



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

LUANA LETÍCIA ALVES DUTRA

**AVALIAÇÃO DOS GENES *AURKA* E *AURKB* EM PACIENTES PEDIÁTRICOS
PORTADORES DE LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA**

FORTALEZA

2015

LUANA LETÍCIA ALVES DUTRA

**AVALIAÇÃO DOS GENES *AURKA* E *AURKB* EM PACIENTES PEDIÁTRICOS
PORTADORES DE LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA**

Defesa de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Medicina II.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- D975a Dutra, Luana Letícia Alves.
Avaliação dos genes *AURKA* e *AURKB* em pacientes pediátricos portadores de leucemia linfóide aguda. / Luana Letícia Alves Dutra. – 2015.
71 f.: il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Medicina II.
Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.
1. Leucemia-Linfoma Linfoblástico de Células Precursoras. 2. Aurora Quinases. 3. Citogenética. I. Título.

CDD 616.99419

LUANA LETÍCIA ALVES DUTRA

**AVALIAÇÃO DOS GENES *AURKA* E *AURKB* EM PACIENTES PEDIÁTRICOS
PORTADORES DE LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA**

Defesa de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Aprovada em 11/02/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes
Universidade Federal do Ceará
Orientadora e Presidente da Banca

Hematologista Dra. Selma Lessa de Castro
Hospital Infantil Albert Sabin
Membro da Banca

Bióloga Dra. Fabíola Fernandes Heredia
Universidade Federal do Ceará
Membro da Banca

Prof. Dr. Manoel Ricardo Alves Martins
Universidade Federal do Ceará
Membro da Banca

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor de todas as coisas, que com sua Justiça e Misericórdia me conduziu e direcionou até aqui, dando-me coragem e sabedoria.

Aos meus pais, que mesmo não compreendendo meu ‘trabalho’ me dão todo o incentivo e força. Minhas realizações são para eles.

À professora Romélia, pela sua paciência, disponibilidade e por ter acreditado em mim nesses seis anos de parceria.

Ao Diego Silva Lima, que de forma gentil e atenciosa dividiu seus conhecimentos comigo e me auxiliou no desenvolvimento do projeto.

À Talita e à Juliana, do Hospital Infantil Albert Sabin, que me ajudaram na prática e na coleta dos dados dos pacientes.

Aos amigos da Hemato, por dividirem as angústias, os desesperos, as risadas e pelas sábias palavras: “Vai dar certo!”.

Aos amigos intercessores, pelas inúmeras ‘Aves-Marias’.

À Comunidade Católica Shalom, à célula Pantocrator, ao grupo Ammi, por serem pais, irmãos e filhos espirituais, um lugar seguro e reflexos de Deus em minha vida.

Ao Rafael, pelo apoio, pelo amor e pela compreensão. Obrigada por apostar em mim e por estar ao meu lado.

À Universidade Federal do Ceará e ao CNPq, por me proporcionarem conhecimento de qualidade e pelo apoio financeiro.

"Não existe triunfo sem perda, não há vitória sem sofrimento, não há liberdade sem sacrifício."

J. R. R. Tolkien

RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é a neoplasia mais frequente na infância. É uma neoplasia hematológica maligna derivada de células linfocitárias indiferenciadas com acúmulo de células jovens e substituição da população normal de células sanguíneas. Os genes Aurora quinase A, B e C estão envolvidos no ciclo celular e codificam proteínas de grande importância na regulação do processo de mitose - separação das cromátides irmãs durante a metáfase/anáfase. O objetivo desse estudo foi avaliar os genes *AURKA* e *AURKB* em pacientes pediátricos portadores de LLA-B tratados no Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS). Tratou-se de um estudo transversal, observacional e analítico. A amostra utilizada no estudo foi de 30 pacientes. O perfil de sexo, idade e dados laboratoriais foi obtido em prontuários dos pacientes e no serviço de diagnóstico do HIAS. A análise de mutações nos genes *AURKA* e *AURKB* foi pela técnica de Fluorescência por Hibridização *in Situ* (FISH), com o uso de sondas específicas para cada gene. A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism 5 e teve nível de significância de 5% para todos os testes. Do total de crianças 53,33% foram do sexo masculino e 46,67% do sexo feminino, com faixa de idade variando de 1 a 16 anos, e média de 7,1 anos. Quanto a classificação FAB, 86,67% dos pacientes eram portadores de LLA-L1 e 13,33% de LLA-L2. Na classificação EGIL, 33,33% eram LLA pré-B e 66,67% eram LLA-comum. Os valores médios de hemoglobina, hematócrito, leucócitos e plaquetas foram, respectivamente, 7,50 g/dL, 22,80%, 69.494/mm³ e 56.439,64/mm³. O cariótipo de 73,33% das crianças estudadas apresentou algum tipo de alteração numérica ou estrutural. Em relação à classificação de risco, 26,67% foram favoráveis, 40% intermediários e 33,33% desfavoráveis. Na relação entre parâmetros hematológicos e classificação de risco, pacientes com cariótipo desfavorável apresentaram leucometria mais elevada (p=0,0025), as análises com os outros parâmetros não foram significantes. No estudo de *AURKA* e *AURKB* foi possível observar monossomia e polissomia do gene *AURKA* e polissomia do gene *AURKB*. Dos pacientes com algum tipo de alteração no cariótipo, foi observada alteração em algum dos genes em aproximadamente 50% dos casos, sendo a alteração no *AURKB* mais frequente. A maioria dos pacientes com alteração no gene *AURKB* apresentou cariótipo favorável, assim como leucometria e contagem de plaquetas menos alteradas. O estudo dos genes *AURKA* e *AURKB* mostrou que esses genes podem ser iniciadores no processo de instabilidade genômica das células leucêmicas e que a *AURKB* parece estar mais envolvida na patogênese da LLA infantil, assim como fator de bom prognóstico.

Palavras-chaves: Leucemia Linfóide Aguda, Aurora Quinases, Citogenética

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy of childhood. It is a hematologic malignant neoplasm derived from undifferentiated young lymphoid lineage cells that accumulate and replace the normal population of blood cells. The Aurora kinase genes A, B and C are involved in cell cycle and encode proteins of great importance in the regulation of the mitosis process - separation of sister chromatids during metaphase / anaphase. The aim of this study was to evaluate the *AURKA* and *AURKB* genes in pediatric patients with ALL-B treated at Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS). This was a cross-sectional, observational and analytical study and 30 patients were enrolled. The sex, age, and laboratory data profile were obtained from medical records of patients diagnosed at HIAS. The analysis of mutations in *AURKA* and *AURKB* genes was performed by the fluorescence in situ hybridization technique (FISH) using probes specific for each gene. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 and used 5% significance level for all tests. Of all children 53.33% were male and 46.67% female, with age ranging from 1 to 16, and average of 7.1 years. Using the FAB classification, 86.67% of patients had ALL-L1 and 13.33% had ALL-L2. According to the EGIL classification, 33.33% were pre-B ALL and 66.67% were common ALL. The mean hemoglobin levels, hematocrit, white blood cells and platelet counts were, respectively, 7.50 g/dL, 22.80%, 69.494/mm³ and 56.439,64/mm³. 73.33% of the children studied had some type of numerical or structural karyotypic abnormality. Regarding the risk classification, 26.67% were favorable, 40% intermediate and 33.33% unfavorable risk. Patients with unfavorable karyotype had a higher white blood cell count ($p = 0.0025$), and the analysis of other parameters was not significant. Monosomy and polysomy of *AURKA* gene and polysomy of *AURKB* gene were observed. Some kind karyotypic change was observed in approximately 50% of cases, the more frequent change was in *AURKB*. Most patients with abnormal *AURKB* gene presented a favorable karyotype, and white blood cell and platelet counts less altered. The study of *AURKA* and *AURKB* genes showed that these genes may be markers of genomic instability and that *AURKB* seems more involved in the pathogenesis of childhood ALL, being also a good prognostic factor.

Keywords: Acute lymphoblastic leukaemia, Aurora kinases, Cytogenetics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo da Hematopoese	15
Figura 2 - Desenvolvimento natural da LLA infantil	20
Figura 3 - Mutações na LLA infantil	22
Figura 4 - Aurora Quinase no processo de divisão celular	29
Figura 5 - Representação esquemática dos passos básicos da técnica de FISH	35
Figura 6 - Cariótipo, <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> do paciente 2	46
Figura 7 - Cariótipo, <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> do paciente 27	46
Figura 8 - Cariótipo e <i>AURKA</i> do paciente 16	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Fatores prognósticos na LLA infantil	18
Quadro 2 - Classificação FAB das células leucêmicas	26
Quadro 3 - Classificação Imunofenotípica da LLA	27
Quadro 4 - Resultado da citogenética dos pacientes	50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Hemoglobina vs Risco do Cariótipo	40
Gráfico 2 - Hematócrito vs Risco do Cariótipo	41
Gráfico 3 - Leucometria vs Risco do Cariótipo	42
Gráfico 4 - Contagem de plaquetas vs Risco do Cariótipo	43
Gráfico 5 - Idade vs Risco do Cariótipo	44
Gráfico 6 - Pacientes aneuplóides vs pacientes euplóides com relação às alterações nos genes Aurora quinase	45
Gráfico 7 - Hb vs alteração nos genes	48
Gráfico 8 - Ht vs alteração nos genes	48
Gráfico 9 - Leucometria vs alteração nos genes	49
Gráfico 10 – Contagem de plaquetas vs alteração nos genes	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Taxas de incidência (por 1000.000 habitantes) de LLA infantil no Brasil	25
Tabela 2 - Características demográficas dos pacientes	37
Tabela 3 - Caracterização laboratorial da população em estudo	38
Tabela 4 - Caracterização citogenética da população em estudo	39
Tabela 5 - Caracterização quanto aos critérios de risco baseados no <i>NCI</i>	39
Tabela 6 - Frequência de alterações nos cromossomos 17 e 20 nos pacientes em estudo	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AURKA – Aurora Quinase A

AURKB – Aurora Quinase B

AURKC – Aurora Quinase C

CFC – Célula formadora de colônia

DNA – Ácido Desoxirribonucleíco

EGIL - European Group for Immunophenotyping Leukemias

FAB - Grupo Frânces-Americano-Britânico

FISH – Fluorescence *In Situ* Hybridization

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LLA – Leucemia Linfóide Aguda

LLC – Leucemia Linfóide Crônica

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

MLL - Mixed Lineage Leukemia

MO – Medula Óssea

MYC - Myelocytomatosis

OMS – Organização Mundial de Saúde

RNA – Ácido Ribonucleíco

SMD – Síndrome Mielodisplásica

SNC – Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Leucemias	14
2.2 Leucemia Linfóide Aguda	15
<i>2.2.1 Fatores Prognósticos e estratificação de risco na LLA infantil</i>	17
<i>2.2.2 História Natural da LLA infantil</i>	19
<i>2.2.3 Genética da LLA</i>	20
<i>2.2.4 Etiologia</i>	22
2.3 Epidemiologia	23
2.4 Classificação	26
<i>2.4.1 Classificação morfológica</i>	26
<i>2.4.2 Classificação imunofenotípica</i>	26
<i>2.4.3 Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS)</i>	27
2.5 Aurora Quinase	28
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	33
4.1 Desenho do Estudo	33
4.2 Casuística	33
4.3 Metodologia	33
<i>4.3.1 Coleta das amostras</i>	33
<i>4.3.2 Obtenção de perfil e dados</i>	33
<i>4.3.3 Seleção das Sondas DNA</i>	33
<i>4.3.4 Hibridização In Situ por Fluorescência</i>	34
<i>4.3.5 Análise estatística</i>	36
<i>4.3.6 Aspectos éticos</i>	36
5 RESULTADOS	37
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO A	64
ANEXO B	65
ANEXO C	66
ANEXO D	67

1 INTRODUÇÃO

A hematopoese é o processo fisiológico onde as células do sangue são formadas. Os mecanismos de proliferação e diferenciação celular são bem coordenados e envolvem diversas interações entre os processos genéticos e o estroma medular. Quando esse processo sofre algum tipo de falha, as células passam a ser proliferar de forma contínua e desordenada. A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é a neoplasia mais comum na infância, sendo um terço de todos os cânceres nessa faixa etária (PUI,1995).

Os genes Aurora quinase A, B e C estão envolvidos no ciclo celular e codificam proteínas de extrema importância na regulação do processo de mitose - separação das cromátides irmãs durante a metáfase/anáfase. A expressão aberrante desses genes pode perturbar o desenvolvimento normal da divisão celular elevar à instabilidade genética, desencadeando no desenvolvimento de tumores. Mutações desses genes já foram detectadas em uma série de tumores sólidos e estão associados a aberrações cromossômicas numéricas (NIGG, 2001).

No final dos anos 70, métodos não isotônicos de marcação de ácidos nucléicos foram desenvolvidos, os quais foram acompanhados pelo aprimoramento das técnicas de detecção utilizando métodos de imunohistoquímica e imunofluorescência e avanços na microscopia de fluorescência e análise de imagens, esse conjunto de melhorias tornou a técnica rápida, segura e de confiança. Nos últimos anos a hibridização *In Situ* por fluorescência emergiu como uma importante ferramenta para pesquisa e aplicação clínica, tendo sido aperfeiçoada ao longo dos anos (SANDBERG; CHEN, 2001).

Dessa forma, o estudo da mutação nos genes da Aurora Quinase, pode contribuir para uma maior compreensão da evolução da doença e adicionar informações importantes no acompanhamento clínico dos pacientes, além de possibilitar o desenvolvimento de terapias geneticamente orientadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leucemias

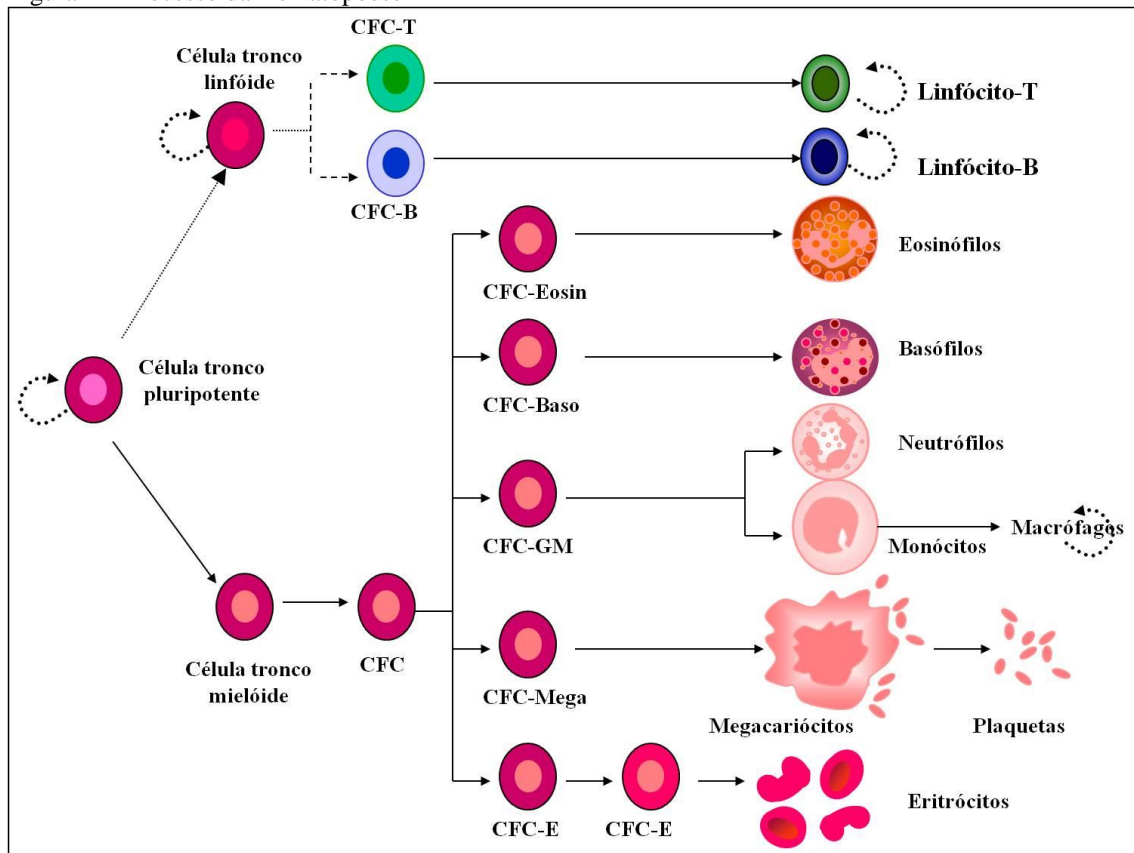
Leucemias são neoplasias hematológicas malignas em células da medula óssea. Sua progressão resulta de uma série de mutações que ocorrem no processo da hematopoese, como expressão aberrante de proto-oncogenes e genes supressores tumorais, além de translocações cromossômicas e aneuploidias. As leucemias agudas podem ser divididas quanto a critérios morfológicos e citoquímicos em dois grandes grupos: mielóide e linfóide. Em adultos, cerca de 85% dos casos é mielóide. Já em crianças, esse quadro se reverte, sendo 80% dos casos linfóide (IRONS; STILMANN, 1996; GREAVES, 1999; PUI; JEHA, 2007).

Durante o processo normal da hematopoese, uma célula progenitora, conhecida como célula-tronco hematopoética, dá origem a duas linhagens de células – mielóide e linfóide. As alterações genéticas contribuem para a transformação destas células, alterando suas funções celulares normais. Tanto a leucemia linfóide aguda (LLA) quanto a leucemia mielóide aguda (LMA), tem sua origem nas mutações que podem ocorrer em diversos pontos do processo da hematopoese (ROSE-INMAN; KUEHL, 2014).

As células leucêmicas não respondem a mecanismos de controle normais do organismo e tem um processo de maturação anormal. Essas células crescem, se multiplicam de forma exagerada e vivem mais tempo que as células normais, aumentando seu número exponencialmente. O acúmulo destas células impede o funcionamento normal da medula óssea, prejudicando a produção dos principais elementos do sangue - hemácias, leucócitos e plaquetas. Essa formação deficiente dos componentes do sangue leva ao aparecimento dos principais sintomas da leucemia (PASSEGUÉ; WEISMAN, 2005).

As leucemias podem ser classificadas, de acordo com o grau de evolução em crônica ou aguda. As leucemias agudas se desenvolvem rapidamente e são caracterizadas pela proliferação excessiva de células imaturas na medula óssea, são muito frequentes em crianças. Nas leucemias crônicas, as células leucêmicas já atingiram um maior grau no processo de maturação, portanto seu desenvolvimento é mais lento, ela aparece mais frequentemente em adultos (PUI, 1995).

