



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA

DANIEL WILLIAN LUSTOSA DE SOUSA

**EXPRESSÃO DA L-SELECTINA E DO CD44 NAS LEUCEMIAS
LINFÓIDES AGUDAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

FORTALEZA

2009

DANIEL WILLIAN LUSTOSA DE SOUSA

**EXPRESSÃO DA L-SELECTINA E DO CD44 NAS LEUCEMIAS
LINFÓIDES AGUDAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Orientador: Prof. Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira

FORTALEZA

2009

S696e Sousa, Daniel Willian Lustosa de
 Expressão da L-selectina e do CD44 nas leucemias
 linfóides agudas em crianças e adolescentes/
Daniel Willian Lustosa de Sousa. – Fortaleza, 2009.
 119f. : Il.

 Orientador: Prof. Dr. Francisco Valdeci de Almeida
 Ferreira

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do
Ceará. Programa de Pós-Graduação em Patologia,
Fortaleza-Ce, 2009

 1. Leucemia linfóide - criança 2. Selectina L 3.
 Antígenos CD 44 4. Citometria de fluxo I. Ferreira,
Francisco Valdeci de Almeida (orient.) II. Título

CDD: 616.99419

DANIEL WILLIAN LUSTOSA DE SOUSA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Aprovada em: 10/09/2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira
Departamento de Patologia e Medicina Legal – UFC (Orientador)

Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho
Departamento de Patologia e Medicina Legal – UFC

Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas
Departamento de Patologia e Medicina Legal - UFC

Prof.^a Dr.^a Selma Lessa de Castro
Serviço de Oncologia e Hematologia Pediátrica
Hospital Infantil Albert Sabin

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo amor incondicional e o apoio em todos os momentos...

Aos nossos pequenos pacientes e seus familiares, grandes guerreiros e combatentes fortes na luta diária contra o câncer.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira**, orientador do trabalho, que com competência e seriedade contribuiu para a finalização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marcus Davis Braga**, orientador inicial do trabalho, por ter me acolhido como orientando, pelo incentivo e confiança.

Ao **Dr. Jesamar Correa de Matos**, pelos seus ensinamentos na citometria de fluxo, pela sua disponibilidade e colaboração na realização do trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marcos Venícius Lopes**, pela inestimável colaboração e minuciosa análise estatística.

A coordenadora do Mestrado em Patologia **Prof^a. Dr^a. Margarida Pompeu e demais professores**, pelo empenho e inúmeros esforços em nos oferecer uma pós-graduação com qualidade.

Ao **Prof. Dr. Antônio Aldo Melo Filho**, pela revisão dos manuscritos e suas importantes críticas e sugestões.

A **Dr^a. Ana Paula Constancio e Dr^a. Georgina Goes Lins**, dedicadas amigas de trabalho, pelo tempo cedido para que se concretizasse este projeto.

Ao Serviço de Hematologia do HUWC-UFC, em especial **Dr^a Silvia Magalhães** pela liberação parcial de minha carga horária para a realização do mestrado.

As bibliotecárias, **Rosane Costa (Centro Ciências da Saúde – UFC) e Cynthia Brasil (HC-ICC)**, sempre tão atenciosas e dispostas a ajudar.

As secretárias da Pós-graduação, **Paula Palácio e Marli**, pela disponibilidade e dedicação.

Aos funcionários do laboratório do Centro de Referência Dr. Murilo Martins – HIAS: **Dra Fátima Guerreiro, Hélio, Diego, Vonete**, pela receptividade, carinho, paciência e disposição para me ajudar no laboratório.

A todos os médicos e funcionários do **Serviço de Oncologia Pediátrica/Peter Pan-HIAS**, pela boa acolhida em seu serviço.

As funcionárias do **Centro de Oncologia Pediátrica-HLF**, pelo carinho e dedicação.

Aos médicos e funcionárias do **Serviço de Oncologia Pediátrica-HCC**, pela dedicação, humanização e carinho em cuidar de nossas crianças e seus familiares.

A todos os **colegas do Curso de Mestrado**, pelo apoio e amizade durante estes anos de convivência.

A todos que colaboraram ou participaram desta pesquisa, o meu muito obrigado.

“Talvez mais que teoricamente justos, esteticamente sensíveis ou politicamente inteligentes, o que nós precisamos mesmo é ser ativamente bons”.

José Saramago

RESUMO

Expressão da L-Selectina e do CD44 em Leucemias Linfóides Agudas em Crianças e Adolescentes

Introdução – Alterações na expressão ou função das moléculas de adesão (MA) nas células leucêmicas podem contribuir para a evolução e no comportamento biológico das leucemias agudas. A expressão aumentada nas LLAs parece relacionar-se aos mecanismos de disseminação extramedular dos linfoblastos, infiltração do SNC e formação de massas tumorais. **Objetivos** – Analisar a expressão da L-selectina e do CD44 nas LLAs em crianças e adolescentes. Avaliar os fatores prognósticos (idade, sexo, leucometria ao diagnóstico, imunofenótipo, classificação FAB, EGIL, índice de DNA e resposta ao tratamento de indução) e as apresentações extramedulares das LLAs e correlacioná-los com essas MA. **Pacientes e Métodos** – Foram avaliados 76 pacientes com LLA, tratados com o Protocolo GBTLI-LLA. O diagnóstico foi baseado em critérios FAB, imunofenotípicos (EGIL) e citogenéticos. A expressão das MA foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando tripla marcação. O anticorpo monoclonal CD45-PerCP (Immunotech®) foi utilizado como marcador dos linfoblastos. O CD44-PE (Clone HP2/9 - Immunostep®) e o CD62L-FITC (Clone HI62L - Immunostep®) foram utilizados para a marcação das MA. Para a análise das amostras e o cálculo da intensidade média de fluorescência foi utilizado o programa Cell Quest. Na análise estatística utilizou-se o software SPSS 16.0. A associação entre as variáveis, os fatores prognósticos e resposta foi realizada com os testes de Qui-quadrado, exato de Fisher e Mann-Whitney. Sobrevida global foi determinada por curvas Kaplan-Meier e teste log-rank. Análise multivariada por modelo proporcional de Cox foi utilizada para assegurar a independência dos fatores prognósticos. **Resultados** – A média de idade foi $6,3 \pm 0,5$ anos (5m -17a) e predominou o sexo masculino (65%). Ao diagnóstico os achados clínicos foram: hepatomegalia (63%), esplenomegalia (58%) e linfadenomegalia (44%). A infiltração SNC ocorreu em 6,6% dos casos e o alargamento de mediastino em 11,8%. Quanto ao risco, 54% eram baixo risco e 46% alto risco. A classificação FAB determinou 83% como L1 e 17% L2. Diagnóstico de LLA-B foi mais frequente (89,5%) e o da LLA-T em 10,5% dos pacientes. O subtipo EGIL mais prevalente foi B II e B III, 51,5% e 45% respectivamente. O IDNA ≥ 1.16 foi encontrado em 19% dos pacientes e associou-se a bom prognóstico. Na avaliação do D8, 95% dos pacientes apresentaram contagem de blastos $< 1000/\text{mm}^3$ e leucócitos $< 5.000/\text{mm}^3$. A taxa de remissão de indução foi de 95% e ocorreram 2,6% de óbitos na indução. Observou-se uma maior expressão do CD44 na LLA-T (87,5%/ IMF= $150,44 \pm 20,29$), porém sem significância estatística. LLAs com massa tumoral apresentaram 84% de expressão do CD44, quando comparada a 52% das LLAs sem massa tumoral ($p=0.01$; OR=4,8). Expressão aumentada da L-selectina na LLA-T (87,5%/IMF= $272,33 \pm 52,72$) foi estatisticamente significativa ($p=0,004$), comparado a LLA-B (54,5%/ IMF= $115,90 \pm 12,75$). Não houve correlação entre os outros fatores prognósticos e essas MA. Na análise multivariada as variáveis de maior impacto para a sobrevida foram: a leucometria ao diagnóstico, sexo, imunofenótipo T e a L-selectina. **Conclusão** – A expressão da L-selectina e do CD44 estão aumentadas nas LLAs estudadas, principalmente na LLA-T. O CD44 correlacionou-se com LLAs com massas tumorais e parece estar relacionado aos mecanismos de disseminação extramedular dos linfoblastos

Palavras-chave – Leucemia linfóide aguda, LLA, crianças, fatores prognósticos, moléculas de adesão, CD44, CD62L, L-selectina.

ABSTRACT

Expression of adhesion molecules L-selectin and CD44 in childhood acute lymphoblastic leukemia

Introduction – Altered expression or function of adhesion molecules on leukemic blasts may contribute to the evolution of acute leukemia and its biological behavior. The elevated expression of adhesion molecules in ALL might be correlated with the extramedullary dissemination of blast cells, CNS involvement and leukemia tumor burden. **Purpose** – To analyze the expression of L-selectin and CD44 in ALL in children and adolescents. As well as to evaluate the prognostic factors (age, gender, initial leukocyte count, immunophenotype, FAB and EGIL classification, DNA index and early response to treatment) and the extramedullary presentation of ALL, to finally correlate the prognostic factors with these adhesion molecules. **Patients and Methods** – From November 2007 to November 2008, 76 patients with newly diagnosed ALL started on Brazilian GBTLI-ALL Protocol. The diagnosis was based on cytological, immunophenotypic, and cytogenetic methods. The mean fluorescence intensity (MFI) and the percentage of the adhesion molecules blasts cells was measured by flow cytometry using triple staining with McAb directly conjugated. CD45-PerCP positive cells were gated for blasts analysis. Anti-CD44-PE (Clone HP2/9 - Immunostep®) and CD62L-FITC (Clone HI62L - Immunostep®) were used to mark the adhesion molecules. The Cell Quest program was used for data acquisition and analysis. Statistical analysis was done by SPSS 16.0 Software. The association of features, prognosis and response to treatment was assessed by Chi-square, Fisher exact and Mann-Whitney tests. Overall survival curves were constructed by the Kaplan-Meier method and the log-rank test. Multivariate Cox regression analysis showed independent prognostic factors. **Results** – The mean age at diagnosis was 6.3 ± 0.5 years (range 9mo to 17yr) and 65% of them were boys. Clinical findings were hepatomegaly (63%), splenomegaly (58%), lymphadenopathy (44%). CNS involvement was detected in 6.6% of cases and mediastinal mass appeared in 11.8% of them. Patients were classified into low risk (54%) and high risk (46%). FAB classification identified 83% as L1 and 17% as L2. Immunophenotypically, 89.5% of patients were classified as B-lineage ALL and 10.5% as T-lineage ALL. The most frequent EGIL subtype was B common and pre-B-ALL (51.5% and 45.5%, respectively). DNA index greater than 1.16 was found in 19% of the patients and was associated with favorable prognosis. On the D8 evaluation, 95% of the patients had blast count lower than $1.000/\text{mm}^3$ and leukocyte count lower than $5.000/\text{mm}^3$. The remission induction rate was 95% and there was a rate of 2.6% of death during induction therapy. CD44 had greater expression to the rate of 87.5% in T-cell ALL (MFI= 150.44 ± 20.29) with no statistical correlation. A significant positive correlation was demonstrated between 84% of CD44 expression and Leukemia burden tumor cases ($p=0.01$; $OR=4.8$). There was statistical correlation between L-selectin expression (87.5%/MFI= 272.33 ± 52.72) and T-cell ALL ($p=0,004$). No significant correlation was detected between L-selectin and CD44 expression and other prognostic factors. Multivariate statistical analysis (adjusted for overall survival) indicated that initial leukocyte count, gender, T immunophenotype and L-selectin were independent factors. **Conclusion** – L-selectin and CD44 expressions were elevated in ALL studied, mainly in T-cell ALL. The research demonstrated that there is an association between CD44 expression and leukemia tumor burden, which might be involved in the dissemination of leukemic cells and the progression of the disease.

Keywords – acute lymphoblastic leukemia, ALL, children, prognostic factors, adhesion molecules, CD44, CD62L, L-selectin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da estrutura das diferentes moléculas de adesão.....	19
Figura 2	Estrutura das selectinas: L – domínio da selectina tipo C aminoterminal; E – domínio do fator de crescimento epidermal (EGF); C – repetições consensuais.....	23
Figura 3	Modelo da estrutura do CD44 – O diagrama da esquerda mostra os quatro principais domínios do CD44 e à direita mostra a região de inserção dos éxons variantes das várias isoformas (CD44v.....	26
Figura 4	Correlação do imunofenótipo com a sobrevida global pela Curva de Kaplan-Meier nos 76 pacientes com LLA.....	61
Figura 5	Histogramas do IDNA, por citometria de fluxo, em pacientes com LLA diplóide (A) e LLA hiperdiplóide (B).....	62
Figura 6	Expressão das MA na LLA de linhagem B.....	65
Figura 7	Expressão das MA na LLA de linhagem T.....	65
Figura 8	Correlação do CD44 com a sobrevida global pela Curva de Kaplan-Meier nos 76 pacientes com LLA.....	68
Figura 9	Correlação da L-selectina com a sobrevida global pela Curva de Kaplan-Meier nos 76 pacientes com LLA.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Famílias das Moléculas de adesão: ligantes e distribuição celular.....	27
Tabela 2	Classificação Imunológica das LLAs – EGIL.....	32
Tabela 3	Sistema de pontuação proposto pelo grupo EGIL para as leucemias bifenotípicas.....	35
Tabela 4	Fatores prognósticos nas LLAs.....	39
Tabela 5	Painel de anticorpos monoclonais utilizado para imunofenotipagem e avaliação da expressão das moléculas de adesão.....	56
Tabela 6	Características clínicas dos 76 pacientes estudados com LLA.	59
Tabela 7	Características laboratoriais dos 76 pacientes estudados com LLA.....	60
Tabela 8	Características da LLA-B e LLA-T dos 76 pacientes estudados.....	61
Tabela 9	Expressão da L-selectina e do CD44 em linfócitos e granulócitos de indivíduos normais. Fortaleza, 2009.....	63
Tabela 10	Expressão do CD44 nas LLAs. Fortaleza, 2009.....	65
Tabela 11	Análise da associação entre a positividade do CD44 e os fatores prognósticos das LLAs. Fortaleza, 2009.....	64
Tabela 12	Análise da associação entre a positividade do CD44 e a Classificação FAB, EGIL e citogenética das LLAs. Fortaleza, 2009.....	66
Tabela 13	Análise de diferença de média/ mediana do CD44IMF segundo características clínicas dos pacientes. Fortaleza, 2009.....	67
Tabela 14	Análise da associação entre a positividade do CD44 e a resposta ao tratamento de indução das LLAs. Fortaleza, 2009.....	67
Tabela 15	Análise da associação entre a positividade do CD44 e o acometimento extramedular e as formas tumorais das LLAs.	69

	Fortaleza, 2009.....	
Tabela 16	Expressão da L-selectina nas LLAs. Fortaleza, 2009.....	70
Tabela 17	Análise da associação entre a positividade da L-selectina e os fatores prognósticos das LLAs. Fortaleza, 2009.....	70
Tabela 18	Análise da associação entre a positividade da L-selectina segundo a Classificação FAB, EGIL e citogenética das LLAs. Fortaleza, 2009.....	71
Tabela 19	Análise de diferença de média / mediana do IMF da L-selectina segundo Classificação FAB, EGIL e citogenética das LLAs. Fortaleza, 2009.....	72
Tabela 20	Análise da associação entre a positividade da L-selectina e a resposta ao tratamento de indução das LLAs. Fortaleza, 2009.....	72
Tabela 21	Análise da associação entre a positividade da L-selectina e o acometimento extramedular e formas tumorais das LLAs. Fortaleza, 2009.....	74
Tabela 22	Resultados do modelo de riscos proporcionais de Cox dos fatores prognósticos das LLAs estudadas. Fortaleza, 2009.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMO	Anticorpos monoclonais
AR	Alto risco para recaída
BFM	Grupo alemão Berlin-Frankfurt-Munich
CALLA	Antígeno comum da LLA
CD	Cluster of Differentiation
CD62L	L-Selectina, LAM-1, LECAM-1
DRM	Doença Residual Mínima
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EGIL	Grupo Europeu para Caracterização das Leucemias
FAB	Franco-Americana-Britânica
FISH	Hibridização in situ
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Forward scatter (tamanho)
GBTLI	Grupo Brasileiro para o Tratamento das Leucemias na Infância
Hb	Hemoglobina
HC-ICC	Hospital do Câncer - Instituto do Câncer do Ceará
HEV	Vênulas de endotélio alto
HIAS	Hospital Infantil Albert Sabin
HLF	Hospital Luís França
ICAM	molécula de adesão intercelular
IDNA	Índice de DNA
Ig_{cit}	Imunoglobulina citoplasmática
IgS	Imunoglobulina de superfície
IMF	Intensidade média de fluorescência
IT	Intratecal
LCR	Líquido cefaloraquidiano
LDH	Desidrogenase láctica
LLA	Leucemia Linfóide Aguda

