *TP53* e *RB*. Esses resultados sugeriram que *ABL* pode ter função de regulação do crescimento celular. É interessante que o potencial de

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

crescimento celular de *BCR/ABL* parece depender da atividade do *TP53* e do *RB* (THIJSEN *et al.*, 1999; LICHTY & KAMEL-REID, 2000).

A Figura 14 apresenta o gene *ABL*, localizado no cromossomo 9 e o gene *BCR* localizado no cromossomo 22, envolvidos na formação do cromossomo Ph.

O gene *BCR*, localizado no cromossomo 22, tem 135 Kb e compreende 23 exons. O gene *BCR* se expressa em todos os tecidos e pertence a uma família de genes com função não esclarecida, que inclui os genes *BCR2, BCR3* e *BCR4*. A expressão do gene dá origem a dois tipos de RNAm de 4,5 e 6,7 Kb, que são ambos traduzidos em uma fosfoproteína de 160 KDa, com atividade serina treonina quinase (HEISTERKAMP, *et al.*, 1985; MARU & WITTE, 1991). Li *et al.* (1989) mostraram que em células humanas várias proteínas bcr diferentes podem ser identificadas, com tamanhos que variam de 83 a 190 KDa. São encontradas no citoplasma de células em interfase e detectadas ao redor dos cromossomos durante a divisão, o que sugere uma função na regulação do ciclo celular.

O ponto de quebra no gene *BCR*, envolvido na translocação, difere em suas posições, dando origem a transcritos híbridos com diferentes tipos de junção *BCR/ABL* (Figura 15). Na LMC, o ponto de quebra no cromossomo 22, ocorre na região central do gene *BCR* denominada M-bcr ("Major breakpoint cluster region"), que se estende do exon 12 (b1) ao



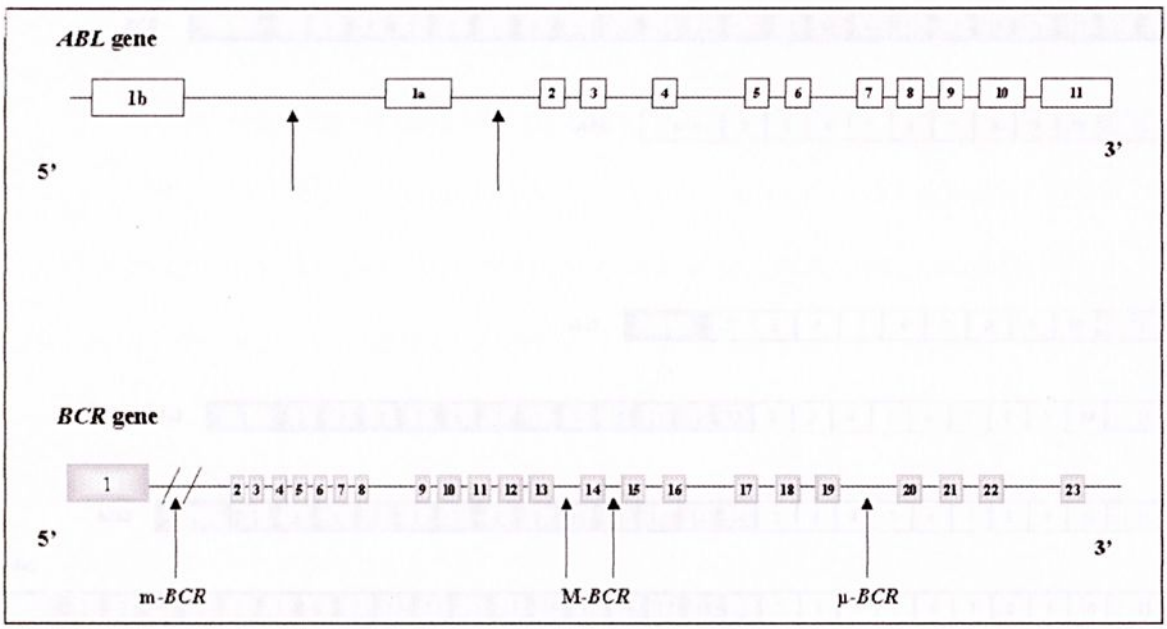


Figura 14: O gene *ABL*, localizado no cromossomo 9 e o gene *BCR* localizado no cromossomo 22 estão envolvidos na formação do cromossomo Ph. As linhas horizontais representam as seqüências do DNA genômico dos genes *BCR* e *ABL*. Os quadros representam a posição dos exons. Os espaços entre os quadros representam as seqüências de introns desses genes. As regiões de ponto de quebra estão representadas com setas. (THIJSEN *et al.*, 1999).

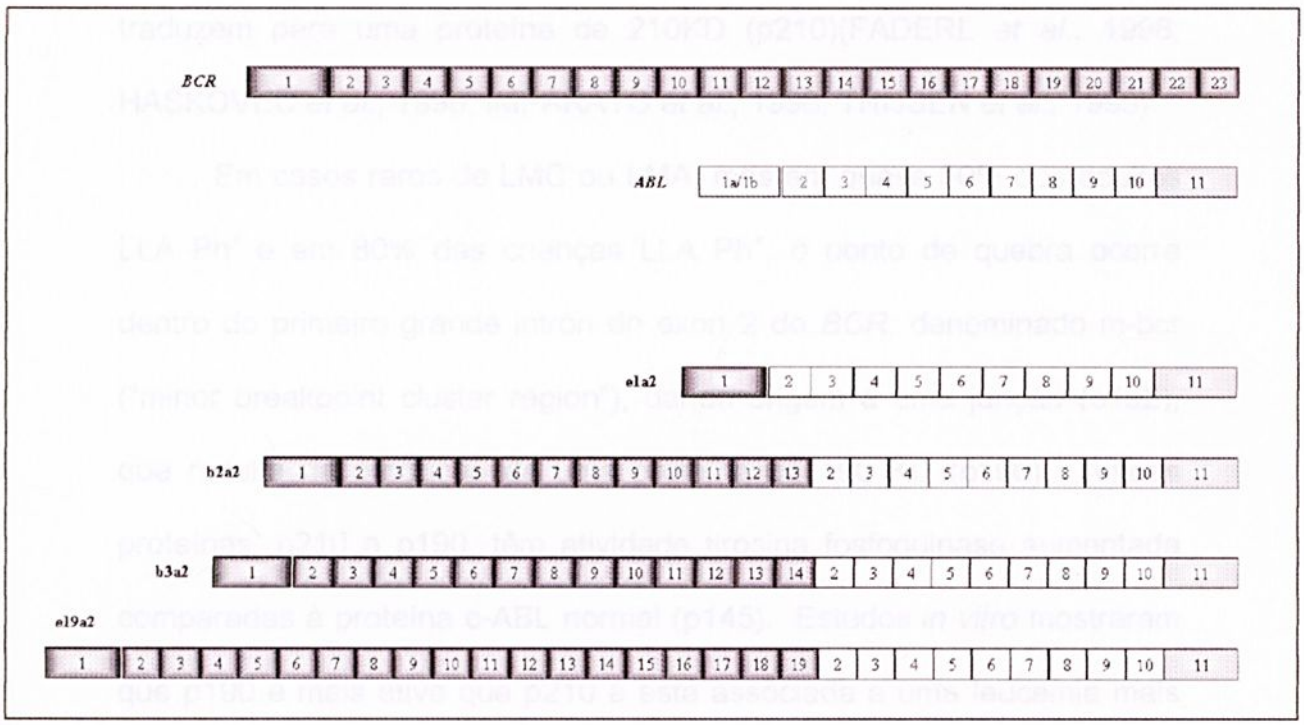


Figura 15: Proteínas de fusão BCR/ABL. Os exons da proteína BCR estão indicados com caixa escura e estão enumerados de 1 a 23. Os exons da proteína ABL estão representados em caixas claras e enumerados de 1 a 11 (THIJEN *et al.*, 1999).

16 (b5) e dois tipos diferentes de junção *BCR/ABL* podem ocorrer. No primeiro, o exon 13 do *BCR* se justapõe ao exon 2 do *ABL* (junção e13a2 ou b2a2). No segundo, o exon 14 do *BCR* se justapõe ao exon 2 do *ABL* (junção e14a2 ou b3a2). Os dois RNAm quiméricos (b2a2 e b3a2), traduzem para uma proteína de 210KD (p210)(FADERL *et al.*, 1998; HASKOVEC *et al.*, 1998; IMPARATO *et al.*, 1998; THIJSEN *et al.,* 1999).

Em casos raros de LMC ou LMA, mas em quase 50% dos adultos LLA Ph^+ e em 80% das crianças LLA Ph^+, o ponto de quebra ocorre dentro do primeiro grande intron do exon 2 do *BCR*, denominado m-bcr ("minor breakpoint cluster region"), dando origem a uma junção (e1a2), que resulta na produção de uma proteína de 190 KD (p190). Ambas proteínas, p210 e p190, têm atividade tirosina fosfoquinase aumentada comparadas à proteína c-ABL normal (p145). Estudos *in vitro* mostraram que p190 é mais ativa que p210 e está associada a uma leucemia mais agressiva (FADERL *et al.*, 1998; HASKOVEC, *et al.*, 1998; MEISSNER *et al.*, 1999; THIJSEN *et al.*, 1999). Suas funções na transformação leucêmica ainda não são bem entendidas, mas parece estar envolvida em múltiplas vias de sinalização, incluindo ativação do mediador *RAS* do *JUN*, ativação do *STAT5*, alterações do oncogene *MYC* e expressão de ciclina D1 (RUBNITZ & LOOK, 1998). De acordo com IMPARATO, *et al.* (1998), a atividade de tirosina quinase da proteína híbrida bcr/abL, é similar à proteína codificada pelo gene c-*ABL*, que tem localização



exclusivamente nuclear, porém mais ativa e com localização citoplasmática. Por causa dessa alta atividade específica e nova localização na célula, bcr/abl tem acesso a substratos citoplasmáticos que a proteína c-ABL não tem, e as fosforilam de maneira desordenada.

No nível transcricional, o RNAm híbrido *BCR/ABL* de 8,5 Kb apresenta seqüência 5' para o *BCR* e 3' para *ABL*. Na forma b2a2, a proteína contém 902 aminoácidos, codificados pelo gene *BCR* e em b3a2, 927 aminoácidos que estão, fusionados com os 1096 aminoácidos codificados pelo gene *ABL*. Ocasionalmente, ambos os transcritos são detectáveis no mesmo paciente por causa do *splicing* alternativo (THIJSEN *et al.*, 1999).

Também já foi identificada uma região mais rara de ponto de quebra, denominada μ-bcr, localizada distalmente no sentido 3' da região M-bcr, entre os exons e19 e e20 (c3 e c4), que dá origem a uma junção e19a2 e a uma proteína de fusão p230 (230KD). Essa proteína foi identificada em pacientes com uma forma branda de LMC, designada leucemia neutrofílica crônica Ph^+ (LNC) (FADERL *et al.*, 1998; HASKOVEC *et al.*, 1998).

A presença ou ausência do exon b3 do *BCR* e suas implicações na heterogeneidade da LMC, tem sido tópico de muitos estudos. INOKUCHI *et al.* (1994), sugeriram que b3a2 pode estar relacionada com trombocitose. Contudo, outros autores não puderam confirmar esta

hipótese (ROZMAN *et al.*, 1995; OPALKA *et al.*, 1992; AGUIAR, 1995). Resultados conflitantes similares foram relatados com relação à resposta ao interferon (THIJSEN *et al.*, 1999; INOUE *et al.*, 1992; OPALKA *et al.*, 1995).

Alguns autores reforçam que a localização do ponto de quebra no gene *BCR* e/ou possivelmente no gene *ABL*, determina o fenótipo da doença. A proteína p190 pode funcionar preferencialmente durante a diferenciação linfóide ou monocítica, enquanto a p210 contém a seqüência *BCR* adicional que parece afetar a via comum de ambos precursores de LLA e LMC. A variabilidade da localização do ponto de quebra dentro do gene *BCR* e o fato de que p190 está predominantemente associada com LLA, enquanto p210 é mais consistente em LMC (90% dos pacientes), mostra uma distinção entre a verdadeira LLA *de novo* (m-BCR, p190) e a LMC na fase blástica linfóide (M-BCR, p210) (FADERL *et al.*, 1998; HASKOVEC *et al.*, 1998; HUETTNER *et al.*, 2000). Na LMA, o ponto de quebra pode ocorrer em qualquer uma das regiões. Os rearranjos que codificam a p210 tornam a LMA indistinguível da LMC em crise blástica mielóide, enquanto a expressão da p190 identifica a verdadeira LMA, também chamada LMA *de novo* (COLLEONI, *et al.*, 1998).

MEISSNER *et al.* (1999), analisaram o tipo de junção no RNAm híbrido *BCR/ABL*, em sangue periférico, de 33 pacientes com LMC. Em

42,4% dos casos, foi observado RNAm com junção do tipo b3a2, em 39,4% o RNAm b2a2 e em 18,2% ambos os tipos, mas com predomínio de b3a2. Contudo, não foram observadas correlações significativas entre tipo de RNAm e idade, teor de hemoglobina, contagem de leucócitos e plaquetas, porcentagem de blastos ou basófilos e esplenomegalia ao diagnóstico, assim como sexo ou duração da fase crônica.

A maioria dos estudos em LMC enfocam a t(9;22) com relação aos genes *BCR/ABL* no cromossomo 22 e seus produtos. Contudo, como conseqüência da recombinação recíproca, um outro gene *ABL/BCR* também é formado em 9q (ALMEIDA *et al.*, 1999; THIJSEN *et al.*, 1999). A coexpressão deste gene poderia levar a uma função biológica e/ou clínica heterogênea na LMC.