Figura 1 – Processo da Hematopoese



Fonte: <http://www.ingoh.com.br/site/versaoImpressao.php?CodMateria=14>
 CFC= célula formadora de colônias

2.2 Leucemia Linfóide Aguda

A LLA é um tipo de neoplasia hematológica maligna derivada de células linfocitárias indiferenciadas, que estão presentes em grande número na medula óssea, no timo e nos gânglios linfáticos. Essa doença maligna resulta de um dano na hematopoese normal, impedindo a diferenciação em formas maduras com consequente acúmulo de células jovens e substituição da população normal de células sanguíneas (PUI; BEHM; CRIST, 1993).

Ela é causada por alterações na sequência de proto-oncogenes, genes supressores tumorais e genes de microRNAs de células-tronco hematopoéticas, translocações e mudanças no número de cromossomos. Essas mudanças alteraram os processos básicos de regulação em células-alvo, desencadeando uma capacidade ilimitada de auto-renovação, subvertendo os controles de proliferação normais, bloqueando a diferenciação de células e promovendo a resistência a sinais de morte (apoptose) (PUI; JEHA, 2007).

A LLA é caracterizada por alterações cromossômicas estruturais e numéricas, como hiperdiploidia, hipodiploidia, translocações – t(12;21), t(1;19), t(9;22), t(4;11) - e rearranjos - *MYC*, *MLL*. No entanto, estudos indicam que estas lesões por si só são incapazes de induzir a leucemia, sendo necessário um conjunto de fatores associados. O conhecimento dessas alterações genéticas é de grande importância no diagnóstico, prognóstico, classificação, estratificação de risco e podem possibilitar tratamento individualizado (LO NIGRO, 2013; ZUCKERMAN; ROWE, 2014).

Entre as décadas de 1970 e 1980, tornou-se evidente, a partir de caracterização fenotípica com anticorpos, que a LLA é uma doença de linhagens distintas de linfócitos: B ou T, sendo a LLA de células B a mais prevalente em crianças, com aproximadamente 85% dos casos. Os linfoblastos leucêmicos não evoluem no processo de diferenciação celular, podendo ficar em uma fase inicial e levar a uma proliferação celular anômala. O prognóstico e o quadro clínico da LLA variam entre as linhagens de células acometidas (GREAVES, 1999).

O processo de maturação das células é estreitamente controlado por fatores de transcrição e sinais de transdução. No caso das células B, seu desenvolvimento apresenta as seguintes fases de maturação: célula linfóide progenitora, progenitor linfóide comum, célula pró-B, célula pré-B e célula B madura. Para as células T, os estágios de maturação são: célula pró-T, célula pré-T, cortical e célula T madura. A leucemia de células B tem uma biologia bem caracterizada, enquanto a de células T ainda está em delineamento, por se tratar de uma doença mais heterogênea (BENE *et al.*, 1995).

Por ser uma doença da medula óssea, a suspeita clínica surge com sinais e sintomas reflexivos de insuficiência medular, resultante da falta de células sanguíneas normais circulantes, que ocorre quando as células leucêmicas assumem o lugar destas na medula óssea. Os sintomas mais comuns incluem fadiga, sonolência, perda de peso, palidez, dor nos ossos, artrite, sangramentos, petéquias, entre outros. O exame físico pode mostrar linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (MARGOLIN; STEUBER; POPLACK, 2006).

O diagnóstico é feito com base nos resultados de análises morfológicas da medula óssea, em conjunto com as reações citoquímicas, perfil imunofenotípico e citogenético das células leucêmicas. A anemia – do tipo normocítica e normocrômica - e a trombocitopenia são muito comuns no hemograma ao diagnóstico, encontradas em 75 a 90% dos casos. A contagem de leucócitos pode estar diminuída, normal ou aumentada. (HENRY, 1995; NAOUM; NAOUM, 2006).

O mielograma avalia a medula óssea (MO) e tem a finalidade de estudar as células germinativas sanguíneas de forma qualitativa e quantitativa. O diagnóstico da LLA fundamenta-se na demonstração de mais de 25% de linfoblastos na MO. A medula encontra-se hiper celular, com a substituição dos espaços e elementos celulares normais por células leucêmicas (FALCÃO; REGO, 2002).

2.2.1 Fatores Prognósticos e estratificação de risco na LLA infantil

O prognóstico de crianças com LLA tem melhorado muito nas últimas décadas. Isto se deve aos protocolos terapêuticos, bem como as ferramentas utilizadas no monitoramento do tratamento, que favorecem o aumento da qualidade de vida dos pacientes e a redução da taxa de mortalidade. As novas tecnologias, como a citogenética e a biologia molecular, além de serem importantes ferramentas no diagnóstico, podem ser usadas como indicadores de prognóstico e de acompanhamento terapêutico (GARIOCHEA, 2001).

A LLA é uma doença heterogênea, com diversidade de apresentações clínicas e respostas terapêuticas, assim a estratificação de pacientes em grupos de risco facilita a escolha do tratamento adequado e permite maior sucesso terapêutico. Pacientes considerados de baixo risco podem ser tratados com protocolos menos agressivos, enquanto que pacientes com alto risco podem receber terapias mais agressivas ou diferentes tipos de terapia (HOLZER *et al.*, 2002).

Os dois fatores mais importantes de prognóstico na LLA são a idade e a contagem de glóbulos brancos, no momento do diagnóstico. Segundo o *National Cancer Institute (NCI)/Rome*, os critérios de estratificação dos pacientes são: idade de 1 a 9.99 anos e leucócitos $<50.000/\text{mm}^3$, confere um risco padrão, idade ≥ 10 anos e/ou leucócitos $\geq 50.000/\text{mm}^3$, confere um alto risco. Idade inferior a 1 ano confere um prognóstico desfavorável. A vantagem deste sistema é que estas variáveis podem ser medidas em quase todas as circunstâncias de forma confiável e, portanto, estes critérios podem ser aplicados para as crianças em todo o mundo. Outros sistemas de classificação e estratificação de risco foram criados, incluindo além da idade e da leucometria ao diagnóstico, a resposta às medidas de terapia e características moleculares das células leucêmicas (CARROLL *et al.*, 2003).

O gênero e raça são outras características que demonstraram estar associadas com o desfecho. O sexo feminino tem uma sobrevida livre de eventos superior quando comparadas ao sexo masculino. Embora a magnitude dessa diferença seja menor em estudos recentes, a intensificação da terapia não foi capaz de anular essa diferença. A taxa de sobrevivência em

crianças negras tem sido um pouco mais baixa do que as taxas em crianças brancas com LLA (PUI *et al.*, 2004)

Quanto a expressão imunofenotípica das células leucêmicas, a linhagem pré-B apresenta bom prognóstico, enquanto a LLA de células T é geralmente considerada de risco alto ou muito alto. A presença de doenças no sistema nervoso central (SNC), no momento do diagnóstico também é um fator prognóstico adverso, assim como a presença de envolvimento testicular e hepatoesplenomegalia (CARROLL *et al.*, 2003; PUI *et al.*, 2004).

As lesões genéticas também tem grande importância prognóstica, porém apenas algumas possuem valor prognóstico relevante. São considerados fatores de alto risco a hipodiploidia, a t(4;11) com reordenamento do gene *MLL*, a t(9;22) que apresenta o gene de fusão *BCR/ABL*. São indicativos de bom prognóstico a hiperdiploidia com 50 ou mais cromossomos, em particular as que incluem as trissomias dos cromossomos 4,7 e 10, e a t(12;21) com gene de fusão *TEL/AML1* (FRIEDMANN *et al.*, 2000).

Quadro 1 – Fatores prognósticos na LLA infantil

Aspectos Clínicos	Favoráveis	Desfavoráveis
Leucometria	< 50.000/mm ³	≥ 50.000/mm ³
Idade (anos)	1 a 9	< 1 e ≥ 10
Sexo	Feminino	Masculino
Origem	Caucasiano, Asiático	Africano, Americano
Infiltração no SNC	Ausente	Presente
Classificação FAB	LLA-L1	LLA-L2 e LLA-L3
Hemoglobina	< 7,0g/dL	> 10,0g/dL
Plaquetas	> 100 x 10 ⁹ /L	< 30 x 10 ⁹ /L
Classificação EGIL	Linhagem pré-B	Linhagem T e mista
Ploidia	>50	<45
Citogenética	Trissomia 4 e 10	t(4;11) e t(9;22)
Genética Molecular	<i>TEL-AML1</i>	<i>MLL-AF4</i> e <i>BCR-ABL</i>

Fonte: Adaptado de MINASI, 2009.

2.2.2 História Natural da LLA infantil

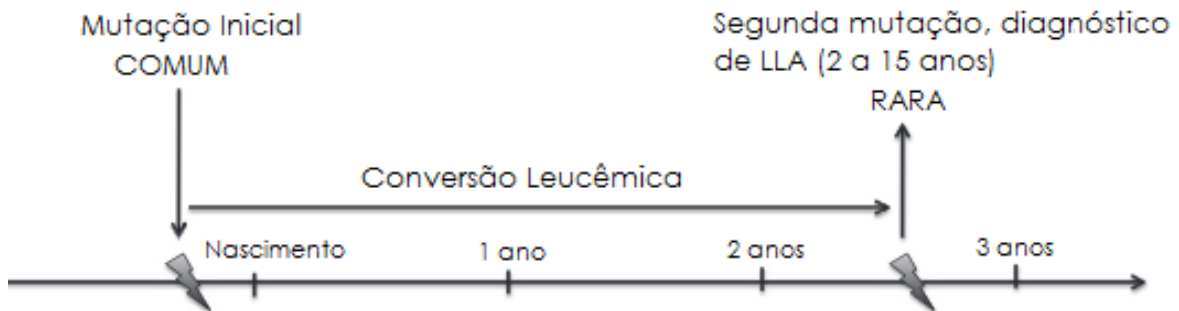
A história natural da LLA tem sido associada a mutações ainda no período embrionário, esse tipo de mutação é considerado comum, já que atinge pelo menos 1% das crianças nascidas. Após o nascimento, uma segunda mutação na mesma célula é um evento raro e pode desencadear o início da leucemia. A ocorrência dessa segunda mutação pode ser reforçada pelas características do desenvolvimento imunológico (WIEMELS *et al.*, 1999; GREAVES, 1999; GREAVES, 2002)

Estudos moleculares realizados com gêmeos idênticos portadores de LLA indicam que mutações como os rearranjos no gene *MLL* que levam ao desenvolvimento da leucemia tem início ainda no útero materno, porém não são herdadas, já que desaparecem em remissão. A explicação para esse fato em que os gêmeos compartilham o mesmo ‘ponto de quebra’ cromossômico é que a mutação ocorre em uma célula de apenas um dos gêmeos, porém como estes compartilham a mesma placenta, esta célula transformada é compartilhada pela circulação intra-fetal. Neste momento é disseminado um clone pré-leucêmico, que pode evoluir para uma leucemia verdadeira entre dois meses e 14 anos após o nascimento. Assim, em aproximadamente 100% dos casos de leucemia em gêmeos, é possível observar a doença em ambos (FORD *et al.*, 1993; WIEMELS *et al.*, 1999).

Outras pesquisas também evidenciam que o início da leucemia ocorre antes do nascimento. Um estudo retrospectivo analisou manchas de sangue armazenadas em papel filtro de ‘Cartões de Guthrie’ de crianças que desenvolveram leucemia. Foram realizados testes de PCR para fusões de genes específicos, os resultados mostraram mutações semelhantes às de pacientes no momento do diagnóstico, o que mostra claramente que estas mutações ocorrem no período fetal. A mutação mais encontrada nesse estudo foi a translocação (12;21) (GALE *et al.*, 1997).

Mutações como a translocação (1;19) e mutações no *RAS* são claramente evidenciadas após o nascimento, enquanto t(11q23) é bastante comum em crianças menores de 1 ano. É importante lembrar que essas mutações, quando isoladas, são incapazes de desencadear o processo leucêmico. Este é o caso da fusão *TEL-AML1* ou t(12;21), que é a mais comum em casos de LLA. Estudos utilizando sangue do cordão umbilical de crianças normais, mostram essa translocação em uma taxa de aproximadamente 1%, o que sugere que parte significativa da população possui um clone pré-leucêmico no período fetal, mas estes são autolimitados e a doença não se desenvolve (WIEMELS, 2012).

Figura 2 – Desenvolvimento natural da LLA infantil



Fonte: Adaptada de WIEMELS, 2012.

2.2.3 Genética da LLA

Aproximadamente 75% dos casos de LLA infantil apresentam algum tipo de alteração genética, incluindo aneuploidias, rearranjos e translocações. As alterações cromossômicas mais comuns observadas em blastos leucêmicos são ganhos ou perdas de cromossomos inteiros - hiperdiploidia ou hipodiploidia. A ‘alta’ hiperdiploidia (51 a 65 cromossomos) é a mais comum encontrada em crianças com LLA-B, sendo encontrada em 25 a 30% dos casos em crianças de 1 a 4 anos de idade, sendo que esta alteração está associada com bom prognóstico (PAULSSON; JOHANSSON, 2009; WOO; ALBERTI; TIRADO, 2014).

A hipodiploidia é caracterizada pela presença de um número menor que 46 cromossomos, o que pode ser observado em 5 a 8% de todos os casos de LLA-B. A maioria dos casos de hipodiploidia em crianças portadoras de LLA-B apresenta 45 cromossomos. Os casos de hipodiploidia podem ser: ‘alta hipodiploidia’ (40 a 44 cromossomos), ‘baixa hipodiploidia’ (33 a 39 cromossomos) e ‘quase haplóide’ (24 a 29 cromossomos). Em geral, casos de hipodiploidia com menos de 40 cromossomos conferem um mau prognóstico (HEEREMA, 1999).

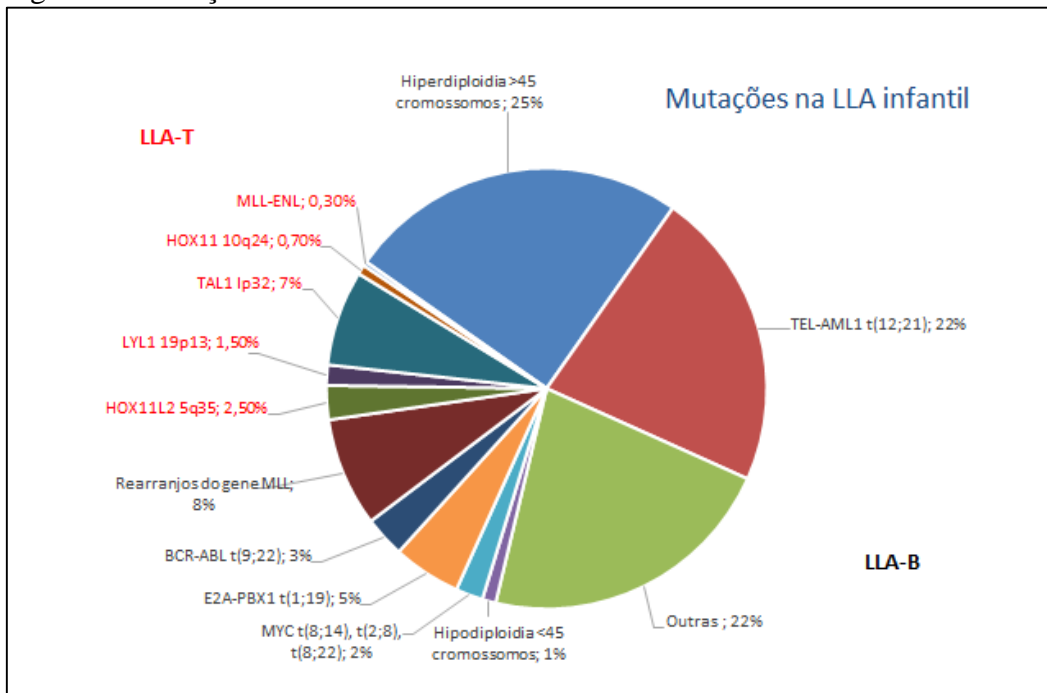
As translocações na LLA infantil geralmente afetam fatores de transcrição da hematopoese ou ativam oncogenes, levando ao processo leucêmico. A translocação mais comum na LLA-B é a $t(12;21)(p13;q22)$, conhecida também como a fusão *TEL-AML1*, codificando a proteína de fusão ETV6-RUNX1. Os fatores de transcrição ETV6 e RUNX1 são necessários para o funcionamento normal da hematopoese. Ela acontece em 25% das crianças com LLA-B e confere um excelente prognóstico (MULLIGHAN, 2012; WOO; ALBERTI; TIRADO, 2014).

A t(1;19)(q23;p13) é encontrada em aproximadamente 6% das crianças com LLA-B e normalmente está associada com mau prognóstico. Já a t(9;22) ou cromossomo ‘Philadelphia’, que gera a proteína de fusão BCR-ABL1, está presente em 3 a 5% dos casos de LLA-B infantil e está associada com idade avançada, maior contagem de leucócitos e maior envolvimento do SNC no momento do diagnóstico (RIBEIRO *et al.*, 1987; HUNGER, 1996).

O gene *MLL*, localizado no cromossomo 11q23, possui diversos rearranjos diferentes e estes estão presentes em 80% dos casos de LLA em crianças menores de 1 ano e 10% na LLA infantil. O gene *MLL* codifica para uma proteína com atividade de metiltransferase, que é essencial para a regulação da hematopoese. Este gene é considerado promíscuo, pois pode se rearranjar com mais de 100 genes parceiros. A t(4;11)(q21;q23) é a mais comum, gerando o gene de fusão *MLL-AFA4*, que confere mau prognóstico em portadores menores de 6 meses (ARMSTRONG *et al.*, 2002).

O gene *MYC* foi descoberto pela primeira vez como o oncogene aviário encontrado em retrovírus leucemogênicos, posteriormente foi encontrado translocado no linfoma humano. O c-myc é uma fosfoproteína nuclear, que tem uma atividade de ligação de DNA e participa no controle da proliferação e diferenciação normais. Evidências mostram que c-Myc é um dos fatores de transcrição que desempenham um papel importante na hematopoese. Mutações no *MYC* são menos frequentes em crianças com LLA, aparecendo em apenas 2% dos casos (VARMUS, 1984).

Figura 3 - Mutações na LLA infantil



Fonte: Adaptada de PUI, 2004.

2.2.4 Etiologia

A etiologia da LLA ainda não é clara, mas existem alguns fatores de risco associados a essa doença, como: efeitos da radiação, exposição a drogas, fatores genéticos, fatores imunológicos e vírus. A transformação leucêmica não é resultante de um evento único, mas sim do acúmulo de múltiplos processos que levam a danos nos indivíduos acometidos. A partir de estudos foi possível chegar à conclusão de que o desenvolvimento leucêmico se inicia na vida embrionária e que é necessário um segundo evento para desencadear a leucemia. Outros fatores (ambientais ou constitucionais) tem sido propostos como causadores do processo leucêmico (GREAVES, 1997; WIEMELS, 2012).