LLA-B	Leucemia Linfóide Aguda de linhagem B
LLA-T	Leucemia Linfóide Aguda de linhagem T
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
MA	Molécula de Adesão
MEC	Matriz extracelular
MO	Medula óssea
MTX	Metotrexate
NCI	National Cancer Institute
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Ficoeritrina
PerCP	Clorofilperidinina
Ph1	Cromossomo philadelphia
RB	Risco baixo para recaída
sCD44	Forma solúvel do CD44
SG	Sobrevida Global
SLE	Sobrevida Livre de Eventos
sL-selectina	Forma solúvel da L-selectina
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Sangue Periférico
SSC	Side scatter (granulosidade)
TdT	Terminal-deoxinucleotidil-transferase
TCR	Receptor de Células T
TMO	Transplante de Medula Óssea

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Moléculas de adesão	18
1.1.1 Integrinas	19
1.1.2 Caderinas	20
1.1.3 Família das Imunoglobulinas	21
1.1.4 Selectinas	22
1.1.4.1 L-selectina ou CD62L	24
1.1.5 Família do CD44	25
1.2 Moléculas de adesão e Hematopoese normal	28
1.3 Leucemias Linfóides Agudas	30
1.3.1 Etiologia	30
1.3.2 Classificação	31
1.3.2.1 Classificação morfológica	32
1.3.2.2 Classificação imunofenotípica	32
1.3.2.3 Classificação citogenética e molecular	35
1.3.3 Manifestações clínicas	36
1.3.4 Dados laboratoriais	37
1.3.5 Tratamento	37
1.3.6 Prognóstico	38
1.4 Fatores Prognósticos	39
1.4.1 Idade	40
1.4.2 Sexo	41
1.4.3 Leucometria ao diagnóstico	41
1.4.4 Leucemias com grandes massas tumorais (<i>tumor burden</i>)	42
1.4.5 Níveis de Desidrogenase láctica (LDH)	42
1.4.6 Infiltração do SNC	43
1.4.7 Citogenética e biologia molecular	43
1.4.8 Imunofenotipagem	44
1.4.9 Resposta ao tratamento de indução	45

1.4.10 Doença residual mínima	45
1.5 Moléculas de adesão e leucemias Agudas	46
1.5.1 CD44	47
1.5.2 L-Selectina	48
2 OBJETIVOS	50
2.1 Objetivo geral.....	50
2.2 Objetivos específicos.....	50
3 PACIENTES E MÉTODOS	51
3.1 Pacientes	51
3.1.1 Critérios de inclusão	51
3.1.2 Critérios de exclusão	51
3.2 Questões éticas	51
3.3. Coleta dos dados	51
3.4 Critérios diagnósticos	52
3.4.1 Análise citomorfológica	52
3.4.2 Análise imunofenotípica	53
3.4.3 Análise citogenética	53
3.5 Diagnóstico de Leucemias Extramedulares	54
3.5.1 Infiltração leucêmica do SNC	54
3.5.2 Infiltração testicular	54
3.5.3 Leucemias com grandes massas tumorais	54
3.6 Critérios de estratificação dos grupos de risco	54
3.7 Protocolos para análise da expressão da L-selectina e do CD44	55
3.7.1 Processamento - Separação e preparação das amostras	55
3.7.2 Aquisição e leitura das amostras	57
3.8 Análise Estatística	57
4 RESULTADOS	58
4.1 Características clínicas	58
4.2 Características laboratoriais	59
4.3 Avaliações da taxa de remissão e da resposta ao tratamento de indução.....	62
4.4 Expressão do CD44 e da L-selectina em indivíduos normais	63
4.5 Expressão do CD44 nas LLAs	63

4.5.1 Expressão do CD44 e fatores prognósticos	64
4.5.2 Expressão do CD44 e classificação FAB, EGIL e citogenética	64
4.5.3 Expressão do CD44 e avaliação da resposta ao tratamento de indução...	67
4.5.4 Expressão do CD44 no acometimento extramedular e nas formas tumorais das LLAs	68
4.6 Expressão da L-selectina nas LLAs	70
4.6.1 Expressão da L-selectina e fatores prognósticos das LLAs	70
4.6.2 Expressão da L-selectina e classificação FAB, EGIL e citogenética	71
4.6.3 Expressão da L-selectina e avaliação da resposta ao tratamento	72
4.6.4 Expressão da L-selectina no acometimento extramedular e nas formas tumorais das LLAs	73
4.7 Análise multivariada dos fatores prognósticos das LLAs estudadas...	74
5 DISCUSSÃO	76
5.1 Características clínicas, laboratoriais e fatores prognósticos das LLAs.....	76
5.2 Expressões da L-selectina e do CD44 nas LLAs	83
5.2.1 Expressão do CD44 nas LLAs	83
5.2.2 Expressão da L-selectina nas LLAs	86
5.3 Análise multivariada dos fatores prognósticos e moléculas de adesão	89
6 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	92
APÊNDICES	109
ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 Moléculas de adesão

As moléculas de adesão (MA) são glicoproteínas que constituem um conjunto de receptores e contrarceptores de membrana encarregados de mediar interações célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC) através de uma união ligante-receptor. Cada um desses receptores apresenta especificidade aos ligantes, qualidade que é necessária para sua função específica na migração leucocitária e recirculação de linfócitos (DRILLENBURG e PALS, 2000).

Essas glicoproteínas membranares são essenciais na manutenção da estrutura dos organismos multicelulares, facilitam a comunicação intercelular e definem a arquitetura dos órgãos. Embora todas as MA estejam envolvidas nas interações celulares, elas também podem atuar em uma série de funções como a motilidade celular, na sinalização, proliferação e diferenciação celular, expressão gênica e apoptose (GOODSON *et al.*, 1999).

As MA intervêm em um grande número de processos fisiológicos como: a regulação do extravasamento de leucócitos durante a resposta inflamatória, entrada seletiva dos linfócitos em órgãos linfóides ou “*homing*” e na ativação da resposta imune. Tais moléculas também atuam na interação dos progenitores hematopoiéticos com o microambiente da medula óssea (MO) e, na interação dos leucócitos e plaquetas com o endotélio vascular, mediando a adesão celular com outras células e componentes da MEC. A expressão das MA regula a hematopoese normal, a migração e funções das células hematopoiéticas maduras (THOMAS e ANGLARET, 1999).

Essas moléculas estão envolvidas em diversos processos patológicos: na inflamação, cicatrização de feridas, choque séptico, rejeição de transplante, arteriosclerose e nas neoplasias, principalmente na progressão e disseminação tumoral (DRILLENBURG e PALS, 2000).

As MA pertencem a diferentes famílias, como as integrinas, caderinas, cateninas, imunoglobulinas, selectinas, e família do CD44 (DRILLENBURG e PALS, 2000). A estrutura das moléculas de adesão é demonstrada na figura 1.

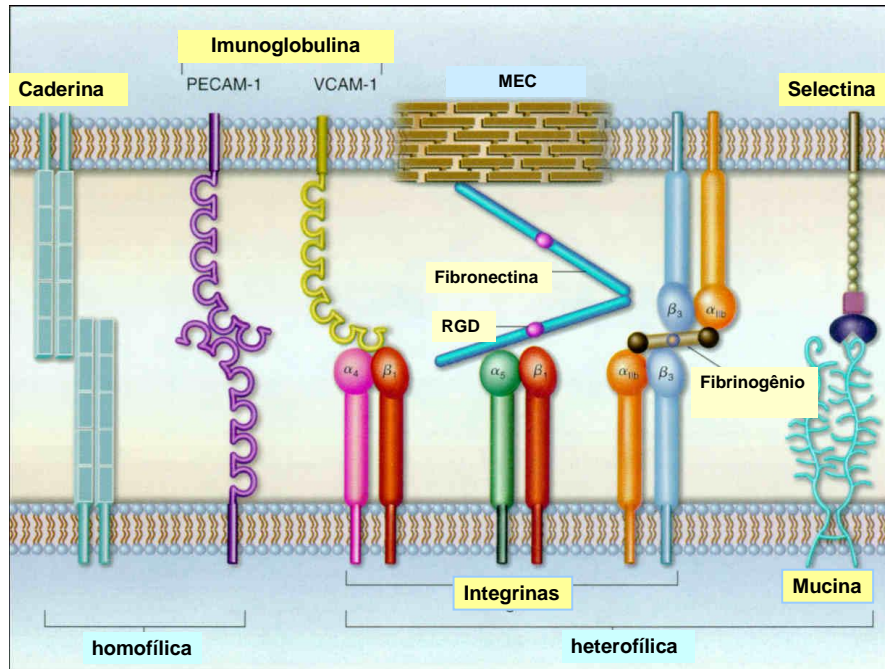


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura das diferentes moléculas de adesão (WWW.nejm.org v.334, n.2, June,1996).

1.1.1 Integrinas

As integrinas são heterodímeros compostos por duas cadeias polipeptídicas de membrana, denominadas α (alfa) e β (beta), que estão associadas de forma não covalente. A subunidade β pode se associar a diferentes subunidades α resultando nas várias subfamílias. O sítio de união ao ligante ocorre nas regiões das cadeias α e β , a interação receptor–ligante é dependente da presença do Ca^{+2} e Mg^{+2} (HYNES, 1992).

Essas MA participam na organização tecidual e como receptores para outras moléculas de adesão. Elas são mediadoras na interação de linfócitos com uma grande variedade de células e componentes da MEC. Atuam como moléculas reguladoras na organização do citoesqueleto e progressão do ciclo celular. Apresentam importantes funções como regulação do extravasamento leucocitário na inflamação, no início da resposta imune e no tráfico leucocitário em condições fisiológicas (HYNES, 1992).

Em condições basais, as integrinas se encontram em estado inativo e apresentam baixa afinidade a seus ligantes. Essas MA necessitam da ativação por outras moléculas (fatores solúveis, citoquinas) que provocam uma mudança

conformacional em sua estrutura, ocasionando uma maior avidéz por seu ligante e em algumas ocasiões um aumento da densidade antigênica da molécula.

Atualmente a família das integrinas é constituída por pelo menos 22 hetodímeros α - β diferentes que constituem as diversas subfamílias. As subfamílias β -1 (antígeno de apresentação tardia – VLA), β -2 (integrinas leucocitárias) e β -3 (citoadesinas) são as mais importantes.

As β -1 integrinas têm o CD29 como a parte comum da cadeia β . Essas integrinas desempenham as funções de adesão molecular sendo capazes de mediar interação célula-célula e no reconhecimento dos componentes da MEC (TEROL *et al.*, 1998).

As β -2 integrinas têm uma parte comum da cadeia β (CD18) que tem uma estrutura típica e três subunidades que apresenta uma associação não covalente com CD18: CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1, Mo-1) e CD11c (p150,95).

As β -3 integrinas ou citoadesinas são receptores que medeiam à adesão intercelular homotípica e a adesão a MEC. Essas MA são encontradas nas plaquetas e leucócitos.

O gene que codifica a cadeia β está no cromossoma 10 e o que codifica a subunidade α esta no cromossoma 5 para VLA-1/ VLA-2 e no cromossoma 17 para o VLA-3.

1.1.2 Caderinas

As caderinas são glicoproteínas transmembranares responsáveis pelo mecanismo de adesão célula-célula cálcio-dependente, sendo importantes na composição da arquitetura tecidual de todo o organismo (GOODSELL, 2002). No tecido hematopoiético as caderinas se distribuem praticamente em todas as linhagens leucocitárias. De acordo com sua distribuição tecidual as caderinas estão divididas em vários subtipos: E-caderina ou uvomurolina, encontrada principalmente em epitélios; P-caderina, presente na placenta e no endométrio; N-caderina, em tecidos de origem nervosa; M-caderina, no músculo.

As caderinas estão inseridas na membrana na forma de dímeros unidos por pontes de Ca^{+2} . A região citoplasmática das caderinas associa-se indiretamente ao citoesqueleto por meio de um complexo de proteínas denominadas cateninas.

Existem três categorias de cateninas: α -catenina, β -catenina e γ -catenina. A molécula de caderina interage diretamente com a β -catenina ou com a γ -catenina, as quais se associam com a α -catenina (COLLARES-BUZATO, 2001).

Nos processos de progressão tumoral, vários mecanismos moleculares podem estar envolvidos na perda de adesão entre as células neoplásicas: mutações nos genes que codificam caderinas e cateninas; repressão do processo de transcrição dos genes das caderinas e cateninas e comprometimento da interação molecular entre caderinas e cateninas (COLLARES-BUZATO, 2001; GOODSELL, 2002).

Essas MA são importantes no estabelecimento e manutenção das junções intercelulares e também na especificidade adesiva das células. Geralmente células com poucas moléculas de caderina apresentam menor adesividade (TAKEICHI, 1991).

1.1.3 Família das Imunoglobulinas

A família das imunoglobulinas é constituída por um conjunto de glicoproteínas de membrana, caracterizadas por apresentar, em sua seqüência polipeptídica, uma região com um ou mais domínios estruturais das imunoglobulinas ou semelhantes à Ig (WILLIAMS e BARCLAY, 1988).

Essa família apresenta moléculas com funções e distribuição celular diversas. Sua ação ocorre através de uniões homofílicas e heterofílicas as que intervêm em uma grande quantidade de processos, como na resposta imune, nos mecanismos de reconhecimento celular e embriogênese.

A maioria dessas imunoglobulinas está relacionada na interação célula-célula ou união com antígenos e incluem moléculas que intervêm na imunidade celular como os receptores de células T, antígenos dos linfócitos B, proteínas do MHC I e II, correceptores CD4, CD8, CD22 e CD28, receptores FC dos linfócitos e diversos anticorpos (STREETER *et al.*, 1988).

Alguns membros dessa família expressos por células endoteliais estão envolvidos na adesão de leucócitos: molécula de adesão intercelular (ICAM), molécula de adesão plaqueta-célula-endotelial (PECAM-1), adressina da mucosa (MAdCAM-1), molécula de adesão celular neuronal (NCAM) e neuroglial (NgCAM) (CARLOS e HARLAN, 1994).

As ICAMs atuam como ligantes para a integrina leucocitária LFA-1 (CD11a/CD18) na ativação de células T.

A ICAM-1 ou CD54 é encontrada na superfície de células endoteliais ativadas, células epiteliais, macrófagos, fibroblastos, células hematopoiéticas progenitoras e linfócitos ativados. A ICAM-2 ou CD102 se expressa de forma constitutiva no endotélio e na maioria dos leucócitos, enquanto que a ICAM-3 ou CD50 é encontrado nas células de origem hematopoiética (monócitos, linfócitos e neutrófilos).

O CD56 é expresso em uma grande variedade de células e tecidos normais, como as células neuroectodérmicas, músculo estriado e tecidos embrionários. Essas moléculas também são expressas por células neoplásicas provenientes de tumores do sistema nervoso central, neuroblastomas e tumor de wilms, assim como em plasmócitos no mieloma múltiplo, nos linfomas de células T e nas leucemias mielóides agudas (STREETER *et al.*, 1988; WILLIAMS e BARCLAY, 1988).

1.1.4. Selectinas

As selectinas correspondem a um grupo de glicoproteínas transmembranares composto de 117 a 120 aminoácidos que apresentam homologia com várias lectinas presentes em diversas espécies de animais.

As selectinas são compostas de múltiplos domínios, dentre eles: um domínio de lectina tipo C aminoterminal cálcio-dependente; um domínio do tipo fator de crescimento epidermal (EGF); um número variável de repetições consensuais (2 na L-selectina, 6 na E-selectina e 9 na P-selectina), também conhecidos como domínios de ligação do complemento ou domínios reguladores do complemento; uma região transmembranar e uma extremidade citoplasmática curta (MCEVER, 1995; KANSAS, 1996; RAINER, 2002). A estrutura das selectinas é mostrada na figura 2.