No presente trabalho, dois pacientes (15%) com LMC (casos 2588 e 2628) apresentaram a maior parte das células com cariótipos normais e ausência de aberrações cromossômicas clonais. Este resultado é esperado em 5 a 10% dos casos com esta patologia e reflete um prognóstico ruim (SEEBACH *et al.*, 1992). Contudo, nem sempre esta relação entre cariótipo normal na LMC e prognóstico ruim é verdadeira. O cariótipo normal em bandamento GTG não permite a exclusão da presença de aberrações cromossômicas submicroscópicas, que não podem ser observadas com as técnicas de citogenética clássica (SEONG *et al.*, 1999; SESSAREGO *et al.*, 2000).

Em alguns casos podem ocorrer translocações complexas e variáveis envolvendo três ou mais cromossomos e mascarando o marcador Ph ou, ainda, criando um gene de fusão pela inserção de seqüências ABL em um cromossomo 22 aparentemente normal (FADERL *et al.*, 1998; HASKOVEC *et al.*, 1998).

Realmente, a fusão gênica *BCR/ABL* no cromossomo 22 pode ocorrer sem alterar a morfologia cromossômica. ESTOP *et al.*, (1997) descreveram um paciente com LMC e cariótipo normal, cuja análise citogenética molecular, pela técnica de FISH, detectou o rearranjo *BCR/ABL*. Esse caso Ph-negativo e *BCR/ABL* positivo resultou da inserção da seqüência do cromossomo 9 no cromossomo 22, sem alterar a morfologia cromossômica. EM LLA, TCHIRKOV *et al.*, (1998), identificaram por FISH a fusão gênica *BCR/ABL* em um cromossomo 22, citogeneticamente normal. Em pacientes com LMC Ph negativo, com rearranjo gênico *BCR/ABL* detectado molecularmente, a fusão gênica já foi localizada no cromossomo 22 e também no cromossomo 9 (HAGEMEIJER, 1993).

Neste estudo, a técnica de FISH foi realizada nos casos 2588 e 2628 e confirmou a ausência do rearranjo e, conseqüentemente, o prognóstico ruim.

Em 5 a 10% dos pacientes com LMC são observadas outras translocações que formam Ph variantes. Em casos raros, mais que três

cromossomos estão envolvidos na translocação (MITELMAN *et al.*, 1993; YEHUDA *et al.*, 1999;). É interessante a hipótese de que a aquisição de uma alteração secundária à translocação Ph variante é seguida de um padrão semelhante ao da LMC Ph+ clássica, e que o prognóstico de pacientes com LMC com translocação Ph variante, distinta da inserção de *BCR* em 9q34, é comparável como aqueles com a translocação Ph clássica. O Ph variante pode ser um evento secundário que surge após a translocação Ph simples ou pode surgir simultaneamente como um terceiro rearranjo (HURET, 1990; YEHUDA *et al.*, 1990; CALABRESI *et al.* (1994).

Dos 214 pacientes com suspeita diagnóstica de LMC estudados por YEHUDA *et al.* (1990), 186 apresentaram evidência citogenética ou molecular da presença da fusão gênica *BCR/ABL*. Destes, 169 (91%) apresentaram a translocação Ph simples, 13 (7%) uma translocação Ph variante e quatro (2%) apresentaram o rearranjo *BCR/ABL* sem nenhuma evidência citogenética de translocação. Freqüências similares de rearranjos variantes foram encontradas em outros estudos (MITELMAN, 1993; HEIM & MITELMAN, 1995).

Nos casos 2486, 2532, 2556, 2594, 2741 e 2673, com hipótese diagnóstica de LMC, a presença do cromossomo Ph como única alteração cromossômica, confirmou o diagnóstico clínico, descartou hipótese de outras alterações, evidenciando uma fase crônica da doença e favoreceu

a terapêutica, inclusive, permitiu a liberação do medicamento interferon-α, junto aos órgãos públicos, para pacientes do SUS. Nos casos em que foi possível somente análise através da técnica de FISH (casos 2692, 2677, 2723 e 2855), a detecção somente da fusão *BCR/ABL* também foi importante para confirmação do diagnóstico e terapêutica.

Nos estágios mais avançados da LMC é comum o surgimento de uma evolução citogenética com freqüentes ganhos ou perdas de cromossomos inteiros. Nestes casos, as alterações cromossômicas adicionais predizem a crise blástica mesmo se o paciente está clinicamente em uma fase crônica silenciosa (MOHAMED *et al.*, 1998; HONDA *et al.*, 2000).

Com a utilização de técnicas moleculares, HASKOVEC *et al.* (1998) detectaram pela primeira vez um caso complexo de um paciente com fenótipo de LMA ao diagnóstico, que apresentou o rearranjo *BCR/ABL* com ponto de quebra localizado na região μ-BCR (junção e19a2). A análise citogenética mostrou uma progressão do clone maligno, que resultou em células com dois cromossomos Ph, trissomia do 8, isocromossomo 17q e deleção de 7q.

Neste trabalho, alguns casos de LMC apresentaram outras alterações cariotípicas clonais atípicas ou adicionais (casos 2500 e 2642), ou cromossomo Ph adicional (caso 2809). Para eles pôde ser sugerida uma evolução clínica desfavorável e predizer uma provável crise

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

blástica, relacionada a uma progressão clonal da doença. A crise blástica que advém de tal progressão, é uma fase altamente maligna e revela um estágio mais avançado da doença. Sua detecção precoce reflete diretamente no procedimento terapêutico (HEIM & MITELMAN, 1995).

O paciente 2500 também apresentou outras alterações clonais, que foram a trissomia do cromossomo 2 e monossomias do 5, 7 e 8, além de um cromossomo marcador.

O envolvimento do cromossomo 2 tem sido referido em aberrações cromossômicas detectadas em leucemias e em outras condições malignas. BALOGH *et al.* (1998), descreveram trissomia da região 2q em hepatoblastoma. Também em hepatoblastoma, a trissomia completa do cromossomo 2 foi encontrada como única anomalia ou associada a outras alterações (JONATHAN *et al.*, 1999; SAINATI *et al.*, 1998; TONK *et al.*, 1994; BARDI *et al.*, 1992). Contudo, a trissomia do cromossomo 2 ainda não foi relatada em casos de LMC.

Em pacientes com LMC, há uma descrição de YEHUDA *et al.* (1999), na qual a região 2p13 foi envolvida em uma translocação complexa com os cromossomos 9 e 22. Em LLA, na t(2;8)(p12;q24), o lócus gênico da imunoglobulina (cadeia Kappa) em 2p12 se transloca para o cromossomo 8, em um segmento adjacente ao c-*MYC*, desregulando sua expressão. A interação entre a proteína c-myc alterada e vários outros fatores de transcrição levam à transformação linfóide

(RUBNITZ & LOOK, 1998). O envolvimento da região 2p12 também tem sido encontrado em cerca de 1 a 4% dos pacientes com LLC de células B, em translocações envolvendo 18q21, onde se localiiza o gene *BCL-2*, que codifica um potente supressor de apoptose (REES, 1998). Também foi encontrada por HAMAGUCHI *et al.* (1999), em LMA, uma forma variante da t(4;12), a t(2;4;12)(p21;q12;p13).

Inversão pericentrica de um cromossomo 2 foi detectada em adição a um cromossomo 8 extra em um paciente com diagnóstico diferencial de LMC e mielofibrose idiopática (MARK *et al.*, 1998). De acordo com GARDNER & SUTHERLAND (1989), embora a inversão do 2 seja comum em leucemia, essa inversão particular afetando os pontos de quebra q11 e q13, aparentemente inócua, não é rara e já foi previamente descrita como uma anomalia constitucional. Segundo MARK *et al.* (1998), como essa anomalia foi observada em todas as células obtidas por cultura estimulada de sangue periférico, há a possibilidade de ser uma anomalia cromossômica constitucional.

O envolvimento do cromossomo 7 tem sido relatado em anormalidades numéricas e estruturais observadas em diferentes neoplasias, inclusive, hematopoéticas. A monossomia deste cromossomo, tem sido descrita em muitos casos de leucemias e está relacionada a um prognóstico ruim em síndromes mielodisplásicas, LMA e LLA, pois acarreta maior resistência à quimioterapia (PEDERSEN *et al.*,

1997; BAIN *et al.*, 1998; GRIMWADE *et al.*, 1998). Há sugestão de que tenha uma função específica no desenvolvimento e na evolução de leucemias, o que já foi observado em LMA (KRAUTER *et al.*, 1999).

Deleções ou monossomias são consistentes em síndromes mielodisplásicas e em LMA e, nas primeiras, associadas à exposição anterior a agentes carcinogênicos ou leucemogênicos e, também, a um prognóstico desfavorável (PEDERSEN, 1997; DABAJA, 1999). Translocações envolvendo ambos os braços do 7 também são comuns em LMA e LLA e, neste cromossomo já foram mapeados os genes *TCR-β* e *HOXA 9* (SANCHES-GARCIA,1999).

Embora a monossomia e outras anomalias do cromossomo 7 sejam marcadores de mau prognóstico em SMD, LMA e LLA, a fisiopatologia dessa associação precisa ser elucidada. Há duas regiões neste cromossomo, terminal do braço longo e pericentromérica, que estão sendo associadas a estas doenças e que parecem não ter uma importância primária, mas sim representar eventos secundários após o estabelecimento das doenças, envolvidos com sua evolução (SOKOLIC *et al.*, 1999).

A monossomia do cromosomo 8, também encontrada no caso 2500, foi descrita por BURBANO (1997), em lesões benignas da mama. A região 8q14, onde está mapeado o oncogene *c-MYC*, também se encontra freqüentemente envolvida em translocações em pacientes

portadores do linfoma de Burkitt (THERMAN & SUSMAN, 1996). A t(8;21)(q22;q21) é uma das anomalias cromossômicas mais freqüentes em LMA, resultando na fusão dos genes *AML1* e *ETO* (PASKULIN, 1998), que parece ser capaz de induzir a transformação leucêmica alterando o ciclo celular e o processo de apoptose, através da interação com genes normalmente regulados pelo *AML1* (ARRUDA & FIGUEIREDO, 1997; LANGABEER, *et al.*, 1997; PERALTA-ZAARAGOZA, *et al.*, 1997; PASKULIN *et al.*, 1998; RUBNITZ *et al.*, 1999). Segundo GOVAERTS *et al.* (1998), a deficiência parcial ou total do braço longo do cromossomo 8 é fundamental para o desenvolvimento da LMA.

Outro achado citogenético importante no caso 2500 foi a detecção de um cromossomo marcador em quatro células analisadas, cuja origem não pode ser elucidada pelas técnicas convencionais. A ocorrência de cromossomos marcadores tem sido freqüentemente relatada em casos de LMC.

Ganhos ou perdas de cromossomos inteiros também podem ser identificados como única aberração em malignidades hematológicas (MOHAMED *et al.*, 1998). A nulissomia do cromossomo Y, tem sido a alteração numérica mais comum nas lesões benignas e malignas de próstata, em outras neoplasias malignas e também é muito freqüente em LMA (BROTHMAN *et al.*, 1989; TAJARA *et al.*, 1992; PERKINS *et al.*, 1997).

unesp

Estudos moleculares realizados por TRICOLI *et al.*, 1993, identificaram em Yp11.3, o gene *SRY*, cuja expressão pode resultar na ativação de proto-oncogenes com conseqüente proliferação celular e ser responsável por importantes funções na próstata do adulto. Segundo HERENS *et al.* (1999), o cariótipo 45,X,-Y é observado em células de medula óssea de homens idosos, mas também em malignidades hematológicas. Se essa perda em células neoplásicas está relacionada a um processo normal do envelhecimento ou é parte do processo carcinogênico ainda não se sabe. Estudos realizados pelos mesmos autores revelaram a nulissomia do Y em sete casos de leucemia, três dos quais foram considerados como evento secundário em pacientes com LMA-M2. Em três outros casos, os autores referiram que esta alteração era parte de um cariótipo complexo e somente em um paciente foi observado o cariótipo 45,X,-Y sem nenhum outro rearranjo, que pôde ser positivamente correlacionado com o processo neoplásico. KRAUTER *et al.* (1999), encontraram perda de Y como única anomalia em 1% dos casos de LMA analisados.

No presente estudo, este achado foi observado em dois (18,2%) dos onze casos do sexo masculino analisados citogeneticamente. No caso 2624 a alteração pôde ser considerada como secundária. Provavelmente ocorreu posteriormente à t(9;22). No caso 2642, foi o único evento encontrado. Segundo alguns autores, como já citado, esta

alteração quando isolada pode ser relacionada ao processo neoplásico, contudo, a idade do paciente (73 anos) deve ser considerada, uma vez que a perda do Y é comum em células de homens idosos. Além disso, outras alterações submicroscópicas podem não ter sido observadas em função do nível de resolução das técnicas utilizadas (HERENS *et al.*, 1999).

Comparando a quantidade variada e complexa de alterações citogenéticas de medula óssea em leucemias, ganhos ou perdas de certos cromossomos podem ou não ser significativos para o prognóstico. Uma outra anomalia que pode estar relacionada a idade, particularmente em homens, é a trissomia do cromossomo 15, no entanto, o significado desta alteração não é conhecido (SMITH, 1999b).

A inversão do cromossomo 16 é a alteração mais comum em LMA-M4 (SHARMA *et al.*, 1999) e a trissomia do cromossomo 22 tem sido encontrada como um evento secundário nessa leucemia. Em cerca de 10% dos casos de LMA com trissomia do 22 esta é a única alteração encontrada. Diferentes autores a consideram como secundária e, provavelmente, os casos que a apresentam como única anomalia têm a inversão do cromossomo 16, porém, não detectada. Inclusive, um terço dos casos de LMA com trissomia do 22 têm rearranjos visíveis do cromossomo 16 e a maioria deles é LMA-M4 (HEIM & MITELMAN,1995).



No paciente 2710, a inversão do cromossomo 16 foi encontrada com a trissomia do 22, sugerindo o diagnóstico de LMA-M4 que, inicialmente, havia sido sugerido pela equipe médica como LMA-M1.