A remissão de alguns clones leucêmicos após tratamento indica que a maioria das mutações que levam a leucemia são adquiridos e não herdados. No entanto, uma proporção de aproximadamente 5% de leucemias agudas está associada com herança genética, predispondo síndromes genéticas, muitas vezes envolvendo genes que codificam funções relacionadas com a estabilidade genômica e reparo do DNA (GREAVES, 2002).

A predisposição genética está relacionada com genes de alta penetrância e ocorre quando sequências mutantes levam a um aumento do risco de câncer em uma família. Estima-se que para a leucemia menos de 5% de casos podem ser atribuídos a tais genes. A síndrome de Down é um fator que eleva o risco de desenvolver LLA, sendo que 1 entre 95 portadores

da síndrome desenvolvem LLA. As mutações que ocorrem no período embrionário também são predisposições genéticas, já que formam um clone pré-leucêmico, necessitando de um segundo evento para iniciar a leucemia verdadeira. A suscetibilidade genética está relacionada com genes de baixa penetrância e que influenciam a forma como cada indivíduo lida com exposições ambientais, metabolismo de produtos químicos ou toxinas, resposta a danos no DNA e infecções (GREAVES, 1997).

A evidência epidemiológica mostra um pico de incidência de LLA-B em lugares com nível socioeconômico mais elevado em todo o mundo. A radiação ionizante, certas substâncias químicas (como o benzeno), vírus (EpsteinBarr, HTLV-I) e bactérias (*Helicobacter pylori*) podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de alguns tipos de leucemia e linfomas em adultos e crianças, contribuindo para leucomogênese ou como principais fatores de risco (GRÜNWALD, 1996; GREAVES, 1997).

A radiação ionizante é um dos fatores relacionados com o desenvolvimento de leucemias, assim como os danos cromossômicos secundários à exposição por agentes químicos ou físicos e à possível incorporação de informações genéticas virais transmitidas às células progenitoras susceptíveis. Anormalidades genéticas hereditárias tais como Síndrome de Down, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi e ataxia-telangectasia, podem predispor a LLA (PUI, 1995; TAKEUCHI *et al.*, 1998).

2.3 Epidemiologia

As leucemias são as neoplasias mais frequentes na infância, seguida de tumores no sistema nervoso central e linfomas. A cada ano surgem aproximadamente cerca de 90.000 novos casos no mundo e 10.000 no Brasil. No Brasil, somente de 2001 a 2005, foi responsável por 34,5% de mortes em indivíduos de até 18 anos de idade. Com o constante aumento de casos desta doença, o número de vítimas fatais de leucemia também está crescendo rapidamente. Foram estimados cerca de 350 mil casos novos e 265 mil óbitos por leucemia no mundo para o ano de 2012. Para o Brasil, no ano de 2014, há uma estimativa de 11.370 novos casos, 5.050 homens e 4.320 mulheres (PUI, 1997; LI *et al.*, 2008; INCA, 2008).

No Brasil, para os 20 Registros de Câncer de Base Populacional (RBCP), observou-se o predomínio das leucemias como tumor mais frequente, com percentual mediano de 29%. Os RCBP localizados na região norte do país apresentaram os maiores percentuais para leucemia - acima de 39%, com 42,5% em Manaus (INCA, 2008).

Entre as leucemias, a LLA é a mais comum em crianças e adolescentes, representando 81% das leucemias infantis e constituindo cerca de um terço de todas as neoplasias malignas diagnosticadas em crianças de 0 a 14 anos. Nos Estados Unidos são diagnosticados cerca de 3500 novos casos por ano. No Brasil, corresponde a aproximadamente 23% dos casos de câncer na faixa etária de 0 a 14 anos, com pico de incidência entre 1 e 5 anos de idade. Em contraste, a LLA mostra uma porcentagem de apenas 20% das leucemias agudas em adultos, sendo a idade média entre 30 e 35 anos, entretanto dados mostram que a incidência da doença aumenta em pessoas com idade superior a 50 anos (HOLZER; GOLKBUGET, 2000; INCA, 2008).

A incidência da LLA é mais comum em indivíduos de cor branca e do sexo masculino, com uma relação de 1,5/100.000 na população branca e 0,8/100.000 na população negra. Nos EUA, as taxas médias de incidência de leucemias foram maiores em crianças brancas (45,6 por milhão) do que em crianças negras (27,8 por milhão), para o período de 1986-1995, na faixa etária de 0 a 14 anos. Para o período de 2001-2003, a taxa média de incidência ajustada por idade para leucemias em meninos, com idade entre 0 e 19 anos, foi de 47,22 por milhão, e para as meninas 39,96 por milhão. No Brasil, para o sexo masculino, a maior taxa média de incidência ajustada por idade foi observada em Cuiabá (2000-2003), com 90,6 casos por milhão e a menor taxa foi observada em Salvador (1998-2002), com 25,5 por milhão. No sexo feminino, a maior taxa foi observada em Curitiba (1998-2002), com 69,9 e a menor, assim como no sexo masculino, ocorreu em Salvador (1998-2002), com 18,6 casos por milhão (FARHI; ROSENTHAL, 2000; INCA, 2008; LI *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, houve uma considerável progressão no tratamento das leucemias. Em virtude das diferenças no acesso ao tratamento, observa-se uma considerável diferença entre populações com relação à sobrevida. Entre a população masculina dos Estados Unidos e da Europa Ocidental, a sobrevida em cinco anos é de 43%, enquanto, para o Japão, observa-se uma sobrevida de 25%; na América do Sul, 24%; na Índia, 19%; na Tailândia, 15%; e na África subsaariana, 14%. Em áreas com acesso a tratamentos, a sobrevida relativa em cinco anos, em crianças, alcança 80%. Frequências mais altas de LLA tem sido relatadas em países industrializados e áreas urbanizadas (FARHI; ROSENTHAL, 2000).

Tabela 1 – Taxas de incidência (por 1000.000 habitantes) de LLA infantil no Brasil

Cidades	<1 ano	1-4 anos	5-9 anos	10-14 anos	15-18 anos	0-18 anos
Aracaju (1996-2000)	2,50	4,46	1,89	1,23	0,95	1,97
Belo Horizonte (2000-2001)	5,60	4,18	2,55	3,14	0,57	2,70
Campo Grande (2000-2001)	4,28	5,16	6,99	3,00	2,67	4,45
Curitiba (1998-2002)	1,52	8,52	5,77	2,66	2,40	4,49
Distrito Federal (1999-2002)	0,48	3,75	2,48	1,69	0,44	1,95
Fortaleza (1998-2002)	0,96	3,66	2,46	1,95	1,16	2,20
Goiânia (1999-2003)	3,26	6,45	5,74	2,74	3,35	4,37
João Pessoa (2000-2004)	0	3,71	2,14	1,30	2,60	2,22
Manaus (1999-2002)	3,69	9,45	5,04	2,82	1,88	4,69
Natal (1998-2002)	0	6,76	1,86	3,04	1,61	2,99
Palmas (2000-2003)	0	0	1,52	1,56	0	0,76
Porto Alegre (1998-2002)	1,90	5,87	3,47	1,78	1,21	2,87
Recife (1997-2001)	1,73	6,97	3,19	4,39	1,55	3,79
Salvador (1998-2002)	0	2,42	1,73	1,00	0,79	1,34
São Paulo (1998-2002)	1,86	4,99	3,12	2,62	1,81	2,99
Vitória (1997)	4,27	4,22	0,77	1,41	0,87	1,78

Fonte: Ministério da Saúde (2008)

2.4 Classificação

2.4.1 Classificação morfológica

Em 1976 o grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) classificou as LLAs em critérios baseados na morfologia (diâmetro celular, forma do núcleo e protuberância dos nucléolos) e na citoquímica das células blásticas, a LLA foi classificada como L1, L2 e L3. Quanto ao diagnóstico morfológico da LLA, este é fundamentado na demonstração de mais de 25% de linfoblastos na medula óssea. Foi então observado que a frequência de cada subtipo varia com a faixa etária, sendo a mais comum em crianças a LLA-L1 (BENNETT *et al.*, 1976; FALCÃO, 2002).

Quadro 2 - Classificação FAB das células leucêmicas

Aspecto morfológico	L1	L2	L3
Diâmetro celular	Predominância de células pequenas, homogêneas	Grandes, heterogêneas	Grandes, homogêneas
Cromatina nuclear	Fina ou aglomerada	Fina	Fina
Forma do núcleo	Regular, pode apresentar fenda ou indentação	Irregular, podendo apresentar fenda ou indentação	Regular, redondo ou oval
Nucléolos	Indistintos ou não-visíveis	Um ou mais por célula, grandes, proeminentes	Um ou mais por célula, grandes, proeminentes
Quantidade de citoplasma	Escassa	Moderadamente abundante	Moderadamente abundante
Basofilia citoplasmática	Ligeira	Ligeira	Evidente
Vacúolos citoplasmáticos	Variáveis	Variáveis	Evidente

L1= Leucemia linfóide aguda tipo L1; L2= Leucemia linfóide aguda tipo L2; L3= Leucemia linfóide aguda tipo L3. Fonte: Lee et al., 1998.

2.4.2 Classificação imunofenotípica

A classificação mais comumente utilizada é a desenvolvida pelo European Group for Immunophenotyping Leukemias (EGIL), que se baseia no perfil imunofenotípico das células em concordância com os aspectos morfológicos dos casos, permite a diferenciação em subtipos imunológicos. Através desta é possível classificar a linhagem celular (B ou T) e caracterizar o estágio de maturação da mesma (BENE *et al.*, 1995; FALCÃO, 2002).

A maioria dos casos de LLA é de linhagem B, estes são agrupados em diferentes subtipos, os quais correspondem a diferentes níveis de maturação do desenvolvimento da célula B normal. Com base na sequência de maturação normal da célula B, esta classificação

conta com quatro subtipos: LLA pró-B, comum, LLA pré-B e LLA B madura. A LLA de células T é menos comum, mas também pode ser separada dentro dos grupos fenotípicos que correspondem a diferentes estágios de maturação das células T no timo, sendo classificada como: LLA pró-T, LLA pré-T, LLA T-cortical e LLA T-madura (BENE *et al.*, 1995).

Quadro 3 - Classificação Imunofenotípica da LLA

Marcador	Linhagem B				Linhagem T		
	Pró-B	Comum	Pré-B	B	Pré-T	Intermediário	T
HLA-DR	+	+	+	+	+/-	-	-
TdT	+	+	+	+/-	+	+	+
CD19	+	+	+	+	-	-	-
CD22(c)	-/+	+	+	+	-	-	-
CD10	-	+	+	-/+	-/+	-/+	+/-
CD20	-	-/+	+	+	-	-	-
cμ	-	-	+	-	-	-	-
Smlg	-	-	-	+	-	-	-
CD7	-	-	-	-	+	+	+
CD2	-	-	-	-	-	+	+
CD3(c)	-	-	-	-	+/-	+	+
CD1a	-	-	-	-	-	+/-	-
CD3	-	-	-	-	-	-	+
CD4/CD8	-	-	-	-	-	+/-	+

TdT= Terminal Desoxinucleotidil Transferase; CD22(c)= intracitoplasmático; cμ= cadeia μ citoplasmática; Smlg= imunoglobulina de superfície; += expressão do antígeno; +/- = expressão variável, frequentemente positiva; - = ausência de expressão do antígeno; -/+ = expressão variável, frequentemente negativa. Fonte: Farias, 2004.

2.4.3 Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS)

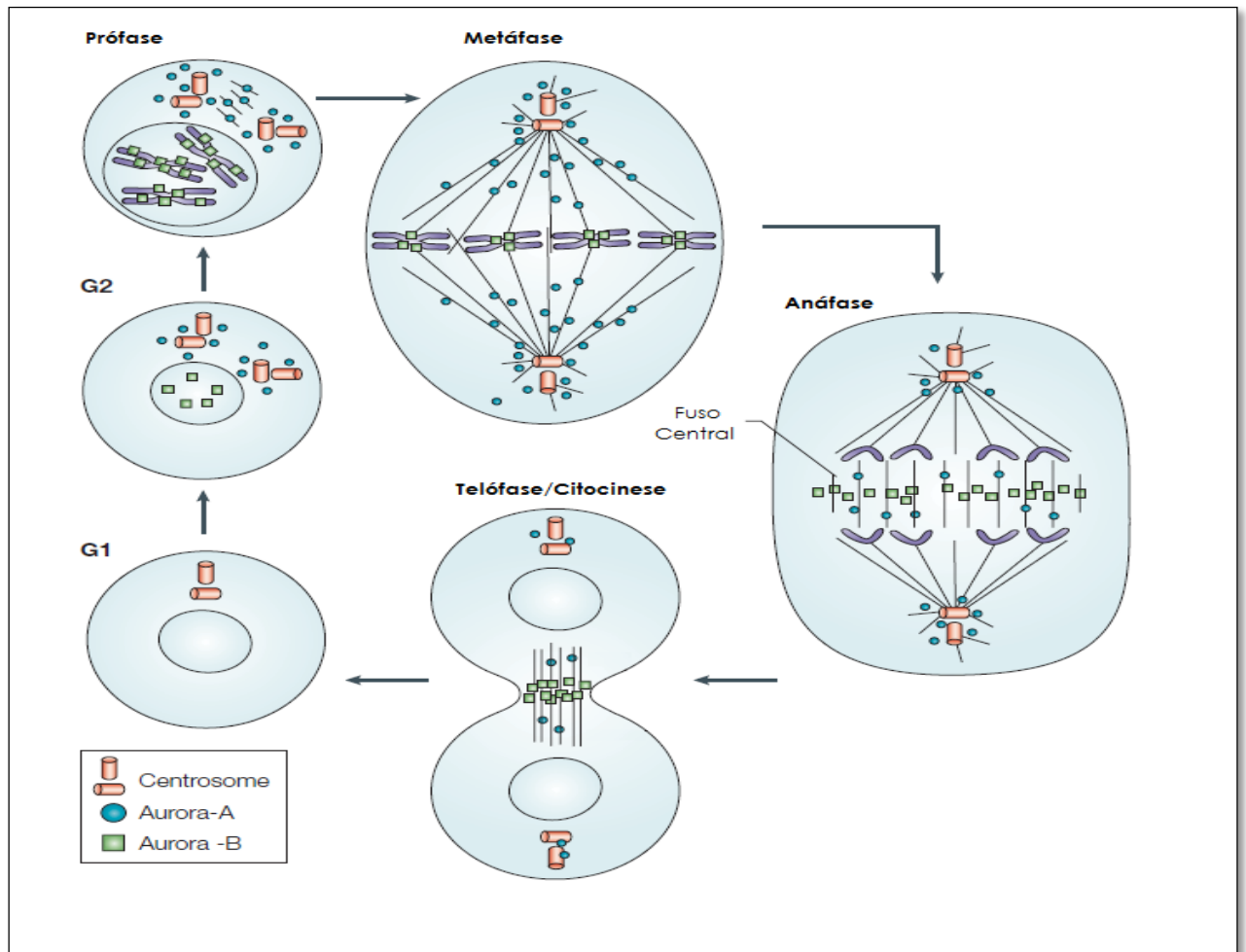
Atualmente, uma classificação utilizada é a da Organização Mundial de Saúde (OMS), que adaptou os critérios do grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) e divide a LLA em dois grandes grupos: leucemia linfoblástica aguda de precursor B, que corresponde a 80% dos casos, e leucemia linfoblástica aguda de precursor T, utilizando dados de imunofenotipagem (FALCÃO, 2002; FARIAS; CASTRO, 2004).

2.5 Aurora Quinase

Os genes aurora quinase codificam proteínas pertencentes a uma família de quinases do tipo serina/treonina que estão envolvidas no processo de divisão celular. O primeiro membro dessa família foi identificado em 1993, quando observou-se um processo mitótico falho na segregação cromossômica em *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que o gene aurora foi primeiramente observado em *Drosophila melanogaster*. Diversas mutações no gene aurora quinase da *Drosophila* caracterizaram problemas na mitose, como presença de fusos monopolares, defeitos de separação do centrossoma, problemas na segregação cromossômica segregação e posicionamento do fuso. Estudos em organismos modelo indicaram que estas proteínas são um requisito importante no processo de divisão celular (SUNKEL; GLOVER, 1988; GLOVER *et al.*, 1995).

Auroras quinases estão envolvidas na organização dos centríolos e ciclos celulares, além de terem funções essenciais nos processos de mitose e meiose, como condensação dos cromossomos, orientação dos cromossomos metafásicos, organização dos microtúbulos e citocinese. Em mamíferos são encontradas Aurora quinases A, B e C, que apesar de apresentarem estrutura semelhante, tem localização e funções distintas. No entanto, entre as três quinases de mamíferos, aurora A tem atraído uma maior atenção, já que observou-se alta expressão em diversos tipos de câncer. Outros experimentos mostraram que animais desenvolveram tumores após receberem células transformadas com *AURKA*, indicando-o como um oncogene (CARMENA; EARNSHAW, 2003; KATAYAMA; BRINKLEY; SEN, 2003).

Figura 4 - Aurora Quinase no processo de divisão celular



Fonte: Adaptada de Adaptada de MARUMOTO; SAYA, 2005

O gene *AURKA* codifica uma proteína com 403 aminoácidos e está localizado no cromossomo 20q13.2, uma região geralmente amplificada em tumores de mama, cólon, pâncreas, ovários, bexiga, fígado, estômago e pele. Os processos regulados por *AURKA* incluem a maturação e a separação do centrôssoma, a montagem do fuso bipolar, o gatilho de entrada na mitose, o alinhamento de cromossomos na metáfase e a citocinese. *AURKA* é a principal proteína reguladora do processo de maturação dos centrôssomos, que ocorre no final da fase G2 e durante a prófase (ZHOU *et al.*, 1998; MARUMOTO; ZHANG; SAYA, 2005; LUKASIEWICZ e LINGLE 2009)

A superexpressão de *AURKA* interfere na formação do complexo de checagem mitótico e interfere em diversos processos celulares que resultam em falhas no processo de divisão celular e instabilidade genômica. Em cultura de células humanas, a deleção de *AURKA* levou a inibição do centrôssoma, mostrando o quão essencial ele é no processo. A interação entre *AURKA* e p53 resulta na inibição ou degradação de p53, dessa forma, a

superexpressão de *AURKA* interfere nos mecanismos de reparo do DNA, sobrevivência e transformação celular (KE *et al.*, 2003; TONG, 2004).