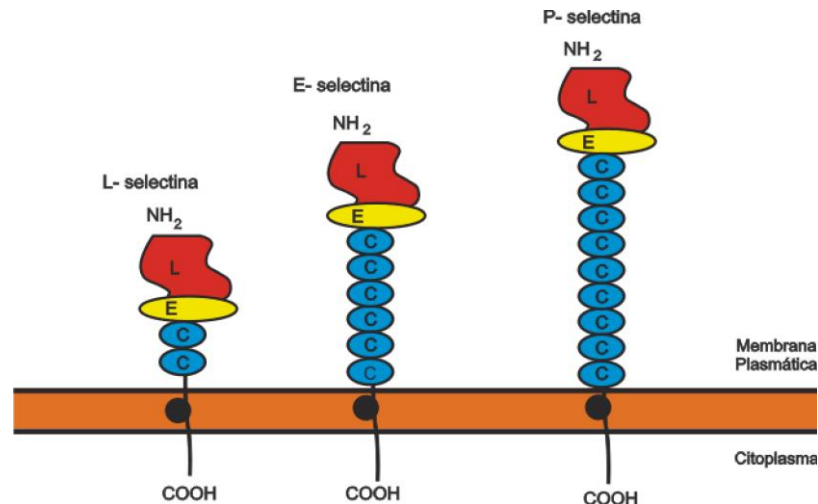


Figura 2 – Estrutura das selectinas: L – domínio da selectina tipo C aminoterminal; E – domínio do fator de crescimento epidermal (EGF); C – repetições consensuais.

A E-selectina ou CD62E é expressa fundamentalmente em células endoteliais. Pode ser estimulada por citocinas como IL-1, TNF e por lipopolissacarídeos. Tem um papel na sustentação de adesão de neutrófilos e provavelmente monócitos ao endotélio vascular.

A P-selectina ou CD62P esta presente na superfície das plaquetas ativadas e nas células endoteliais. O CD62P é sintetizado e armazenado em grânulos citoplasmáticos alfa das plaquetas e nos corpúsculos de Weibel-Palade das células endoteliais (BONFANTI *et al.*, 1989).

A L-selectina ou CD62L é expressa em granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), nos monócitos e em muitos linfócitos T e B (CARLOS e HARLAN, 1994).

Os genes para as três selectinas estão localizados no braço longo cromossomo 1 (CARLOS e HARLAN, 1994; RAINER, 2002).

As selectinas são mediadoras das ligações leucócitos às células endoteliais nos linfonodos e auxiliam no extravasamento de leucócitos na inflamação (CARLOS e HARLAN, 1994).

O acúmulo anormal dessas MA tem sido implicado em diversos estados patológicos como na artrite reumatóide e síndrome respiratória aguda. As selectinas também podem participar de distúrbios trombóticos e no processo das metástases hematogênicas de tumores malignos.

Os ligantes das selectinas (adressinas) são estruturas ricas em ácido siálico que se encontram formando parte das células hematopoiéticas. Os ligantes conhecidos para CD62E e CD62P são Sialil Lewis (Sle^x, CD15). O CD62P também se liga a PSGL-1 (ligante da proteína P - selectina 1) (CARLOS e HARLAN, 1994).

O desenvolvimento de análogos de ligantes de selectinas que possam interferir *in vivo* parecem possuir um potencial terapêutico em vários processos patológicos (VARKI, 1994).

1.1.4.1 L-selectina ou CD62L

Embora originalmente descrito como receptor de alojamento de linfócito, foi demonstrado posteriormente que a L-selectina é expressa em outros leucócitos do sangue (CARLOS e HARLAN, 1994).

O CD62L reconhece carboidratos sialilados e fucosilados como o sialil Le^x e também ligantes de glicoproteínas como GlyCAM, MAdCAM-1 e o CD34. O antígeno CD34 se liga a L-selectina somente nas células endoteliais de certos leitos vasculares (CARLOS e HARLAN, 1994; VESTWEBER e BLANKS, 1999).

A L-selectina é liberada da membrana celular após a ativação dos leucócitos por citocinas, fatores quimiotáticos ou ésteres de forbol. Essa liberação ocorre através de mudanças na sua conformação por ação das metaloproteases endoplasmáticas dependentes de zinco, o que as deixa susceptível a clivagem proteolítica (CARLOS e HARLAN, 1994).

Essa MA é capaz de transmitir sinais intracelulares, incluindo o aumento da fosforilação da tirosina e a ativação do MAP quinase. Tais eventos devem contribuir para a ativação dos neutrófilos durante a adesão (WANDELL *et al.*, 1995).

A L-selectina participa de várias interações leucócito-endotélio, entre elas a ligação dos linfócitos às vênulas do endotélio alto (HEV) do nódulo linfático periférico, o rolamento dos neutrófilos e a ligação do leucócito ao endotélio estimulado por citocinas *in vitro* (KANSAS, 1996).

Nas células B e T, a L-selectina é encontrada em todas as células virgens no sangue ou nos tecidos, mas esta ausente em algumas células de memória. Durante o desenvolvimento da célula B, a L-selectina parece ser expressa relativamente tarde, após o rearranjo do gene da imunoglobulina e antes das células B

imunocompetentes virgens e maduras migrarem para fora da medula óssea (KANSAS, 1996).

O CD62L atua na migração de células T e B nos tecidos linfóides. As células T migram com maior eficiência que as células B nos tecidos linfóides periféricos, possivelmente devido a uma maior expressão da L-selectina (50% a 70% mais elevados) nas células T (RAINER, 2002).

O antígeno do CD62L também pode ser expresso em células mielóides e nas células hematopoiéticas imaturas, incluindo as células formadoras de colônias mielóides (KANSAS, 1996). Nas células blásticas apresentam um papel na aderência de leucócitos em gânglios periféricos e na luz endotélio-vascular.

1.1.5 Família do CD44

A molécula do CD44 foi originalmente descrita por Dalchau et al. (1980), como uma molécula humana definida pelo anticorpo monoclonal F10-44-2 (HAYNES *et al.*, 1989). O CD44 é uma glicoproteína de membrana de 90 a 250 kDa, sendo conhecida sob diversas denominações: receptor de alojamento de linfócitos, (gp90HERMES), receptor III da matriz extracelular (ECMR III), glicoproteína do fagócito (Pgp-1) e receptor de hialuronato (HCAM) (GÜNTHERT, 1995). Essas glicoproteínas de membrana estão envolvidas em mecanismos de interação intercelular e entre células e componentes da MEC.

As glicoproteínas do CD44 são moléculas de cadeia única, apresentando um domínio extracelular N-terminal, uma região próxima a membrana e uma extremidade citoplasmática. Essas glicoproteínas são membros da família do receptor hialuronato e possuem ligantes na MEC. O maior ligante é o hialuronato, que é um polissacarídeo extracelular encontrado em grande quantidade na matriz extracelular de mamíferos. Outros ligantes incluem osteopontina, a serglicina, colágenos tipo I e IV, adressinas, fibronectina e a laminina (GOODISON *et al.*, 1999).

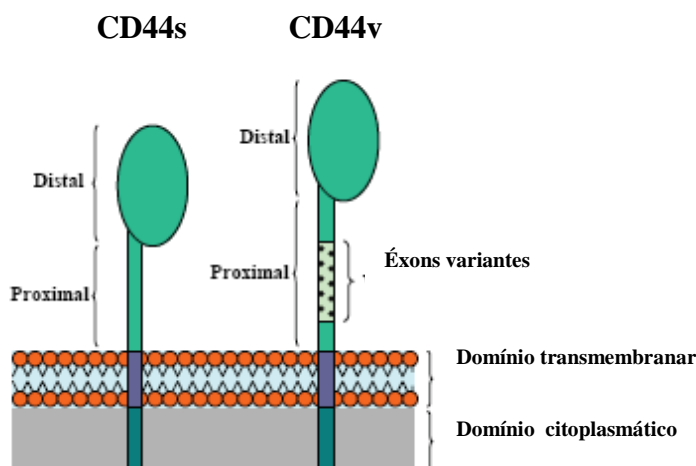


Figura 3 – Modelo da estrutura do CD44 – O diagrama da esquerda mostra os quatro principais domínios do CD44 e à direita mostra a região de inserção dos éxons variantes das várias isoformas (CD44v).

São vários os mecanismos que regulam a expressão e função do CD44. Incluem a fosforilação do domínio citoplasmático, as interações com o citoesqueleto, o processamento alternativo ou “*splicing*”, a disponibilidade do ligante e o desligamento da molécula da superfície celular (BORLAND *et al.*, 1998).

O CD 44 é uma molécula de adesão multifuncional com ampla distribuição tecidual. Está expressa em várias células incluindo linfócitos B e T e relacionada à adesão destas células ao endotélio vascular e as diversas proteínas da matriz extracelular (HAYNES, 1989; NAOR *et al.*, 1997).

O CD 44 apresenta funções importantes na hematopoese, nos processos de progressão tumoral e metástases, assim como na linfopoiese, ativação, migração e recirculação linfocitária (HUET *et al.*, 1989; NAOR *et al.*, 1997).

O CD 44 é codificado por um gene localizado no braço curto do cromossomo 11 em humanos. Possui múltiplas isoformas geradas por processamento alternativo do RNA mensageiro. O gene possui 20 éxons, 10 dos quais são expressos pela isoforma padrão humana ou hematopoiética (CD44) encontrada em maior quantidade nas células hematopoiéticas. As outras isoformas são geradas pela inserção de éxons alternativos (éxons 6 a 15) e podem ser encontradas em vários tecidos, sendo mais comuns em células endoteliais, células epiteliais, linfócitos T ativados e células tumorais (CICHY e PURE, 2003).

O antígeno do CD44 possui funções variadas dependendo da estrutura extracelular da proteína produzida pelas suas isoformas. O principal papel fisiológico dessa MA é manter a estrutura tecidual via adesão matriz-célula e célula-célula. Algumas isoformas variantes podem mediar a ativação e o alojamento do linfócito, a ligação dos linfócitos nas vênulas do endotélio alto, assim como a apresentação de fatores químicos e hormonais (GOODISON *et al.*, 1999).

As isoformas do CD44 também são expressas em células normais, particularmente quando essas células estão ativadas ou em proliferação. Algumas dessas isoformas aparecem durante a maturação normal de células do sistema imune. A expressão aumentada de isoformas do CD44 pode predispor as células na aquisição de certas propriedades malignas. Tem sido demonstrado que a ligação do CD44 ao hialuronato das células tumorais poderiam protegê-las da apoptose.

A expressão das múltiplas isoformas do CD44 e o resultante perfil de ligação ao ácido hialurônico pode influenciar o crescimento tumoral e o desenvolvimento de metástases. Linhagens de células tumorais com concentrações elevadas da proteína do CD44 foram capazes de formar tumores mais agressivos em animais (GOODISON *et al.*, 1999).

As famílias das MA, seus ligantes e a distribuição celular estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1 – Famílias das Moléculas de adesão: ligantes e distribuição celular.

Famílias MA	Ligantes	Distribuição celular
Integrinas		
Subfamília $\beta 1$ (VLA1-6)	Colágeno, laminina,	Linfo B/T, plaquetas, monócitos
Subfamília $\beta 2$	VCAM -1, fibronectina	Leucócitos
Subfamília $\beta 3$	ICAM -1,2,3	Plaquetas
	Fibrinogênio, FvW	
Caderinas	α , β e γ -Cateninas	Leucócitos

Tabela 1 (Cont.) – Famílias das Moléculas de adesão: ligantes e distribuição celular.

Famílias MA	Ligantes	Distribuição celular
Imunoglobulinas		
CD2	CD58 (LFA-3), CD59	Células T, NK
CD31 (PECAM-1)	PECAM-1, $\alpha V\beta_3$	Linfo B, Granulócitos, monócitos
CD50 (ICAM-3)	LFA-1	Leucócitos
CD54 (ICAM-1)	LFA-1	Células endoteliais ativadas
CD56 (NCAM)	-----	Células NK
CD102 (ICAM-2)	LFA-1 (CD11a/CD18)	Linfócitos e monócitos
CD106 (VCAM-1)	VLA - 4	Células endoteliais ativadas
Selectinas		
Selectina-L (CD62L)	GlyCAM-1, CD34, MadCAM-1	Leucócitos
Selectina-E (CD62E)	sLe ^x , adressinas	Célula endotelial
Selectina-P (CD62P)	sLe ^x sializado+ proteína	Célula endotelial, plaquetas
Família do CD44	Ácido hialurônico, fibronectina, colágeno	Granulócitos, linfócitos B e T

1.2 Moléculas de adesão e hematopoese normal

A hematopoese é um sistema altamente organizado responsável pela produção das células sanguíneas. A interação célula-célula e célula - MEC através das MA tem um papel importante na hematopoese.

A hematopoese normal ocorre na MO sob a influência do microambiente medular que produz mais de 40 diferentes fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que interagem com as células hematopoéticas progenitoras através das MA.

Os precursores celulares, MEC e interações com células endoteliais determinam a manutenção ou liberação das células hematopoéticas do microambiente da medula óssea para o sangue periférico. Conseqüentemente, mudanças na afinidade ou quantidade de moléculas de adesão expressas no estroma medular ou nas células precursoras durante o desenvolvimento normal ou durante os processos malignos afetam a migração e a adesão celular (THOMAS e ANGLARET, 1999).

A menor expressão das MA nas células do estroma medular poderia ser um dos fatores responsáveis pela liberação dos blastos da MO para a corrente sanguínea resultando na infiltração do baço, fígado, linfonodos, mediastino e outros tecidos do corpo. Outros fatores como a constituição do estroma, também podem modificar a migração celular (THOMAS e ANGLARET, 1999).

Mais de 20 diferentes MA ou proteínas com funções adesivas têm sido identificadas nas células hematopoiéticas como as integrinas, selectinas, CD44, imunoglobulinas e citocinas (PAPAYANNOPOULOU e CRADDOCK, 1997).

As $\beta 1$ e $\beta 2$ -integrinas são responsáveis pela interação célula-célula e célula e componentes da MEC como a fibronectina, colágeno, laminina e trombospondina ou MA expressas na superfície celular incluindo as ICAMs e VCAM-1 (VERFAILLIE e POSPER, 2001).

Estudos têm mostrado que a interação entre a $\beta 1$ -integrina e seus ligantes (VCAM-1 e fibronectina) e da $\beta 2$ -integrina com seus ligantes ICAM-1 e ICAM-2 participam da mobilização de células progenitoras para o sangue periférico (VERFAILLIE e POSPER, 2001).

O CD44 é expresso em todas as células hematopoiéticas e participa na adesão célula hematopoiética-MEC em cooperação com as $\beta 1$ -integrinas (VERFAILLIE e POSPER, 2001).

O CD44 é um receptor também produzido pelas células tumorais que contém sulfato de condroitina em sua estrutura molecular, podendo se ligar à fibronectina, colágeno tipo I e à laminina. Essa MA pode contribuir em eventos como migração e proliferação celular, adesão celular, indução da diferenciação hematopoiética e interações com sinais de ativação celular (LESLEY *et al.*, 1993).

Na linfopoiese B normal a expressão do CD 44 ocorre em todas as fases de diferenciação celular aumentando sua intensidade a mediada que as células passam do estágio pré-B para B, porém a expressão máxima ocorre após a ativação das células B.

Em relação à linfopoiese dos linfócitos T a expressão do CD 44 ocorre praticamente em toda a sua fase de ontogenia, os níveis dessa molécula variam de acordo com a maturação e estágio funcional dos linfócitos. Níveis elevados de CD 44 na sua superfície são característicos da ativação da célula T após o encontro com o respectivo antígeno.

1.3 Leucemias linfóides agudas

As leucemias resultam da expansão clonal de uma célula tronco pluripotente que adquiriu uma série progressiva de alterações genéticas, as quais se acumularam em um único clone celular. As células transformadas apresentam vantagem proliferativa em relação às demais células que alteraram seu processo de diferenciação normal e apoptose (GREAVES, 2000).

As leucemias agudas constituem o tipo de neoplasias mais comuns na criança, correspondem cerca de 30% de todas as doenças malignas em pacientes com menos de 15 anos de idade (BATHIA, 2003).

A leucemia linfóide aguda (LLA) é a mais frequente em crianças e representa 75% a 80% dos casos. Apresenta frequência quatro vezes maior que a leucemia mielóide aguda (LMA). A incidência da LLA é de 3 a 4 casos/100.000 crianças abaixo de 15 anos de idade, com pico entre dois a cinco anos de idade. Observa-se uma ligeira predominância em crianças do sexo masculino (1,3M:1F), essa diferença se torna maior na puberdade (BATHIA, 2003).