A ocorrência de anomalias como inv(16)(p13q22), t(16;16)(p13;q22) e del(16)(q22) em LMA e SMD, geralmente, conferem um prognóstico favorável aos pacientes (SHARMA *et al.*, 1999; SOTO-QUINTANA, 1998; GRIMWAD *et al.* 1998).

Os pontos de quebra envolvidos nessa inversão (16p13 e 16q22) interrompem um gene responsável pela cadeia pesada de uma proteína da musculatura lisa, denominada miosina (*MYH11*), localizado em 16p13 e que também envolve o gene *CBFβ*, localizado em 16q, que codifica uma subunidade de um fator de transcrição heterodímero (LIU *et al.*, 1993). Esses autores sugeriram que a dimerização da proteína de fusão CBFβ pode levar a alterações na regulação transcricional e contribuir para a transformação leucêmica. A quebra no lócus da *MYH11* também foi detectada por VAN DER REIJDEN *et al.* (1993) e DAUWERSE *et al.* (1993) em uma grande série de pacientes com LMA-M4 portadores da inv(16) ou t(16;16). Posteriormente, LIU *et al.* (1993) e DAUWERSE *et al.* (1993) descreveram deleções submicroscópicas imediatamente proximais ao ponto de quebra 16p13.

A freqüência da inv(16)(p13q22) em M4 ainda não está determinada. KRAUTER *et al.* (1998), estudaram 140 pacientes com LMA

de novo e sete (5%) apresentaram o transcrito de fusão CBFβ/MYH11 detectado por PCR. Dois pacientes tinham uma trissomia do cromossomo 8 na análise por FISH. Na análise citogenética, em quatro dos sete pacientes a inv(16) não foi detectada. Foram encontrados três casos com cromossomo 16 normal e um com del(16)(q22). Três pacientes tinham trissomia do cromossomo do 21. Achados em alguns pacientes que apresentaram o transcrito de fusão CBFβ/MYH11 e a del(16)(q22) indicaram que a inv(16) pode estar mascarada (LIU *et al.*, 1995; TOBAL *et al.*, 1995). KRAUTER *et al.* (1999), estudaram 447 pacientes com LMA *de novo* e 16 deles(4%) apresentaram a inv(16).

SEYMOUR *et al.* (1999), identificaram em seus estudos dois pacientes com inv(16) em LMA secundárias. Associados aos dados do MD Anderson Cancer Center, um total de 36 casos com essa alteração foram identificadas nesta leucemia, onde tem sido observada uma predominância do sexo feminino, ao contrário dos casos *de novo*, e uma associação com a exposição precedente a drogas citotóxicas, preferencialmente usadas no tratamento de câncer de ovário e de mama (SEYMOUR *et al.*; 1999).

A diferença biológica em indivíduos com LMA foi comparada entre Japão e Austrália por NAKASE *et al.* (2000). Citogeneticamente os japoneses apresentaram alta freqüência de LMA-M2 com t(8;21) seguida

pela LMA-M4, com inv/del(16). A freqüência de LMA-M4, com inv/del(16) foi similar para os dois países.

A existência de translocações e de outros rearranjos com cromossomos 16 variantes, sugerem que algumas de suas regiões são propensas a rearranjos em malignidades (MAAREK *et al.* (1999). Esse cromossomo também foi encontrado no caso 2822 (LMA), envolvido em uma translocação com o cromossomo 5, t(5;16)(q13;q22), não descrita anteriormente.

A maioria dos estudos associam, como já referido, a inv(16) a um prognóstico favorável. Ao contrário, a monossomia do 5 ou a deleção de (5q) e alterações cromossômicas complexas estão relacionadas a um prognóstico ruim, sugerindo que, em muitos casos, as anomalias citogenéticas refletem diferenças nos processos biológicos envolvidos na leucemia, resultando em uma resposta variável ao tratamento (GRIMWADE *et al.*, 1998).

A região 5q13 tem sido amplamente descrita com envolvimento em deleções, ganhos e translocações observadas em LMA e em várias outras neoplasias: câncer de mama, câncer de pulmão e síndrome mielodisplásica (CASTRO *et al.*, 1998; SCHWENDEL *et al.*, 1998; WU *et al.*, 1998; CASTRO *et al.*, 2000; RICHARD *et al.*, 2000; YAMAMOTO *et al.*, 2000).



ROULSTON *et al.* (1998), detectaram o envolvimento de 5q em t(5;21)(q13;q22), em 20 células analisadas de uma paciente com SMD que evoluiu para LMA-M4.

Genes supressores de tumor e genes para fatores de crescimento de células da linhagem granulocítica e monocítica, foram identificados em 5q13 e 5q31 (HEIM & MITELMAN, 1995; CASTRO *et al.*, 2000). Os estudos de CASTRO *et al.* (1998), já haviam sugerido a presença de um gene crítico nessa região. Outros resultados também indicaram que em 5q13.3 pode haver uma fragilidade que predispõe à ocorrência de translocação não balanceada e deleção intersticial, que resultam na perda de segmentos significativos do cromossomo 5.

Em 5q13 foram mapeados os genes humanos *PAR-1, PAR-2* e *PAR-3*, (NYSTEDT *et al.* 1995; BAHOU *et al.* 1993; SCHMIDT *et al.* 1997a; SCHMIDT *et al.* 1997b). Quando comparados, os três genes mostraram uma organização genômica similar e uma complexidade limitada. Eles contém dois exons e, a maioria das seqüências são codificadas pelo exon maior (NYSTEDT *et al.* 1995; SCHMIDT *et al.* 1997a; SCHMIDT *et al.* 1996).

Segundo alguns autores, tais genes podem ter uma origem evolucionária comum e serem parte de uma família de genes localizada em 5q. O mapeamento da região 5q13 estabeleceu a ligação dos genes *PAR* e estabeleceu suas ordens dentro do *lócus PAR*, essa ligação

também foi mostrada em várias ocasiões, como por exemplo, para membros de fatores de crescimento hematopoético, purinoceptor (P2Y) e família mucin (VAN LEEUWEN *et al.* 1989; SOMERS *et al.* 1997; DUPERAT *et al.* 1995).

Os produtos desses genes estão relacionados a receptores de trombina (receptor ativador de proteases), que é um membro de uma família receptora acoplado a uma proteína G. A trombina é uma protease serina com um agonista potente para agregação de plaquetas e um indutor mutagênico para a proliferação de vários tipos celulares (CHEN & BUCHANAN, 1995; DUPÉRAT *et al.* 1998).

Os genes *PAR* estão localizados em uma região que é contígua para o ponto de quebra proximal (q13→q15) identificado na "síndrome 5q- de mielodisplasia". Por causa do efeito conhecido da trombina em vários tipos celulares, incluindo megacariócitos, alguns autores sugeriram que *PAR-1* poderia estar envolvido na dismegacariocitopoese observada nessa síndrome. Outros estudos seriam necessários para esclarecer o envolvimento dos genes *PAR* na síndrome 5q- e doenças relacionadas (BOULTWOOD *et al.* 1994; DEMETRICK *et al.* 1996).

A identificação da translocação t(5;16)(q13;q22), única alteração clonal detectada nas células da paciente 2822, sugere sua participação na etiopatogenia da doença.

O caso 2765 foi encaminhado com hipótese diagnóstica inicial de leucemia mielomonocítica crônica (LMMOC) ou síndrome mielodisplásica. A análise citogenética e por FISH identificou o cariótipo poliplóide. Este foi comunicado ao médico, que com mais esta informação pode concluir o diagnóstico LLA.

Anomalias cromossômicas numéricas isoladas ou em associação com alterações estruturais, são encontradas em cerca de metade dos casos de LLA. A hiperdiploidia com número cromossômico entre 47 e 50 é observada em cerca de um quarto dos casos LLA em adultos e confere um prognóstico intermediário. A hiperdiploidia com cerca de 50 cromossomos é mais comum em crianças e está associada a um bom prognóstico (HEIM & MITELMAN, 1995).

PASZEK-VIGIER *et al.* (1997), relataram 72 pacientes em que o ganho de cromossomos foi muito mais freqüente do que a perda e foi associado com um bom prognóstico. Embora muitos casos apresentem poliploidia, com número cromossômico ao redor de 55, alguns mostram números próximos de triploide (3n±) ou próximo da tetraploide (4n±). Esses pacientes apresentam um prognóstico pior em relação àqueles com cerca de 50 cromossomos (PUI *et al.,* 1989; HEIM & MITELMAN,1995).

O caso aqui estudado (caso 2765) apresentou número modal de 90 (próximo de tetraplóide), contudo alterações estruturais não puderam ser detectadas. Seu prognóstico pôde ser, então, caracterizado como ruim.

Os mecanismos pelos quais a poliploidia contribui para a leucemogênese ainda não são conhecidos. HEIM & MITELMAN (1995), sugeriram duas hipóteses: um efeito de dose, onde a abundância de certos produtos gênicos resultaria na diferenciação ou proliferação anormal e multiplicação de um "defeito" genético pequeno com potencial oncogênico.

Embora vários cromossomos estejam envolvidos na hiperdiploidia, alguns são mais prevalentes. ANKATHIL *et al.* (1992) observaram que o cariótipo hiperdiplóide se caracteriza, principalmente, por trissomia dos cromossomos 8, 18, 19 e 21. Os cromossomos 6, 10 e 14 adicionais parecem mais freqüentes em grupos hiperdiplóides.

Quanto às alterações estruturais detectadas em LLA, já foram descritos mais de trinta rearranjos diferentes, destacando-se as translocações t(8;14) e t(4;11) bem como $14q^{+}$, que estão relacionadas com alto risco de envolvimento do SNC. Tanto em crianças quanto em adultos, as translocações cromossômicas estão relacionadas a um pior prognóstico em relação ao cariótipo normal (FADERL *et al.*, 1998; FORREST *et al.*, 1998; REICHEL et al., 1999).

O caso 2776 foi encaminhado com diagnóstico de LMA-M5. Não foram detectadas aberrações cromossômicas estruturais e, sim numéricas, com número cromossômico próximo de triplóide e modal de 60.

Em LMA-M5 é freqüente a ocorrência de rearranjos envolvendo o cromossomo 11. Embora aneuploidias sejam freqüentes em LMA, a polipoidia é raramente observada na análise cariotípica convencional. Casos de tetraploidia em LMA foram previamente descritos nos subtipos da classificação FAB M0 (LEMES *et al.*, 1994), M1 (ZELANTE *et al.*, 1988), M2 (ABE *et al.*, 1985), M4/5 (CLARKE *et al.*, 1996; WEB *et al.*, 1983), M6 (KOCOVA & SANDBERG, 1985), M7 (LION *et al.*, 1992) e, mais recentemente, em M3 (AU *et al.*, 1999). A tetraploidia em LMA é freqüentemente associada a um prognóstico ruim, com resposta insatisfatória ao tratamento.

Nos casos 2787, 2661, 2699 e 2822, portadores de LMA, os cariótipos foram considerados normais. Tais casos podem apresentar aberrações cromossômicas submicroscópicas, não detectadas em função da resolução da técnica utilizada (RUBNITZ & LOOK, 1998). No caso 2817, a monossomia do cromossomo 4 foi a única alteração clonal encontrada. Segundo HEIM & MITELMAN (1995), trissomias do cromossomo 4 já foram encontradas em casos de LMA.

Alterações não clonais também foram observadas em vários dos casos estudados no presente trabalho. É interessante que alguns cromossomos foram encontrados envolvidos de forma consistente em vários achados. Por exemplo, a monossomia dos cromossomos 7 e 8 que foi encontrada como clonal no caso 2500, também foi observada, de

forma não clonal, em oito e seis outros casos, respectivamente. A monossomia do cromossomo 11 foi encontrada em sete casos, monossomia do 19 e do 18 em seis, monossomia do 20 e do 17 em cinco e monossomia do 9 e do 6 em quatro casos. Todos esses cromossomos são referidos em vários casos de leucemias, envolvidos em anomalias estruturais e numéricas (RUBNITZ & LOOK, 1998; SCHWENDEL *et al.*, 1998; WILKENS *et al.*, 1998; CARLSON *et al.*, 2000; RICHARD *et al.*, 2000; RHODES *et al.*, 2000).

Anomalias envolvendo a banda 11q23 são encontradas em aproximadamente 5 a 10% dos pacientes com LMA primária, são freqüentes em pacientes com LMA-s e em mais de 10% dos casos de LLA. Translocações envolvendo esta região ocorrem em mais de 80% das crianças com menos de um ano que tem leucemias, tanto linfóide quanto mielóide (ROWLEY,1999; STROUT *et al.*, 1999).

A região 11q23 já foi identificada em translocações envolvendo mais de 25 regiões cromossômicas diferentes entre elas, as mais comuns foram t(6;11)(q27;q23), t(9;11)(p22;q23), t(10;11)(p12;q23) e t(11;19)(q23;p13)], em deleções intersticiais e terminais, em trissomia (+11) como única anomalia e também em duplicação parcial em tanden. Os pacientes, freqüentemente, têm características clínicas agressivas, e prognóstico muito ruim (SATAKE *et al*, 1999; TAKI *et al.*, 1999).

Contudo, crianças com LMA e t(9;11)(p22;q23) têm um melhor prognóstico do que aquelas com translocações entre 11q23 e outros cromossomos (STROUT *et al.*, 1999).

O cromossomo 17 encontra-se envolvido em LMA na t(15;17) e na ins(17;3)(q11.2;q21q26.3) (ARRUDA *et al.*, 1997; SCHNTIGER *et al.*, 1998). Nele, está mapeado o supressor de tumor NF1 e sua perda tem sido associada a LMC do tipo juvenil (BROWN, 1997).