Os níveis de *AURKA* e atividade da quinase começam a se elevar na fase tardia de G2 até a fase M. Para iniciar sua ação é necessário que a proteína *AURKA* seja fosforilada, tornando-se ativada. Uma vez ativada, *AURKA* medeia suas múltiplas funções interagindo com diversos substratos. A degradação proteolítica da Aurora A é necessária antes que as células entrem na fase G1. A alta expressão de *AURKA* está relacionada com aumento do número de centrossomas e fusos multipolares, que surgem como decorrência de uma citocinese falha. Essas evidências sugerem que a *AURKA* possa ser um promotor da tumorigênese (NIKANOVA *et al.*, 2013).

A correlação da alta expressão de *AURKA* com a indução de aneuploidia, anormalidades no centrossoma e ocorrência de tumores humanos e tumores experimentais tem reforçado a ideia de que *AURKA* desempenha um papel crucial neste processo. Com efeito, a inibição de *AURKA* em células tumorais humanas revelou inibição do crescimento e a reversão da transformação tumorigênica (MARUMOTO; ZHANG; SAYA, 2005).

O gene *AURKB* codifica uma proteína que interage com uma proteína interna do centrômero, formando um complexo importante na citocinese é um dos principais componentes do complexo responsável pela separação das cromátides e citocinese. Está localizado no cromossomo 17p13.1 e tem sido associado à separação dos cromossomos e citocinese, e sua atividade é necessária para a orientação bipolar e condensação dos cromossomos, este gene não está amplificado em tumores, entretanto mRNA e proteínas *AURKB* estão com níveis elevados em tumores, principalmente o colorretal (MURATA-HORI *et al.*, 2002; DEWAR *et al.* 2004).

Embora *AURKB* não tenha sido estabelecido como oncogene, a sua alta expressão em células embrionárias de hamster chinês resulta em defeitos na separação de cromossomas durante a mitose, sugerindo um papel para a *AURKB* na tumorigênese. A superexpressão de *AURKB* resulta em multinucleações e poliploidia em células humanas (KATAYAMA *et al.*, 1999; KAMADA *et al.*, 2004).

AURKB participa da orientação cromossômica, fornecendo alinhamento adequado para uma segregação precisa, falhas neste momento podem levar a instabilidade cromossômica e aneuploidias. Sem atividade de *AURKB*, o 'checkpoint' mitótico fica comprometido, resultando em aumento do número de células aneuplóides, instabilidade genética e tumorigênese (JINGYAN *et al.*, 2007).

Um gene que codifica a Aurora-C está localizado no cromossoma 19q13.43, que é uma região frequentemente excluída ou reorganizados em vários tumores. No entanto, o envolvimento de Aurora-C no desenvolvimento do câncer ainda é incerto (KIMURA *et al.*, 1999).

IKEZOE *et al.* (2007) estudaram a expressão de *AURKA* e *AURKB* em linhagens celulares de leucemia e células mononucleares de leucemia isoladas de pacientes e encontraram expressão aberrante em várias doenças hematológicas, incluindo LMA, LLA e LMC. LUCENA-ARAUJO *et al.* (2011) demonstraram superexpressão de *AURKA* e *AURKB* em aproximadamente 10% dos pacientes portadores de LMA *de novo* e associação significativa com resultados de citogenética desfavorável. Recentemente, CARETA *et al.* (2011) avaliaram medula óssea e sangue periférico de seis pacientes portadores de LLC, e encontraram superexpressão de *AURKA* e *AURKB* nas amostras de medula dos pacientes quando comparados com a amostras controles. As alterações de expressão destas proteínas estão fortemente relacionadas à instabilidade cromossômica, aneuploidia e progressão tumoral em diferentes tumores sólidos e neoplasias hematológicas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a presença de alterações (amplificação/deleção) dos genes *AURKA* e *AURKB* em pacientes pediátricos portadores de LLA-B através da técnica de FISH.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a população em estudo - perfil demográfico (sexo e idade), parâmetros hematológicos e classificação da doença;
- Identificar alterações genéticas nos pacientes a partir do estudo citogenético pela técnica de Banda G e estratificar os pacientes por risco do cariótipo;
- Identificar alterações nos genes *AURKA* e *AURKB* pela técnica de Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH);
- Avaliar a relação entre os parâmetros hematológicos e o cariótipo dos pacientes;
- Avaliar a relação entre alterações dos genes *AURKA* e *AURKB* e o risco do cariótipo.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Desenho do Estudo

Tratou-se de um estudo transversal, observacional e analítico.

4.2 Casuística

Para este estudo foi selecionado um número de 30 pacientes pediátricos portadores de LLA *de novo* de células precursoras B acompanhados no Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS) no momento do diagnóstico. As amostras foram coletadas no período de setembro de 2012 a agosto de 2014.

Os critérios de inclusão foram: pacientes até 18 anos incompletos, de ambos os sexos, com LLA de células precursoras B ao diagnóstico e que tenham o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado por seus responsáveis, autorizando o uso das amostras no estudo.

4.3 Metodologia

4.3.1 Coleta das amostras

As amostras utilizadas no estudo foram provenientes da coleta no momento em que os pacientes realizaram o mielograma para confirmar o diagnóstico de LLA, não sendo necessário coletar mais material, além daquele usado nos testes de rotina do serviço.

4.3.2 Obtenção de perfil e dados

A obtenção do perfil (sexo e idade) e dos dados laboratoriais (hemograma, mielograma, imunofenotipagem e citogenética) foi através de busca em prontuários dos pacientes, juntamente com a pesquisa no arquivo do serviço de diagnóstico do HIAS.

4.3.3 Seleção das Sondas DNA

Para o delineamento da pesquisa foram utilizadas duas sondas-DNA prontas para uso. As sondas utilizadas no estudo são da marca Kreatech[®]: KBI-10721 ON AURKA (20q13) / 20q11e e KBI-10722 ON AUKRB (17p13) / SE 17 - para analisar as mudanças no número de cópias do gene Aurora Quinase.

4.3.4 Hibridização *In Situ* por Fluorescência

Para a realização da técnica de FISH foram utilizadas suspensões de leucócitos de medula óssea provenientes das preparações de citogenética clássica, estando estas células previamente estocadas em solução de Carnoy e armazenadas a -20°C . As amostras foram transferidas para tubo cônico tipo Falcon de 15mL, completando o volume para 10mL com fixador de Carnoy e centrifugadas por 10 minutos a 1500 RPM, onde posteriormente foram gotejadas.

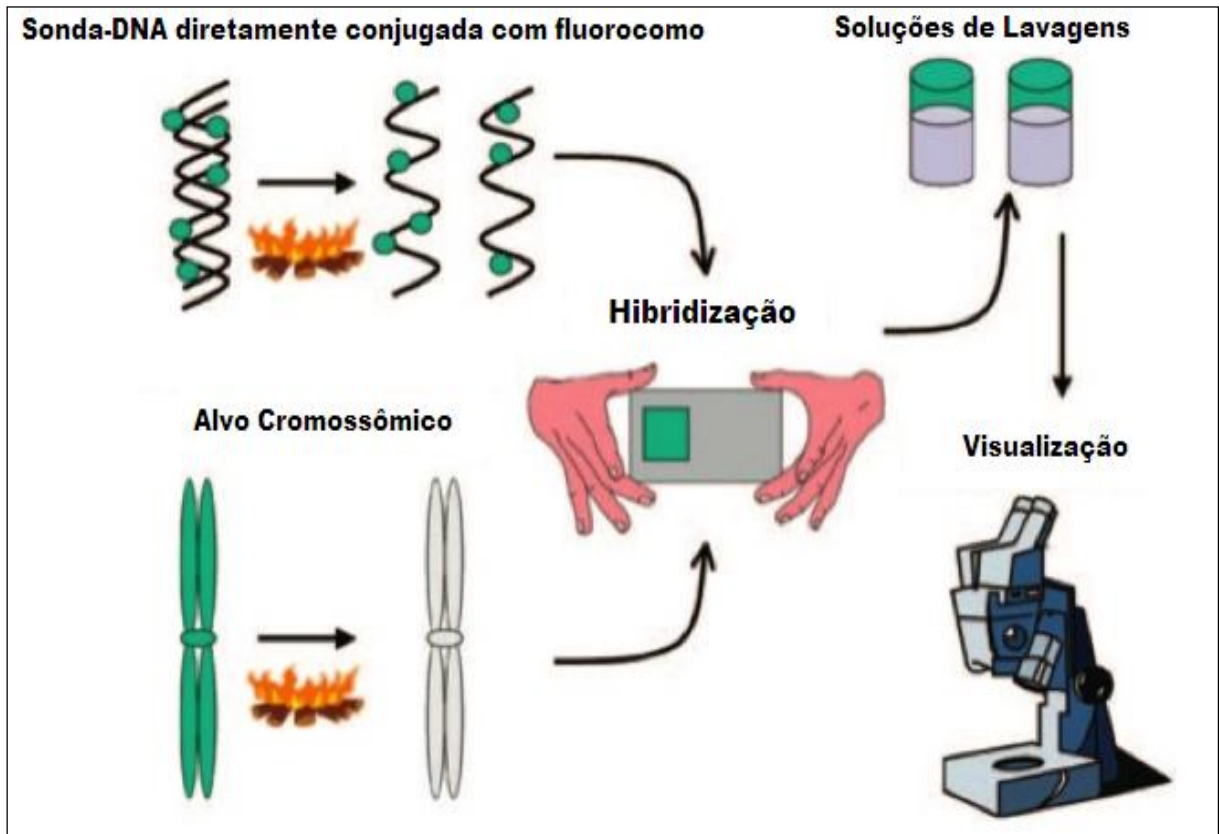
Inicialmente foram gotejadas duas lâminas para cada amostra. Estas lâminas permaneceram à temperatura ambiente até a secagem completa. Em seguida, foram deixadas por 2 minutos em solução 2XSSC (pH 7,0) previamente aquecida a 37°C . Ao fim deste prazo, as lâminas foram incubadas em uma solução de pepsina 5% e HCl 0,01M a 37°C por 10 minutos; posteriormente lavadas com 1XPBS por 10 segundos e diretamente incubadas em solução de formaldeído 1% e 1XPBS (pH 7,2) por 5 minutos. Terminada esta etapa, as lâminas foram lavadas em solução de 1XPBS e passaram por um processo de desidratação em soluções seriadas de etanol (70%, 85% e 100%) por dois minutos cada e colocadas para secar ao ar.

Neste espaço de tempo as sondas foram ressuspendidas e aliqüotadas em capela de fluxo laminar de acordo com o número de amostras. Tanto a sonda quanto as lâminas foram incubadas em solução de Formamida 70% em 2XSSC a 73°C por 5 minutos para desnaturação do DNA. Antes do término, as lâminas foram removidas da solução de formamida e novamente passaram por um processo de desidratação em soluções seriadas de etanol (70%, 85% e 100%). Terminados os 5 minutos foram aplicados $2,5\mu\text{L}$ de cada sonda em sua respectiva lâmina sendo esta coberta por lamínula (22x22mm). Após a distribuição completa da sonda as lâminas foram seladas com *rubber cement* (cola plástica). Por fim as lâminas foram colocadas em câmara escura a 37°C para a hibridização por um período de 24h.

No dia seguinte, as lâminas foram retiradas da câmara escura, onde sob abrigo da luz, foram removidas as lamínulas e a cola plástica. Imediatamente as lâminas foram submergidas em solução pré-aquecida a 37°C de 2XSSC/ 0,1% NP-40 por 5 minutos sem agitar. Terminado o prazo as lâminas foram imediatamente submergidas em solução de 0,4% 2XSSC/ 0,3% NP-40 a 73°C por 2 minutos, sem agitar. Posteriormente foram submergidas novamente em solução de 2XSSC/ 0,1% NP-40 e logo depois em solução de 1XPBS, ambas as soluções estando a temperatura ambiente. As lâminas foram secas no ambiente.

No próximo passo foram adicionados 7 μ L do reagente DAPI/DABCO e as lâminas foram cobertas com lamínula (24X72mm). As lâminas foram postas em repouso ao abrigo da luz por um prazo não inferior a 10 minutos, na temperatura de aproximadamente 4°C. Foi utilizado um microscópio de epifluorescência para analisar as lâminas. Para a captação, tratamento e análise das imagens foi utilizado um sistema de cariotipagem.

Figura 5 - Representação esquemática dos passos básicos da técnica de FISH



Fonte: Adaptado de Gersen e Keagle (2005).

As células avaliadas foram divididas em:

- 2 sinais vermelhos e 2 sinais verdes = normal
- ≥ 3 sinais vermelhos e o mesmo número de sinais verdes = polissomia do cromossomo
- ≥ 3 sinais vermelhos e 2 sinais verdes = amplificação
- 1 sinal verde e 1 sinal vermelho = monossomia do gene
- ausência de sinal = falha de hibridação

4.3.5 Análise estatística

Foi utilizado o teste exato de Fisher para comparar diferenças nas variáveis categóricas e foi utilizado o teste t de Student para comparar variáveis contínuas. O ANOVA com pós-teste de Tukey foi usado para comparar todos os pares de colunas entre três grupos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico Graphpad Prism 5, com o nível de significância de $p < 0,05$.

4.3.6 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin. Número de parecer: 603.145-0.

5 RESULTADOS

A população em estudo foi constituída por 30 pacientes pediátricos com LLA. Observou-se que 16 pacientes eram do sexo masculino e 14 do sexo feminino, não havendo assim predominância de sexo. Quanto à idade, mais da metade dos pacientes tinha idade entre 1 e 9 anos, sendo 63,33%. A média de idade dos pacientes em estudo foi 7,1 anos, com mínimo de 1 ano e máximo de 16 anos (Tabela 2).

Tabela 2 - Características demográficas dos pacientes

Idade	
Média (anos)	7,1 ± 4,88
Mediana	5 (1 – 16)
Entre 1 e 9 anos	19 (63,33%)
≥ 10 anos	11 (36,67%)
Sexo	
Masculino	16 (53,33%)
Feminino	14 (46,67%)

Quanto à classificação FAB dos pacientes, a grande maioria dos pacientes apresentou LLA-L1, sendo 86,67% da população em estudo. Em relação a classificação EGIL, 20 pacientes (66,67%) apresentaram como perfil imunofenotípico LLA-B do tipo Comum, enquanto 10 pacientes (33,33%) apresentaram perfil Pré-B (Tabela 3).

Em relação a celularidade da medula óssea, foi observado que a metade dos pacientes apresentava medula hiper celular no momento do diagnóstico, enquanto que 14 pacientes (46,67%) apresentaram medula normocelular e apenas 1 paciente (3,33%) apresentou medula hipocelular (Tabela 3).

Quanto aos dados do hemograma ao diagnóstico, foi possível observar valores médios de hemoglobina (Hb) de 7,50 g/dL, hematócrito (Ht) de 22,80%, 69.494/mm³ de leucócitos e 56.439,64/mm³ de plaquetas (Tabela 3).

Tabela 3 - Caracterização laboratorial da população em estudo

Classificação FAB	
LLA-L1	26 (86,67%)
LLA-L2	4 (13,33%)
Classificação EGIL	
LLA pré-B	10 (33,33%)
LLA-comum	20 (66,67%)
Celularidade da Medula	
Hiper celular	15 (50,00%)
Normocelular	14 (46,67%)
Hipocelular	1 (3,33%)
Parâmetros Hematológicos	
Hb (g/dL)	7,50 ± 2,1372
Ht (%)	22,80 ± 7,1127
Leucócitos/mm ³	69.494 ± 105841,0207
Plaquetas/mm ³	56.439,64 ± 51325,4231

Os resultados do estudo citogenético mostraram que 24 pacientes apresentaram cariótipo alterado, enquanto 6 apresentaram cariótipo sem alterações. Quanto a complexidade, isto é, mais de três alterações, 13 pacientes apresentaram cariótipo complexo. Quanto ao número de cromossomos, ou ploidia, 20 pacientes apresentaram cariótipo aneuploide. Quanto ao prognóstico baseado no resultado citogenético, encontramos que 8 pacientes apresentaram cariótipo com prognóstico favorável, 12 pacientes com prognóstico intermediário e 10 pacientes com prognóstico desfavorável (Tabela 4).

Tabela 4 - Caracterização citogenética da população em estudo

Características Citogenéticas	
Normalidade	
Normal	6 (20,00%)
Alterado	24 (80,00%)
Complexidade	
Complexo	13 (43,33%)
Não complexo	17 (56,67%)
Ploidia	
Euploide	8 (26,70%)
Aneuploide	20 (66,70%)
Pseudodiploide	2 (6,70%)
Prognóstico	
Favorável	8 (26,67%)
Intermediário	12 (40,00%)
Desfavorável	10 (33,33%)

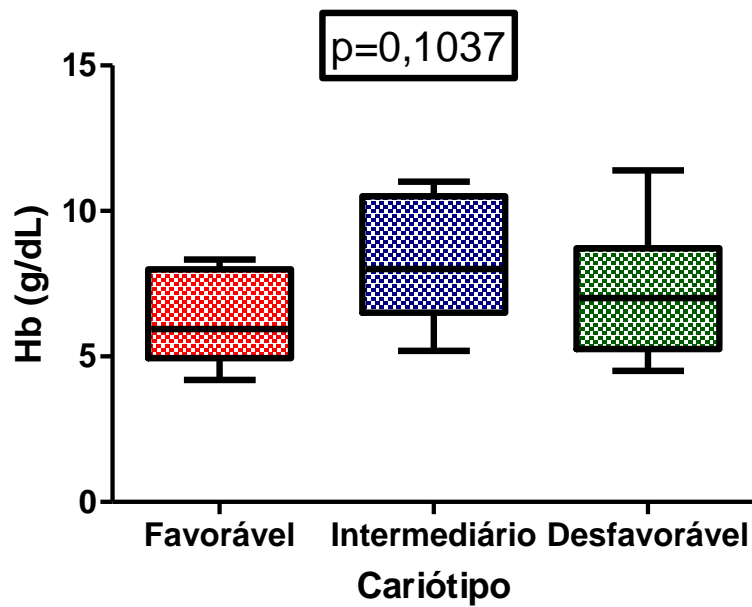
De acordo com a estratificação de risco do *National Cancer Institute (NCI)*, os pacientes foram divididos em dois grupos - risco padrão e alto risco, sendo que 17 pacientes se enquadraram no grupo de alto risco (Tabela 5).