Essa doença é heterogênea, apresenta subtipos que diferem nas características celulares e moleculares, assim como em sua resposta ao tratamento e no risco de recaída (PUI e EVANS, 1998; PUI *et al.*, 2001).

1.3.1 Etiologia

Embora os avanços da biologia molecular e imunologia tenham contribuído para o melhor entendimento da transformação maligna das células hematopoiéticas, a etiologia das leucemias ainda permanece obscura. Na etiopatogenia parecem estar envolvidos e associados os mecanismos genéticos, ambientais e infecciosos.

Muitos fatores de risco são relatados na patogênese das LLAs: radiação ionizante; exposição a substâncias químicas como o benzeno, metais pesados e pesticidas; agentes alquilantes; inibidores da topoisomerase II e infecções virais.

A radiação ionizante é um dos poucos fatores de risco ambientais com relação causal com as leucemias em crianças (BELSON *et al.*, 2007). Seu efeito pode ocorrer antes da concepção, durante a gestação ou no puerpério. A magnitude do risco depende da dose, duração da exposição e da idade da criança no tempo da exposição. Os indivíduos expostos a explosão da bomba atômica de Hiroshima e

Nagasaki apresentaram um risco vinte vezes maior de desenvolver leucemias que a população em geral (MAHONEY *et al.*, 2004).

O papel das infecções virais na patogênese das leucemias agudas tem sido intensivamente investigado. Algumas observações têm contribuído para confirmar essas evidências: o sistema imune da criança está em desenvolvimento e talvez mais vulnerável aos efeitos oncogênicos de alguns vírus e a associação do vírus HTLV com leucemias de células T do adulto e do vírus EBV com linfomas de Burkitt e Doença de Hodgkin (GREAVES, 1993).

A ocorrência de leucemias em crianças pode ser o resultado da interação entre a herança genética e exposições ambientais (BELSON *et al.*, 2007). A importância de eventos genéticos na vida uterina foi estudada utilizando concordância entre gêmeos com leucemia (GREAVES *et al.*, 2003). Esses estudos sugerem que os clones pré-leucêmicos gerados em alta frequência intraúteros e a exposição a certos agentes ambientais poderiam desencadear alterações genéticas espontâneas levando a fenótipos leucêmicos (ISAACS, 2003).

Existe um grande número de alterações genéticas associadas às leucemias. Pacientes com doenças genéticas com maior instabilidade cromossômica como a Síndrome de Down, Anemia de Fanconi e a Síndrome de Bloom apresentam um risco de desenvolverem leucemias de 1:95, 1:8 e 1:12, respectivamente. Outras doenças genéticas como a Síndrome de Li-Fraumeni, Monossomia do 7, Doença de Kostmann e as imunodeficiências primárias (Síndrome de Wiscott-Aldrich, hipogamaglobulinemia congênita) apresentam uma predisposição maior para desenvolver leucemias (ROSS *et al.*, 1994).

1.3. 2 Classificação

As LLAs são classificadas com base em critérios morfológicos, imunológicos, citogenéticos e moleculares.

1.3.2.1 Classificação morfológica

A primeira classificação foi proposta pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) em 1976. Utilizaram-se critérios morfológicos e foram definidos três subtipos de LLA (BENNETT, 1976).

O subtipo L1 é caracterizado por células blásticas pequenas, com alta relação núcleo-citoplasma, ocorre em 76% a 89% das crianças. O subtipo L2 é caracterizado por células blásticas maiores, com baixa relação núcleo-citoplasma e

nucléolos proeminentes, ocorre em 14% a 22% das crianças. Os subtipos L1 e L2 podem envolver linfócitos B ou T.

O subtipo L3 caracteriza-se por apresentar células blásticas grandes, citoplasma basófilo com vacúolos proeminentes e nucléolos múltiplos. Está associado com LLA de células-B maduras, as quais expressam imunoglobulinas de superfície (IgS). A LLA-L3 não responde aos protocolos utilizados para os subtipos L1 e L2, requer tratamento mais intenso e com menor duração, semelhante ao usado para o linfoma de Burkitt.

A classificação FAB não reflete a diversidade biológica das LLAs. Os blastos leucêmicos não apresentam características citomorfológicas específicas. O prognóstico nos diferentes subtipos permanece obscuro. Embora historicamente a classificação FAB tenha sido amplamente utilizada, atualmente seu uso clínico é discutido e pouco utilizado (PUI e EVANS, 1998).

1.3.2.2 Classificação imunofenotípica

As LLAs são classificadas imunologicamente de acordo com sua origem e estágio de maturação ou diferenciação celular. O estudo imunológico das células blásticas pode ser realizado por citometria de fluxo. Esse método baseia-se na expressão de reatividade de um painel de anticorpos monoclonais associados.

Em 1995, o Grupo Europeu para Caracterização Imunológica das Leucemias (EGIL) propôs uma classificação imunológica, na qual as LLAs foram divididas em LLA de linhagem B e T e subdivididas em estágios de diferenciação (I a IV; tabelas 2). Esse grupo também definiu os critérios e sistemas de escores para a caracterização das leucemias bifenotípicas (tabelas 3).

Tabela 2 - Classificação Imunológica das LLAs pelo Grupo EGIL.

Linhagem B	Marcadores	Linhagem T	Marcadores
B I (Pró-B)	HLA-DR, Tdt, CD19, CD22, CD79a +, CD10(-)	T I (Pró-B)	CD7, CD3cit +
B II (B comum)	CD19, CD22, CD79a +, CD10 +	T II (Pré-T)	CD2, CD5, CD8 +
B III (Pré-B)	CD19, CD21, CD22, CD79a +, CD10 +, IgCit +	T III (T cortical)	CD1a +
B IV (B madura)	CD21, CD22, CD79a + IgS +	T IV (T madura)	CD3m+

Com a finalidade de superar as limitações da classificação FAB, em 2000, a Organização Mundial de Saúde, em conjunto com a Sociedade Americana de Hematologia e a Associação Européia de Hematologia, publicou uma nova classificação para neoplasias do sistema hematopoiético e linfóide. Essa classificação considera as características morfológicas, imunofenotípicas, genéticas e moleculares dos blastos e define as leucemias em subtipos de acordo com a linhagem linfóide (B e T) e mielóide, incluindo as bifenotípicas (BENNETT, 2000).

- LLA de linhagem B (LLA-B)

Ocorre em 80% dos casos das LLAs. Essas leucemias podem ser identificadas pela expressão dos antígenos HLA-DR, CD19 e pelo menos um destes antígenos de linhagem B: CD20, CD21, CD22, CD24 ou CD79a. O CD10 é expresso em torno de 90% da LLA-B, sua presença esta associada a um melhor prognóstico

Na LLA-B há quatro subclasses de relevância clínica: pró-B, comum (Calla+), pré-B e leucemia B madura que correspondem na classificação EGIL os tipos BI, BII, BIII e BIV, respectivamente (Tabela 2) (BENE *et al.*, 1995).

A LLA pró-B representa 5% dos casos. Os blastos expressam HLA-DR, CD19, Tdt e CD22_C, porém não apresentam imunoglobulina citoplasmática (Ig_{Cit}) ou de superfície (IgS). O CD10 é negativo. O imunofenótipo pró-B é mais encontrado nas leucemias de lactentes. Apresenta associação com a translocação t(4;11) e um prognóstico bastante reservado.

A LLA comum representa 65% dos casos nas crianças. Seus blastos, além de expressarem os antígenos da LLA pró-B, expressam também o CD10. Não apresenta Ig_{Cit} ou IgS. Nesse tipo de LLA observa-se uma maior incidência entre 2 a 5 anos de idade, com leve predomínio do sexo masculino e uma baixa contagem de leucócitos ao diagnóstico (< 20.000/mm³). Apresenta uma associação significativa com hiperdiploidia e a presença do rearranjo TEL-AML1 que são fatores de bom prognóstico nas LLAs em crianças.

A LLA pré B (EGIL BIII) apresenta Ig_{Cit}. Representa 25% dos casos de LLA em crianças (PUI *et al.*, 1993) e pode estar associada com a t(1;19)(q23;p13).

A LLA de células B maduras (EGIL IV ou FAB L3) caracteriza-se pela expressão IgS e translocação do gene C-myc. Representa 1 a 2% dos casos em crianças e é considerada de prognóstico ruim (COPELAN e MCGUIRE, 1995).

- LLA de Linhagem T (LLA-T)

Na LLA-T as células leucêmicas estão associadas aos antígenos CD3_{Cit}, com CD7, CD2 e/ou CD5. De acordo com o estágio de diferenciação foram subclassificadas pelo grupo EGIL em LLA pró-T (T I), LLA pré-T (T II), LLA -T cortical (T III) e LLA-T madura (T IV), conforme demonstrado na tabela 2 (PUI *et al.*, 1993).

A LLA-T ocorre em 10% a 15% dos casos e apresenta comportamento biológico e manifestações clínicas diferentes da LLA-B. Predomina no sexo masculino. Geralmente esta associada a fatores prognósticos de alto risco: idade acima de 9 anos, leucócitos acima de 100.000/mm³, massa mediastinal em metade dos casos e maior infiltração de SNC (UCKUN *et al.*, 2001).

A expressão de CD10 ocorre em 30 a 40% dos casos de LLA-T. Tal expressão associa-se a um melhor prognóstico quando comparado aos casos CD10 negativo (PUI *et al.*, 1993).

Anormalidades citogenéticas encontradas na LLA-B como a hiperdiploidia são raras nas LLA-T. As mutações NOTCH1 ocorrem em aproximadamente 50% dos casos e parecem estar associadas a um melhor prognóstico (ZHU *et al.*, 2006).

- Leucemias linfóides com marcadores mielóides e bifenóticas

Nas crianças com LLA, 5% a 22% dos linfoblastos expressam antígenos de linhagem mielóide: CD13, CD33 ou CD65 (CAMITTA *et al.*, 1997).

Vários estudos têm descrito piores resultados nos casos de LLA com expressão dos antígenos mielóides (WIERSMA *et al.*, 1991), porém em muitos trabalhos essa expressão não foi um fator prognóstico ruim (PUI, 1993).

As leucemias bifenóticas são caracterizadas pela presença de uma única população de blastos que coexpressam vários antígenos específicos de mais de uma linhagem. Nessas leucemias 60% a 70% apresentam blastos com expressam de marcadores de linhagem B e mielóides e 20% a 30% apresentam blastos com

expressam de marcadores linfóides T e mielóides. (KILLICK *et al.*,1999). Muito raramente existe a expressão simultânea mielóide, linfóide B e T (RUBIO *et al.*, 2003). Ocorrem em 3% a 5% das leucemias em crianças e apresentam alta incidência do cromossomo Ph1 e da translocação11q23 (KILLICK *et al.*,1999).

Essas leucemias devem ser diferenciadas das LLAs e LMAs que apresentam expressão antigênica anômala com marcadores aberrantes. A distinção é baseada em sistemas de pontuações proposto pelo Grupo EGIL, apresentados na Tabela 3 (BENE *et al.*, 1995).

Tabela 3 - Sistema de pontuação proposto pelo grupo EGIL para as leucemias bifenotípicas.

Pontuação	linfóide B	linfóide T	mielóide
2,0	* CD79a cit IgM cit, CD22 cit	CD3 (sup/cit) anti-TCR	MPO
1,0	CD19, CD20 CD10	CD2, CD5 CD8, CD10	CD117, CD13 CD33, CD65
0,5	TdT, CD24	TdT, CD7 CD1a	CD14, CD15 CD64

* CD79a pode ser expresso em alguns casos de LLA T.

1.3.2.3 Classificação citogenética e molecular

O reconhecimento das anormalidades citogenéticas tem contribuído de forma importante para o entendimento da patogênese e do prognóstico da LLA (PUI, 1998).

Aproximadamente 80% a 90% dos pacientes apresentam alterações cromossômicas numéricas (ploidias) ou estruturais (inversões, deleções e translocações).

Nas células blásticas pode haver perda ou ganho de cromossomos que resulta em hipodiploidia ou hiperdiploidia, respectivamente. Pacientes com blastos hiperdiploides (com mais de 50 cromossomos ou IDNA maior que 1,16) são considerados de baixo risco para recaída e apresentam excelente prognóstico.

Algumas translocações cromossômicas como a t (9,22), t (4,11) e t (1,19) estão associadas às altas taxas de falência terapêutica e recaídas precoces.

1.3.3 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas das leucemias agudas são explicadas pela fisiopatologia da doença. Elas decorrem basicamente de dois processos: a inibição da hematopoese pelas células leucêmicas e os efeitos da infiltração leucêmica de diversos órgãos e sistemas (VIANA, 1996).

As leucemias são doenças primárias da medula óssea e sangue periférico, porém qualquer órgão pode ser infiltrado por células blásticas como o fígado, baço, linfonodos, ossos, rins pulmões, SNC, testículos, ovários, retina e pele. A frequência e a intensidade da infiltração destes órgãos variam entre os pacientes e provavelmente estão relacionadas às moléculas de adesão das células leucêmicas (THOMAS E ANGLARET, 1999).

As manifestações clínicas são muito variáveis. Os sintomas iniciais geralmente são inespecíficos: anorexia, adinamia, letargia e palidez e podem durar dias a meses. A febre é um achado comum e pode ser decorrente de processo infeccioso ou resultante da produção de citocinas pelas células normais ou leucêmicas (RIBEIRO, 2001).

A hepatomegalia e/ou esplenomegalia estão presentes ao diagnóstico em cerca de 50% dos pacientes e geralmente não acarretam distúrbios fisiológicos. A adenomegalia também é um achado comum, ocorre em 30% a 50% dos casos. O aumento dos linfonodos é geralmente indolor e sem sinais flogísticos locais. O fígado, baço, mediastino e linfonodos são os principais locais de doença extramedular.

A infiltração renal está presente em muitos casos, entretanto, manifestações clínicas que expressem esse fenômeno são pouco frequentes. Ocorrem principalmente em LLA-T e LLA-B madura (SILVERMAN, 2003).

O acometimento precoce do SNC tem implicações prognósticas e terapêuticas importantes. Pode ser encontrado ao diagnóstico em 5% a 10% dos pacientes.

O envolvimento testicular clinicamente detectável é incomum nos casos recém-diagnosticados. Ocorre aproximadamente em 1% a 2% dos meninos e caracteriza-se pelo aumento testicular indolor, uni ou bilateral (SILVERMAN, 2003).

A presença de massa mediastinal ocorre em 5% das leucemias agudas, porém na LLA-T ocorre em 50% a 60% dos casos.

O comprometimento osteoarticular ocorre em 25% a 40% dos casos e manifesta-se por dores ósseas e artralguas. As dores são causadas por infiltração leucêmica do periósteo ou das articulações, infarto ósseo ou por expansão da cavidade medular decorrente da presença de blastos (SILVERMAN, 2003).

1.3.4 Dados Laboratoriais

O diagnóstico das leucemias é sugerido pela presença de células blásticas no esfregaço do sangue periférico (SP) e confirmado pela MO. A infiltração da MO por blastos acarreta a diminuição da produção de hemácias, granulócitos e plaquetas, causando na grande maioria dos casos anemia, leucopenia e plaquetopenia no SP.

A contagem de leucócitos ao diagnóstico pode estar diminuída, normal ou aumentada. A hiperleucocitose (leucócitos superior a $100.000/\text{mm}^3$) pode ser observada em 5% a 20% dos pacientes e está associada a alto índice de mortalidade precoce, geralmente decorrente da falência respiratória ou hemorragia intracraniana secundárias a leucostase (KELLY e LANGE, 1997).

A contagem de plaquetas encontra-se geralmente diminuída, embora, em 20% dos casos a contagem possa estar acima de $100.000/\text{mm}^3$.

Nos casos com infiltração de SNC, o exame do líquido mostra pleocitose e blastos no exame citológico.

1.3.5 Tratamento

Há mais de 25 anos a quimioterapia combinada constitui o eixo principal de tratamento da LLA. A maioria dos regimes terapêuticos modernos, inclusive o Protocolo do Grupo Brasileiro para o tratamento das leucemias na infância (GBTLI) tem duração total de 2 a 3 anos. Compreende uma fase de indução da remissão, seguida das fases de consolidação (intensificação) e de manutenção associadas à profilaxia do SNC (BRANDALISE, 1993; CHESSELS, 2000).

O principal objetivo do tratamento de indução é induzir a remissão completa, ou seja, atingir menos de 5% de blastos na MO, restaurar a hematopoese normal com desaparecimento de toda a sintomatologia clínica associada. Essa fase geralmente é composta de três drogas: corticóide, vincristina e L-asparaginase associadas ou não a daunoblastina (PUI e CAMPANA, 2001).