Com relação ao cromossomo 20, a análise em bandamento GTG mostrou monossomia não clonal em seis casos (2500, 2556, 2642, 2710, 2776, 2817). Este achado foi observado por WILKENS *et al.* (1998) em pacientes com trombocitemia primária e também tem sido muito referido em pacientes com LLA (FADERL *et al.* (1998). Além disso, o envolvimento do cromossomo 20 é referido em vários rearranjos estruturais. WANG *et al.* (1998), estudaram células leucêmicas, através da técnica de FISH, de dezoito pacientes com del(20q). Foram identificadas variações no intervalo deletado, estendendo-se de 20q11.2 a 20q12. Em outras análises, usando um marcador polimórfico, fizeram um mapa físico da região deletada estendendo-se de 20q11.2 a 20q13.1. No entanto, o mecanismo patogênico pelo qual 20q- altera a origem das células hematopoéticas nas doenças hematológicas permanece desconhecido (KURTIN, 1996). Quanto aos tumores sólidos, BARKS *et*



al. (1997), encontraram um aumento no número de cromossomos 20, detectado por FISH, em melanoma maligno.

Nos casos aqui estudados não foram detectadas alterações cromossômicas estruturais do 20 através das técnicas utilizadas. No entanto, os casos 2743 (LLA) e 2661 (LMA-M6) mostraram trissomia do cromossomo 20, observada com a utilização da sonda WCP 20 e da sonda α-centromérica do 20.

Pouco se sabe sobre os genes localizados no cromossomo 20, porém alguns parecem apresentar potencial oncogênico, por exemplo, o *SRC* (WILKENS *et al.*, 1998; ROWLEY, 1999).

Vários estudos vêm apontando este cromossomo como um candidato à leucemogênese e a freqüência de 7% de trissomia na casuística aqui estudada, reforça esta hipótese.

O paciente 2556 foi submetido a um transplante de medula óssea (TMO) alogênico e a doadora foi sua irmã. Suas células foram analisadas antes e após o procedimento. Os resultados pós transplante foram incluídos neste estudo em função da relevância dos mesmos.

A detecção da ocorrência do rearranjo gênico *BCR/ABL* é importante para avaliar pacientes com LMC em aparente remissão, pós TMO alogênico. As sondas X e Y são utilizadas no monitoramento destes transplantes, para estimar o sucesso do procedimento e evidenciar o quimerismo XX e XY (SMITH *et al.*, 1999a).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

A maioria dos pacientes nos seis primeiros meses pós transplante, apresentam o rearranjo gênico *BCR/ABL* em freqüências progressivamente menores, até seu desaparecimento na remissão permanente (cura). Aqueles pacientes nos quais o monitoramento detecta a persistência do rearranjo com um aumento progressivo na sua freqüência, têm risco eminente de recaída, por ausência de cura da doença, ou seja, insucesso do transplante (HUGHES *et al.*, 1991; DREXLER *et al.*, 1995).

Para o paciente 2556, a realização da técnica de FISH foi fundamental para monitoramento do TMO. O sucesso do procedimento pôde ser observado antes do tempo exigido para monitoramento pelas técnicas hematológicas e imunológicas.

Os achados do presente estudo mostraram a importância da citogenética convencional no diagnóstico, prognóstico e, conhecimento dos mecanismos biológicos envolvidos na leucemogênese e da técnica de FISH como técnica complementar, inclusive, para identificação de alterações não identificadas através das técnicas citogenéticas convencionais.

Atualmente, não há como dissociar a Hematologia da Genética. As duas áreas se complementam e esta associação resulta em benefícios cada vez maiores para os pacientes com estas afecções tão graves, as leucemias.

unesp

V. Conclusões

Os resultados obtidos através deste trabalho:

a) Reforçaram a importância da análise cariotípica para o conhecimento dos mecanismos biológicos envolvidos nos processos leucêmicos;

b) Permitiram a confirmação e revisão dos diagnósticos e deram subsídios para o prognóstico e terapia dos doentes;

c) Possibilitaram a liberação do medicamento interferon-α junto aos órgãos governamentais de saúde para os pacientes, que foram todos atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS);

d) Permitiram a identificação de alterações cariotípicas ainda não descritas na literatura como a trissomia do cromossomo 2 e a translocação envolvendo os cromossomos 5 e 16;

e) Possibilitaram a implantação das técnicas de obtenção de células da medula óssea para estudo citogenético e implantação da técnica de FISH, como técnica complementar fundamental, no Serviço de Genética da FAMERP, com a criação do Laboratório de Citogenética Molecular.

unesp

VI - Referências Bibliográficas

AATOLA, M., ARMSTRONG, E., TEERENHOVI, L., BORGSTRÜM, G.H. Clinical significance of the del(20q) chromosome in hematologic disorders. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.62, p.75-80, 1992.

ABE, R., RAZA, A., PREISLER, H. D., TEDDI, C. K., SANDBERG, A. A. Chromosomes and causation of human câncer and leukemia LIV: near-tetraploidy in acute leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 14, p. 45-59, 1985.

AGUIAR, R. C., DAHIA, P. L., BENDIT, L., BEITLER, B., DORLHIAC, P., BYDLOWSKI, S., CHAMONE, D. Further evidence for the lack of correlation between the breakpointsite within M-BCR and CML prognosisand for the occasional involvement of p53 in transformation. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 84, p. 105-112, 1995.

ALMEIDA, T.A., CIGUDOSA, J.C., OTERO, A., GARCIA-MIRANDA, J.L. B2 exon of the BCR gene is also duplicated in some patients with CML. **Leukemia,** v. 13, p. 645-651, 1999.

ANKATHIL, R., STEPHEN, J., VASULDAN, D.M., KUSUMAKUMARY, P., PILLAI, G.R., NAIR, M.K. Prognostic significance of kariotype analysis in children with acute lymphoblastic leukemia. **Hematol. Oncol.**, v. 10, n.6, 339-344, 1992.

ARKESTEIJN, G., JUMELET, E., HAGENBEEK, A., SMIT, E.,SLATER, R., MARTENS, A. Reverse chromosome painting for the identification of marker chromosomes and complex translocations in leukemia. **Cytometry**, v. 35, p. 117-124, 1999.

ARKESTEIJN, G.J.A., ERPELINCK, S.L.A., MARTENS, A.C.M., HAGEMEIJER, A., HAGENBEEK, A. The use of FISH with chromosome-specific repetitive DNA probes for the follow-up of leukemia patients. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 88, p. 69-75, 1996.

ARRUDA, V.R., FIGUEIREDO, M.S. Biologia molecular para o hematologista clínico. In: Temas de hematologia. Viana, M.B., Fagundes, E.M., Belo Horizonte: Imprensa Universitária, 1997. p.187-199.

AU, W. Y., MA, S. K., LAM, C. C. K., CHAN, L. C., KWONG, Y. L. Tretaploid acute promyelocytic leukemia with large bizarre blast cell morphology. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 115, p. 52-55, 1999.

AURICH, J., DASTUGUE, N., DUCHAYNE, E., SCHLAIFER, D., RIGAL-HUGUET, F., CABALLIN, M.R. Location of the BCR-ABL fusion gene on the 9q34 band in two cases of Ph-positive chronic myeloid. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 20, p.148-154, 1997.

AZIZ, K.J. Clinical molecular biology: concepts and applications. **Adv. Clin. Chem.**, v. 32, p. 39-72, 1997.

BAHOU, W. F., NIERMAN, W. C., DURKIN, A. S., POTTER, C. L., DEMETRICK, D. J. Chromosomal assignment of human thrombin receptor gene: localization to region q 13 of chromosome 5. **Blood,** v. 82, p. 1532, 1993.

BAIN, B.,J. Classification of acute leukaemia: the need to incorporate cytogenetic and molecular genetic information. **J. Clin. Pathol**., v. 51, p.420-423, 1998.

BALOGH E., SWANTON S., KISS C., JAKAB Z.S., SECKER-WALKER L.M., OLÁH É. Fluorescence in situ Hybridization reveals trisomy 2q by insertion into 9p in hepatoblastoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, 1998, v. 102, p. 148-150.

BARCINSKI, M.A., DOS REIS, G.A. Apoptosis in parasites and parasite-induced apoptosis in the host immune system: a new approach to parasitic diseases. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 4, p. 395-401, 1999.

BARDI, G., JOHANSSON, B. PANDIS, N., HEIM, S., MANDAHL, N., BÉKÀSSY, A., HAGERSTRAND, I., MITELMAN. Trisomy 2 as the sole chromosomal abnormality in a hepatoblastoma. **Genes Chromosom Cancer,** v. 4, p. 78-80, 1992.

BARKS, J.H., THOMPSON, F.H., RAYMOND, T., YANG, J.M., STONE, J.F., WYMER, J.A., KHAVARI, R., GUAN, X.Y., TRENT, J.M., PINKEL, D., NELSON, M.A. Increased chromosoe 20 copy number detected by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) in malignant melanoma. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 19, p. 278-285, 1997.

BENNETT, J.C., PLUM, F. **Cecil:** tratado de medicina interna. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1297p.

BHATIA, S., ROBISON, L.L. Epidemiology of leukemia and lymphoma. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 6, n. 4, p. 201-204, 1999.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

BROTHMAN, A.R., LESHO, L.J., SOMERS, K.D., SCHELLHAMMER, P.F., LADAGA, L.E., MARCHANT, D.J. Cytogenetic analysis of four priimary prostatic cultures. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 37, p.241-248, 1989.

BODMER, W.F. 1998 runme shaw memorial lecture: somatic evolution of cancer. **Ann. Acad. Med Singapore**, v. 28, n.3, p. 323-329, 1999.

BOUKAMP, P., POPP, S., ALTMEYER, HÜLSEN, A., FASCHING, C., CREMER,T., FUSENING, N.E. Sustained non tumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line hacat. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 19, n. 4, p. 201-214, 1997.

BOULTWOOD, J., LEWIS, S., WAINSCOAT, J.S. The 5q – syndrome. **Blood,** v. 84, p. 3253, 1994.

BROWN, M.A. Tumor suppressor genes and human cancer. **Adv. Genet.**, v. 36, p.45-135, 1997.

CALIGIURI, M.A., STROUT, M.P.,GILLILAND, D.G. Molecular biology of myeloid leukemia. **Semin. Oncol.**, v. 24, n.1, p. 32-44, 1997.

CAMACHO, J.A. Leucemias crónicas. **Salud Uninorte. Barranquila** (Col.), v. 4-5(2), p. 91-104, 1988.

CAMARGO, J.L.V. Carcinogênese. In: Mutagênese, teratogênese e carcinogênese - Métodos e critérios de avaliação. Rabello-Gay, M.N., Rodrigues, M.A., Monteleone-Neto, R. **Soc. Br. Genét.**, 1991, 177p.

CAMPBELL, L.J., GARSON, O.M. The prognostic significance of deletion of the long arm of chromosome 20 in myeloid disorders. **Leukemia**, v. 8, p. 67-71, 1994.

CARLSON, K.M., VIGNON, C., BOHLANDER, S., MARTINEZ-CLIMENT, J.A., LE BEAU, M., ROWLEY, J.D. Identification and molecular characterization of CALM/AF10 fusion products in T cell acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 14, n. 1, p. 100-104, 2000.

CARVALHO-SALLES, A.B.F. **Análise Citogenética e Molecular em Hiperplasias e Neoplasias da Próstata**. São José do Rio Preto, 1998. 138p. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética Humana)., Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, UNESP.

CASTRO P.D., FAIRMAN, J., NAGARAJAN, L. The unexplored 5q13 locus: a role in hematopoietic malignancies. **Leuk. Lymphoma**, v. 30, n.5-6, p. 443-448, 1998.

CASTRO P.D., LIANG, J.C., NAGARAJAN, L. Deletions of chromosome 5q13.3 and 17p loci cooperate in myeloid neoplasms. **Blood**., v. 95, n.6, p. 2138-2143, 2000.

CAVANI S., PERFUMO C., ARGUSTI A., PIERLUIGI M., PERRONI L., SCHMIEGELOW K., PETERSEN M.B., COTTER F.E., STRIGINI P., DAGNA-BRICARELLI F., NIZETIC D. Citogenetic and molecular study of 32 Down syndrome families: potential leukaemia predisposing role of the most proximal segment of chromosome 21q. **Br. J. Haematol.**, v. 103, n.1, p.213-216, 1998.

CHARLE, M. R., LYNCH, E. F., CONTIS, L. C., SHERER, M. R. SHEKHTER LEVIN, S. Near-tetraploidy in adult acute myelogenous leukemia**. Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 86, p. 107-115, 1996.

COLLEONI, G.W.B., SATAKE, M., BOROVIK, C.L., KERBAUY, J., YAMAMOTO. Leucemia mielóide aguda Ph1-positivo *de novo* ou crise blástica deleucemia mielóide crônica? Análise molecular e evolução clínica de um caso. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 44, n. 3, p. 253-255, 1998.

COTRAN, R.S., KUMAR,V., ROBBINS, S.L. **Robbins:** patologia estrutural e funcional. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 593-599.

DAGHISTANI, D., TOLEDANO, S.R. & CURLESS, R. Monosomy 7 syndrome. **Cancer Genet. Cytogenet**., v. 44, p. 263-9, 1990.

DAVIS,M.P., DEWALD,G.D., PIERRE, R.V., HOAGLAND, H.C. Hematologic manifestations associated with deletions of the long arm of chromosome 20. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 12, p. 63-71, 1984.

DE VITA, V.T.Jr, CANELLOS, G.P. The Lymphomas. **Semin. Hematol.**, v. 36, n. 4, p. 84-94, 1999.

DEMETRICK, D. J., DEWALD, D. W., LANAMAN, J., BAHOU, W. F. The thrombin receptor gene is centromeric to the common proximal breakpoint in patients with the 5q – syndrome: identification of a previously unrecognized chromosome 5 inversion. **Br J Haematol**, v. 92, p. 339, 1996.

DEMORY, J.L., DUPRIEZ, B., FENAUX, P., et al. Cytogenetic studies and their prognostic significance in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 47 cases. **Blood**, v. 72, p. 855-859, 1988.

DEVITA, V.T.Jr., HELLMAN, S., ROSENBERG, S.A. **Cancer principles and practice of Oncology**. 5.ed. New York: Lippincott-Raven, 1997. v. 2, p. 2285-2343.