Tabela 5 - Caracterização quanto aos critérios de risco baseados no *National Cancer Institute*

Risco	Crítérios	n. (%)
Padrão	1 a 9,99 anos e < 50.000 leucócitos/ mm ³	13 (43,33%)
Alto	≥ 10 anos e/ou > 50.000 leucócitos/mm ³	17 (56,67%)

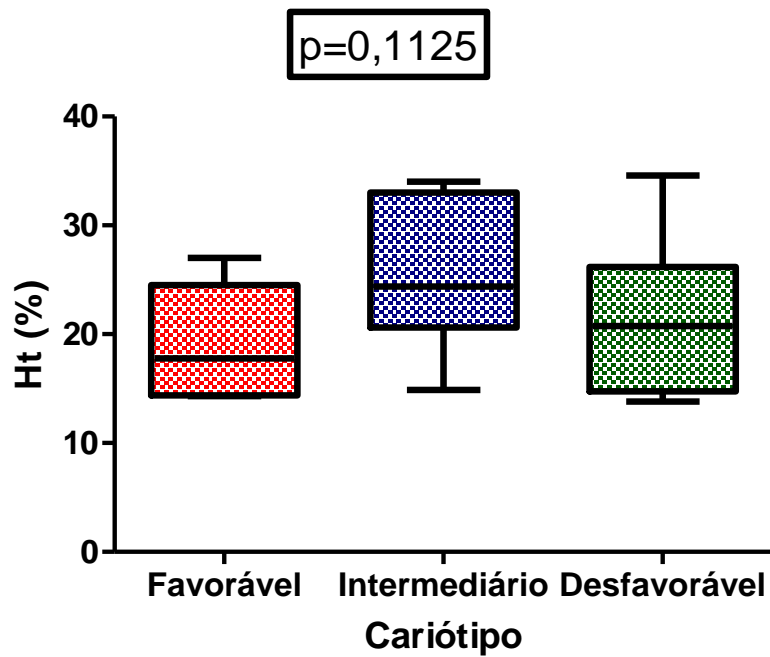
A partir dos parâmetros hematológicos e dos resultados da citogenética, cada parâmetro foi relacionado com os cariótipos de prognóstico favorável, intermediário e desfavorável. Para a análise da Hb, encontramos que os valores médios para os pacientes com cariótipo favorável, intermediário e desfavorável foram de 6,364 g/dL, 8,481 g/dL e 7,211 g/dL, respectivamente. Não foi observada significância estatística nessa análise (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Hemoglobina vs Risco do Cariótipo



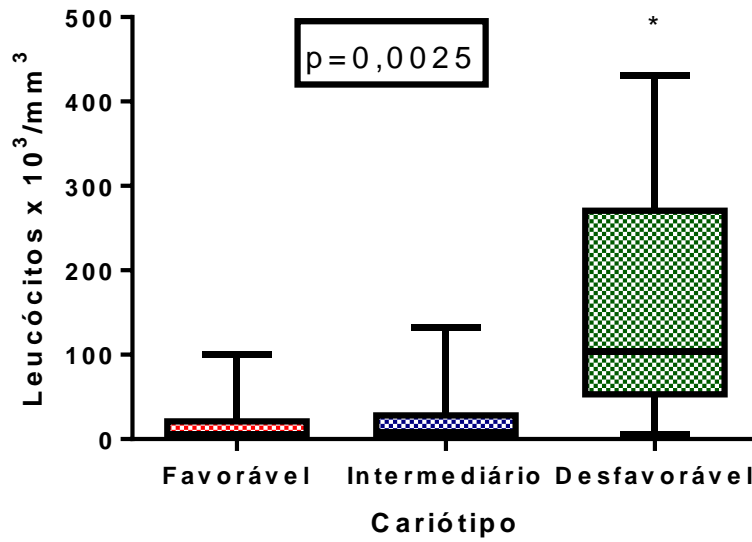
Para a análise do Ht, encontramos que os valores médios para os pacientes com cariótipo favorável, intermediário e desfavorável foram de 19,64%, 26,19% e 21,29%, respectivamente. Não foi observada significância estatística nessa análise (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Hematócrito vs Risco do Cariótipo



Para a análise da leucometria, encontramos que os valores médios para os pacientes com cariótipo favorável, intermediário e desfavorável foram de 21.710/mm³, 22.920/mm³ e 154.200/mm³, respectivamente, mostrando o aumento expressivo do número de células brancas em pacientes com cariótipo desfavorável. Nessa análise foi observada significância estatística (Gráfico 3).

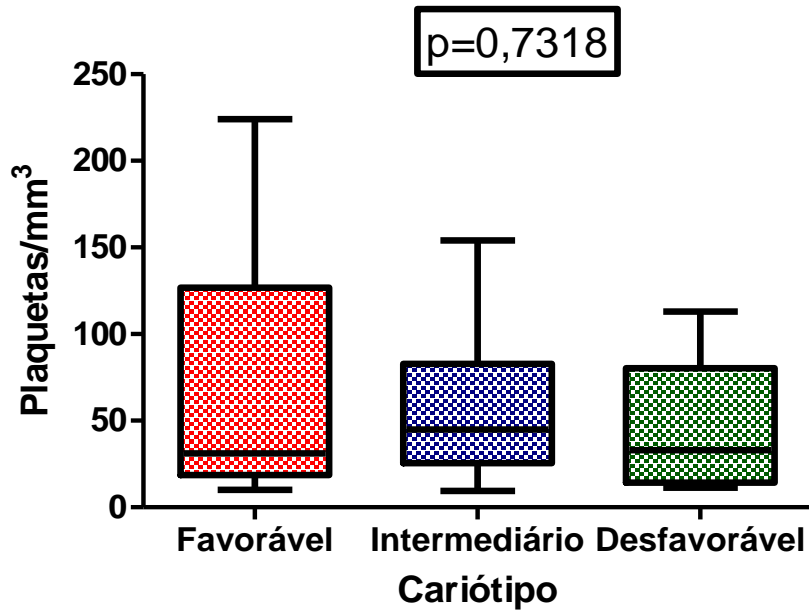
Gráfico 3 - Leucometria vs Risco do Cariótipo



*Significante com relação aos outros dois grupos.

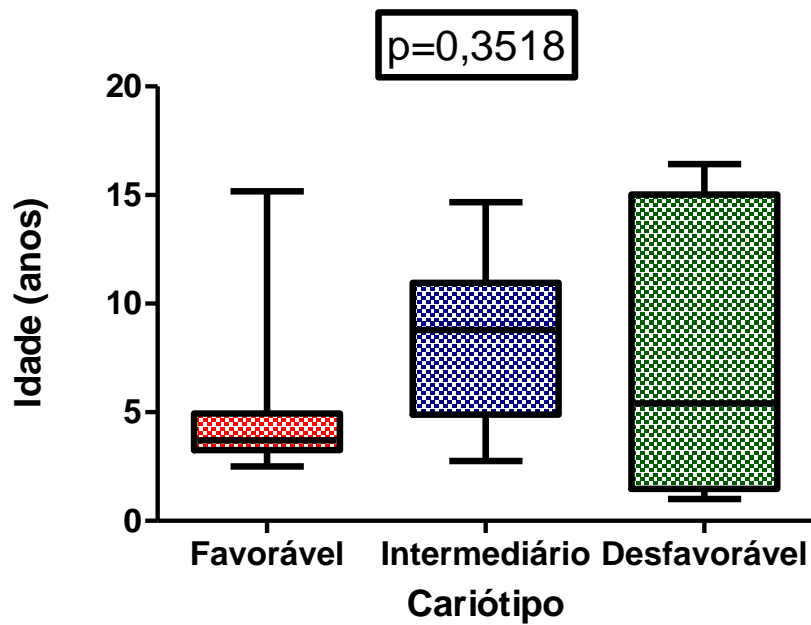
Para a análise das plaquetas, encontramos que os valores médios para os pacientes com cariótipo favorável, intermediário e desfavorável foram de 67.790/mm³, 57.550/mm³ e 47.270/mm³, respectivamente. Não foi observada significância estatística nessa análise (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Contagem de plaquetas vs Risco do Cariótipo



A idade também foi relacionada com os cariótipos de prognóstico favorável, intermediário e desfavorável. Observamos menor média de idade no grupo de pacientes com prognóstico favorável (5,146 anos), seguida dos pacientes com prognóstico desfavorável (7,525 anos) e dos pacientes com prognóstico intermediário (8,096 anos). Essa análise não teve significância estatística (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Idade vs Risco do Cariótipo



Dos 30 pacientes do estudo, nenhum apresentou amplificação ou deleção de *AURKA* ou *AURKB*, mas foi observada monossomia e polissomia dos genes. A monossomia do cromossomo 20 foi observada em 2 pacientes (6,7% dos casos), a polissomia do cromossomo 20 foi observada em 3 pacientes (10% dos casos) e a polissomia do cromossomo 17 foi observada em 8 pacientes (26,7% dos casos). Entre os 24 pacientes com cariótipo alterado, 11 (45,83%) apresentaram alterações – 3 no *AURKA*, 6 no *AURKB* e 2 em ambos os genes. Todas essas alterações foram encontradas em pacientes com aneuploidias e apenas dois pacientes apresentaram alteração nos dois genes (Tabela 6 e Gráfico 6).

A técnica da citogenética molecular - FISH, pelo menos na avaliação dos genes *AURKA* e *AURKB*, foi condizente com a citogenética clássica em 93,30% das análises, sendo que em 2 casos (11 e 14) observamos a polissomia do cromossomo 20 na citogenética molecular, enquanto na citogenética clássica o cariótipo se apresentou normal.

Tabela 6 - Frequência de alterações nos cromossomos 17 e 20 nos pacientes em estudo

Aurora Quinase	Nº de pacientes
Monossomia do cromossomo 20	2
Polissomia do cromossomo 20	3
Polissomia do cromossomo 17	8
Sem alterações nos cromossomos 17 e 20	19

Gráfico 6 - Pacientes aneuplóides vs pacientes euplóides com relação às alterações nos genes Aurora quinase

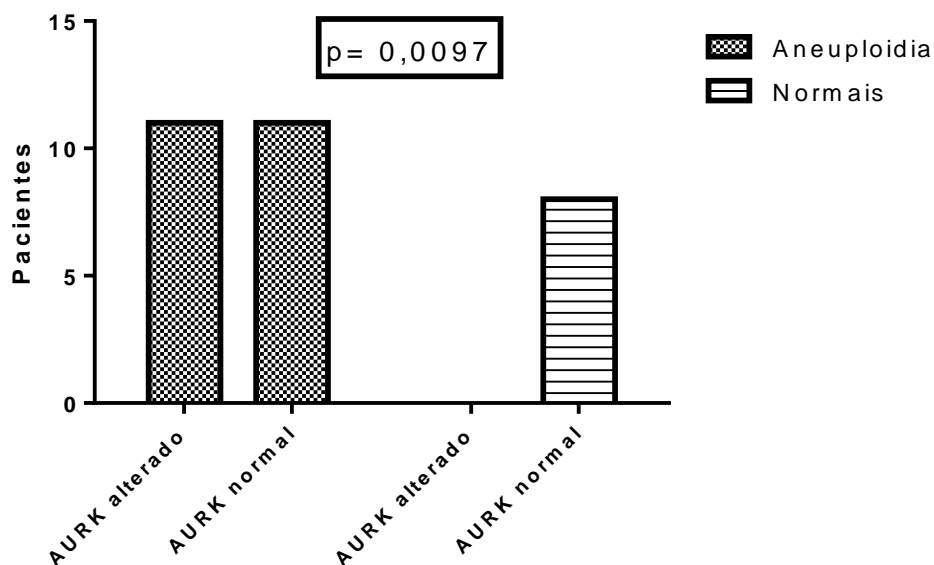


Figura 6 - Cariótipo, *AURKA* e *AURKB* do paciente 2

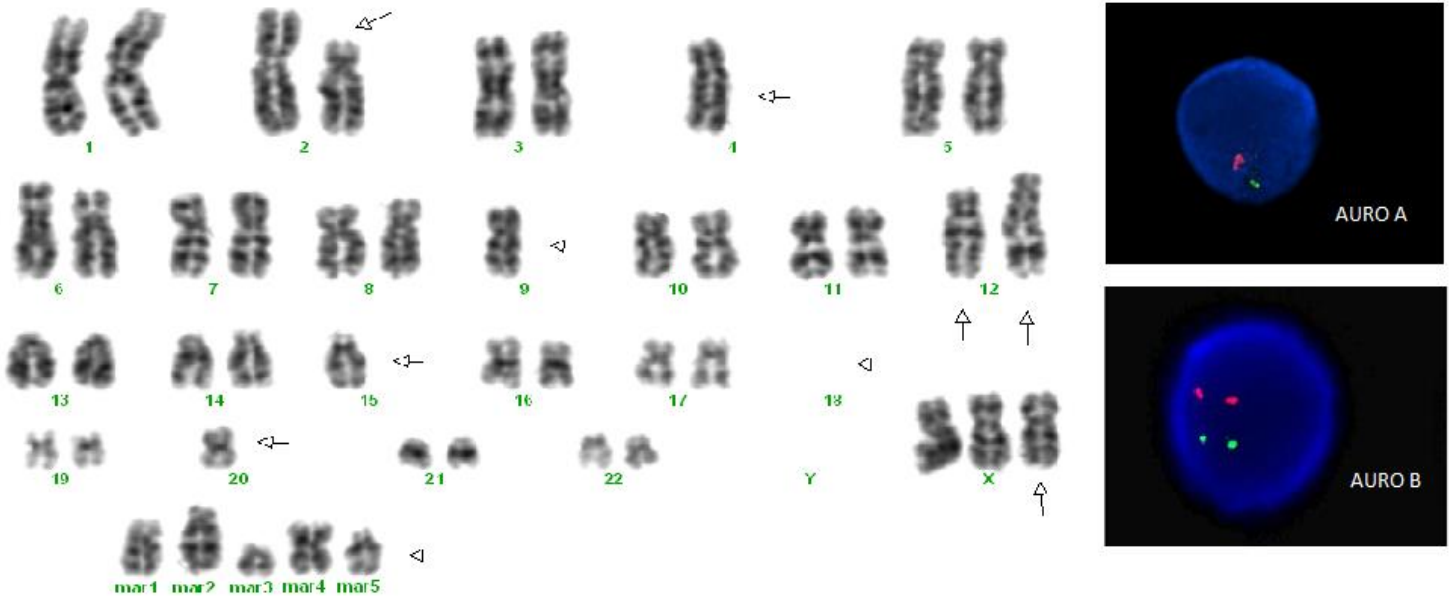


Figura 7 - Cariótipo, *AURKA* e *AURKB* do paciente 27

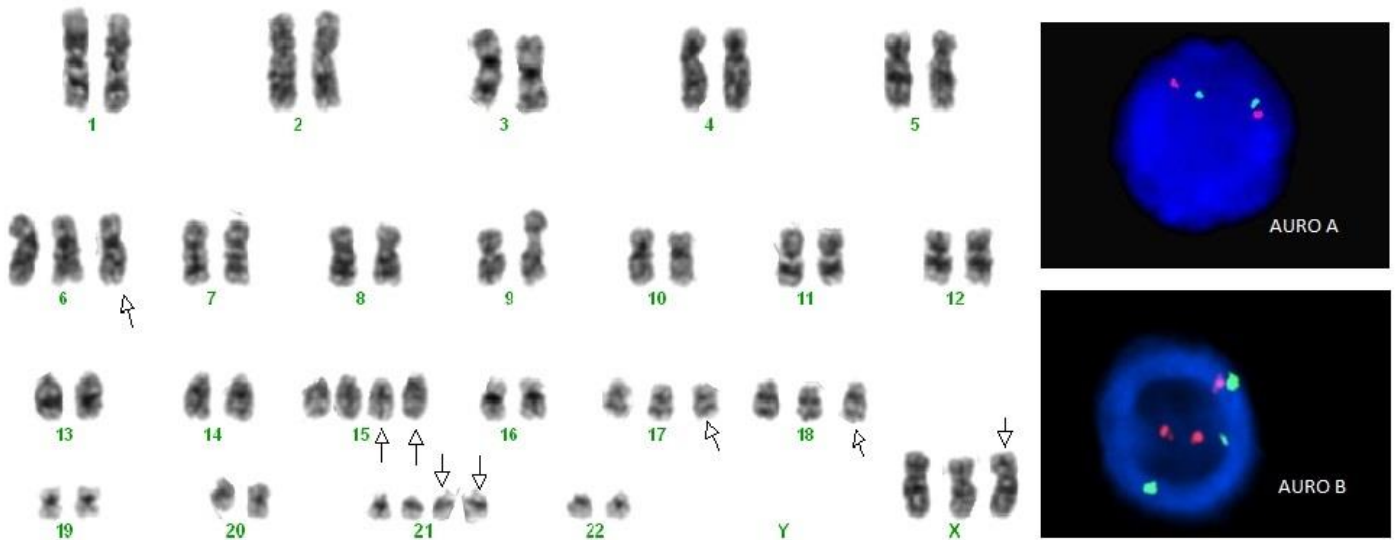
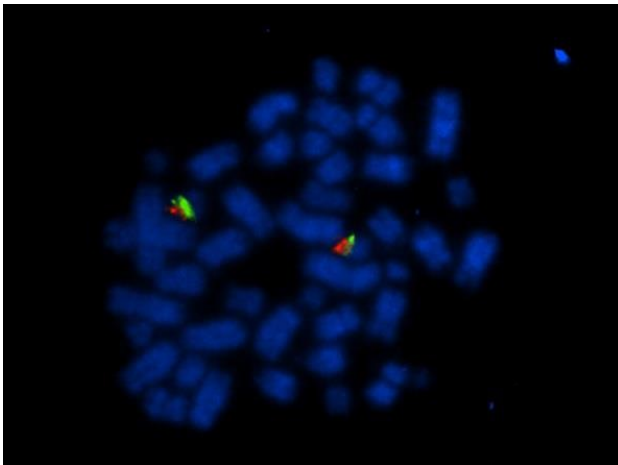
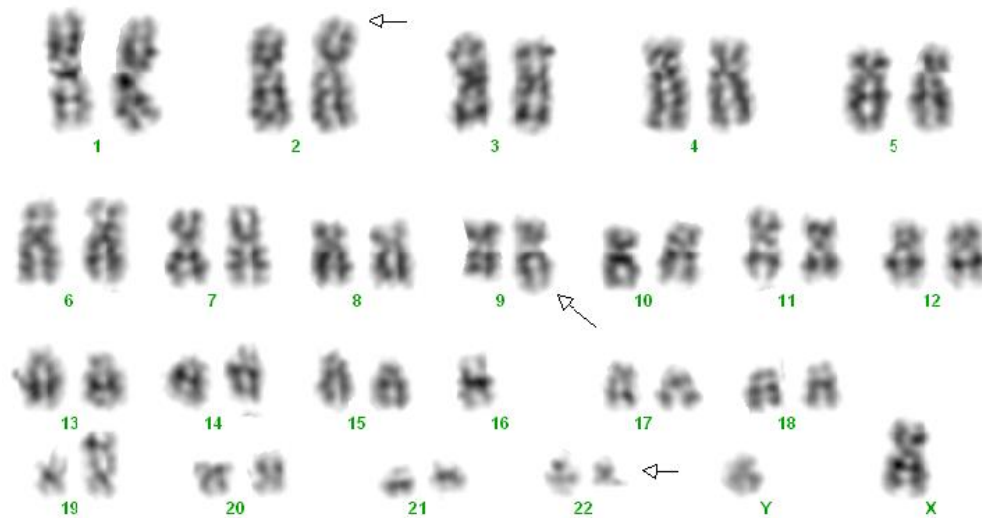


Figura 8 - Cariótipo e *AURKA* do paciente 16



Nas análises dos parâmetros hematológicos com relação às alterações nos genes Aurora quinase os pacientes foram divididos em três grupos: Normal - pacientes sem alterações nos genes em estudo, *AURKA* - pacientes com alterações no *AURKA* e *AURKB* - pacientes com alterações no gene *AURKB*. Apenas dois pacientes apresentaram alterações nos dois genes concomitantemente e devido ao número reduzido não foi possível realizar as análises com um quarto grupo, portanto estes foram incluídos separadamente em cada grupo.