Logo após, inicia-se a fase de consolidação, cujo objetivo é reduzir a doença residual mínima e ajustar a intensidade do tratamento, conforme a estratificação do risco de recidiva (PUI e CAMPANA, 2001).

A radioterapia de SNC é indicada a pacientes com envolvimento de SNC. A última fase é a terapia de manutenção, cujo objetivo é a erradicação de células leucêmicas residuais. Nessa fase, a quimioterapia é menos intensiva e tem como base o uso contínuo ou intermitente da 6-mercaptopurina, acompanhada de doses semanais de metotrexate e pulsos adicionais de vincristina e dexametasona (BRANDALISE, 2007; CONTER *et al.*, 2007).

A taxa de remissão completa esperada é de 95% a 96%. A duração da remissão e o potencial de cura estão correlacionados aos fatores prognósticos. A resposta clínica incompleta após a fase de indução indica mau prognóstico, com altos riscos de falha terapêutica (PUI, 1998).

Pacientes com baixo risco para recaída, com prognóstico favorável, recebem terapia convencional e aqueles de alto risco e prognóstico desfavorável recebem terapia intensificada, alguns com indicação de transplante de células hematopoiéticas (CHESSELS, 2000; RIBEIRO e PUI, 1993).

O TMO é usualmente indicado para pacientes com alterações genéticas desfavoráveis, Ph1 +, t(4;11) e t(1,19); pacientes que não alcançaram a remissão após a primeira fase de indução e para aqueles com recidiva hematológica precoce (LOCATELLI *et al.*, 2002).

1.3.6 Prognóstico

Nas últimas décadas, o uso de terapias adequadas ao risco de recaída revolucionou o tratamento da LLA. A doença vem atingindo altos índices de cura. Em países desenvolvidos, a chance de cura alcança 75% a 80% para os pacientes de risco básico para recaída e aproximadamente 70% para os pacientes de alto risco (PUI *et al.*, 2006).

No Brasil, os pacientes tratados com o Protocolo GBTLI-93 apresentaram uma remissão no final da indução de 95%, superponíveis aos dados da literatura. A sobrevida global em seis anos para o risco básico foi de 73% e para os pacientes de AR foi de 59% (Protocolo GBTLI, 1993).

O uso mais racional de drogas quimioterápicas, o melhor suporte clínico, transfusional e cuidados intensivos ajudaram a melhorar as chances de cura e sobrevida nas leucemias, no entanto, a morte relacionada ao tratamento ainda continua um problema. Infelizmente 1% a 3% dos pacientes morrem de complicações relacionadas ao tratamento (SILVERMAN *et al.*, 2003).

1.4 Fatores prognósticos

Fatores prognósticos são dados ou parâmetros relacionados à doença ou ao paciente que individualmente ou em conjunto expressam a probabilidade do paciente em conseguir manter a remissão e alcançar a cura (RIBEIRO e PUI, 1993).

Os fatores prognósticos podem ser de natureza clínica, laboratorial e constitucional (genéticos). Fatores prognósticos pré-tratamento identificam os pacientes com LLA com maior ou menor chance de cura.

Uma série de fatores clínico-biológicos tem sido utilizada para estratificação de grupos de risco e para a escolha de terapias individualizadas que reduzam o risco de recaída da doença. Dentre eles estão a idade, a leucometria ao diagnóstico e a contagem de blastos, envolvimento do SNC, o imunofenótipo e alterações citogenéticas numéricas e estruturais detectadas ao diagnóstico (Tabela 4). Esses achados são mais importantes na LLA de linhagem B que na LLA -T (RIBEIRO e PUI, 1993).

Tabela 4 - Fatores prognósticos nas LLAs.

	Favorável	Desfavorável
Idade	1-9 anos	<1 ano e > 9 anos
Sexo	Feminino	Masculino
Leucometria	< 50.000/mm ³	> 50.000/mm ³
Imunofenótipo	LLA comum	Pró-B, B-madura, LLA-T
Citogenética (IDNA)	IDNA >1,16 Hiperdiploidia	IDNA <1,0 Hipodiploidia
Genética molecular (translocações)	TEL/MLL-1	t(9;22) BCR/ABL t(4;11) MLL/AF4
Infiltração SNC	SNC-1	SNC-3

Resposta precoce ao tratamento - SP D8/D14	Blastos < 1.000/mm ³	Blastos > 1.000/mm ³
Resposta precoce ao tratamento - MO D7/D14	MO=M1	MO=M3
Remissão pós-indução	MO=M1	MO=M2 ou M3

Adaptação de Schrappe, 2003. Indian Journal of Pediatrics.

Nas leucemias a associação desses fatores permite a estratificação em grupos de risco para recaída: baixo risco, risco padrão e alto risco.

Pacientes com baixo risco para recaída e risco padrão apresentam taxa de cura de 80% e os pacientes de alto risco menos de 50%. Apesar dos bons resultados com os protocolos atuais, cerca de 5% dos pacientes apresentam dificuldades para alcançar a remissão e 20% a 30% dos pacientes recaem.

A falta de especificidade de alguns fatores prognósticos conhecidos tem estimulado a se pesquisar fatores mais relevantes. O regime terapêutico empregado surge como um importante fator prognóstico. A resposta precoce à terapia de indução é apontada como uma variável independente, assim como a doença residual mínima (DRM).

A pesquisa da DRM pode ser realizada por citometria de fluxo ou por métodos moleculares. Esses métodos apresentam alta sensibilidade e especificidade. A DRM é um dos fatores mais relevantes e precisos para determinar a resposta ao tratamento e identificar pacientes com maior risco para recaída (DWORZAK *et al.*, 2002).

A identificação de novos marcadores genéticos relacionados ao metabolismo das drogas, bem como o entendimento do mecanismo de resistência à quimioterapia são fatores promissores para se determinar um tratamento com menor toxicidade, maior eficácia e menor risco de recaída nas LLA-B e T derivadas (SCHRAPPE, 2003).

1.4.1 Idade

A idade ao diagnóstico é considerada um fator prognóstico independente, reflete as diferentes biológicas da LLA nos diversos grupos etários (MÖRICKKE *et al.*, 2005).

Atualmente, a maioria dos protocolos nacionais e internacionais utiliza os critérios do Nacional Cancer Institute (NCI) que estratificam as LLAs quanto à faixa etária em lactentes, crianças entre um e nove anos e maiores de nove anos.

Crianças entre um e nove anos apresentam uma melhor sobrevida e bom prognóstico, portanto considerados de baixo risco para recaída quanto à idade.

Lactentes menores de um ano, crianças acima de nove anos e adolescentes são considerados de alto risco pela idade e apresentam piores prognósticos (PUI e EVANS, 1998).

Os adolescentes entre 15 e 21 anos têm taxas de cura e sobrevida menores que as crianças, porém melhores que adultos.

1.4.2 Sexo

O sexo tem sido reconhecido de longo tempo como um fator prognóstico significativo na LLA, meninas apresentam melhor resposta ao tratamento de indução quando comparados aos meninos (PUI *et al.*, 1999; SHUSTER, 1998). Meninos com LLA apresentam uma maior prevalência de fatores prognósticos negativos como idade avançada, alta leucometria, imunofenótipo T, envolvimento do SNC e LLA ph1 positiva (CHRIST *et al.*, 1986).

O melhor prognóstico em meninas pode ser explicado pela ocorrência de recaídas testiculares e maior risco de recidivas medulares nos meninos (CHESSELLS *et al.*, 1995; PUI *et al.*, 1999).

Em protocolos americanos e ingleses, o sexo tem influenciado na estratificação do tratamento, meninos com alto risco são tratados com 3 anos de terapia de manutenção enquanto meninas com 2 anos (CHESSELLS, 1995; NACHMAN *et al.*, 1998).

1.4.3 Leucometria ao diagnóstico

O valor prognóstico da contagem de leucócitos ao diagnóstico é evidenciado em todos os estudos de LLA.

Segundo o Consenso Internacional, publicado em 1996, pacientes com LLA de linhagem B e leucometria acima de $50.000/\text{mm}^3$ são classificados como alto risco

(AR), apresentam um maior risco para a falha de tratamento, portanto, devem receber tratamento mais intensivo (SMITH *et al.*, 1996).

Crianças com alta contagem de leucócitos ao diagnóstico apresentam uma doença de evolução rápida com alta taxa de proliferação das células blásticas.

1.4.4 Leucemias com grandes massas tumorais (*tumor burden*)

Pacientes com achados linfomatosos apresentam massa mediastinal, esplenomegalias, linfadenopatias resultando em grandes massas tumorais. Esses achados estão relacionados a maior risco de recaída e são mais frequentemente encontrados na LLA - T (STEINHERZ *et al.*, 1998).

No estudo do CCG-123 com leucemias linfomatosas, 65% das crianças apresentavam LLA-T (STEINHERZ *et al.*, 1998).

1.4.5 Níveis de desidrogenase láctica (LDH)

A LDH é uma enzima ligada à piridina encontrada em todos os tecidos animais, funciona primariamente no metabolismo da glicose. Esta elevada em diversas neoplasias e reflete a grande produção e liberação dessa enzima pelas células malignas.

A atividade da LDH encontra-se elevada na maioria dos pacientes com LLA, pode esta relacionada à contagem inicial de leucócitos e a carga tumoral (SUAREZ e MILLER, 1984).

Os pacientes que apresentam níveis de LDH mais elevados têm maior chance de recidiva precoce ou não resposta à terapêutica inicial, enquanto que aqueles com níveis menores têm menor risco de recidiva (PUI *et al.*, 1985).

1.4.6 Infiltração SNC

A infiltração de SNC ao diagnóstico ainda tem importância prognóstica na LLA, porém seu valor prognóstico tem diminuído com o emprego da quimioterapia intratecal (MTX it ou tripla terapia com MTX, citarabina e dexametasona) e quimioterapia sistêmica com MTX em altas (SMITH *et al.*, 1996).

Crianças que apresentam infiltração de SNC ao diagnóstico apresentam alto risco para recaída e falha terapêutica, portanto devem ser tratadas com protocolos mais intensivos.

1.4.7 Citogenética e biologia molecular

A análise citogenética fornece informações importantes quanto ao prognóstico e é utilizada para categorização dos grupos de risco.

Alterações citogenéticas numéricas ou estruturais podem ser evidenciadas pela análise do cariótipo ou através da medida do conteúdo de DNA por citometria de fluxo.

A hiperdiploidia é um importante fator prognóstico. Essa alteração está associada a um bom prognóstico e geralmente os pacientes apresentam fatores prognósticos favoráveis como a idade entre 1 e 9 anos, baixa contagem leucocitária (MÖRICKÉ *et al.*, 2005). Ocorre em 20% a 25% da LLA de linhagem B e muito raramente na LLA-T (JACKSON *et al.*, 1990; LOOK *et al.*, 1985).

A hipodiploidia ocorre em cerca de 1% das crianças com LLA. Esta associada a alto risco de recaída e um prognóstico ruim (HEEREMA *et al.*, 1999). As translocações cromossômicas recorrentes podem ser detectadas na maioria dos pacientes com LLA e tem sido descrito associação das translocações com o prognóstico e resposta ao tratamento das LLAs.

Estudos demonstraram a t(12;21) está associada a baixa contagem de leucócitos ao diagnóstico e a uma boa resposta a terapia de indução. Essa translocação resulta da fusão dos genes TEL (ETV6) do cromossomo 12 e AML1 (CBFA2) do cromossomo 21. Pode ser detectada em 20% a 25% dos casos de LLA de precursores B, porém é rara em LLA-T (UCKUN *et al.*, 2001). Geralmente ocorre em crianças de 2 a 9 anos de idade e tem um excelente prognóstico. (MAGALHÃES, 2000; UCKUN *et al.*, 2001).

Outras translocações cromossômicas como a t(9,22), t(4,11) e t(1,19) estão associadas às altas taxas de falência terapêutica e recaídas precoces (FRIEDMAN e WEINSTEIN, 2000; PUI e EVANS, 1998).

A t(9;22)(q34;q11) resulta da fusão dos genes *BCR* (cromossomo 9q) e *ABL* (cromossomo 22q) que codifica uma proteína com alta atividade de tirosina quinase. Ocorre aproximadamente em 5% das LLAs da criança (RADICH, 2001).

A translocação t(4;11) resulta do rearranjo 11q23. Ocorre em 5 a 8% da LLAs em crianças (JOHANSSON *et al.*, 1998). Em lactentes está presente em cerca de 70% dos casos e esta relacionada à alta leucometria, infiltração de SNC, pouca resposta ao tratamento inicial e tem sido associada com o fenótipo pró-B (RUBNITZ *et al.*, 1999).

A t(1;19) é resultante da fusão dos genes *E2A* (cromossomo 19) e *PBX1* (cromossomo 1), pode ser encontrada em 5-6% das LLAs de criança. Ocorre quase exclusivamente em LLAs pré-B (RAIMONDI *et al.*, 1990).

A presença dessas translocações estratifica a LLA como alto risco para recaída. Confere um prognóstico desfavorável e uma resposta ruim ao tratamento convencional. Pacientes com tais translocações ou hipodiplóides necessitam de tratamento intensivo e em muitos casos está indicado o transplante de medula óssea (TMO).

1.4.8 Imunofenotipagem

A imunofenotipagem no diagnóstico das leucemias agudas permite a definição correta da linhagem celular em 98% dos casos, dado fundamental na abordagem terapêutica.

A importância prognóstica do imunofenótipo nas LLAs tem sido relatada na literatura, entretanto a importância dessa variável tem diminuído com os avanços no tratamento.

Pacientes com LLA de linhagem B que expressam o antígeno CD10 têm melhor prognóstico. A LLA de células B maduras (FAB-L3 e translocação do gene *C-myc*) é considerada de prognóstico ruim.

A LLA-T, quando associada a fatores prognósticos desfavoráveis como sexo masculino, leucocitose e massa mediastinal, é submetida a tratamento quimioterápico intensivo, apresenta prognóstico similar aos outros casos de LLA T (UCKUN *et al.*, 2001).

A presença de antígenos mielóides na LLA, não é considerada como fator prognóstico ruim na maioria dos trabalhos (PUI, 1993).

1.4.9 Reposta ao tratamento de indução

A rápida resposta a terapia de indução é apontada como uma variável independente de risco de recaída, tanto para as LLA B como para as LLA T.

A intensidade da citorredução é um fator prognóstico independente que pode identificar precocemente pacientes com resposta lenta, os quais estão em risco de apresentar uma remissão de curta duração (PINKEL, 1996).

Há várias formas de avaliar o grau de resposta ao tratamento de indução: análise da medula óssea no D7 ou D14; resposta após a pré-fase com corticóide; avaliação dos blastos no SP após sete dias do início da indução (GAYNON *et al.*, 1997) e mais recentemente, a pesquisa da DRM durante ou no final da indução (CAMPANA, 2003; PUI e EVANS, 2006; SCRIDEI, 2006).

A resposta ao tratamento pode ser avaliada pela monitoração dos blastos no SP no D8 (GAJJAR *et al.*, 1995; GAYNON *et al.*, 1997) ou na MO no D7 ou D15 da citorredução (SCHULTZ *et al.*, 1997).

O grupo BFM tem empregado a resposta a pré-fase com corticóide durante a primeira semana de tratamento como um importante fator prognóstico nas LLAs. Pacientes com menos de 1.000 blastos no sangue periférico após o sétimo dia da pré-fase têm prognóstico mais favorável comparados aos pacientes que permanecem com mais de 1.000 blastos (DORDELMANN *et al.*, 1999). Esse método tem possibilitado detectar um subgrupo de pacientes de muito alto risco que necessitam de tratamento intensivo para alcançar a cura (SCHRAPPE *et al.*, 2000).

Outro método para a análise da resposta ao tratamento é a avaliação da velocidade de redução dos leucócitos periféricos na primeira semana de terapia de indução. No Protocolo GBTLI-99 a leucometria no SP no D8 é usada como parâmetro de definição de risco das leucemias, ou seja, pacientes de RB com contagem de leucócitos superior a $5.000/\text{mm}^3$ no D8 serão considerados respondedores lentos à terapia de indução e deverão ser tratados como alto risco para recaída.

1.4.10 Doença Residual Mínima

Avanços nas técnicas de biologia molecular e da citometria de fluxo permitiram melhor identificação e quantificação das células leucêmicas residuais, aparentemente não identificadas por técnicas morfológicas e de citogenéticas usuais.