DEWALD, G.W., WYATT, W.A., JUNEAU, A.L., CARLSON, R.O., ZINSMEISTER, A.R., JALAL, S.M., SPURBECK, J. L., SILVER, R.T. Highly sensitive fluorescence in situ hybridization method detect double BCR/ABL fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 9, p. 3357-3365, 1998.

DREXLER, H.G., BORKHARD, A., JANSSEN, J.W.G. Detection of chromosomal translocations in leukemia-lymphoma cells by polymerase chain reaction. **Leuk. Lymph.,** v. 19, p. 359-380, 1995.

DRINKWATER, N.R., SUGDEN, B. **Mecanismos da Carcinogênese**. In: Manual de Oncologia Clinica. Hossfeld, D.K., Sherman, C.D., Love, R.R., Bosch, F.X., Springer-Verlag, Fundação Oncocentro de São Paulo, 2ª ed., 1996, p. 7-20.

DUPÉRAT, V. G., JAQUELIN, B., BOISSEAU, P., ARVELIER, B., NURDEN, A. T. Protease-activated receptor genes are clustered on 5p13. **Blood**, v. 92, p. 25-31, 1998.

EASTMOND, D.A., SCHULER, M., RUPA, D.S. Advantages and limitations of using Fluorescence in situ Hybridization for detection of aneuploid in interphase human cells. **Mutat. Res.**, v. 348, p. 153-162, 1995.

EIBL, B., EBNER, S., DUBA, C., BÖCK, G., ROMANI, N., ERDEL, M., GÄCHTER, A., NIEDERWIESER, D., SCHULER, G. Dendrictic cells generated from blood precursors of chronic myelogenous leukemia patients carry and cna induce a CML – specific primary cytotoxic T-cel response. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 20, p. 215-223, 1997.

ESTOP, A.M., SHERER, C., CIEPLY, K., GROFT, D., BURCOGLU, A., JHANWAR, S., THOMAS, J. A Ph-negative chronic myeloid leukemia Patient with a now-classical BCR-ABL rearrangement characterizes by Fluorescence *in situ* Hybridization. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 96, p. 174-176, 1997.

FADERL, S. KANTARJIAN, H.M., THOMAS, D.A., CORTES, J., GILES, F., PIERCE, S., ESTROV, Z. Outcome of Philadelphia chromosome-positive adult acute lymphoblastic leukemia. **Leuk. Lymphoma,** v. 36, n. 3-4, p. 263-273, 2000.

FADERL, S., KANTARJIAN, H.M, TALPAZ, M., ESTROV, Z. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 91, p. 3995-4019, 1998.

FADERL, S., TALPAZ, M., ESTROV, Z., KANTARJIAN, H.M. Chronic Myelogenous Leukemia: Biology and Therapy. **Ann. Intern. Med.**, v. 131, p. 207-219, 1999.

FEJZO, M.S., GODFREY, T., CHEN,C., WALDMAN, F., GRAY, J.W. Molecular cytogenetic of consistent abnormalities at 8q12-q22 in breast cancer. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 22, p.105-113, 1998.

FORREST, D.L., NEVILL, T.J., HORSMAN, D.E., BROCKINGTON, D.A., FUNG, H.C., TOZE, C.L., CONNEALLY, E.A., HOGGE, D.E., SUTHERLAND, H.J., NANTEL, S.H., SHEPHERD, J.D., BARNETT, M.J. Bone marrow transplantation for adults with acuteleukemia and 11q23 chromosomal abnormalities. **Br. J. Haematol.,** v. 103, p. 630-638, 1998.

GARDNER, R.J.M., SUTHERLAND, G.R. **Chromosome abnormalities and genetic counseling**. New York: Oxford University Press, 1989.

GOASGUEN, J.E., BENNETT, J.M. Biological diagnosis of leukemia. In: Temas de hematologia. Viana, M.B., Fagundes, E.M., Belo Horizonte, 1997. p. 13-27.

GOVAERTS L., DAENEN S., BONG B., BREED A., JONG B. Deletion (8)(q22) as the only chromosomal abnormality in a patient with RAEB-t with progression to acute myelocytic leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 30, p. 319-321, 1998.

GRIMWADE, D., WALKER, H., OLIVER, F., WHEATLEY, K., HARRISON, C., HARRISON, G., REES, J., HANN, I., STEVENS, R., BURNETT, A., GOLDSTONE, A. The importance of diagnostic cytogenetic on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children´s Leukemia Working Parties. **Blood**, v.92, n.7, p. 2322-2333, 1998.

GROUCHY, J.D.E., TURLEAU, C. **Atlas des maladies Chromosomiques**, Paris Expasion Scientifique Francise, 1977.

HALL, I., GIOELI, D.D., WEISSMAN, B.E., TESTY, T.D. Identification of additional complementation groups that regulate genomic instability. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 20, n. 2, p. 103-112, 1997.

HAGEMEIJER, A., BUIJS, A., SMIT, E., JANSSEN, B., CUENERS, G.J., G.J., VANDER D., GOUSVELD, G. Translocation of BCR to chromosome 9: a new cytogenetic variant detected by FISH in two Ph-negative, BCR-positiv patients with chronic myeloid leukemia. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 8, n. 4, p. 237-245, 1993.

HAMAGUCHI, H., NAGATA, K., YAMAMOTO, K., KOBAYASHI, M., TAKASHIMA, T., TANIWAKI, M. A new translocation, t(2;4;12)(p21;q12;p13), in CD7-positive acute myeloid leukemia: a variant form of t(4;12). **Cancer Genet. Cytogenet,** v. 114, p. 96-99, 1999.

HARRIS, C., ROBISNSON, T., MICHAISKI, K., MEISNER, L. Specimen sahage whith FISH. **Applied Cytogenetic**, v. 21, p.66-70, 1995.

HASKOVEC, C., PONZETTO, C., POLÁK, J., MARITANO, D., ZEMANOVÁ, Z., SERRA, A., MICHALOVÁ, K., KLAMOVÁ, H., CERMÁK, J., SAGLIO, G. P230 BCR/ABL protein main be associated with an acute leukemia phenotype. **Br. J. Haematol.**, v. 103, p. 1104-1108, 1998.

HEIM, S., MITELMAN, F. **Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells.** 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1995.



HEISTERKAMP, N., STAM, K., GROFFEN, J., DE KLEIN, A., GROSVELD, G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph translocation. **Nature**, v. 315, p. 758-761, 1985.

HERENS, C., BRASSEUR, E., JAMAR, M., VIERSET, L., SCHOENEN, I., KOULESCHER, L. Loss of the Y chromosome in bone marrow cells: results on 1907 consecutive cases of leukaemia na preleukaemia. **Clin. Lab. Haematol.,** v. 21, n. 1, p. 17-20, 1999.

HODGSON, S.V., MAHER, E.R. **A Practical Guide to Human Cancer Genetics**. 2.ed. Cambridge: University Press, 336p., 1999.

HOKAMA, P.O.M., PARDINI, M.I.M.C., COLTURATO, V.A.R., AZEVEDO, W.M., MACHADO,P.E.A. Análise de regiões repetitivas do genoma como parâmetro de avaliação da "pega" do TMO-Alogênico e do *status* quimérico. **Rev. Br. Hematol. Hemot.**, v. 21, n.1, p. 23-27, 1999.

HONDA, H., USHIJIMA, T., WAKAZONO, K., ODA, H., TANAKA, Y., AIZAWA, SI., ISHT., YAZAKI, Y., HIRAI, H. Acquired loss of p53 induces blastic transformation in p210 (bcr/abl)-expressing hematopoietic cells:a transgenic studyfor crisis of human CML.

HORRIGAN, S.K., ARBIEVA, Z.H., XIE, H.Y., KRAVARUSIC, J., FULTON, N.C., NAIK, H.,WESTBROOK, C.A. Delineation of a minimal interval and identification of 9 candidate for a tumor suppressor gene in malignant myeloid disorders on 5q31. **Bood**, v. 95, n. 7, p. 2372-2373, 2000.

HUETTNER, C.S., ZHANG, P., VAN ETTEN, R.A., TENEN, D.G. Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR/ABL1. **Nat. Genet.**, v. 24, n.1, p. 57-60, 2000.

HUGHES, T.P., MORGAN, G.J., GOLDMAN, J.M. Detection of residual leukemia after bone marrow transplant for chronic polymerase chain reaction in predicting relapse. **Blood,** v. 77, p. 874-878, 1991.

IMPARATO, F.P., MENEZES,C.L., ANELLI, A., OLIVEIRA, R.M., CABALLERO, O.L., SIMPSON, A.J.G. Co-evolução da terapêutica e do diagnóstico molecular da leucemia mielóide crônica. **Act. Oncol. Br.**, v. 19, n. 1, p. 259-266, 1998.

INOKUCHI, K., FUTAKI, M., DAN, K., NOMURA, T. Posible correlation of b3-a2-type bcr-abl messenger RNA defined by semiquantitative RT-PCR to platelet and megakaryocyte counts in Philadelphia-positive chronic myelogenous leudemia. **Int. Med**. v. 33, p189-192, 1994.

INOUE, T., TOJO, A., TSUCHIMOTO, D., OKAMOTO, S., OGURA, H., TANI, K., OZAKA, K., SHIBUYA, M., ASANO, S. Possibible correlation between fusion pattern of BCR/ABL mRNA and clinical response to alphaterferon in chronic myelogenous leukemia. **Leukemia**, v. 6, p. 948-951,1992.

ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature. MITELMAN, F. ed. Karger, Basel, 114p., 1995.

ISSELBACHER, K.J., BRAUNWALD, E., WILSON, J.D., MARTIN, J.B., FAUCI, A.S., KASPER, D.L. **Medicina interna.** 13.ed. México: Nueva Editorial Interamericana, 1995. v. 1, p. 391-409.

JACOBSON, L.O., MARKS, E.K., ROBSON, M.J., et al. Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 34, p. 1538-1543, 1949.

JOHANSSON, B., BILLESTRÖM, R., KRISTOFFERSSON, U., AKERMAN, GARWICZ,S., AHLGREN, T., MALM, C., MITELMAN, F. Deletion of chromosome arm 3p in hematologic malignancies. **Leukemia**, v.11, p. 1207-1213, 1997a.

JOHANSSON, B., BRONDUM-WILLSEN, BILLSTRÖM, R., SCHIODT,I., MITELMAN, F. Translocation between the long arm of chromosomes 1 and 5 in hematologic malignancies are strongly associated with neoplasms of the myeloid lineages. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.99, p 97-101, 1997b.

KALIL, N., CHESON, BD. Management of chronic lymphocytic leukaemia. **Drugs Aging**, v. 16, n. 1, p. 9-27, 2000.

KAWAMURA, M. DNA circulante em pacientes com câncer. **Germinis - Boletim Informativo do Conselho Federal de Biologia**. n. 2, p. 8, 1999.

KEMPSKI, H.M., CHESSLLS, J.M., REEVES,B.R. Deletions of chromosome 21 restricted to the leukemic cells of children with Down syndrome and leukemia. **Leukemia**, v.11, p. 1973-1977, 1997.

KOBZEV, Y., DOMRACHEVA, E., ZAKHAROVA, A., KHOROSHKO, N., TURKINA, A., DEWALD, G. Fluorescence *in situ* Hybridization studies of interphase nuclei for assessing response to terapy in patients with chronic myeloid leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.** v. 106, p. 128-134, 1998.

KOCOVA, M., SANDBERG, A. Major karyotipic abnormalities in a near-tetraploid erythroleukemia. **Cancer Genet Cytogenet,** v. 17, p. 143-150, 1985.

KRAUTER, J., GANSER, A., BERMANN, L., RAGHAVACHAR, A., HOELZER, D., LUBBERT, M., SCHLIMOK, G., ARNOLD, R., KIRCHNER, H., PORT, M., HEIL, G. Association between structural and numerical chromosomal aberrations in acute myeloblastic leukemia: a study by RT-PCR and FISH in 447 patients with de-novo AML. **Ann. Hematol.** v. 78, n. 6, p. 265-269, 1999.

KRAUTER, J., PETER, W., PASCHEBERG, U., HEINZE, B., BERGMANN, L., HOELZER, D., LÜBBERT, M., SCHLIMOK, G., ARNOLD, R., KIRCHNER, H., PORT, M., GANSER, A., HEIL, G. Detection of karyotypic aberrations in acute myeloblastic leukemia: a prospective comparison between PCR/FISH. **Br. J. Haematol.,** v. 103, p. 72-78, 1998.

KURTIN, P.J., DEWALD, G.W., SHIELDS, D.J., HANSON, C.A. Hematologic disorders associated with deletions of chromosome 20q. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 106, n. 5, p. 680-688, 1996.

LANGABEER, S.E., WALKER, H., ROGER, J.R., BURWETT, A.K., WHEATLEY, K., SWIRSKY, D., GOLDSTONE, A.H., LINCH, D.C. Incidence of AML1/ETO fusion transcripts in patients entered into the MRC AML trials. **Br. J. Haematol.**, v. 99, p. 925-928, 1997.

LEE, G.R., BITHELL, T.C., FOERSTER, J., ATHENS, J.W.,LUKENS, J.N. **Clin. Hematol.** Philadelphia, London: Lea & Febiger., 1993, v. 2, 2324 p.

LEE, R.G., LUKENS, J., GREER, J.P., FORESTER, J., PARASKEVAS, F., RODGERS, G. **Wintrobe's Clinical Hematology,** 10ed., USA: Willians & Wilkins, 1998, v. 2, 2763p.

LEMES, P., LELINEK, J., MICHALOVA, K., KOUBEK, K., SCHWARZ, J., MALASKOVA, V., RYPACKOVA, B., JIRASEK, A., BREZINOVA, J., HRABENEK, J. Near-tetraploid poorly differentiatedacute myeloid leudemia MO diagnosed by short-tern cultures with a phorbol ester TPA. **Leuk. Res.**, v. 18, p. 493-497, 1994.