Na análise da hemoglobina (g/dL), os valores médios para os grupos normal, *AURKA* e *AURKB* foram, respectivamente, 7,98 g/dL, 6,69 g/dL e 6,44 g/dL (Gráfico 7). A análise do hematócrito (%) mostrou valores médios para os grupos de 24,44%, 20,10% e 19,31% (Gráfico 8). Para os leucócitos, as médias dos grupos foram de 70.640/mm³, 88.290/mm³ e 38.830/mm³(Gráfico 9). E a análise das plaquetas apresentou valores médios de 54.450/mm³, 57.460/mm³ e 62.960/mm³(Gráfico 10). Apenas a análise dos leucócitos apresentou significância estatística ($p=0,0339$).

Gráfico 7 - Hb vs alteração nos genes

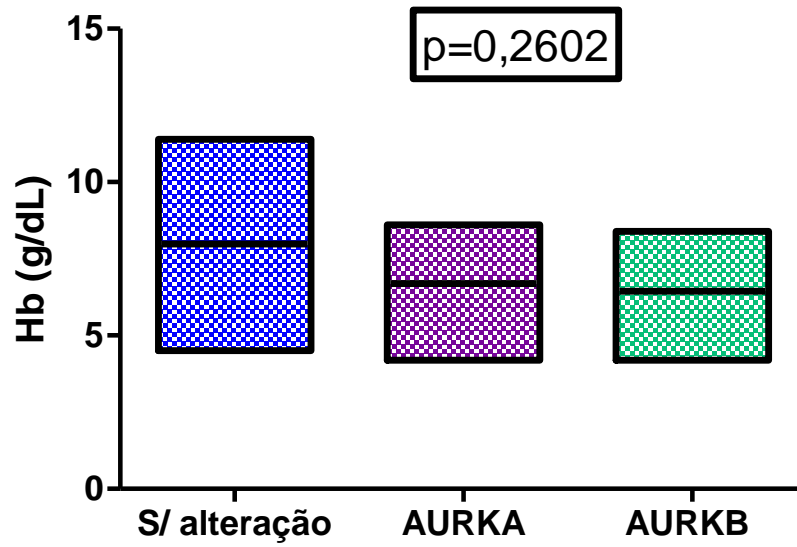


Gráfico 8 - Ht vs alteração nos genes

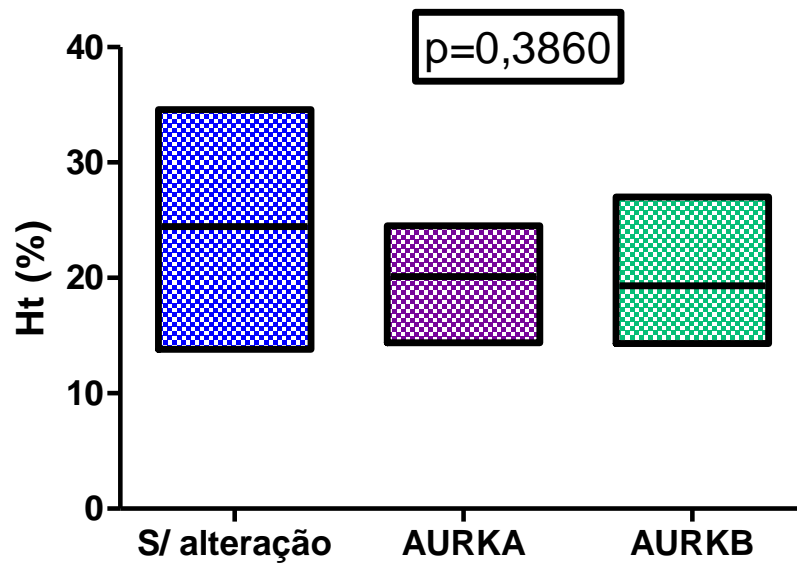
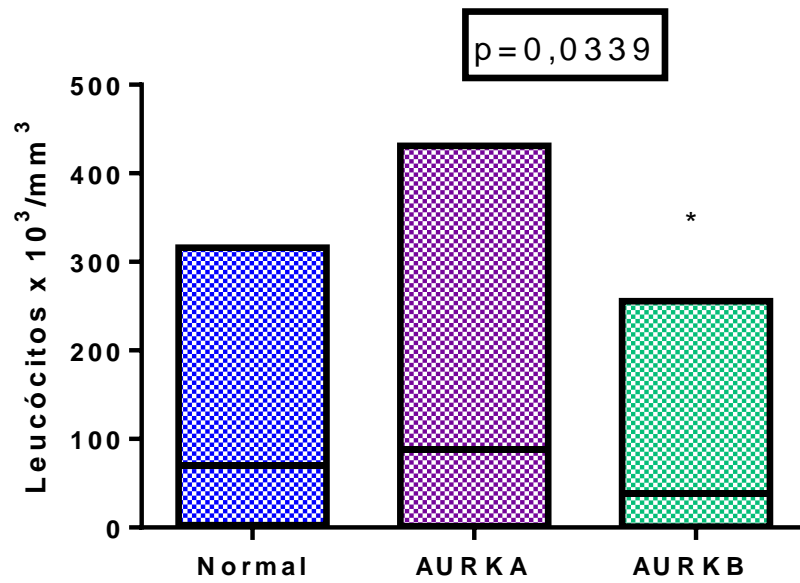
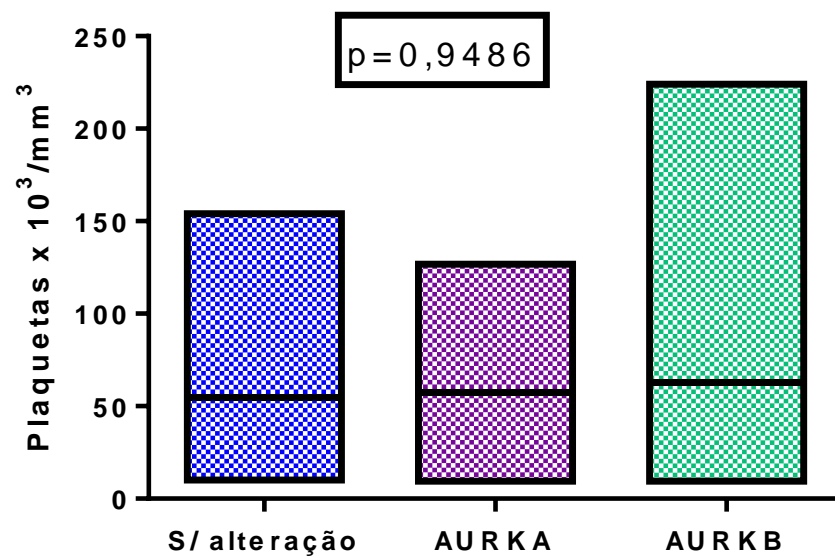


Gráfico 9 - Leucometria vs alteração nos genes



*Significante com relação aos outros dois grupos

Gráfico 10 - Contagem de plaquetas vs alteração nos genes



Quadro 4 - Resultado da citogenética dos pacientes

Registro	Resultado segundo o ISCN 2005
1	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[10]
2	46,XX,+X,del(2)(p13),-4,-9,add(12)(q22),add(12),add(12)(q11),-15,-18,-18,20,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5[13]/46,XX[5]
3	45,XX,-20[22]
4	46,XX[18]
5	47,XY,+21c[20]
6	45,X,-Y[16]/46,XY[2]
7	48,XY,+X,+21c[9]/47,XY,+21c[3]
8	50,XY,+5,+8,+14,der(19)t(1;19)(q23;p13),+22[3]/46,XY,der(19)t(1;19)(q23;p13)[3]/46,XY[10]
9	46,XY[18]
10	46,XY[15]
11	46,XY[18] (análise diferente do FISH, com polissomia no cromossomo 20)
12	53,XY,+X,+4,+6,+8,+17,+21,+21[10]/46,XY[5]
13	54,XY,+X,+Y,+1,+10,+14,+15,+21,+21[16]/46,XY[4]
14	46,XX[12] (análise diferente do FISH, com polissomia no cromossomos 20 e 17)
15	46,XX[20]
16	45,XY,?add(2)(p25),t(9;22)(q34;q22),-16,add(19)(p13.3)[11]/46,XY,?add(2)(p25),t(9;22)(q34;q22)[9]
17	52,XY,+Y,+5,+14,+18,+21,+22[8]/46,XY[6]
18	46,XY,-5,add(11)(p15),der(12;13)(q10;q10),-21,+mar1x2,+mar2[8]/46,XY[2]
19	49,XY,+X,?add(14)(q32),+15,-21,+mar1,+mar2[16]/46,XY[2] (Análises do FISH mostrou polissomia do cromossomo 17, provável cromossomo marcador)
20	46,XY[20]
21	54,XX,+X,dup(1)(q31q44),+4,+6,+14,+17,+18,+21,+21[8]/46,XX[6]
22	47,XX,add(21)(p13),+21[17]/46,XX[3]
23	47,XX,+5,t(9;19)(p13;p13.3)[16]/46,XX[2]
24	46,XX,del(2)(q24),del(6)(q21),?add(12)(p13)[10]/46,XX[10]
25	56,XX,+X,+4,+6,+8,+10,+11,+14,+17,+21,+mar[15]/46,XX[3]
26	46,XX[18]
27	54,XX,+X,+6,+15,+15,+17,+18,+21,+21[11]/46,XX[3]
28	47,XY,+21c[18]
29	54,XX,+4,+6,+9,+12,+14,+15,+17,+21[18]/46,XX[2]
30	94,XXYY,+3,-18,+19,+20[10]/46,XY[10]

6 DISCUSSÃO

A LLA é o tipo de leucemia mais frequente na infância e o câncer mais comum nessa faixa etária. É uma doença heterogênea do ponto de vista biológico e clínico, portanto a identificação de fatores genéticos e biológicos que influenciam na patogênese da LLA é de grande importância no acompanhamento dos pacientes e no manejo terapêutico.

No presente estudo foram avaliados 30 pacientes pediátricos portadores de LLA-B. Com relação ao sexo, foi encontrada uma proporção semelhante entre o sexo feminino e o masculino, sendo que 53,33% dos casos eram do sexo masculino. Estudos anteriores já descritos na literatura mostram que a incidência da LLA é mais comum em indivíduos do sexo masculino. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a maior incidência de LLA no Brasil ocorre em crianças do sexo masculino, variando a proporção entre os estados. Ikeuti e colaboradores (2006) em São Paulo encontraram uma frequência de 58% do sexo masculino, Rodrigues e colaboradores (2006) em Pernambuco também encontraram resultado semelhante, em Goiânia, Braga e colaboradores (2002) mostraram que a proporção entre os sexos foi semelhante.

Estudo realizado entre os anos de 2001 e 2003 nos EUA, Li e colaboradores (2008) observaram uma maior incidência de LLA em crianças do sexo masculino, com 5297 casos, comparados a 4269 casos no sexo feminino. Outro estudo realizado nos EUA entre os anos de 1990 e 2005 também observou predominância do sexo masculino entre as crianças estudadas (HUNGER *et al.*, 2012). No Reino Unido, a taxa anual para crianças do sexo masculino foi de 50 casos por milhão e 41 casos por milhão para o sexo feminino (STILLER; KROLL, 2007). O presente estudo não encontrou diferença significativa entre os sexos, o que pode ser justificado pelo tamanho da amostra.

Quanto a idade, a média encontrada entre os pacientes foi de 7,2 anos e a maioria dos pacientes (60%) tinham entre 1 e 9 anos. Registros do Ministério da Saúde mostram que a maior incidência de LLA no Brasil ocorre na faixa etária de 1 a 4 anos. Em São Luís, 72,5% das crianças em estudo tinham entre 1 e 10 anos (VERAS; ARAGÃO; SANTOS, 2008). Borim e colaboradores (2000), em São José do Rio Preto, encontraram que a faixa etária mais frequente foi de 5 a 9 anos, seguida de 1 a 4 anos. Em outros países os resultados também estão concordantes com o nosso, estudo realizado na Holanda, em Amsterdam, observou que dos 394 pacientes em estudo, 284 tinham entre 1 e 9 anos. Nos Estados Unidos, em Nova York, essa também foi a faixa etária predominante entre os anos de 1990 e 2005 (PIETERS *et al.*, 1998; HUNGER *et al.*, 2012).

Em relação à classificação FAB, a grande maioria dos pacientes em estudo foram classificados como LLA-L1 (86,70%), o que está de acordo com o descrito na literatura, em que a LLA-L1 é o tipo predominante, representando cerca de 85% das leucemias linfóides agudas em crianças (ZAGO, 2001). Um estudo realizado em Manaus também encontrou maior frequência do subtipo L1 em crianças, com 68% dos casos (LEITÃO, 2007).

A caracterização imunofenotípica mostrou que 66,67% dos pacientes apresentavam LLA do tipo comum, seguidos de LLA do tipo pré-B - 33,33%. Nossos achados estão de acordo com os dados encontrados na literatura, em que a LLA comum ou Calla é o tipo mais expressivo, representando cerca de 75% dos casos da LLA infantil. Nesses tipos de leucemia as células expressam o antígeno comum LLA - CD10, uma glicoproteína que confere prognóstico favorável e boa resposta ao tratamento (CONSOLINI *et al.*, 1998).

Os resultados hematológicos apresentam médias de hemoglobina, hematócrito, leucócitos e plaquetas de: 7,48 g/dL, 22,72%, 69.032,84/mm³ e 56.358,08/mm³, respectivamente. A partir da análise dos níveis de hemoglobina e hematócrito, foi possível observar a presença de anemia na maioria dos pacientes. Esse resultado é esperado, pois devido ao acúmulo de células leucêmicas na medula, ocorre a substituição das células vermelhas, diminuindo o número destas e culminando com a anemia, que normalmente é do tipo normocítica e normocrômica (SWERDLOW, 2008). Teuffel e colaboradores em 2008, demonstraram que 80% dos pacientes com LLA-B apresentam valores de hemoglobina inferiores a 10g/dL.

A anemia presente nesses pacientes também pode estar relacionada com outros fatores que vão além da leucemia aguda. A anemia ferropriva é uma deficiência nutricional frequente em crianças de todo o mundo que é causada principalmente pela ingestão insuficiente de ferro, que se reflete pela má alimentação, baixo nível socioeconômico e presença de doenças infecto-parasitárias (COSTA; MONTEIRO; AUGUSTO, 2004).

A contagem de leucócitos acima de 100.000/mm³ está presente em apenas 10% dos casos, enquanto uma contagem de mais de 10.000/mm³ pode ser observada em 45% dos casos, já a leucopenia pode ser vista em 30% dos casos. Um estudo realizado por MA e colaboradores (1997) demonstrou que 20% dos pacientes apresentavam leucometria acima de 50.000/mm³, outro estudo realizado na Inglaterra em 2003 também mostrou resultado semelhante (CHESSELLS, 2003). A trombocitopenia é evidenciada devido a falência medular e foi frequente em nossos pacientes. Nossos achados corroboram com outros estudos descritos na literatura, em que a maioria dos pacientes apresenta entre 20.000 e 100.000 plaquetas por mm³.

Na análise dos parâmetros hematológicos com relação a presença de alterações nos genes *AURKA* e *AURKB* não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, porém o grupo com alterações no gene *AURKB* demonstrou uma tendência a leucometria mais baixa e contagem de plaquetas mais elevada, que é considerado como fator de prognóstico favorável. Estudo realizado com pacientes portadores de LMA em São José do Rio Preto não encontrou associação entre o aumento da expressão de *AURKB* e o número de leucócitos (LUCENA-ARAÚJO *et al.*, 2011). Nosso resultado pode ser explicado pelo pequeno tamanho da amostra ou pelo fato de que a presença do gene *AURKB* leva a uma instabilidade genética, favorecendo a hiperdiploidia, que confere prognóstico favorável à doença (PAULSSON; JOHANSSON, 2009).

Ye e colaboradores (2009) estudaram pacientes com LMA e SMD e não encontraram correlação entre a expressão de *AURKA* com variáveis clínicas como contagem de blastos, alterações citogenéticas, estratificações de risco, entre outros. Huang e colaboradores (2008) também não encontraram resultados significantes ao relacionar a expressão dos genes Aurora com sexo, idade, classificação FAB e contagem de leucócitos em pacientes portadores de LMA.

A análise citogenética pode ser considerada como importante fator de prognóstico independente nas leucemias agudas. Vários estudos tem proposto um sistema de estratificação de risco citogenético de pacientes nas seguintes modalidades: favorável, intermediário e desfavorável. A LLA-B é a leucemia que apresenta uma quantidade elevada de alterações cromossômicas, sejam elas numéricas ou estruturais. Neste estudo a maioria dos pacientes (73,33%) apresentou cariótipo alterado, correspondendo ao observado por Artigas e colaboradores (2006) que descreveram alterações em 60 a 75% dos casos.

Na análise da relação entre os parâmetros hematológicos e os cariótipos com prognóstico favorável, intermediário e desfavorável, observamos que pacientes com cariótipo desfavorável apresentaram número elevado de leucócitos. O número de leucócitos acima de 50.000 é considerado um marcador de mau prognóstico em pacientes de LLA-B (PUI; EVANS, 1998).

Os resultados da citogenética clássica foram condizentes com os achados do FISH em 93,33% dos pacientes. Nos pacientes que apresentaram deleção ou adição dos cromossomos 17 ou 20, foi possível observar a concordância no número de sinais fluorescentes dos genes *AURKA* ou *AURKB*, exceto em dois pacientes. Alterações nesses genes estão associadas com instabilidade cromossômica e com disfunção na divisão celular, promovendo o desenvolvimento do tumor. A amplificação de *AURKA* induz a formação de

um fuso mitótico multipolar, que resulta em um alinhamento anormal de cromossomos e divisão celular equivocada (MERALDI et al, 2002). A amplificação de *AURKB* tem sido associada com perda da conexão entre cinetócoro e microtúbulos e finalização da mitose sem os eventos característicos da anáfase ou citocinese, levando também a uma instabilidade genômica e tumorigênese (MURATA-HORI et al., 2002).