A DRM pode ser entendida como a persistência de células blásticas ao longo do tratamento que só podem ser detectadas por técnicas mais sensíveis como PCR ou citometria de fluxo (MARIN *et al.*, 2001; SCRIDEI, 2002). Métodos de detecção da DRM podem ser 100 vezes mais sensíveis que o exame morfológico (CAMPANA, 2003).

A citometria de fluxo utiliza imunofenótipos aberrantes presentes nos blastos residuais para a detecção da DRM (DWORZAK *et al.*, 2002). Esse é um método tecnicamente rápido, simples e mais prático. Quando comparado com outros métodos como o PCR, há uma concordância de 99% entre os resultados obtidos (COUSTAN-SMITH *et al.*, 2002).

A detecção da DRM permite uma melhor avaliação da resposta ao tratamento. Muitos grupos têm demonstrado que pacientes com altos níveis de DRM no final da indução apresentam prognóstico ruim comparados aos com baixos níveis (CHEN *et al.*, 2001). Na fase de consolidação ou mesmo de manutenção a DRM é um forte fator para predizer as recaídas.

A DRM é um fator prognóstico independente e bastante específico na LLA, o seu uso como estratificação de grupo de risco é usado em diversos protocolos, no entanto, a relação da DRM com outros fatores prognósticos ainda não está bem estabelecida (BOROWITZ *et al.*, 2008).

1.5 Moléculas de adesão e leucemias agudas

As interações entre as células neoplásicas, células endoteliais e a MEC são determinantes para a localização dos tumores, assim como a capacidade de migrarem para outros tecidos e se adaptarem em outros microambientes.

Nas leucemias agudas o estroma da MO apresenta um papel importante na regulação da proliferação dos blastos. Essa regulação pode ocorrer pela produção de fatores de crescimento hematopoiéticos solúveis ou ligados a MEC.

As células leucêmicas possuem grande capacidade de disseminação no organismo, uma vez que as mesmas são liberadas da MO para a circulação. A infiltração das células blásticas circulantes começa com a adesão dos blastos aos componentes da MEC e nas células endoteliais, seguida da migração para outros tecidos. Tal fato pode estar relacionado ao aumento da expressão das MA como as integrinas, o CD44 e a L-selectina nos blastos.

Na LLA de precursores B a adesão ao estroma é mediada principalmente pelo VLA-4 e VLA-5, enquanto na leucemia mielóide a adesão é mediada pela combinação da ação das $\beta 1$ e das $\beta 2$ -integrinas. Outras MA como o CD31, CD44 também apresentam um importante papel. Estudos de Anjos *et al.* (2004) sugerem

que a adesão à MEC e a disseminação de células leucêmicas pode ser modulada pela laminina.

Geijtenbeek *et al.* (1999) estudaram a expressão e função das $\beta 1$ e $\beta 2$ -integrinas em 20 pacientes com LLA-B e relataram que as células leucêmicas apresentam defeitos nas vias de ativação dessas MA ou em suas proteínas regulatórias. Esses autores também evidenciaram que as $\beta 1$ -integrinas têm um papel importante no controle do crescimento e sobrevivência das células precursoras B imaturas.

Estudos têm mostrado que a interação $\alpha 4\beta 1$ e seu ligante VCAM-1 apresenta um papel importante na resistência à quimioterapia nas leucemias (MUDRY *et al.*, 2000). Outros estudos têm mostrado o papel da interação e mediação das integrinas na regulação da proliferação anormal e apoptose na LLA (SHAH, 1998).

A expressão do CD 44 e da L-selectina está aumentada em algumas neoplasias hematológicas e associa-se a metástases e ao prognóstico. Nas leucemias, essas MA podem estar associadas a atividade de doença e suas formas disseminadas (EXTERMANN,1998; LIU e JIANG, 2006).

1.5.1 CD44

O CD44 está expresso em muitas neoplasias e correlaciona-se com o comportamento biológico incluindo a tumorigênese, crescimento tumoral, metástases e prognóstico. É um bom marcador de atividade e carga tumoral (LIU e JIANG, 2006).

O CD44 está expresso em níveis elevados em pacientes portadores de leucemias agudas e crônicas (HORST *et al.*, 1990). Em outras neoplasias hematológicas como os linfomas não Hodgkin os níveis aumentados do CD44 ao diagnóstico estão relacionados a um comportamento mais agressivo, pouca resposta ao tratamento e evolução desfavorável da doença (RISTAMAKI *et al.*, 1997).

Níveis plasmáticos da forma solúvel do CD44 (sCD44) estão elevados em diversas neoplasias. Nas leucemias e linfomas em crianças há poucos trabalhos relacionando a expressão do CD44 e sua forma solúvel com os fatores prognósticos.

Taçyildiz *et al.* (2001) demonstraram que a elevada expressão do CD44 e do sCD44 ao diagnóstico em leucemias e linfomas em crianças está associada a um

pior prognóstico e evolução desfavorável. Nos linfomas de Hodgkin e Não-Hodgkin a expressão do CD44 esta relacionada a estágios avançados de doença.

Os níveis de sCD44 esta aproximadamente três vezes mais elevado no momento do diagnóstico das leucemias, que em indivíduos normais, porém diminuem durante a remissão completa retornando a níveis normais (TAKEUCHI *et al.*, 1999).

O CD44 apresenta várias isoformas e a expressão dessas variantes tem sido associada à disseminação de neoplasias hematológicas e prognóstico ruim (PONTA *et al.*, 2003).

Bendall *et al.* (2004) estudaram a expressão da variante v6 nos processos de disseminação das LLAs e observaram que a expressão aumentada do CD44v6 está associado a um prognóstico desfavorável e menor sobrevida.

Há relatos que a ligação do CD44 com anticorpos monoclonais específicos podem reverter o bloqueio na diferenciação das células leucêmicas (CHARRAD *et al.*, 1999), isso aumenta a perspectiva do CD44 ser utilizado como terapia alvo em algumas leucemias.

1.5.2 L-Selectina

A L-selectina é expressa em muitos leucócitos normais e em torno de 60% das células leucêmicas (SPERTINI *et al.*, 1994). A L-selectina pode ser encontrada nas células normais e nos blastos, ligada à membrana (L-selectina) ou em sua forma solúvel (sL-selectina).

A L-selectina é expressa em blastos principalmente mielóides. Os blastos devem interagir com as MA nas células endoteliais através da expressão de seus ligantes, como o Sialyl Lewis. As células endoteliais também expressam CD34 e GlyCAM-1 que poderiam servir como ligantes para as L-selectinas (LIESVELD, 1997).

Estudos de Spertini *et al.* (1994) e Hafez *et al.* (2003) evidenciaram que a expressão L-selectina e da sL-selectina plasmática encontravam-se elevadas em pacientes com LLA ao diagnóstico e os níveis reduziam significativamente durante a remissão, retornando a níveis normais.

Herold *et al.* (2002) mostraram que a concentração de sL-selectina estava também alta na recidiva e que altos níveis estavam associados a blastos circulantes

e ao imunofenótipo T. A ausência da normalização da sL-selectina após a indução esta associada a um risco de falha para alcançar a remissão completa.

Nas leucemias agudas a diminuição dos níveis da sL-selectina pode esta relacionada a remissão e ao prognóstico. Uma elevação rápida de seus níveis foi observado nas recidivas das leucemias evidenciando o papel dessa MA como um marcador de atividade de doença. Estudos de Extermann *et al.* (1998) demonstraram que o nível plasmático aumentado da sL-selectina é um fator de pior prognóstico na LMA.

Este estudo procura estabelecer a correlação da L-selectina e do CD44 com os diversos parâmetros clínicos e laboratoriais das LLAs com os fatores prognósticos, na tentativa de buscar um melhor entendimento do comportamento biológico e dos mecanismos de disseminação extramedular das células leucêmicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a expressão das moléculas de adesão L-selectina e CD44 nas LLAs em crianças e adolescentes com idade inferior a 18 anos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os fatores prognósticos: idade, sexo, leucometria inicial, imunofenotipagem, Índice de DNA, nível da desidrogenase láctica (LDH) e resposta ao tratamento de indução em pacientes com LLA;

- Correlacionar a expressão da L-selectina e do CD44 com os fatores prognósticos das LLAs;

- Correlacionar a expressão da L-selectina e do CD44 com as formas de apresentação extramedular das LLAs.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Pacientes

3.1.1 Critérios de inclusão

- Portadores de LLA com diagnóstico realizado por critérios morfológicos, citoquímicos, imunofenotípicos e citogenéticos, no Centro de Referência do Câncer Dr. Murilo Martins – HIAS, sem tratamento quimioterápico prévio;
- Idade inferior a 18 anos;
- Tratamento consoante o Protocolo GBTLI nos Serviços de Oncologia Pediátrica HC-ICC, HIAS ou HLF, no período de Novembro de 2007 a Novembro de 2008;

3.1.2 Critérios de exclusão

- Pacientes com tratamento quimioterápico prévio e/ou recidivados;
- Pacientes com diagnóstico de LLA B - L3 ou EGIL IV (IgS+);
- Pacientes com LMA e síndromes mielodisplásicas.

3.2 Questões éticas

O estudo foi realizado de acordo com os princípios enunciados na Declaração de Helsinque emendada em Hong-Kong, em 1989, bem como as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1996). O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HC-ICC (Protocolo 66/2007; Anexo A) e HIAS (Protocolo 058/08; Anexo B).

3.3 Coleta de dados

Os familiares de crianças e adolescentes elegíveis para o estudo foram informados sobre o mesmo e convidados a participar, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE; apêndice A).

A coleta de dados foi realizada através de ficha de registro específica, individualizada para cada paciente, e preenchidos pelo pesquisador (Apêndice B).

Foram analisadas variáveis clínicas e laboratoriais observadas ao diagnóstico. As variáveis clínicas associadas à LLA foram: idade, sexo, hepatomegalia e/ou esplenomegalia, linfadenopatia, massa mediastinal, infiltração testicular e de SNC. As laboratoriais foram: hemoglobina, leucócitos, plaquetas, porcentagem de blastos no SP, dosagem de LDH, análise da MO e líquido, bem como imunofenotipagem e a expressão das MA. Especificamente, a enzima LDH foi dosada em sangue periférico. Considerou-se o valor de 1000U/l, em torno de duas vezes o normal (até 480U/l), como divisor entre pacientes com maior ou menor replicação celular.

No oitavo dia da indução (D8) foram analisados a leucometria e a contagem de blastos para avaliação da resposta ao tratamento.

A análise da MO e líquido foram realizados no D28 para avaliação da remissão e da resposta ao tratamento.

As amostras de SP e/ou aspirado da MO foram coletadas nos Serviços de Oncologia Pediátrica do HC-ICC, HIAS ou HLF.

Amostras de SP foram colhidas de 15 crianças com idade inferior a 18 anos, sem afecção neoplásica e sem quadro infeccioso, para estabilização da técnica e referência para o controle laboratorial.

3.4 Critérios diagnósticos

O diagnóstico da LLA foi realizado por critérios morfológicos, citoquímicos, imunofenotípicos e citogenéticos. Seguiu-se o critério da observação de mais de 25% de linfoblastos entre as células hematopoiéticas no aspirado da MO, conforme critérios GBTLI e OMS (BENNETT, 2000).

A coleta da MO foi realizada na crista ilíaca ou esterno dos pacientes, aspirado 3 ml a 5 ml e acondicionada em tubos de Vacutainer® contendo Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Os tubos foram identificados com rótulo com o nome do paciente, data e hora da coleta, sendo enviada ao laboratório em temperatura ambiente para o diagnóstico citomorfológico e imunológico das leucemias e o estudo da expressão das MA.

3.4.1 Análise citomorfológica

O estudo citomorfológico foi realizado em esfregaços de MO corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa. A avaliação citomorfológica seguiu os critérios propostos pelo grupo FAB para as leucemias agudas (BENNETT *et al.*, 1976). Foram

identificados os subtipos L1 e L2. O subtipo L3 não foi analisado no estudo, pois seu tratamento e prognóstico diferem dos outros dois subtipos.

Colorações citoquímicas foram realizadas com o objetivo de auxiliar na caracterização morfológica das LLAs estudadas. A leucemia foi considerada de linhagem linfóide quando a reação de PAS, se positiva, apresentasse grânulos únicos ou em blocos ou menos de 3% de blastos com reação de mieloperoxidase ou sudan black positivos (padrão mielóide) e ausência de blastos com bastão de auer.

3.4.2 Análise imunofenotípica

A classificação imunológica foi realizada pela imunofenotipagem por citometria de fluxo, com um amplo painel de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos específicos de diferenciação linfóide (B e T), mielóides e de células precursoras hematopoiéticas (FOON, 1986; PUI *et al.*, 1993).

As reações foram consideradas positivas quando mais que 20% das células apresentavam reação positiva para os AcMo, inclusive para os anticorpos anti-CD44 e anti-CD62L. Marcadores de células CD34 e o CD3cy, por serem muito específicos e sensíveis, foram considerados positivos a partir de 10%.

A expressão dos antígenos mielóides (CD13 e CD33) foi considerada positiva quando estava presente em mais de 20% dos linfoblastos.

3.4.3 Análise citogenética

A citogenética foi avaliada pela análise do conteúdo de DNA nos linfoblastos por citometria de fluxo. O Índice de DNA (IDNA) dos blastos é definido como a razão do conteúdo de DNA dos blastos na fase G0/G1 e dos linfócitos diplóides normais.

As alterações do IDNA foram divididas em 3 grupos:

Hipodiploidia - IDNA < 1 (blastos com menos de 45 cromossomos);

Diploidia - IDNA =1 (blastos com 46 cromossomos);

Hiperdiploidia - IDNA > 1 e <1,16 (blastos com 47-50 cromossomos);

- IDNA ≥ 1,16 (blastos com mais de 50 cromossomos).

3.5 Diagnóstico de Leucemias extramedulares

3.5.1 Infiltração leucêmica do SNC

O envolvimento do SNC foi definido pela contagem de leucócitos no líquido > $5/\text{mm}^3$ com de blastos leucêmicos e/ou presença de sinais clínicos como a paralisia de nervos cranianos e/ou a presença de lesões encefálicas documentadas por biópsia.

Os pacientes foram classificados, quanto à infiltração do SNC, segundo os critérios do NCI (GAJJAR, 2000), dentro dos seguintes grupos:

SNC 1 - leucócitos < $5/\text{mm}^3$ e ausência de blastos;

SNC 2 - leucócitos < $5/\text{mm}^3$ e presença de blastos;

SNC 3 - leucócitos > $5/\text{mm}^3$ e presença de blastos e/ou alteração de pares cranianos.

3.5.2 Infiltração testicular

A avaliação dos testículos foi realizada pela palpação ao exame físico (aumento testicular indolor, uni ou bilateral), sendo comprovada por biópsia de testículo.

3.5.3 Leucemias com grandes massas tumorais (“Tumor burden”)

Considerou-se linfadenopatia generalizada quando os linfonodos mediam mais que 2 cm de diâmetro e pertenciam a mais de uma cadeia regional não contígua. Visceromegalias quando o fígado e o baço mediam mais que 3 cm abaixo do rebordo costal direito e esquerdo, respectivamente.

A presença de massa mediastinal foi determinada pelo Rx de Tórax com aumento de 1/3 da imagem radiológica própria do mediastino.

3.6 Critérios de estratificação dos Grupos de Risco

No estudo foi utilizado critérios de risco do GBTLI e NCI, no qual utilizam a idade e a leucometria ao diagnóstico para estratificação dos grupos de risco:

Baixo risco para recaída (RB) - pacientes com idade entre 1 e 9 anos e leucócitos ao diagnóstico inferior a $50.000/\text{mm}^3$.

Alto risco para recaída (AR) - lactentes menores de 12 meses e pacientes acima de nove anos, leucócitos ao diagnóstico maior que $50.000/\text{mm}^3$.

Nos pacientes tratados com o Protocolo GBTLI-99 foi associado ao critério de grupo de risco a resposta a terapia de indução no D8 e D28. Leucócitos no D8 inferior a $5.000/\text{mm}^3$ e MO em remissão no D28 foram mantidos no RB, porém pacientes inicialmente no RB com leucócitos no D8 maior que $5.000/\text{mm}^3$ e MO com mais de 5% de blastos no D28 foram considerados de AR.

Outros fatores de risco como a imunofenotipagem, IDNA e citogenética não são considerados para estratificação do grupo de risco no Protocolo GBTLI-93/99.