LEONE, G., MELE, L., PULSONI, L., EQUITANI, F., PAGANO, L. The incidence of secondary leukemias. **Haematologica**, v. 84, p. 937-945, 1999.

LI, F.P., HECHT, F., KAISER-McCAW, B., BARANKO, P.V. & POTTER, N.U. Ataxia pancytopenia: syndrome of cerebellar ataxia, hypoplastic anaemia, monosomy 7 and acute myelogenous leukaemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 4, p. 189-196, 1981.

LI, W.J., DREAZEN, O.L, KLOETZER, W., GALE, R.P., ARLINGHAUS R.B. Characterization of bcr gene products in hematopoietic cells. **Oncogene**. v. 4, p127-138, 1989.

LICHTY, B.D, KAMEL-REID,S. Exon-skipping in BCR/ABL is induced by ABL exon 2. **Biochem. J.**, v. 348, p. 63-69, 2000.

LILLICRAP, D.A. & STERNDALE, H. Familial chronic myeloid leukaemia. **Lancet,** v. 2, p. 699, 1984.

LION, T., HAAS, O. A., HARBOTT, J., BANNIER, E., RITTERBACH, J., JANKOVIC, M., FINK, F. M., STOJIMIROVIC, A., HERMANN, J., RIEHM, H. J. The translocation t(1;22)(p13;q13) is a nonrandom marker specifically associated with acute megakaryocytic leukemia in young children. **Blood,** v. 79, p. 3325-3330, 1992.

LIU, P., HAJARA, A., WIJMENGA, C. & COLLINS, F.S. Molecular pathogenesis of the chromosome 16 inversion in the M4Eo subtype of acute myeloid leukemia. **Blood,** v. 85, p. 2289-2302, 1995.

LIU. P., TARLÉ, S.A., HAJARA, A., CLAXTON, D.F., MARLTON, P., FREEDMAN, M., SICILIANO, M.J., COLLINS, F.S. Fusion between transcription factor CBFβ/PETBP2β and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. **Science,** v. 261, p. 1041-1044, 1993.

MAAREK, O., SALABELLE, A., LE CONIAT, M.B., DANIEL, M.T., BERGER, R. Chromosome 16 inversion-associated translocation: two new cases. **Cancer Genet. Cytogenet,** v. 114, p. 126-129, 1999.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

MARK, H.F.L., PRZYGODA, J.J., SIKOV, W. Fluorescent in situ Hybridization for identifying cytogenetic abnormalities in inadequate and suboptimal specimens. **Pathobiology**, v. 66, p. 216-220, 1998.

MARU, Y., WITTE, O.N. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. **Cell**. v. 67, p. 459-468, 1991.

MERTENS, A.C., WEN, W., DAVIES, S.M., STEINBUCH, M., BUCKLEY, J.D., POTTER, J.D., ROBISON, L.L. Congenital abnormalities in children with acute leukemia: a report from the children's cancer group. **J. Pediat.**, v.133, n. 5, p. 617-623, 1998.

MELNICK, A.M., WESTENDORF, J.J., POLINGER, A., CARLILE, G.W.,ARAI,S., BALL, H.J., LUTTERBACH,B., HIEBERT, S.W., JICHT, J.D. ETO protein disrupted in t(8;21) associated acute myeloid leukemia is a corepressor for the promyelocytic leukemia zing finger protein. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, n. 6, p. 2075-2086, 2000.

MERTENS, F., JOHANSSON. B., HEIM, S., KRISTOFFERSON, U., MITELMAN, F. Karyotypic patterns in chronic myeloproliferative disorders: report on 74 cases and review of the literature. **Leukemia**, v. 5, p. 214-220, 1991.

MITELMANN, F. The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. **Leuk. Lymphoma**, v. 11, p.11-15, 1993.

MOHAMED, A.N., VARTERASIAN, M.L., DOBIN, S.M., McCONNELL, T.S., WOLMAN, R.S., RANKIN,C., WILLMAN, C.L., HEAD, D.R., SLOVAK, S.L. Trisomy 6 as a primary karyotypic aberration in hematologic disorders. **Cancer Genet. Cytogenet.** v. 106, p. 152-155, 1998.

MOREL, P., HEBBAR, M., LAI, J.L, et al. Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. **Leukemia**, v. 7, p. 1315-1323, 1993.

MÛHLMAN, J., THALER, J., HILBE, W., BECHTER, O., ERDEL, M., UTERMANN, G., DUBA, H.C. Fluorescence in situ Hybridization (FISH) on peripheral blood smears for monitoring Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia (LMC) during interferon treatment – A new strategy for remission assessment. **Genes Chromosom. Cancer**, v.21, p. 90-100, 1998.



NAKASE, K., BRADSTOCK, K., SARTOR, M., GOTTLIED, D., BYTH, K., KITA, K., SHIKU KAMADA, N. Geographic heterogenetic of cellular characteristics of acute myeloid leukemia: a comparative study of Australian and Japan adult cases. **Leukemia,** v. 14, p. 163-8, 2000.

NORDGREN, A., NORDENSKJÖLD, M., SÖDERHÄLD, S., PORWIT-MacDONALD, A., BLENNOW, E. A case of acute lymphoblastic leukemia, near-triploidy, and poor outcome: characterization by Fluorescense *in situ* Hybridization using chromosome-specific libraries from all human chromosomes. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 99, n. 2, p.93-96, 1997.

NOWELL, P.C, BESA, E.C. Prognostic significance of single chromosome abnormalities in preleukemic states. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 42, p. 1-7, 1989.

NOWELL, P.C., HUNGERFORD, D.A. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. **Science**, v. 132. p. 1497, 1960.

NYSTEDT, S., EMILSSON, K., LARSSON, A. K., STÖMBECK, B., SUNDELIN, L. Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2**. Eur. J. Biochem.,** v. 232, p. 84, 1995.

OPALKA, B., WANDL, U. B., STUTENKEMPER, R., KLOBE, O., SEEBER, S., NIEDERLE, N. No correlation between the type of bcr-abl hybrid messenger RNA and platelet counts in chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 80, p. 1854-1855, 1992.

OPALKA, B., WANDL, U., BEER, U., ROGGENBUCK, U., KLOBE, O., NIERDERLE, N. Breakpoint localization within the M-bcr and clinical course do not correlate in patients with chronic myelogenous leukemia undergoing alfa-interferon therapy. **Leukemia**, v. 5, p. 452-456, 1991.

PASKULIN, G.A., PHILIPS, G., MORGAN, R., SANDENBERG, A., RICHKIND, K., BOROVIK, C., McGAVRAN,L., RABINOVICH, N., ERICKSON,P., DRABKIN, H., VARELA-GARCIA M., Pre-clinical evaluation of probes to detect t(8;21) AML minimal residual disease by fluorescence *in situ* Hybridization**. Genes Chromosom. Cancer** v.21, n. 2, 1998.

PASZEK-VIGIER, M., TALMANT, P., MECHINAUD, F., GARAND, R., HAROUSSEAU, J.L., BATAILLE, R., AVET-LOISEAU, H. Comparative genomic hybridization is a powerful too, compelmentary to cytogenetics, to identify chromosomal abnormalities in childhood acute lymphblastic leukemia. **Brit. J. Haematol.**, v. 99, p. 589-596, 1997.

PEDERSEN, B., KOCH, J., HANSEN, K.B., HINDKJAR, J., ANDERSEN, C.L. The monosomy 7 clone in interphase and metaphase cell populations: A combined chromosome and primed *in situ* labeling study. **Acta Haematol.**, v. 97, p. 216-221, 1997.

PEJOVIC, T., HEIM, S., ORNDAL, J.Y., MANDAHL,N., WILLEN, H., MITELMAN, F. Simple numerical chromosome aberrations in well-differentiated malignant epithelial tumors. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 49, p. 95-101, 1990.

PELLER, S., YONA, R., KOPILOVA, Y., PROKOCIMER, M., GOLDFINGER, N., UYSAL, A., KARABULUT, H.G., TUKUN, A., BOKESOY, I., TUNCMAN, G., ROTTER, V. Molecular alterations in the TP53 gene of preipheral blood cell of patients with chronic myeloid leukemia. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 21, n.1, p. 2-7, 1998.

PERALTA-ZARAGOZA, O., BAHENA-ROMÁN, M., DÍAZ-BENÍTEZ, C.E., MADRID-MARINA, V. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. **Salud Públ. Méx.**, v. 39, p. 451-460, 1997.

PERKINS, D., SHAWN, B., CARSTAIRS, K., BAILEY, D., PANTALONY, D., POON, A. FERNANDES, B., DUBÉ, I. regional cancer cytogenetics: A report on 1.143 Diagnostic cases. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 96, p. 64-80, 1997.

POPESCU, N.C., ZIMONJIC, D.B., Molecular gytogenetic characterization of cancer cell alterations. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 93, p. 10-21, 1997.

PRAKASH, O., YUNIS, J.J. High resolution chromosomes of the t(9;22) positive leukemias. **Cancer Genet. Cytogenet.** v. 11, n. 4, p. 361-367, 1984.

PUI, C.H. Recent advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. In: Temas de hematologia. Viana, M.B., Fagundes, E.M., Belo Horizonte: Imprensa Universitária, 1997. p. 9-12.

RANG, H.P., DALL,M.M, RITTER, J.M. **Farmacologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 692 p.

RAPAPORT, S.I. **Hematologia** – Introdução. 2.ed. São Paulo: Roca, 1990. 450p.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico** – Aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

REDDY, K.S. Trysomy 14 and leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.** v. 106, p. 144-151, 1998.

REDNER, R.L., CHEN, J.D., RUSH, E.A., LI, H., POLLOCK, S.L. The t(5;17) acute promyelocytic leukemia fusion protein NPM-interacts with co-repressor and co-ativator proteins and exhib both positive and negative transcriptional properties. **Blood**, v. 95, n. 8, p. 2683-2689.

REEVES, B.R., LOOB, D.S., LAWLER, S.D. Identity of the abnormal F-group chromosome associated with polycythemia vera. **Human genetic**, v. 14, p. 159-161, 1972.

REICHEL, M., GILLERT E., BREITENLOHNER I., REPP R., GREIL J., BECK J.D., MARSCHALEK R. Rapid isolation of chromosomal breakpoints from patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukaemia: implications for basic and clinical research. **Cancer Res.**, v. 59, n. 14, p. 3357-3362, 1999.

RHODES, D.A., VOLZ, A., JONES, T., ZIEGLER, A., TROWSDALE, A.J. Complex duplications at 6p22.1, 6p11.2, 5p15.1 and 5p13 revealed by fluorescent in situ hybridisation. **DNA Seq.**, v. 8, n.3, p. 161-165, 1997.

RICHARD, F., PACYNA-GENGELBACH, M., SCHLUNS, K., FLEIGE, B., WINZER, K.J., DIETEL, M., PETERSEN, I., SCHWENDEL, A. Patterns of chromosomal imbalances in invasive breast cancer. **Int. J. Cancer**, v. 89, n.3, p. 305-310, 2000.

ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S., KUMAR, V. **Fundamentos de Robbins**: patologia estrutural e funcional. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 605p.

ROSENTHAL, S., CARIGNAN, J.R., SMITH B.D. **Oncologia Prática:** Cuidados com o paciente. Rio de Janeiro: Revinter, 1995. 239 p.

ROWLEY, J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identifield by quinacrine fluorescence and giemsa staining. **Nature**, v.243, p.290-293, 1973.

ROWLEY, J.D. The philadelphia chromosome translocation. **Cancer**, v.65, n. 10, p. 2178- 2184, 1990.

ROWLEY, J.D. Chromosome abnormalites in leukemia**. J. Clin. Oncol.**, v. 6, p.194-202, 1988.

ROWLEY, J.D. The role of chromosome translocations in leukemogenesis**. Sem. Hematol.**, v. 36, n. 4, p.59-72, 1999.

ROZMAN, C., URBANOISPIZUA, A., CERVANTES, F., ROZMAN, M., COLOMER, D., FELIZ, P., PUJADES, A., VIVES-CORRONS, J. L. Analysis of the clinical relevance of the breakpoint location within m-bcr and the type of chimeric mRNA in chronic myelogenous leukemia. **Leukemia**, v. 9, p. 1104-1107, 1995.

RUBNITZ E., LOOK, A.T. Molecular Genetics of childhood leukemias. **J. Hematol. Oncol.**, v. 20, n.1, p.1-11, 1998

RUBNITZ, J.E., CAMITTA, B.M., MAHMOUD, H., RAIMONDI, S.C., CARROL, A.J., BOROWITZ, M.J., SHUSTER, J.J., LINK, M.P., PULLEN, D.J., DOWNING, J.R., BEHM, F.G., PUI, CH. Childhood acute lymphoblastic leukemia with the MLL-ENL fusion and t(11;19)(q23;p13.3) translocation. **J Clin Oncol,** v. 17, p. 191-6, 1999.

SAINATI, L., LESZL, A., STELLA, M., MONTALDI, A., PERILONGO, G., RUGGEM., BOLCATO, S., IOLASCON, A., BASSO, G. Cytogenetic analysis of hepatoblastoma: hypothesis of cytobenetic evolution in such tumors and results of a multicentric study. **Cancer Genet. Cytogenet.,** v. 104, p. 39-44, 1998.

SAMBANI, C., TRAFALIS, D.T.P., VESSALAS, G., POLITIS, G., PERISTERIS, P., NAKOPOULOU, L., GIANNOPOULOU, J., MICHAELIDIS, C., AYOUTANTIS, M., PANTELIAS, G.E. Trisomy 6 and double minute chromosomes in a case of chronic myelomonocytic leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 106, p. 180-181, 1998.

SÁNCHES-GARCÍA. Consequences of chromosomal Abnormalities in tumor development. **Ann. R. Genetic**., v.31, p. 429-453, 1997.

SANDLER, D.P., ROSS, J.A. Epidemiology of acute leukemia in children and adults. **Semin. Oncol.**, v. 24, n.1, p. 3-16, 1997.