AURKA e *AURKB* são expressos de forma elevada em tumores sólidos humanos, bem como células de linhagem leucêmica mielóide, conferindo um mau prognóstico nesses pacientes. Estudo *in vitro* com linhagem de células leucêmicas linfóides pediátricas demonstraram que os níveis de expressão das proteínas *AURKA* e *AURKB* foram semelhantes às do grupo controle saudável, porém *AURKA* teve resultados menos expressivos na LLA pediátrica que a *AURKB*. No mesmo estudo, também foi demonstrado uma expressão diferente dos genes entre as linhagens celulares, LLA-B e LLA-T. A LLA-T apresentou um aumento significativo da expressão em relação à linhagem B. Além disso, deve-se ressaltar que em alguns tumores sólidos a expressão de *AURKA* e *AURKB* é usado como marcador de prognóstico isolado, fato que não pode ser considerado nas doenças hematológicas neoplásicas (HARTSINK-SEGBERS et al., 2013).

No presente estudo, encontramos que *AURKB* foi mais expressivo, assim como o descrito em estudo *in vitro* realizado com droga inibidora de *AURKB* (HARTSINK-SEGBERS et al., 2013). Apenas o número de cópias dos genes foi avaliado pelo FISH, desta forma, é possível sugerir que a expressão do gene e da proteína independem do número de cópias, podendo haver outros fatores que levem a um aumento da expressão gênica e proteica. Dos três membros da família de Aurora (A, B e C), mais estudos tem focado sua atenção no *AURKA*, mostrando a sua relevância para a oncogênese. Nossos resultados indicam que *AURKA* está menos envolvido na LLA infantil que *AURKB*. Assim, podemos sugerir que *AURKB*, mais do que *AURKA*, é uma proteína importante para a proliferação e sobrevivência de células de leucemia linfóide aguda de células B em crianças.

Foi possível observar que aproximadamente metade dos pacientes com algum tipo de aneuploidia apresentou alteração em algum dos genes e que as alterações nestes pacientes eram em sua maioria numéricas, sendo que apenas dois pacientes deste grupo apresentaram alteração estrutural. *AURKA* e *AURKB* levam a instabilidade cromossômica no momento da divisão celular, portanto a alteração causada por eles é, em sua maioria, numérica, fato mostrado pelos nossos resultados (MERALDI et al, 2002).

Também foi possível observar que a maioria dos pacientes com alteração no gene *AURKB* apresentou cariótipo considerado favorável. Lucena-Araujo e colaboradores (2011)

mostraram uma associação significativa entre a alta expressão de *AURKA* e citogenética desfavorável em pacientes com LMA, mas não com *AURKB*. Ye *et al.* analisaram 20 pacientes com SMD e não detectaram qualquer correlação significativa da expressão de *AURKA* com anomalias citogenéticas. Heredia e colaboradores (2012) também não encontraram relação entre a expressão de *AURKB* com significado prognóstico em pacientes com SMD.

Nossos resultados não apresentaram amplificação ou deleção de nenhum dos genes estudados, porém encontramos polissomia e monossomia do cromossomo 20 e polissomia do cromossomo 17, com destaque para o aumento do número de cópias do gene *AURKB*. Diferentemente de outros estudos, onde o gene *AURKA* tem maior importância na oncogênese, observamos que a LLA infantil sofre maior influência do gene *AURKB*, sendo um possível iniciador da instabilidade genética, levando a outras alterações numéricas. Também podemos inferir que os genes envolvidos no mecanismo errôneo de divisão celular dessa linhagem sejam outros além dos genes Aurora Quinase, já que nesses cromossomos possam existir outros oncogenes responsáveis pela progressão da doença, sendo necessários mais estudos para comprovar (IKEZOE *et al.*, 2007; LUCENA-ARAUJO *et al.*, 2011; HARTSINK-SEGBERS *et al.*, 2013).

Em suma, os resultados do estudo demonstraram que os pacientes com alteração no número de cópias desses genes sofrem também outras alterações numéricas e que *AURKB* está mais envolvido na progressão da LLA-B em crianças, conferindo melhor prognóstico.

7 CONCLUSÃO

- A população em estudo teve uma leve predominância do sexo masculino e mostrou idade média de 7,1 anos. Os pacientes apresentaram anemia, leucocitose e plaquetopenia ao diagnóstico; e metade apresentou medula hiperclular no resultado do mielograma, já que as células leucêmicas infiltram a medula óssea, ocupando o lugar das células sanguíneas saudáveis.
- As alterações genéticas – estruturais e numéricas - foram frequentes entre os pacientes (80%), mostrando que a LLA infantil tem grande influência genética em sua progressão.
- A análise dos parâmetros hematológicos com relação ao risco do cariótipo mostrou que as crianças com cariótipo de prognóstico considerado desfavorável apresentavam leucometria mais alta, contagem de plaquetas mais baixa e idade mais elevada.
- Entre os pacientes com cariótipo alterado, 45,83% apresentaram alterações em *AURKA* ou *AURKB*, sendo o aumento do número de cópias do gene *AURKB* mais frequente, com 33,33%. A alteração nestes genes está relacionada com divisão celular equivocada, levando à instabilidade genômica.
- Dos 8 pacientes com alteração no gene *AURKB*, 6 (75%) apresentaram cariótipo favorável. Na análise dos parâmetros hematológicos em relação às alterações nos genes observamos que os pacientes com alteração no *AURKB* apresentaram leucometria mais baixa e contagem de plaquetas mais altas, mostrando o envolvimento desse gene com melhor prognóstico da LLA infantil.
- Por fim, podemos concluir que os genes *AURKA* e *AURKB* podem estar envolvidos na patogênese da LLA infantil por promoverem instabilidade genética e que *AURKB* tem maior destaque nesta doença, conferindo melhor prognóstico e reforçando que o seu papel na LLA infantil pode não ser de um oncogene.

REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, S. A.; STAUNTON, J. E.; SILVERMAN, L. B.; PIETERS, R.; DEN BOER, M. L.; MINDEN, M. D.; SALLAN, S. E.; LANDER, E. S.; GOLUB, T. R.; KORSMEYER, S. J. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. **Nat Genet**, v. 30, p. 41-47, 2002.
- ARTIGAS, C. G.; CABRERA, M. E.; MELO, A.; PAEZ, E.; ARRIAGADA, M.; ASTETE, C. Frecuencia de los genes de fusión TEL/AML1 y BCR/ABL en pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda. **Rev Méd Chile**, v. 134, p. 1367-1376, 2006.
- BENE, M.C.; CASTOLDI, G.; KNAPP, W.; LUDWIG, W.D.; MATUTES, E.; ORFAO, A. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of leukemias (EGIL). **Leukemia**, v. 9, n. 10, p. 1783-1786, 1995.
- BENNETT, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M. T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A. G.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. **BJH**, v. 33, n. 4, p. 451-458, 1976.
- BRAGA, P.E.; LATORRE, M.R.D.O.; CURADO, M.P. Câncer na Infância: análise comparativa da Incidência, mortalidade e sobrevida em Goiânia (Brasil) e outros países. **Cadernos de Saúde Pública**, v.18, n. 1, 2002.
- BORIM, L.N.B., RUIZ, M.A., CONTE, A.C.F., CAMARGO, B. Estado nutricional com fator prognóstico em crianças portado. **Revista Brasileira de Hemoterapia e Hematologia**, v. 22, n. 1, p. 47-53, 2000.
- CARETA, F. P.; GOBESSI, S.; PANEPUCCI, R. A. The Aurora A and B kinases are upregulated in bone marrow-derived chronic lymphocytic leukemia cells and represent potential therapeutical targets. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 33, p. 136-137, 2011.
- CARMENA, M.; EARNSHAW, W. C. The cellular geography of aurora kinases. **Nature Reviews**, v. 4, p. 842-854, 2003.
- CARROLL, W. L.; BHOJWANI D.; MIN, D. J.; RAETZ, E.; RELLING, M.; DAVIES, S.; DOWNING, J. R.; WILLMAN, C. L.; REED, J. C. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, 102-131, 2003.
- CHESELLS, J. M. Pitfalls in the diagnosis of childhood leucemia. **British Journal of Haematology**, v. 114, p. 506-511, 2003.
- CONSOLINI, R.; LEGITIMO, A.; RONDELLI, R.; GUGUELMI, C.; BARISONE, E.; LIPPI, A. Clinical relevance of CD10 expression in childhood ALL. **Haematologica**, v. 83, n. 11, p. 967-973, 1998.
- COSTA, L.; MONTEIRO, R. B.; AUGUSTO, C. Consumo de leite de vaca e anemia na infância no município de São Paulo. **Rev Saúde Pública**, v. 38, n. 6, p. 793-803, 2004.

DEWAR, H.; TANAKA, K.; NASMYTH, K., *et al.* Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle. **Nature**; v. 428, p. 93-97, 2004.

FALCÃO, R. P.; REGO, E. M. Leucemia linfóide aguda em adultos e crianças. Características morfológicas e imunofenotípicas. **Ser. Monogr. Esc. Bras. Hematol**, v.9, p. 25-35, 2002.

FALCÃO, R.P. Leucemia linfóide aguda em adultos e crianças: características morfológicas e imunofenotípicas. **Ser Monogr Esc Bras Hemat**.v, 9, p. 25-35, 2002.

FARHI, D. C.; ROSENTHAL, N. S. Acute lymphoblastic leukemia. **Clin Lab Med**, v. 20, p. 17-28, 2000.

FARIAS, M.G.; CASTRO, S.M. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfoides agudas. **J Bras Patol Med Lab**. v. 40, n. 2, p. 91-98, 2004.

FORD, A. M.; RIDGE, S. A.; CABRERA, M. E.; MAHMOUD, H.; STEEL, C. M.; CHAN, L. C. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. **Nature**, v. 363, p. 358-360, 1993.

FRIEDMANN, A. M.; WEINSTEIN, H. J. The role of prognostic features in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. **The Oncologist**, v. 5, p. 321-328, 2000.

GALE, K. B.; FORD, A. M.; REPP, R.; BORKHARDT, A.; KELLER, C.; EDEN, O. B. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 94, p. 13950-13954, 1997.

GARIOCHEA, B.; ZAGO, M. A. Bases moleculares e citogenéticas. Oncogenes e Antioncogenes. **Hematologia Fundamentos e Prática**. São Paulo: Ed. Atheneu, p. 367-381. 2001

GERSEN, S. L.; KEAGLE, M. B. (Ed.). **The principles of clinical cytogenetics**. 2nd ed. Totowa: Humana Press, 2005. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/u768121n31w26831/>>.

GLOVER, D. M.; LEIBOWITZ, M. H.; MCLEAN, D. A.; PARRY, H. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. **Cell**, v. 81, p. 95-105, 1995.

GREAVES, M. F. Aetiology of acute leukaemia. **Lancet**, v. 349, p. 344-349, 1997.

GREAVES, M. F. Childhood leukaemia. **BMJ**, v. 324, p. 283-287, 2002.

GREAVES, M. Molecular Genetics, Natural History and the Demise of Childhood Leukaemia. **Eur F Cancer**, v. 35, n. 14, p. 1941-1953, 1999.

GRÜNWARD, H.; ROSNER, F. Chemicals and leukemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, eds. **Leukemia**, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders, p. 179-94, 1996.

HARTSIK-SEGRS, S.A.; ZWAAN, C. M.; EXALTO, C.; LUIJENDIJK, M. W. J.; CALVERT, V. S.; PETRICOIN, E. F.; EVANS, W. E.; REINHARDT, D., *et al.* Aurora kinases in childhood acute leukemia: the promise of aurora B as therapeutic target. **Leukemia**, v. 27, p. 560–568, 2013.

HEEREMA, N. A.; NACHMAN, J. B.; SATHER, H. N.; SENSEL, M. G.; LEE, M. K.; HUTCHINSON, R.; LANGE, B. J.; STEINHERZ, P. G.; BOSTROM, B.; GAYNON, P. S.; UCKUN, F. Hypodiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's cancer group. **Blood**, v. 94, p. 4036-4045, 1999.

HENRY J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 18. Ed. São Paulo: Editora Manole LTDA, p.814-816, 1995.

HEREDIA, F. F.; SOUSA, J. C.; CARVALHO, A. F.; MAGALHAES, S. M. M.; PINHEIRO, R. F. Aurora-B expression may not contribute to disease progression: a reflection of the heterogeneous pathogenesis? **Haematologica**, v. 97, p. 37-39, 2012.

HOELZER D, GÖKBUGET N, OTTMANN O, PUI CH, RELLING MV, APPELBAUM FR. Acute lymphoblastic leukemia. **Hematology**, 16-192, 2002.

HOLZER, D.; GOKBUGET, N. Recent approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults. **Critical reviews in oncology and hematology**. v. 36, p. 49-58, 2000.

HUANG, X. F.; LUO, S. K.; XU, J.; LI, J.; XU, D. R.; WANG, L. H. Aurora kinase inhibitory VX- 680 increases Bax/Bcl-2 ratio and induces apoptosis in Aurora-A-high acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 11, p. 2854-2865, 2008.

HUNGER, S. P. Chromosomal translocations involving the E2A gene in acute lymphoblastic leukemia: clinical features and molecular pathogenesis. **Blood**, v. 87, p. 1211–1224, 1996.

HUNGER, S. P.; LU, X.; DEVIDAS, M.; CAMITTA, B. M.; GAYNON, P. S.; WINICK, N. J.; REAMAN, G. H.; CARROLL, W. L. Improved Survival for Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia Between 1990 and 2005: A Report From the Children's Oncology Group. **J Clin Oncol**, v. 30, p. 1-21, 2012.

IKEUTI, P.S; BORIM, L.N.B; LUPORINI, R.L. Dor óssea e sua relação na apresentação inicial da leucemia aguda. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 28, n. 1, 2006.

IKEZOE, T.; YANG, J.; NISHIOKA, C.; TASAKA, T.; TANIGUCHI, A.; KUWAYAMA, Y. A novel treatment strategy targeting aurora kinases in acute myelogenous leukemia. **Mol Cancer Ther**, v. 6, p. 1851-1857, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Câncer na criança e no adolescente no Brasil. Dados dos registros de base populacional e mortalidade. 2008.
IRONS, R.D.; STILLMAN, W. S. The process of leukemogenesis. **Environ Health Perspect**, v. 104, sup. 6, p. 1239 – 1246, 1996.

JINGYAN, F.; MINGLEI, B.; QING, J. Roles of Aurora Kinases in Mitosis and Tumorigenesis. **Mol Cancer Res.** v.5, p. 1-10, 2007.

KAMADA, K.; YAMADA, Y.; HIRAO, T. Amplification/overexpression of Aurora-A in human gastric carcinoma: potential role in differentiated type gastric carcinogenesis. **Oncol Rep.** v. 12, p. 593-599, 2004.

KATAYAMA, H.; BRINKLEY, W. R.; SEM, S. The Aurora kinases: Role in cell transformation and tumorigenesis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 22, p. 451-464, 2003.

KATAYAMA, H.; OTA, T.; JISAKI, F. Mitotic kinase expression and colorectal cancer progression. **J Natl Cancer Inst.** v. 91, p. 1160-1162, 1999.

KE, Y. W.; DOU, Z.; ZHANG, J.; YAO, X. B. Function and regulation of Aurora/Ipl1p kinase family in cell division. **Cell Res.**, v. 13, p.69-81, 2003.

KIMURA, M.; MATSUDA, Y.; YOSHIOKA, T; OKANO, Y. Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. **J. Biol. Chem.** v.274, p. 7334-7340, 1999.

LEE, R. G. *et al.* **Wintrobe Hematologia Clínica.** I. ed. São Paulo: Manole, 1998.

LEITÃO, R. S. **Neutropenia febril em pacientes com leucemia linfóide aguda.** Dissertação (Mestrado em doenças tropicais e infecciosas) Universidade do estado do Amazonas, Manaus, 2007.

LI, J.; THOMPSON, T. D.; MILLER, J. W.; POLLACK, L. A.; STEWART, S. L. Cancer incidence among children and adolescents in the United States, 2001-2003. **Pediatrics**, v. 121, n. 6, p. 1470-1477, 2008.

LO NIGRO, L. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Pediatr Hematol Oncol**, v.35, p. 245-252, 2013.

LUCENA-ARAUJO, A. R.; DE OLIVEIRA, F. M.; LEITE-CUEVA, S. D.; DOS SANTOS, G. A.; FALCAO, R. P.; REGO, E. M. High expression of AURKA and AURKB is associated with unfavorable cytogenetic abnormalities and high white blood cell count in patients with acute myeloid leukemia. **Leuk Res**, v. 35, p. 260-264, 2011.

LUKASIEWICZ, K. B.; LINGLE, W. L. Aurora A, centrosome structure, and the centrosome cycle. **Environ Mol Mutagen**, v. 50, p. 602-619, 2009.

MA, S. K.; CHAN, G. C.; HA, S. Y.; CHIU, D. C.; LAU, Y. L.; CHAN, L. C. Clinical presentation, hematologic features and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leucemia: a review of 73 cases in Hong Kong. **Hematol Oncol**, v. 15, n. 3, p. 141-149, 1997.

MARGOLIN, J.F.; STEUBER, C.P.; POPLACK, D.G. Acute lymphoblastic leukemia. **Principles and Practice of Pediatric Oncology.** 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 538-590, 2006.