3.7 Protocolos para análise da expressão da L-selectina e do CD44

3.7.1 Processamento - Separação e preparação das amostras

Após o cadastramento, as amostras de SP e/ou aspirado da MO foram imediatamente analisadas em contador automático (Cell-Dym®) para determinação da leucometria.

O material foi processado de imediato, de acordo com as recomendações do Protocolo de consenso para imunofenotipagem das neoplasias hematológicas por citometria de fluxo (BAIN *et al.*, 2002).

As células mononucleares foram separadas mediante centrifugação em gradiente de densidade utilizando a solução de Fycoll-Hypaque (Becton- Dickson®, San José, CA)

Inicialmente o material foi lavado com solução tampão isotônica de lavagem (PBS-Azida-PSA - anexo B). Centrifugado a $350\times G$ por 2 minutos e descartado o sobrenadante. Foi ajustada a concentração para 10.000 células/ mm^3 com a mesma solução tampão. Todas as centrifugações subsequentes obedeceram ao mesmo padrão.

Aproximadamente $100\mu\text{l}$ ($1.000.000$ de células) foi aliquoteada em 2 tubos FACS de poliestireno para incubação com anticorpos monoclonais conjugados aos fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e clorofilperidina (PerCP).

O antígeno leucocitário comum (CD45 - PerCP) foi utilizado como marcador comum em todos os tubos como método de diferenciar os linfoblastos dos linfócitos, monócitos e granulócitos. (BOROWITZ *et al.*, 1993). Cada amostra foi processada

com um controle isotópico utilizado para definir a fluorescência negativa. Os painéis de anticorpos monoclonais utilizados para avaliar a expressão das MA e demais marcadores estão listados na Tabela 5.

Tabela 5 – Painel de A_cM_O utilizado para imunofenotipagem e avaliação da expressão das moléculas de adesão.

Células precursoras	HLA-DR-FITC (Clone:G4 Pharmingen®) CD34-PE (Clone: 581 Immunostep®)
Ag leucocitário comum	CD45-PerCP (Cl:HI30BD) Pharmingen®)
Linhagem B	CD10-PE (Clone: ALB1- Immunotech®) CD19-PECy5 - Pharmingen®) CD22-PE (Cl: HIB22 – Immunotech®) CD79a-PE (Cl: HM47 BD - Pharmingen®) IgM _{CY} – FITC - Dako®), IgM _m – FITC - Dako®)
Linhagem T	CD1a – FITC - Pharmingen®) CD2 – PE - Immunostep®) CD3– FITC (Clone: UCHT1 – Immunotech®) CD4– FITC - Cytognos®) CD5 – FITC - Pharmingen®) CD7-FITC (Clone: B-B7 – IQP®) CD8 – PE - Cytognos®)
Linhagem mielóide	CD13-PE (Clone: 22A5 – IQP®) CD33-PE (Clone: WM53 BD – Pharmingen®) MPO-FITC (Clone: 266.6K2 – IQP®).
Moléculas de adesão	CD44 – PE (Clone HP2/9 - Immunostep®) CD62L – FITC (Clone HI62L - Immunostep®)

Após a conjugação com os AoMo e homogeneização em vórtex, a mistura foi novamente incubada e mantida em câmara escura por 15 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida material foi tratado com 5 ml de solução de lise para hemácias preparada no próprio laboratório e foi mantido na câmara escura por 10 minutos. O material foi lavado duas vezes com solução tampão de lavagem e suspenso em paraformaldeído a 1% (Anexo C) e encaminhado para leitura imediata no citômetro de fluxo.

3.7.2 Aquisição e leitura das amostras

Aquisição do material foi realizada após calibração e compensação do equipamento FACSCalibur da Becton Dickinson®. Foi realizada a aquisição de 10.000 eventos na região de pequeno tamanho e baixa complexidade definidas pelos parâmetros FSC x SSC.

Para a análise da positividade das amostras e o cálculo da intensidade média de fluorescência (IMF) foi utilizado o programa Cell Quest. A IMF foi expressa por meio de histograma de intensidade de fluorescência versus o número de células. Foi considerada a IMF relativa calculada de acordo com a fórmula: IMF células conjugadas com AcMo menos o IMF das células do controle negativo.

3.8 Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizado o software SPSS 16.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL).

Foi realizado o estudo estatístico descritivo dos parâmetros clínicos e laboratoriais das LLAs e calculadas médias, medianas e desvios padrões.

A análise de associação entre variáveis qualitativas foi efetuada utilizando-se o teste de Qui-quadrado adotando o nível de significância de 5%. Quando as frequências dessas variáveis eram menores que 5, utilizou-se o teste exato de Fisher ou o teste da razão de máxima verossimilhança (no caso de variáveis com três ou mais categorias).

Para análise de diferença de média, cada variável contínua foi avaliada quanto à simetria de sua distribuição por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Na presença de simetria dos dados foram avaliados pelo teste t e na assimetria pelo teste de Mann-Whitney. As curvas de Kaplan-Meier foram utilizadas na determinação das sobrevidas. A comparação univariada das curvas de sobrevida foi realizada através do teste log-rank. As análises multivariadas dos fatores associados com a sobrevida foram realizadas utilizando o modelo de regressão de Cox.

4 RESULTADOS

4.1 Características clínicas

De Novembro/2007 a Novembro/2008 foram diagnosticados 82 casos novos de LLA no Centro de Referência do Câncer Dr. Murilo Martins – HIAS, porém 76 casos foram elegíveis para o estudo.

Todos os pacientes foram tratados com o Protocolo do Grupo Brasileiro para o tratamento das Leucemias na Infância (GBTLI).

A idade média foi de $6,3 \pm 0,5$ anos e a mediana de 5 anos e 3 meses, variando de 5 meses a 17 anos. Os pacientes foram estratificados de acordo com a faixa etária em menores de 1ano, entre 1 e 9 anos e maiores de 9 anos.

A faixa etária mais prevalente foi entre um e nove anos de idade que compreendeu 75% do total. O grupo de lactentes e pacientes acima de 9 anos, considerados grupos de alto risco pela idade, foi de 2,6% e 22,4%, respectivamente.

Em relação ao sexo 65,8% eram do sexo masculino e 34,2% do sexo feminino. A relação masculino: feminino encontrada foi de 1,9:1.

Os pacientes foram distribuídos de acordo com o grupo de risco para recaída, seguindo os critérios do NCI. De acordo com essa classificação 54% dos pacientes do estudo apresentou baixo risco para recaída (RB) e 46% alto risco para recaída (AR).

O achado mais frequente do exame físico foi a hepatomegalia (63%). A esplenomegalia foi encontrada em 58% dos casos e a linfadenomegalia em 44%. Na metade dos casos observou-se hepatoesplenomegalia.

A infiltração de SNC (SNC-3) foi encontrada em 6,5% dos casos, porém um caso (1,3%) apresentou SNC-2. O alargamento de mediastino foi observado em 9 (11,8%) pacientes, associado principalmente a meninos, acima de 9 anos com LLA-T. A infiltração testicular não foi encontrada em nenhum desses pacientes. As características clínicas da amostra estão destacadas na tabela 6

Tabela 6 – Características clínicas dos 76 pacientes estudados com LLA.

Variável	n (%)
Sexo Masculino	50 (65,8)
Feminino	26 (34,2)
Idade (anos) < 1	2 (2,6)
1-9	57 (75)
> 9	17 (22,4)
Risco AR	35 (46,1)
RB	41 (53,9)
Hepatomegalia	48 (63,2)
Esplenomegalia	44 (57,8)
Hepatoesplenomegalia	38 (50,0)
Linfadenopatia	33 (43,4)
Infiltração SNC	5 (6,5)
Massa mediastinal	9 (11,8)

4.2 Características laboratoriais

Em relação ao hemograma do diagnóstico, os valores da média/ mediana para hemoglobina e plaquetas foram respectivamente, 8,24/ 7,9 g/dl e 109.800/ 63.500/mm³. Observou-se que 85% dos pacientes apresentaram Hb <11g/dl, 35% Hb <7g/dl, 65% apresentaram plaquetas abaixo de 100.000/mm³ e 10,5% plaquetas < 20.000/mm³.

A média para a contagem de leucócitos foi de 31.772/mm³ ± 53.352/mm³, com uma mediana de 12.300/mm³. Dezesesseis pacientes (21%) apresentaram leucocitose acima de 50.000/mm³, considerado um fator prognóstico adverso, que os caracteriza como pacientes de alto risco para recaída. A porcentagem de blastos no sangue periférico variou de 0 a 88%, com média de 33,97% ± 32,9% e mediana de 25%. Em 33% dos hemogramas analisados não foram encontrados blastos no esfregaço periférico.

O hemograma apresentou-se normal, sem quaisquer alterações de hemoglobina, leucócitos ou plaquetas e sem blastos, em 4% dos pacientes.

A LDH foi utilizada como marcador prognóstico em todos os casos. Considerou-se o valor de 1000U/l, em torno de duas vezes o normal (até 480U/l), como divisor entre pacientes com maior ou menor replicação celular. Dos pacientes analisados 39 (51,3%) apresentaram LDH > 1000u/l. A média para o LDH foi de 1506,43 ± 1194,03 com variação de 200 – 6565 u/l.

As características laboratoriais dos pacientes estão resumidas na tab. 7.

Tabela 7 – Características laboratoriais dos 76 pacientes estudados com LLA.

Variável	média ± dp	mediana	variação
Hb (g/dl)	8,24 ± 2,68	7,9	2,4 -15,8
Leucócitos (mm ³)	31772 ± 53352	12.300	900 - 320.000
Plaquetas (mm ³)	109.800 ± 122920	63.500	4.000 - 649.000
Blastos SP (%)	33,97 ± 32,96	25	0 - 88
Blastos MO (%)	88,64 ± 13,72	92	30 - 100
LDH (U/l)	1506,43 ± 1194,03	1018	200 - 6565

Pela classificação FAB, o subgrupo L1 foi encontrado em 63 (83%) dos casos e o subgrupo L2 em 13 (17%).

Quanto à classificação imunofenotípica, o imunofenótipo B foi encontrado em 89,5% e o imunofenótipo T em 10,5% dos pacientes. Os subtipos EGIL mais prevalentes foram B II (51,5%) e B III (45,5%). O subtipo EGIL BI (pró-B) foi encontrado em cerca de 3% dos casos. Pacientes com subtipo FAB-L3 ou EGIL B IV não foram incluídos no estudo.

As características dos pacientes com LLA de linhagem B e T estão resumidas na tabela 8. A LLA -T foi mais frequente em meninos, maiores de nove anos de idade, com alta contagem de leucócitos e maior média de hemoglobina ao diagnóstico, maior envolvimento do SNC e mediastinal. A maioria dos casos de LLA-T (75%) apresentou CD10 negativo. Houve uma associação de fatores desfavoráveis nesse grupo de pacientes, que os caracteriza como um grupo de alto risco para recaída, enquanto na LLA-B se observou uma associação com fatores prognósticos mais favoráveis.

Tabela 8 - Características da LLA-B e LLA-T dos 76 pacientes estudados.

Variável	LLA B (n=68)	LLA T (n=68)
Idade (m)	67,94±5,84	134,13 ± 52,09
Sexo Masculino	44 (64,7)	6 (75)
Feminino	24 (35,3)	2 (25)
Risco AR	28 (41,2)	7 (87,5)
RB	40 (58,8)	1 (12,5)
FAB L1	56 (82,4)	7 (87,5)
L2	12 (17,6)	1 (12,5)
Hepatomegalia	43 (63,2)	5 (62,5)
Esplenomegalia	40 (58,8)	4 (50)
Linfadenopatia	26 (38,2)	7 (87,5)
Infiltração SNC	4 (5,9)	1 (12,5)
Massa mediastinal	3 (4,4)	6 (75)
CD10 Positivo	66 (97,1)	2 (25)
Hb	7,9 ± 2,55	10,8 ± 2,45
Leucometria	24304,2 ± 4796,6	95250 ± 36305
LDH	1458,50 ± 140,57	1913,88 ± 524,17

Em relação à sobrevida global nas LLA-B e T, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,087$), conforme se evidencia na figura 4.

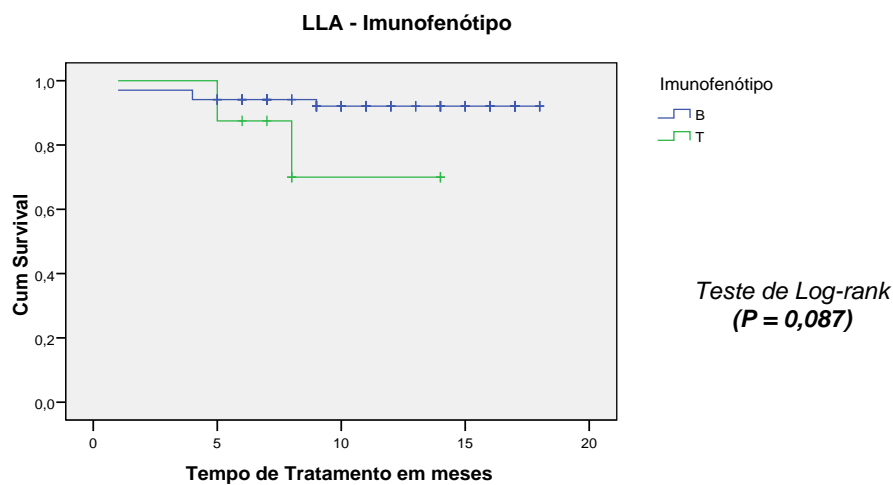


Figura 4 – Correlação do imunofenótipo com a sobrevida global pela Curva de Kaplan-Meier nos 76 pacientes com LLA

A citogenética foi avaliada pelo IDNA por citometria de fluxo em 58 pacientes. Não foi pesquisada a presença do cromossomo Ph1 ou outras translocações.

Observou-se diploidia em 76% (44/58) dos pacientes (fig. 5A) e hiperdiploidia em 24% (14/58) dos casos, sendo 11 casos de hiperdiploidia com IDNA $\geq 1,16$ (fig. 5B).

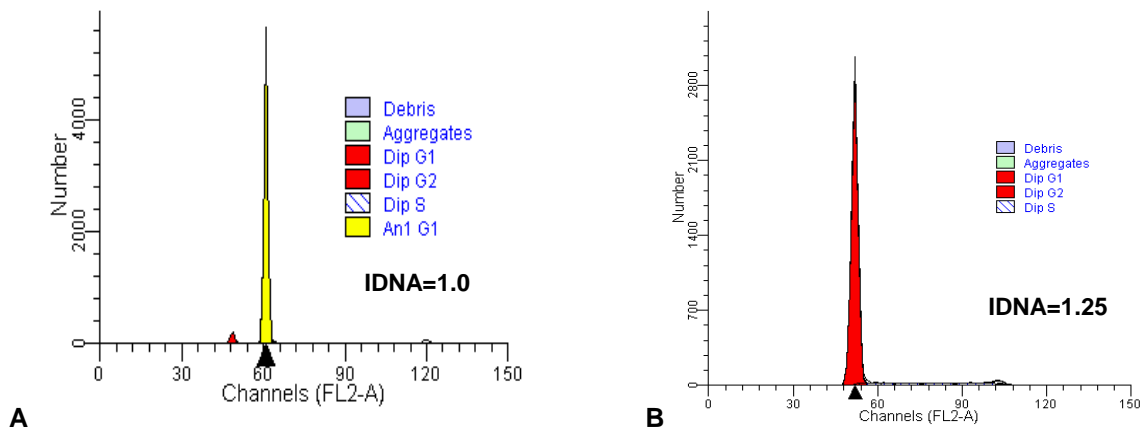


Figura 5 – Histogramas do IDNA, por citometria de fluxo, em pacientes com LLA diploide (A) e LLA hiperdiploide (B).

Nos pacientes hiperdiploides com IDNA $\geq 1,16$ foi encontrada uma forte associação de fatores de bom prognóstico e baixo risco para recaída, tais como idade entre 2 e 8 anos, baixa contagem de leucócitos, imunofenótipo B e 100% de positividade do CD10.

Esses pacientes apresentaram uma boa resposta ao tratamento de indução, blastos D8 $< 1.000/\text{mm}^3$ e leucócitos no D7 $< 5.000/\text{mm}^3$ e uma remissão hematológica de 100%. Nesse grupo de pacientes não houve recidiva precoce e todos estão vivos.