SATAKE N., MASEKI N., NISHIYAMA M., KOBAYASHI H., SAKURAI M., INABA H., KATANO N., HORISKOSHI Y., EGUCHI H., MIYAKE M., SETO M., KANEKO Y. Chromosome abnormalities and MLL rearrangements in acute myeloid leukaemia of infants. **Leukaemia**, v. 13, p. 1013-1017, 1999

SATGÉ D., SOMMELET D., GENEIX A., NISHI M., MALET P., VEKEMANS M. A tumor profile in Down Syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 78, p. 207-216, 1998.

SCHIMIDT, V. A., VITALE, E., BAHOU, W. F. Genomic clonig and characterization of human thrombin receptor gene. **J Biol Chem,** v. 271, p. 9307, 1996.

SCHIMIDT, V. A., NIERMAN, W. C., FELDBLYUM, T. V., MAGLOTT, D. R., BAHOU, W. F. The human thrombin receptor and proteinase activated receptor-2 genes are tighly linked on chromosome 5q13. **Br J Haematol**, v. 97, p. 523, 1997b.

SCHIMIDT, V., WAINER, J., BAHOU, W. Identification and characterization of the human proteolytically activated receptor-3 (PAR-3) gene within the PAR gene cluster by positional mapping. **Blood,** v. 90, p. 284a, 1997a.

SCHNITTGER, S., SCHOCH,C., STREUBEL, B., HINRICHS, H.F., OTREMBA, B., PARWARESCH, R., FONATSCH, C. A case of atypical myelodysplastic syndrome with micromegakaryocytes, normal platelet count, and t(3;21)(q21;p13) with inv (3)(q21 q26). **Genes Chromosom. Cancer**, v. 20, p. 292-298, 1997.

SCHWENDEL, A., RICHARD, F., LANGRECK, H., KAUFMANN, O., LAGE, H., WINZER, R., PETERSEN,I., DIETEL, M. Chromosome alterations in breast carcinomas: frequent involvement of DNA losses including chromosomes 4q and 21 q. **Br. J. Cancer**, v. 78, n. 6,

SEEBACH, C., SANZ P., SOTO V., FUENZALIDA P., TAPIA S., LOREDO E. Estudio citogenetico de leucemias. **Bol. Hosp. Vinã del Mar**, v.48 (3-4), p. 188-194, 1992.

SEONG, D., KANTARJIAN, H. M., ALBITAR, M., ARLINGHAUS, R., XU, J., TALPAZ, M., GUO, J.Q., O'BRIEN, S., SICILIANO, M. Analysis of Philadelphia chromosome-negative BCR-ABL-positive chronic myelogenous leukemia by hypermetaphase fluorescence in situ hybridization. **Ann. Oncol.**, v. 10, n. 8, p. 955-959, 1999.

SESSAREGO, M., DEFERRARI, R., DEJANA, AM., et al. Cytogenetic analysis in essential thrombocythemia at diagnosis and at transformation: a 12 year study. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 43, p.57-65, 1989.

SESSAREGO,M. FUGAZZA, G., BRUZZONE, R., BALLESTRERO, A., MIGLINO, M., BACIGA, A. Complex chromosome rearrangements may locate the bcr/abl fusion gene sites other than 22q11. **Haematologica**, v. 85, n. 1, p. 35-39, 2000.

SEYMOUR, J.F., JUNEJA, S.K., CAMPBELL, L.J., ELLIMS, P.H., ESTEY, E.H., PRINCE, H.M. Secondary acutemyeloid leukemia with inv(16): report of two cases following paclitaxel-containing chemotherapy and review of the role of intensified ara-C therapy. **Leukemia**, v. 13, p. 1735-1740, 1999.

SHARMA, P., WATSON, N., ROBSON, L., GALLO, J., SMITH, A. Associated with Acute Myeloid Leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 113, n.1, p. 25-28, 1999.

SHI, G.,WEH, H.J., DÜHRSEN, U., ZELLER, W., HOSSFELD, D.K. Chromosomal abnormality inv(3)(q21q26) associated with multilineage hematopoietic progenitor cells in hematopoietic malignancies. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 96, p. 58-63, 1997.

SHIMADA, M., OHTSUKA E., SHIMIZU, T., MATSUMOTO, T., MATSUSHITA, K., TANIMOTO, F., KAJII, T. A recurrent translocation, t(16;21) (q24;q22), associated with acute myelogenous leukemia: identification by Fluorescence *in situ* Hibridization. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 96, p. 102-105, 1997.

SIMÃO, T.A., ANDRADA-SERPA, MJ., MENDONÇA, G.A.S. MARQUES D.D., DE-MOURA -GALLO. Detection and analysis of apoptosis in peripheral blood cells from breast cancer patients, **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 32, n. 4, p. 403-406, 1999.

SMITH, A., ROBSON, L.G., SHARMA, P., SHAW, P.J. Application of interfase FISH on direct bone marrow smears for evidence of chimerism in pediatric sex mismatched bone marrow transplant. **Pathology**, v. 31, n. 1, p. 25-28, 1999a.

SMITH, A., WATSON, N., SHARMA, P. Frequency of trisomy 15 and loss of the Y chromosome in adult leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet**., v. 114, p. 108-111, 1999b.

SMITH, D.W. **Síndromes de malformações congênitas**. São Paulo: Manole LTDA, 1989, 671 p.

SOKOLIC, R.A., FERGUSON, W., MARK, H.F.L. Discordant detection of monosomy 7 by GTC-banding and FISH in a patient with Schwaman-Diamond Syndrome without evidence of Myelodysplastic Syndrome or acute myelogenous leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.,** v. 115, p. 106-113, 1999.

SOMERS G. R., HAMMET F., WOOLLATT, E., RICHARDS, R.I., SOUTHEY, M.C., VENTER, D.J. Chromosomal localization of the human P2Y6 purinoreceptor family. **Genomics,** v. 44, p. 127, 1997.

SOTO-QUINTANA, M., ROJAS-ATENCIO, A., CHIRINO, H., ALVAREZ-NAVA, F., GONZÁLES, R. Anormalidades cromoómicas clonales em enfermedades hematológicas malignas mediante FISH. **Invest. Clin**, v. 39, n. 2, p. 85-96, 1998.

STANLEY, W.S., BURKETT, S.S., SEGEL, B., QUIERY, A., GEORGE, A., LOBEL, J., SHAH, N. Constitutional inversion of chromosome 7 and hematologic cancers. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.96, p. 46-49, 1997.

STASS, S.A., MIXSON, J. Oncogenes and tumor suppressor genes: therapeutic implications. **Clin Cancer Res**, v. 3, p. 2687-95, 1997.

STROUT, M.P., MARCUCCI, G., CALIGIURI, M.A., BLOOMFIELD, C.D. Core-binding factor (CBF) and MLL-associated primary acute myeloid leukemia: biology and clinical implications. **Ann Hematol,** v. 78, p. 251-264.

TAJARA, H.E., KAWASAKI-OYAMA, R.S., FETT-CONTE, A.C., GAMA, N.B., TAJARA, R., VARELLA-GARCIA, M. Anomalias cromossômicas em tumores sólidos; aspectos biológicos e aplicações diagnósticas. **Rev. Bras. Pat. Clin**., v.28, n. 1, 1992.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

TAKI, T., KANO, H., TANIWAKI, M., SAKO, M., SAKO,M., YANAGISAWA, M., HAYASHI, Y. AF5q31, a newly identified AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leudemia with ins(5;11)(q31;q13q23). **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 96, n. 25, p. 14535-14540, 1999.

TCHIRKOV, A., BONS, J.M., CHASSAGNE, J., SCHOEPFER C., KANOLD, J., BRIANÇON, G., GIOLLANT, M., MALET, P., DEMÉOCQ, F. Molecular detection of a late appearing BCR-ABL gene in a child with T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Ann. Hematol**., v.77, p. 55-59, 1998.

THERMAN, E., SUSMAN, M. **Cromosomas Humanos:** estructura, comportamiento y efectos. 3 ed. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1996, 386p.

THIJSEN, S.F.T., SCHUURHUIS, G.J., VAN OOSTVEEN, J.W., OSSENKOPPELE, G.J. Chronic myeloid leukemia from basics to bedside. **Leukemia**, v. 13, p. 1646-1674, 1999.

THOMAS D.E. Bone marrow transplantation: a review. **Sem. Hematol.**, v. 36, n. 4, p. 95-103, 1999.

THOMPSON, W.N., THOMPSON, R.R., HUNTINGTON, F.N. **Genética Médica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 339p.

TOBAL, K., JOHNSON, P.R., SAUNDERS, M.J., HARRISON., C.J., LIU YIN, J.A. Detection of CBFB/MYH11 transcripts in patients with inversion and other abnormalities of chromosome 16 at presentation and remission. . **Br. J. Haematol.,** v. 91, p. 104-108, 1995.

TONK, V.S., WILSON, K.S., TIMMONS, C.F., SHNEIDER, N.R. Trisomy 2, trisomy 20, and del(17p) as the sole chromosomal abnormalities in three cases of hepatoblastoma. **Genes Chromosom. Cancer,** v. 11, p. 199-202, 1994.

TUBIANA, M. Contribution of human data to the analysis of human carcinogenesis. **C. R. Acad. Sci. III**, v. 322, p. 215-224, 1999.

VAN LEEUWEN, B. H., MARTINSON, M. E., WEBB, G. C., YONG, I. G. Molecular organization of the of the cytokine gene cluster, involving the human IL-3, IL-4, IL-5, and GM-CSF genes, on human chromosome 5. **Blood**, v. 73, p. 1142, 1989.



VOGEL, F., MOTULSKY, A.G. **Human Genetics:** problems and approaches. Ed. Springer, 1997. 851p.

WANG, P.W., LANNANTUOIN, K., DAVIS, E.M., ESPINOSA III, R., STOFFEL, M., BEAU, M.M.LE. Refinement of the commanly deleted segment in myeloid leukemias with a del (20q). **Genes Chromosom. Cancer**, v. 21, p. 75-81, 1998.

WEH, H. J., von PALESKE, A., HOSSFELD, D. K. Disappearance of hypotetraploid clones after short-ternculture of leukemic cells: a case report. . **Cancer Genet. Cytogenet.,** v. 10, 237-240, 1983.

WEINBERG, R.A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 49, p.3713-3721, 1989.

WILKENS, L., TCHINDA, J., DURKHARDT, D., NOLTE, M., WERNER, M., GEORGII. Analysis of hematologic diseases using conventional karyotyping, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), and Comparative Genomic Hybridization (CGH). **Hum. Pathol**, v. 29, n. 8, p. 883-839, 1998.

WILKINSON, D.G. The Theory and Practice of *In Situ* Hybridization. In: *In Situ* Hybridization - A Practical Approach. Wilkinson, D.G., Oxford, 1994.

WILLMAN, C.L. Molecular evaluation of acute myeloid leukemias. **Semin. Hematol.**, v. 36, n. 4, p. 390-400, 1999.

WLODARSKA, I., PITTALUGA, S., SYUL, M., MARTIAT, P., DIERLAMM, J., MICHAUX, L., WOLF-PEETERS, C., CASSIMAN, J.J., MECUCCI, C., BERGHE, H. Philadelphia-like translocation t(9;22)(q34;q11) found in a follicular lymphoma involving not bcr and abl but igl-mediated rearrangement of an unknown gene on 9q34. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 20, p. 113-119, 1997.

WU, X., ZHAO, Y., KEMP, B.L., AMOS, C.I., SICILIANO, M.J., SPITZ, M.R. Chromosome 5 aberrations and genetic predisposition to lung câncer. **Int. J. Cancer**, v. 79, n. 5, p. 490-493, 1998.

WYNGAARDEN, J.B., SMITH, L.H.Jr. **CECIL:** tratado de medicina interna. 18.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1990. v. 1, p. 585-886.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

YAMAMOTO, K., NAGATA, K., YAGASAKI, F., TSURUKUBO, Y., TAMURA, A., TANIWN, M., HAMAGUCHI, H. Interstitial deletion of the short arm of chromosome12 during clonal evolution in myelodysplastic syndrome with t(5;12)(q13;p13) involving the ETV6 gene. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 119, n.2, p. 113-7, 2000.

YEHUDA, O., ABELIOVICH, D., BEN-NERIAH, S., SVERDLIM, I., COHEN, R., VARADI, G., ORR, R., ASHKENAZI Y.J., HEYD, J., LUGASSY, G., YEHUDA, D.B. Clinical Implications of fluorescence in situ hybridization analysis in 13 chronic myeloid leukemia cases: ph-negative and variant ph-positive. **Cancer Genet. Cytogenet.,** v. 114, p. 100-107, 1999.

ZELANTE, L., PERLA, G., BODENIZZA, C., GRECO, M., CAROTENUTO, M., DALLAPICCOLA, B. Tetraploidy (92, XXYY) in acute nonlymphocytic leukemia (M1) patient following autologous bone marrow transplantation. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 36, p. 69-75, 1988.

ZHANG, X.X., ROBINSON, L.J., STENZEL, T.T., QUMSIYEH, M.B. Translocation (15;17)(q22;q21) as a secundary chromosomal abnormality in a case of acute monoblastic leukemia with tetrasomy 8. **Cancer Genet. Cytogenet**., v. 113, p. 9-13, 1999.

ZIPURSKY, A., BROWN, E., CHRISTENSEN, H., SUTHERLAND, R., DOYLE, J. Leukemia and/a myeloproliferative syndrome in neonates with Down syndrome. **Sem. Perinatol.**, v. 21, n.1, p. 97-101, 1997.