- MARUMOTO, T.; ZHANG, D.; SAYA, H. Aurora-A - a guardian of poles. **Nature Reviews**, v. 5, p. 42-50, 2005.
- MERALDI, P.; HONDA, R.; NIGG, E. A. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. **EMBO J**, v. 21, p.483-492, 2002.
- MINASI, Lysa Bernardes. **Leucemia linfóide aguda na infância: importância do diagnóstico citogenético convencional como fator prognóstico**. 2009. Dissertação (Mestrado em Genética) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2009.
- MULLIGHAN, C. G. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. **Hematol Am Soc Hematol Educ Program**, p. 389-396, 2012.
- MURATA-HORI, M.; TATSUKA, M.; WANG, Y. L. Probing the dynamics and functions of Aurora B kinase in living cells during mitosis and cytokinesis. **Mol Biol Cell**, v. 13, p. 1099-1108, 2002.
- NAOUM F. A.; NAOUM P.C. **Hematologia Laboratorial - Leucócitos** 1. ed. São Jose do Rio Preto: Academia de Ciências e Tecnologia, p. 91-98, 2006.
- NIGG, E.A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, p. 21-32, 2001.
- NIKONOVA, A. S.; ASTSATUROV, I.; SEREBRIISKII, I. G.; DUNBRACK JR, R. L.; GOLEMIS, E. A. Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. **Cell. Mol. Life Sci.** v.70, p. 661-687, 2013.
- PAULSSON, K.; JOHANSSON, B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. **Genes Chromosom Cancer**, v. 48, p. 637-660, 2009.
- PESSEGUÉ, E.; WEISMAN, I.L. Leukemic stem cells: where do they come from? **Stem Cell Rev**, v. 1, n. 3, p. 181-188, 2005.
- PIETERS, R.; DEN BOER, M. L.; DURIAN, M.; JANKA, G.; SCHMIEGELOW, K.; KASPERS, G.; WERING, E. V.; VEERMAN, A. J. P. Relation between age, immunophenotype and *in vitro* drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia – implications for treatment of infants. **Leukemia**, v. 12, p. 1344-1348, 1998.
- PUI, C. H. Acute lymphocytic leukemia. **Pediatr Clin North Am**, v. 44, n. 4, p. 831-846, 1997.
- PUI, C. H.; EVANS, W. E. Acute lymphoblastic leukaemia. **N Engl J Med**, v. 339, n. 9, p. 605-615, 1998.
- PUI, C. H.; JEHA, S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 2, p. 149-165, 2007.
- PUI, C. H.; RELING, M. V.; DOWING, J. R. Acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 350, p. 1535-1548, 2004.

PUI, C.H. Childhood leucemias. **N Engl J Med**. v. 332, p. 1618-1630, 1995.

PUI, C.H.; BEHM, F.G.; CRIST, W.M. Clinical and Biologic Relevance of Immunologic Marker Studies in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**, v. 82, n. 2, p. 343-362, 1993.

RIBEIRO, R. C.; ABROMOWITCH, M.; RAIMONDI, S. C.; MURPHY, S. B.; BEHM, F.; WILLIAMS, D. L. Clinical and biologic hallmarks of the Philadelphia chromosome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 70, p. 948-953, 1987.

RODRIGUES, C.S.C.; OLIVEIRA, C.L.; CARVALHO, C.N.; SILVA, A.C.; RAPHAEL, P.; NAVEGA, S.C.; ROCHA, F.H. Z.; SOUZA, M.H.F.O. Avaliação antropométrica de crianças com Leucemia Linfoblástica Aguda. **Nutrição em pauta**, v. 81, p. 39-41, 2006.

ROSE-INMAN, H.; KUEHL, D. Acute Leukemia. **Emerg Med Clin N Am**, v. 32, p. 579–596, 2014.

SANDBERG, A. A.; CHEN, Z. FISH analysis. In: FAGUET, G. B. **Hematologic malignancies: methods and techniques**. Totowa: Elsevier, p. 19-42, 2001. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/n483157288592w2u/#section=83797&page=1>>.

STILLER, C. A.; KROLL, M. E. Time trends in incidence 1966-2000. In: STILLER C. A., editor. Childhood cancer in Britain: incidence, survival, mortality. **Oxford University Press**, 2007.

SUNKEL, C. E.; GLOVER, D. M. Polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. **J. Cell Sci**. V. 89, p. 25-38, 1988.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E; HARRIS, N. L.; JAFFI, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H. Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. **IARCpress**, p. 157-178, 2008.

TAKEUCHI, S.; KOIKE, M.; PARK, S. The ATM gene and susceptibility to childhood T-cell acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Haematology**. v. 103, p. 536-538, 1998.

TEUFFEL, O.; STANULLA, M.; CARIO, G.; LUDWING, W. D.; ROTTGERS, S.; SCHAFER, B. W. Anemia and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Haematologica**, v. 93, n. 11, p. 1652-1657, 2008.

TONG, T.; ZHONG, Y.; KONG, J. *et al.* Overexpression of Aurora-A contributes to malignant development of human esophageal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res.**; v. 10, p. 7304-7310, 2004.

VARMUS, H.E. The molecular genetics of cellular oncogenes. **Annu Rev Genet**, v. 18, p. 553-612, 1984.

VERAS, G. L. R. R.; ARAGÃO, V. M. F.; SANTOS, A. M. Leucemia linfoblástica aguda em São Luís. Aspectos clínicos e terapêuticos. **RBM**, v. 69, n. 7, p. 173-181, 2008.

WIEMELS, J. L.; CAZZANIGA, G.; DANIOOTTI, M.; EDEN, O. B.; ADDISON, G.M.; MASERA, G.; SAHA, V.; BIONDI, A.; GREAVES, M. F. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. **Lancet**, v. 354, p. 1499-1503, 1999.

WIEMELS, J. Perspectives on the causes of childhood leucemia. **Chemico-Biological Interactions**, v. 196, p. 59-67, 2012.

WOO, J. S.; ALBERTI, M. O.; TIRADO, C. A. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 3, n. 16, 2014.

YE, D.; GARCIA-MANERO, G.; KANTARJIAN, H. M.; XIAO, L.; VADHAN-RAJ, S.; FERNANDEZ, M. H. Analysis of Aurora kinase A expression in CD34(+) blast cells isolated from patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **J Hematop**, v. 2, p. 2-8, 2009.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo. Atheneu, 2001.

ZHOU, H. *et al.* Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. **Nature Genet**, v. 20, p. 189-193, 1998.

ZUCKERMAN, T.; ROWE, J.M. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leucemia. **F1000Prime Rep**, v.6, n. 59, p. 1-5, 2014.

ANEXO A

Cat No/REF: KI-10721

Repeat-Free™ Poseidon™ AURKA (20q13) & 20q11 probe

Introduction:
The **AURKA (20q13)** specific DNA probe is optimized to detect copy numbers of the AURKA gene region at region 20q13. The 20q11 specific DNA probe is included to facilitate chromosome identification.

Critical region 1 (red): The **AURKA (20q13)** gene region probe is direct-labeled with PlatinumBright[®]950.

Control region 2 (green): The **20q11** control DNA probe is direct-labeled with PlatinumBright[®]950.

Reagent:
Poseidon™ probes are direct-labeled DNA probes provided in a ready-to-use format.

Patterns:
The **AURKA (20q13)** probe is designed as a dual-color assay to detect amplifications at 20q13. Amplifications involving the AURKA gene region at 20q13 will show several red signals, while the control at the chromosome 20q11 specific region will provide 2 signals. Two single color red (R) and green (G) signals will identify the normal chromosomes 20 (2R2G).

Expected Signals	Normal Signal Pattern	20q13 Amplification
	2R2G	3+R2G

References:
Sen et al, 2002, J of Nat. Canc Inst. 94: 1320-1329.
Lassmann et al, 2007, Clin Cancer Res. 13: 4083-4091.

Warning and precautions: In case of emergencies check MSDS sheets for medical help. MSDS sheets may be obtained by either contacting Kreatech Technical Support or visiting www.kreatech.com. All materials should be disposed of according to your institution's guidelines for hospital waste disposal.

Reagent Storage and Handling: Store 2-8 °C. Reagents are stable until the expiration date on the wall label.

TECHNICAL SUPPORT
Technical support is available at www.kreatech.com or toll free at +1 866 572-1432 or via e-mail: techservices@kreatech.com.

CUSTOMER SERVICE
Poseidon™ probes may be ordered through Kreatech Customer Service toll free at +1 866 572-1432 or order via e-mail: customerservice@kreatech.com.

AM-KI-10721_R1.0

POSEIDON is a trademark of Kreatech Diagnostics, REPEAT-FREE is a trademark of Veridex, LLC

RF™ POSEIDON™ FISH DNA PROBES

Product Information

KI-10721
AURKA (20q13) / 20q11

RUO - Research Use Only
Not for use in diagnostic procedures

KREATECH
DIAGNOSTICS

KREATECH Diagnostics
10321G, Amsterdam
The Netherlands
www.kreatech.com

Published Oct 2010

8°C
long term storage

500 KB

600 KB

Not to scale

ANEXO B

Cat No/REF: KI-10722

Repeat-Free™ Poseidon™ AURKB (17p13) / SE 17 probe

Introduction:
The **AURKB (17p13)** specific DNA Probe is optimized to detect copy numbers of the AURKB gene region at region 17p13. The Chromosome 17 Satellite Enumeration (SE) probe is included to facilitate chromosome identification.

Critical region 1 (red): The **AURKB (17p13)** gene region probe is direct-labeled with PlatinumBright1550.

Control region 2 (green): The **SE 17** control DNA probe is direct-labeled with PlatinumBright495.

Reagent: Poseidon™ probes are direct-labeled DNA probes provided in a ready-to-use format.

Patterns: The **AURKB (17p13)** probe is designed as a dual-color assay to detect amplifications at 17p13. Amplifications involving the AURKB gene region at 17p13 will show several red signals while the control at the chromosome SE 17 specific region will provide 2 signals. Two single color red (R) and green (G) signals will identify the normal chromosomes 17 (2R2G).

Expected Signals	Normal Signal Pattern	17p13 Amplification
	2R2G	3+R2G

References: Smith et al. 2005. Br J Cancer, 93: 719-729

Warning and precautions: In case of emergencies check MSDS sheets for medical help. MSDS sheets may be obtained by either contacting Kreatech Technical Support or visiting www.kreatech.com. All materials should be disposed of according to your institution's guidelines for hospital waste disposal.

Reagent Storage and Handling: Store 2-8 °C. Reagents are stable until the expiration date on the vial label.

TECHNICAL SUPPORT
Technical support is available at www.kreatech.com or toll free at +1 866 572-1432 or via e-mail: techservices@kreatech.com.

CUSTOMER SERVICE
Poseidon™ probes may be ordered through Kreatech Customer Service toll free at +1 866 572-1432 or order via e-mail: customerservice@kreatech.com.

AM-KI-10722_R1.0

POSEIDON is a trademark of Kreatech Diagnostics. REPEAT-FREE is a trademark of Veridex, LLC

RT™ POSEIDON™ FISH DNA PROBES

Product Information

KI-10722
AURKB (17p13) / SE 17

RUO - Research Use Only
Not for use in diagnostic procedures

KREATECH

KREATECH
Vianweg 20
1032 LG Amsterdam
The Netherlands
www.kreatech.com
Published Oct 2010

20°C
80°C

Not to scale

ANEXO C



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA, MESTRADO EM PATOLOGIA

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
 PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA**

Convidamos o (a) seu/sua filho (a) (ou menor de idade que está sob sua responsabilidade para participar, como voluntário (a), da pesquisa intitulada como “**Avaliação dos genes *AURKA E AURKB* em pacientes pediátricos portadores de LLA**”. O objetivo dessa pesquisa é estudar a genética da Leucemia Linfóide Aguda. Esse estudo visa uma melhor compreensão do desenvolvimento dessa doença nas crianças, ajudando no acompanhamento desses pacientes e em escolhas de tratamentos mais eficazes.

Esta pesquisa é orientada pela Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, que reside na Rua Pereira Valente, 640, Apto 701, bairro Meireles, Fortaleza, CE; telefone: (085) 33668264. Também participarão os seguintes pesquisadores: Luana Letícia Alves Dutra, telefone (085) 88535959.

Para que a criança possa participar da pesquisa necessitamos que o (a) senhor (a) autorize a obtenção e uso das amostras coletadas no exame do mielograma. Não será colhida nenhuma amostra além da necessária para a realização do exame. As amostras serão utilizadas para a realização de exames que visam buscar alterações no sangue. A coleta será realizada no Hospital Infantil Albert Sabin do Estado do Ceará, localizado na Rua Tertuliano Sales, 544, Vila União.

A participação na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material, sendo que, ao participar da pesquisa, não ficará exposto a riscos, podendo desistir de participar, a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes.

Esse documento será impresso em duas vias, ficando uma com o entrevistado e a outra com a pesquisadora.

Certo e ciente dos detalhes acima descritos, e, por concordar com todos os termos acima expostos, por vontades próprias, livres e conscientes, o propósito de participar do presente estudo.

Fortaleza, ____ de _____ de _____.

Assinatura do responsável

Assinatura de quem obteve o termo

ANEXO D

HOSPITAL INFANTIL ALBERT
SABIN - CE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS E SUA ASSOCIAÇÃO COM MUTAÇÕES NOS GENES AURO-A E AURO-B EM PACIENTES PEDIÁTRICOS PORTADORES DE LLA

Pesquisador: Luana Letícia Alves Dutra

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 19865413.8.3001.5042

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 603.145-0

Data da Relatoria: 12/02/2014

Apresentação do Projeto:

A leucemia linfóide aguda (LLA) é um tipo de neoplasia hematológica maligna derivada de células linfocitárias indiferenciadas com consequente acúmulo de células jovens e substituição da população normal de células sanguíneas. A LLA é a neoplasia mais frequente na infância, correspondendo a 30-35% dos casos de câncer nessa faixa etária. Existem alguns fatores de risco associados a essa doença, como: efeitos da radiação, exposição a drogas, fatores genéticos, fatores imunológicos e vírus. Os genes Auroraquinase A, B e C estão envolvidos no ciclo celular e codificam proteínas de extrema importância na regulação do processo de mitose - separação das cromátides irmãs durante a metáfase/anáfase. Os miRNAs são RNAs de cadeia simples compostos por aproximadamente 22 nucleotídeos e estão envolvidos na regulação gênica pós-transcricional, podendo direcionar e regular uma ampla variedade de processos fisiológicos, tais como a progressão do ciclo celular e apoptose. O objetivo desse estudo é avaliar o perfil de expressão de microRNAs e sua associação com eventuais mutações nos genes AURO- A E AURO- B em pacientes pediátricos portadores de LLA. Trata-se de um estudo transversal, observacional e analítico. A amostra utilizada no estudo será de aproximadamente 50 pacientes. O estudo citogenético dos pacientes será realizado pela técnica de

Endereço: Rua Tertuliano Sales, 544

Bairro: Vila União

CEP: 60.410-790

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (853)101-4212

Fax: (853)101-4212

E-mail: cep@hlas.ce.gov.br

HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN - CE



Continuação do Parecer: 603.145-0

Banda G. A análise de mutações nos genes AURO-A e AURO-B será pela técnica de Fluorescência por Hibridização in Situ (FISH), com o uso de sondas específicas para cada gene. Para avaliação quantitativa dos miRNAs será desenvolvida a técnica de Real Time Δ PCR. As análises serão realizadas no programa estatístico SPSS15.0 software. O nível de significância estatística considerado para todas as análises será $p < 0.05$.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Avaliar o perfil de expressão de microRNAs e sua associação com eventuais mutações nos genes Auro- A e Auro- B em pacientes pediátricos portadores de LLA.

Objetivos específicos: *Avaliar o perfil demográfico (idade, gênero e etnia) da população em estudo; *Identificar alterações genéticas nos pacientes em estudos a partir do estudo citogenético pela técnica de Banda G; *Identificar eventuais mutações nos genes Auro- A e Auro- B pela técnica de Hibridização in situ por fluorescência (FISH); *Avaliar o perfil de expressão de miRNAs por qRT-PCR; *Associar o estudo citogenético com mutações nos genes Auro- A e Auro- B; *Associar o perfil de expressão de miRNAs com as alterações genéticas;

* Associar a expressão de miRNAs com mutações nos genes Auro- A e Auro- B; *Relacionar a expressão de miRNAs, citogenética e mutações nos genes Auro- A e Auro- B com a classificação EGIL dos pacientes em estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos para os pacientes serão mínimos, uma vez que não será colhida nenhuma amostra além da que é usualmente colhida pelo serviço do centro de referência onde o estudo será realizado.

Benefícios: Este estudo contribuirá para um melhor entendimento da fisiopatologia da LLA, levando a conhecer possíveis desfechos de forma prévia, visando à melhoria da qualidade de vida dos pacientes, contribuindo para o prognóstico dessa doença que apresenta elevada taxa de morbidade e mortalidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo transversal, observacional e analítico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentação: esclarecedora. Embasamento teórico bem fundamentado. Objetivos adequados ao estudo e demais documentos em conformidade. Cronograma atualizado. Apresentou TCLE e incluiu Termo de Assentimento para pesquisa envolvendo menores.

Endereço: Rua Tertuliano Sales, 544
 Bairro: Vila União CEP: 60.410-790
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (853)101-4212 Fax: (853)101-4212 E-mail: cep@hlias.ce.gov.br

HOSPITAL INFANTIL ALBERT
SABIN - CE



Continuação do Parecer: 603.145-0

Banda G. A análise de mutações nos genes AURO-A e AURO-B será pela técnica de Fluorescência por Hibridização in Situ (FISH), com o uso de sondas específicas para cada gene. Para avaliação quantitativa dos miRNAs será desenvolvida a técnica de Real Time ζ PCR. As análises serão realizadas no programa estatístico SPSS 15.0 software. O nível de significância estatística considerado para todas as análises será $p < 0.05$.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Avaliar o perfil de expressão de microRNAs e sua associação com eventuais mutações nos genes Auro- A e Auro- B em pacientes pediátricos portadores de LLA.

Objetivos específicos: *Avaliar o perfil demográfico (idade, gênero e etnia) da população em estudo; *Identificar alterações genéticas nos pacientes em estudos a partir do estudo citogenético pela técnica de Banda G; *Identificar eventuais mutações nos genes Auro- A e Auro- B pela técnica de Hibridização in situ por fluorescência (FISH); *Avaliar o perfil de expressão de miRNAs por qRT-PCR; *Associar o estudo citogenético com mutações nos genes Auro- A e Auro- B; *Associar o perfil de expressão de miRNAs com as alterações genéticas;

* Associar a expressão de miRNAs com mutações nos genes Auro- A e Auro- B; *Relacionar a expressão de miRNAs, citogenética e mutações nos genes Auro- A e Auro- B com a classificação EGIL dos pacientes em estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos para os pacientes serão mínimos, uma vez que não será colhida nenhuma amostra além da que é usualmente colhida pelo serviço do centro de referência onde o estudo será realizado.

Benefícios: Este estudo contribuirá para um melhor entendimento da fisiopatologia da LLA, levando a conhecer possíveis desfechos de forma prévia, visando à melhoria da qualidade de vida dos pacientes, contribuindo para o prognóstico dessa doença que apresenta elevada taxa de morbidade e mortalidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo transversal, observacional e analítico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentação: esclarecedora. Embasamento teórico bem fundamentado. Objetivos adequados ao estudo e demais documentos em conformidade. Cronograma atualizado. Apresentou TCLE e incluiu Termo de Assentimento para pesquisa envolvendo menores.

Endereço: Rua Tertuliano Sales, 544
 Bairro: Vila União CEP: 60.410-790
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (853)101-4212 Fax: (853)101-4212 E-mail: cep@hias.ce.gov.br