VII. ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Eu, _____ RG: _____, nascido em ____/____/19____ e domiciliado à _____, município de _____, usuário (ou responsável legal pelo usuário _____), declaro que consinto em participar como voluntário do projeto de pesquisa "Estudo das alterações cariotípicas, do rearranjo gênico *BCR/ABL* e do cromossomo 20 em leucemias" sob responsabilidade da pesquisadora Profa. Dra. Agnes Cristina Fett Conte (CRB: 04735/87). Declaro que fui satisfatoriamente esclarecido que: A) o estudo será realizado em parte das minhas células do sangue e da medula óssea coletadas para os exames clínicos solicitados rotineiramente pelo meu médico hematologista; B) que os riscos para minha saúde são desprezíveis, mas que posso sentir dor e ardência no local de introdução das agulhas; C) que posso consultar a pesquisadora responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone (0xx17) 210-5000, ramal 348, para esclarecimento de qualquer dúvida; D) que estou livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa e que não preciso apresentar justificativas para isso; E) que todas as informações por mim fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo e que, estes últimos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas; F) que serei informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato destes poderem mudar meu consentimento em participar da pesquisa e; G) que este estudo é importante porque os seus resultados poderão ajudar no diagnóstico, no tratamento e na compreensão das leucemias.

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

São José do Rio Preto, ____ de _____ de _____.

_____ Usuário / responsável legal

_____ Pesquisadora responsável

OBS: Este termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante legal e a outra ao pesquisador.

Profa. Dra. Agnes Cristina Fett Conte
Cargo / Função: **Professora Adjunta da FAMERP / Responsável pelo Serviço de Genética / Chefe do Departamento de Biologia Molecular**
Instituição: **Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto**
Endereço: **Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – Bairro Universitário – CEP 15.090-000**

ANEXO II

Ficha de avaliação

Serviço de Genética

PACIENTE

Nome _____ Sexo ____ Data Nasc. ___ /___/___

Número do Registro _____

Endereço_____ Fone (___) _____

Cidade_____

MÉDICO RESPONSÁVEL_____

MATERIAL Sangue ( ) Medula ( )

Data Coleta _____ Hora _____

DIAGNÓSTICO CONSIDERADO _____

INFORMAÇÕES CLÍNICAS

1- Sinais Clínicos _____

_____

_____

2- Medula: % de Blastos _____Contagem de glóbulos brancos _____

relação L/E _____

3- Sangue periférico: % de blastos na periferia _____

Contagem de: glóbulos brancos _____ glóbulos vermelhos _____

plaquetas _____

4- Cronologia da doença: data do diagnóstico _____

5- Terapia ( )Não ( )Sim: Quimio ( ) Radio ( ) Outras ( )

OBS:_____

_____

OUTRAS INFORMAÇÕES

Profissão do Paciente _____

Exposição a carcinógenos: tipo _____ duração _____

História familial de neoplasia ( ) tipo _____

Radiografia recente ( ) tipo _____

Fumante ( ) Cigarros/dia _____ Tempo _____

Comentários _____

_____

_____

ANEXO III

SOLUÇÕES

•Ácido acético 70%

15ml de água

35ml de ácido acético

•Solução de PBS 10x

80g de NaCl

2g de KCl

11,5g de $NaHP0_4$

2g de KH_2PO_4

1.000ml de água autoclavada

• Solução de PBS 1x

20ml PBS10x

180ml de água autoclavada

•Solução Salina 20xSSC

87,650g de NaCl

44,10g de $Na_3C_6H_7O_7 . 2H_2O$

1.000ml de água autoclavada

•Solução 2xSSC

20ml de 20xSSC

180ml água autoclavada

•Solução 0,5xSSC

10ml de 2xSSC

300ml água autoclavada

•RNAse

Solução estoque (10mg/ml)

0,010g de RNAse

1ml de água

Solução de uso **(100μg/ml2xSSC)**

10μl de solução estoque

1ml de 2xSSC (pH 7.0)

Preparação para lâmina

1μl da solução de uso

100μl de 2xSSC

- **Pepsina**

Colocar no banho-maria a 37°C

42ml de água deionizada

50μl de pepsina

42μl de HCl fumegante

- **Formaldeído 4%**

Colocar no banho-maria a 37°C

40ml de água autoclavada

5ml de PBS 10x

5ml de formaldeído (na hora de usar)

- **Solução desnaturante de Formamida a 70%**

Colocar no banho-maria a 37°C

28ml de formamida

4ml de 20xSSC pH 5,0

8ml de água autoclavada

Transferir para banho-maria a 70°C

- **Formamida 50%**

50ml de formamida

10ml de 20xSSC pH 5,0

40ml de água autoclavada

- **2xSSC/0,1%NP40**

100ml de 2xSSC

0,1ml (100μ) de NP40

•1 x PBD Buffer

450ml de água autoclavada

50ml de 10 x PBD Buffer

Contracorantes

•DAPI

300μl de solução estoque DAPI

300μl de "antifade"

•Iodeto de Propídio

300μl de solução estoque

300μl de antifade

misturar bem antes de usar

ANEXO IV

Valores de referência e obtidos em cada caso do eritrograma e leucograma para hemoglobina, hematócrito, leucócitos e plaquetas.

Caso	Eritrograma / Leucograma Valores			
	Hemoglobina	Hematocrito	Leucocitos	Plaquetas
	g %	%	Valor absoluto	mm^3
Normais para menores de 13 anos	12 a 16	♀ 36 a 47 ♂ 40 a 55	4000 a 11000	150.000 a 450.000
2486	10,7	36	186.000	280.000
2500	NI	NI	NI	NI
2532	NI	NI	65.100	NI
2556	NI	NI	NI	NI
2588	15,8	47	14.300	328.000
2594	43	14	24.000	960.000
2624	NI	NI	NI	NI
2628	9,2	29	46.200	60.000
2673	10	30	221.000	562
2692	NI	NI	NI	NI
2723	11,6	35,8	156.600	473.000
2741	NI	NI	NI	NI
2766	NI	NI	NI	NI
2809	11,2	35	165.700	302.000
2855	10,1	32	142.800	321.000
2642	4,9	16	7.400	NI
2661	NI	NI	NI	NI
2699	5,1	15	21.200	60.000
2710	7,5	23	18.400	10.000
2724	NI	NI	NI	NI
2744	6,7	21	15.600	20.000
2776	3,2	10	500	NI
2777	5,6	18	63.000	24.000
2787	7,2	23	5.200	200.000
2817	12,0	37	122.500	78.000
2822	8,1	25	68.200	25.000
2743	11,9	39	200.000	110.000
2765	7,5	22	18.400	NI

NI = não informado (ausência da informação na ficha enviada ao laboratório e no prontuário do doente)



ANEXO V.

Queixas clínicas no momento do diagnóstico,apresentadas por cada paciente. (G = generalizadas; T = tórax; A = articulações; MI = membros inferiores).

Caso	Queixas Clínicas												
	Adinamia	Infecção/ Febre	Palidez	Distúrbio Hemorrágico	Icterícia	Náusea/ Vômito	Dor Abdominal	Emagrecimento	Anorexia	Esplenomegalia	Hepatomegalia	Mal Estar	Dores: G.; T.; A.; MI.
2486	NI	NI	NI	+	NI	+	+	NI	NI	NI	NI	NI	NI
2500	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
2532	NI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2556	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
2588	+	NI	NI	NI	NI	NI	NI	+	NI	NI	NI	NI	+
2594	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	+
2624	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
2628	+	NI	NI	NI	NI	+	NI	+	+	NI	NI	NI	+
2673	+	+	NI	NI	NI	NI	NI	+	+	+	NI	+	NI
2692	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
2723	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	+	+	+	NI	NI	NI
2741	+	NI	NI	NI	NI	NI	NI	+	NI	NI	NI	NI	NI
2766	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	+	NI	NI	NI
2809	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
2855	+	NI	+	NI	NI	NI	NI	NI	NI	+	NI	NI	NI
2642	NI	NI	NI	NI	NI	+	NI	NI	NI	NI	NI	NI	+
2661	NI	+	NI	NI	NI	NI	+	NI	NI	NI	NI	+	NI
2699	+	-	NI	NI	NI	-	NI	+	-	NI	NI	NI	+
2710	NI	NI	NI	+	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
2724	+	NI	+	+	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	+	NI
2744	+	NI	NI	NI	NI	+	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
2776	+	NI	NI	NI	+	NI	NI	NI	NI	+	+	NI	NI
2777	+	NI	NI	NI	NI	+	NI	+	+	NI	NI	+	NI
2787	+	+	+	NI	NI	NI	NI	NI	+	NI	NI	+	NI

Continuação

2817	+	NI	NI	NI	NI	+	NI	+	+	NI	+	NI	+
2822	NI	+	NI	NI	NI	NI	NI	+	NI	NI	NI	NI	NI
2743	-	-	NI	NI	NI	NI	NI	-	NI	NI	NI	NI	NI
2765	+	NI	+	NI	+	NI	NI	+	+	NI	NI	NI	NI

NI = não informado (ausência da informação na ficha enviada ao laboratório e no prontuário do doente)
- = ausência da queixa
+ = presença da queixa

ANEXO VI

Exposição a carcinógenos (diversos), tabaco, álcool, presença de neoplasias na família e profissão dos casos estudados.

Caso	Exposição a Carcinógeno	Tabagista	Etilista	Neoplasia em familiares	Profissão
2486	NI	+	NI	NI	do lar
2500	NI	-	NI	+	do lar
2532	NI	NI	NI	NI	comerciante
2556	NI	NI	NI	NI	NI
2588	NI	+	-	+	NI
2594	NI	-	-	NI	NI
2624	NI	NI	NI	NI	médico
2628	NI	-	-	NI	NI
2673	-	+	NI	-	do lar
2692	+	NI	NI	NI	NI
2723	-	-	-	-	estudante
2741	NI	+	NI	-	motorista
2766	NI	NI	NI	NI	do lar
2809	-	+	NI	-	mecânico
2855	-	-	NI	-	servente
2642	NI	+	+	NI	NI
2661	NI	NI	NI	NI	do lar
2699	NI	+	NI	-	camareira
2710	-	NI	NI	-	comerciante
2724	NI	NI	NI	NI	NI
2744	-	+	NI	-	doméstica
2776	NI	NI	+	NI	lavrador
2777	NI	+	+	NI	NI
2787	NI	+	+	NI	vigilante
2817	-	NI	NI	+	NI
2822	-	-	NI	-	babá
2743	-	NI	NI	+	estudante
2765	NI	NI	NI	NI	NI

NI = não informado (ausência da informação na ficha enviada ao laboratório e no prontuário do doente).

unesp

VIII. Resumo

As leucemias são doenças genéticas resultantes de um processo anormal, não controlado, da diferenciação e proliferação das células hematopoéticas.

Alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais têm sido observadas de forma consistente e específica em leucemias. A detecção destas alterações, além de contribuir para a compreensão da base genética destas doenças, têm importância fundamental no diagnóstico, prognóstico e tratamento dos pacientes.

O presente trabalho teve como objetivos estudar as alterações cromossômicas em sangue periférico e/ou medula óssea de pacientes portadores de diferentes tipos de leucemias, através das técnicas de citogenética convencional, e investigar a presença do rearranjo gênico *BCR/ABL* e de alterações no cromossomo 20, através da técnica de FISH.

Foram estudadas amostras de sangue periférico e/ou de medula óssea de 28 pacientes, 15 portadores de LMC, 11 portadores de LMA e dois de LLA, não submetidos a tratamento quimio ou radioterápico.

A alteração mais freqüente foi a t(9;22) em LMC, cuja presença ou ausência foram relacionadas a um bom e mau prognóstico, respectivamente. Um caso de LMA apresentou inv(16)(p13q22), relacionada a bom prognóstico. Foram também encontradas alterações não descritas anteriormente na literatura, como a trissomia do

cromossomo 2 em um caso de LMC, associada ao cromossomo Ph, indicando um avanço da doença, t(5;16)(q13;q22) em um paciente com LMA. Um dos casos, foi submetido a transplante de M.O. alogênico. O monitoramento realizado 23 dias após o transplante, detectou 95% das células da doadora, confirmando o sucesso do transplante.

Dois pacientes, um portador de LMA e outro de LLA apresentaram trissomia do cromossomo 20 nas células neoplásicas.

Os resultados mostraram a importância da análise citogenética em leucemias, seus benefícios diretos para o doente e para o conhecimento dos mecanismos biológicos envolvidos nesta patologia e possibilitaram a implantação, no Serviço de Genética da FAMERP das técnicas de obtenção de metáfases de medula óssea e da técnica de FISH.

Palavras Chave: Leucemias; Aberrações Cromossômicas; Citogenética; FISH.

IX. Abstract

Leukemia is a genetic disease from a non controlled abnormal process of the hematopoetic cells differentiation and proliferation.

Some alterations of structure and number of chromosomes have been well and specifically observed in leukemia. The detection of those alterations is highly significant in providing the patients' diagnosis, prognosis and treatment as well as the understanding of the genetic bases of that disease.

The purpose of this work is to study some chromosomal alterations in peripheral blood and/or bone marrow in patients with different leukemia types, by means of conventional cytogenetic techniques, and also to investigate the presence of *BCR/ABL* gene rearrangement and some alterations in chromosome 20 by FISH technique.

Samples of peripheral blood and/or bone marrow of 28 patients, no one under chemio or radiotherapeutic treatment: 15 with CML, 11 with AML and 2 with ALL were studied.

The alteration most frequent was t(9;22) in the CML, whose presence or absence was related to a good or bad prognosis, respectively. A case of AML showed inv(16)(p13q22), related to a good prognosis. Some alterations not reported previously in the literature were found such as the trysomy in chromosome 2 in one of the CML cases associated to

chromosome Ph showing some disease progress, and t(5;16)(q13;q22) in a AML patient. One of the cases was submitted to an allogenic bone marrow transplant. The monitoring after the 23rd day transplant, detected 95% of the donor cells predicting the procedure succeeded.

Two patients, a AML and other, ALL showed trisomy of chromosome 20 in the neoplastic cells.

The results showed the importance of the cytogenetics analysis in relation to leukemia, its straight benefits to the patients and the biological mechanisms involved in that disease. They also allowed in the Genetic Service of FAMERP the use of bone marrow metaphases techniques as well as FISH technique introduction.

Key Words: Leukemias; Chromosomal Alteration; Cytogenetic; FISH.