4.3 Avaliações da taxa de remissão e da resposta ao tratamento de indução

Em relação ao tratamento de indução 75 (98,7%) dos pacientes foram analisados. Um paciente apresentou óbito precoce na indução, portanto foi excluído da avaliação da resposta no D28. Dos 75 pacientes avaliados a remissão hematológica completa foi de 95 % e a falha indutória foi observada em 5% dos pacientes.

A maioria dos pacientes 95% (72/76) apresentou uma leucometria no D8 menor que $5.000/\text{mm}^3$ e contagem de blastos no $\text{D8} < 1.000/\text{mm}^3$, resultados associados a uma boa resposta a terapia de indução.

A recidiva precoce ocorreu em 4% dos casos. Ao final da avaliação 90,8% (69/76) estavam vivos e 9,2% (7/76) foram a óbito, sendo dois óbitos (2,6%) na fase de indução. Não houve perda de seguimento do grupo estudado.

4.4 Expressão do CD44 e da L-selectina em indivíduos normais

A expressão da L-selectina e do CD44 foi avaliada em granulócitos e linfócitos do sangue periférico de 15 crianças e adolescentes normais, com idade variando de 1 a 18 anos. Observou-se uma alta positividade do CD44 e da L-selectina nos granulócitos e linfócitos do SP de indivíduos normais (tabela 9). Em relação ao IMF houve uma maior expressão do CD44 e da L-selectina nos linfócitos que nos granulócitos (tabela 9)

Tabela 9 - Expressão da L-selectina e do CD44 em linfócitos e granulócitos de indivíduos normais. Fortaleza, 2009.

	Linfócitos	Granulócitos
CD44 (%)	87,33±14,28	94,30±10,35
CD44 IMF	212,00±72,04	199,48 ±56,99
L-selectina (%)	81,28±13,45	87,33 ±13,41
L-selectina IMF	268,85±68,21	258±72,03

4.5 Expressão do CD44 nas LLAs

O CD44 foi avaliado, por citometria de fluxo, nas 76 amostras de pacientes com LLA. Os parâmetros analisados foram positividade e a intensidade média de fluorescência (IMF).

A expressão do CD44 em todas as leucemias estudadas foi de 75% e a média do IMF de $127,52 \pm 10,84$ (tabela 10).

Tabela 10 – Expressão do CD44 nas LLAs. Fortaleza, 2009.

LLA (n=76)	LLA - B (n=68)	LLA - T (n=8)
75%*	76,3%	87,5%
127,52±10,84**	124,83±11,87	150,44 ±20,29

* porcentagem de casos positivos ** IMF

4.5.1 Expressão do CD44 nos fatores prognósticos nas LLAs

A relação entre os fatores prognósticos das LLAs (idade, sexo, risco, leucometria ao diagnóstico) e a expressão do CD44 é demonstrada na tabela 11. Não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa entre as variáveis analisadas ($p > 0,05$).

Tabela 11 – Análise da associação entre a positividade do CD44 e os fatores prognósticos das LLAs. Fortaleza, 2009.

Variáveis	CD 44			Estatísticas
	Positivo	Negativo	Total	
1. Idade				
1-9 anos	42	15	57	p = 0,349 ¹ OR = 0,52* IC 95%: 0,10 – 2,33
<1 a e > 9 a	16	03	19	
Total	58	18	76	
1. Sexo				
Masculino	40	10	50	p = 0,295 ¹ OR = 1,778* IC 95%: 0,602 – 5,253
Feminino	18	8	26	
Total	58	18	76	
3. Risco				
Alto Risco	27	8	35	p = 0,875 ¹ OR = 1,089* IC 95%: 0,376 - 3,153
Baixo Risco	31	10	41	
Total	58	18	76	
4. Leucometria ao diagnóstico				
< 50.000	45	15	60	p = 0,601 ¹ OR = 0,69* IC 95%: 0,14 – 3,15
> 50.000	13	03	16	
Total	58	18	76	

Fonte: primária 1 – Teste de Qui-quadrado * razão de prevalências

4.5.2 Expressão do CD44 e Classificação FAB, EGIL e citogenética

Na análise da expressão do CD44 e a classificação FAB observou-se que pacientes com LLA L1 apresentaram uma positividade do CD44 de 76% e LLA L2 de 77%, porém sem significância estatística ao nível de 5%. Em relação à classificação imunofenotípica a LLA-B apresentou uma expressão do CD44 de 76,3% e a média de IMF de 124,83±11,87, enquanto na LLA-T a positividade foi de 87,5% e a média de IMF de 150,44 ±20,29. Houve uma maior expressão do CD 44 no imunofenótipo

T. A expressão do CD44 nas LLA B e T não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Tabelas 12).

As Figuras 6 e 7 mostram uma elevada expressão da L-selectina e do CD44 em linfoblastos de LLA-B e T, respectivamente. O CD 45 foi utilizado como janela para melhor identificação das células blásticas.

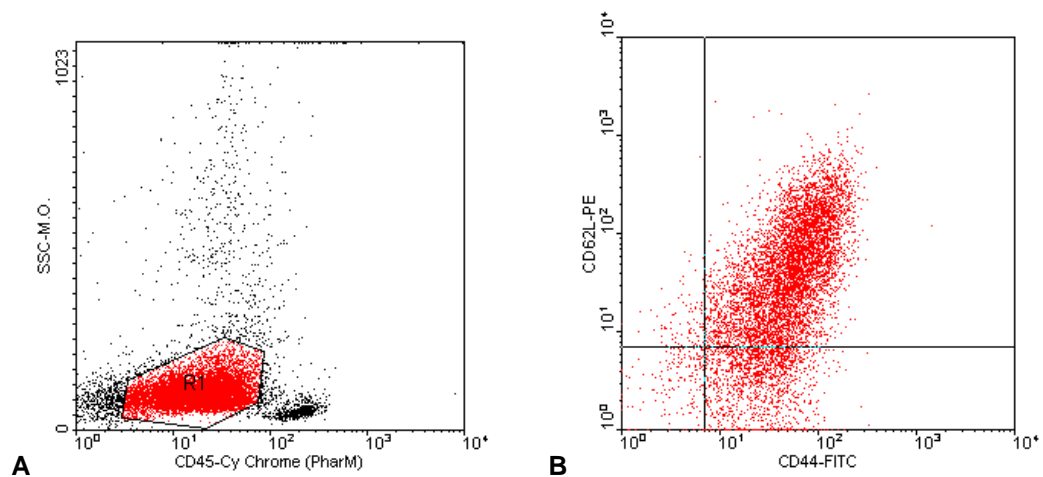


Figura 6 - Expressão das MA na LLA de linhagem B. A - seleção das células blásticas de acordo com a intensidade de fluorescência do CD45. B - expressão do CD44 e CD62L na população de blastos.

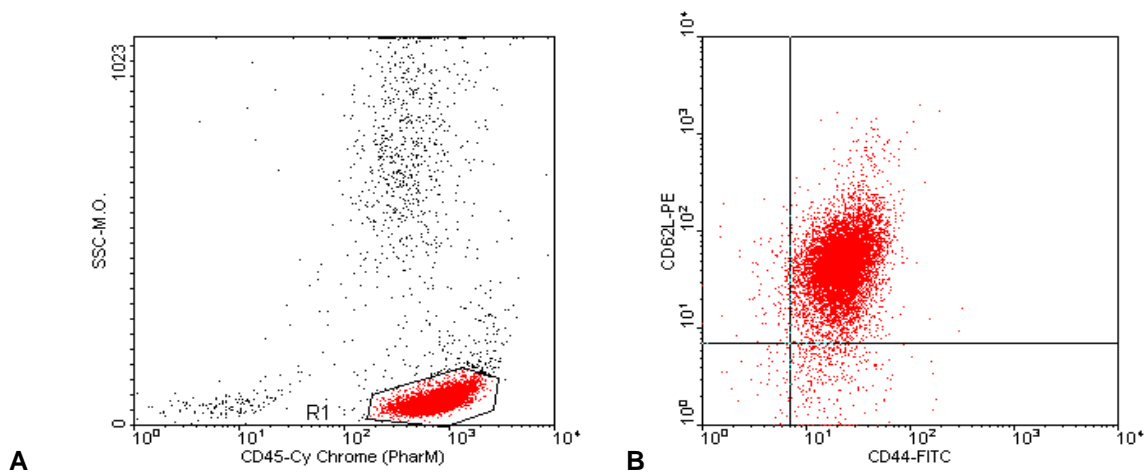


Figura 7 - Expressão das MA na LLA de linhagem T. A - seleção das células blásticas de acordo com a intensidade de fluorescência do CD45. B - expressão do CD44 e CD62L na população de blastos.

Todos os subtipos EGIL, BI a BIII e TII a TIV, apresentaram uma positividade do CD44 acima de 75%, porém sem significância estatística ($p=0,638$; tabela 12).

O IDNA foi realizado em 58 pacientes. Observou-se diploidia em 76% (44/58) dos pacientes e hiperdiploidia em 24% (14/58) dos casos, sendo 11 casos de hiperdiploidia com IDNA $\geq 1,16$.

Na análise da expressão do CD44 em relação ao IDNA foi encontrada uma positividade em 100% dos pacientes hiperdiploides, enquanto que nos pacientes diploides foi de 72%, sendo estatisticamente significativa ($p=0,028$; tabela 12).

Quando se correlaciona a média do IMF do CD44 com o IDNA, observa-se que a média nos blastos hiperdiploides (185,40) é superior a média dos blastos diploides ($p=0,034$; tabela13).

Tabela 12 – Análise da associação entre a positividade do CD44 e a Classificação FAB, EGIL e citogenética das LLAs. Fortaleza, 2009.

Variáveis	CD 44			Estatísticas
	Positivo	Negativo	Total	
1. Morfologia FAB				
L1	48	15	63	p = 1,000 ² OR = 0,960 IC 95%: 0,233 - 3,950
L2	10	3	13	
Total	58	18	76	
2. Imunofenótipo				
B	51	17	68	p = 0,672 ² OR = 0,429* IC: 0,049 – 3,739
T	7	1	8	
Total	58	18	76	
3. Classificação EGIL				
BI	2	0	2	p = 0,638 ³
BII	26	9	35	
BIII	23	8	31	
TII	3	0	3	
TIII	3	1	4	
TIV	1	0	1	
Total	58	18	76	
4. CD10				
Positivo	51	17	68	p = 0,672 ² OR = 0,429* IC 95%: 0,049 - 3,739
Negativo	7	1	8	
Total	58	18	76	
5. Índice de DNA				
Hiperdiploide	14	0	14	p = 0,028 ² RP = 1,375* IC 95%: 1,147 - 1,648
Diploide	32	12	44	
Total	46	12	58	

Fonte: primária 2 – Teste exato de Fisher; 3 - Teste da razão de máxima verossimilhança; * razão de prevalências.

Tabela 13 – Análise de diferença de média/ mediana do CD44IMF segundo características clínicas dos pacientes. Fortaleza, 2009.

	CD44IMF			Valor p
	N	Média	Desvio padrão	
Índice de DNA				
Hiperdiplóide	14	185,40	93,87	0,034 ¹
Diplóide	44	121,63	96,47	

Fonte: primária 1 - Teste t assumindo variâncias iguais.

4.5.3 Expressão do CD44 e avaliação da resposta ao tratamento de indução

Dentre os fatores prognósticos relacionados ao tratamento (contagem de leucócitos e blastos no D8, avaliação da MO no D28) a intensidade da expressão do CD44 não se relacionou com a resposta ao tratamento ($p > 0,05$; tabela 14).

Tabela 14 – Análise da associação entre a positividade do CD44 e a resposta ao tratamento de indução das LLAs. Fortaleza, 2009.

Variáveis	CD 44			Estatísticas
	Positivo	Negativo	Total	
1. Leucometria D8				
< 5.000	50	16	66	p = 0,767 ¹ OR = 0,78* IC 95%: 0,10 – 4,67
> 5.000	8	2	10	
Total	58	18	76	
2. Blastos D8				
< 1.000	55	17	72	p = 0,942 ¹ OR = 1,08* IC 95%: 0,57 – 1,82
> 1.000	3	1	4	
Total	58	18	76	
3. Medula Óssea D28				
M1	54	17	71	p = 0,105 ³
M2	0	1	1	
M3	3	0	3	
Total	57	18	75	
4. Status				
Vivo	52	17	69	p = 1,000 ² OR = 0,510* IC95%: 0,057 - 4,540
Morto	6	1	7	
Total	58	18	76	

Fonte: primária 1 – Teste de Qui-quadrado; 2 – Teste exato de Fisher; 3 – Teste da razão de máxima verossimilhança; * razão de prevalências.

Em relação à sobrevida global dos pacientes com positividade para o CD44 (figura 8), não foi estatisticamente significativa ($p=0,560$).

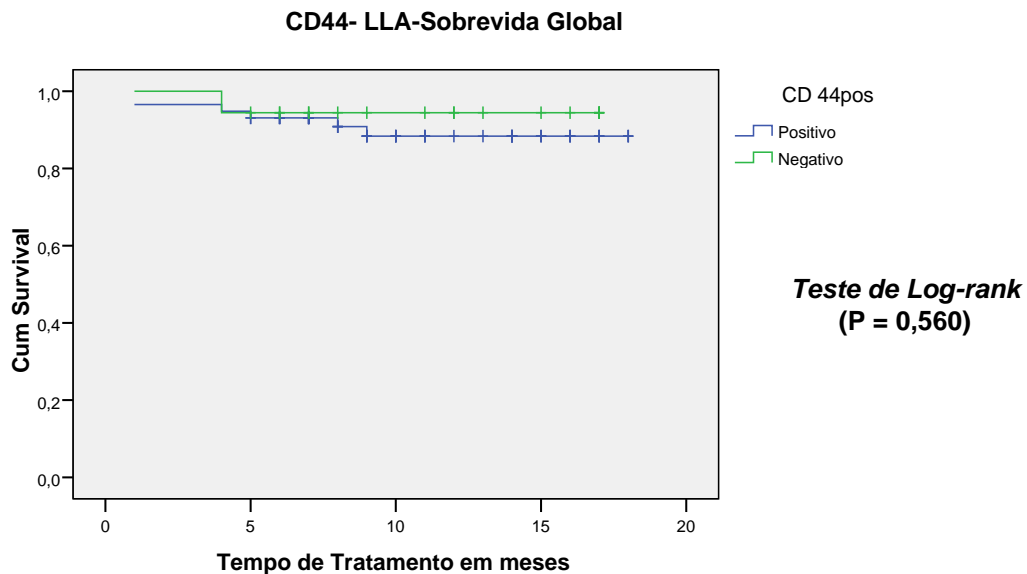


Figura 8 - Correlação do CD44 com a sobrevida global pela Curva de Kaplan- Meier nos 76 pacientes com LLA.

4.5.4 Expressão do CD44 no acometimento extramedular e nas formas tumorais das LLAs

No acometimento extramedular (ganglionar, esplênico, hepático, mediastinal e de SNC) das LLAs foi observado uma expressão do CD44 acima de 80%, porém não estatisticamente significante ($p > 0,05$) quando analisado separadamente cada tipo de acometimento extramedular (tabela 15).

Observa-se na tabela 15 uma maior expressão do CD 44 nos linfoblastos dos pacientes que apresentam massa tumoral. Dos 57 pacientes que apresentavam massa tumoral, 48 (84%) apresentam positividade para o CD44, enquanto que os pacientes com LLA sem massa tumoral apresentam uma positividade de 52%, sendo esta diferença estatisticamente significante ($p = 0.01$). Pacientes que apresentam LLA com massa tumoral têm quase cinco vezes mais chances de expressar o CD44 que os pacientes sem massa tumoral (OR=4,8).

Quando se separa as LLAs pelo imunofenótipo, pacientes com LLA-B com massa tumoral apresentam 84% de linfoblastos CD44 positivos, mantendo a significância estatística ao nível de 1%. Pacientes que apresentam LLA-B com

massa tumoral apresentam quase cinco vezes mais chances de expressar o CD44 que os pacientes sem massa tumoral (OR=4,61).

Em relação aos pacientes com LLA-T com massa tumoral apresentaram uma positividade para o CD44 de 100%, no entanto, o pequeno tamanho da amostra (n=8) limitou a aplicação dos testes estatísticos.

Tabela 15 – Análise da associação entre a positividade do CD44 e o acometimento extramedular e as formas tumorais das LLAs. Fortaleza, 2009.

Variáveis	CD 44			Estatísticas
	Positivo	Negativo	Total	
1. Linfadenomegalia				
Sim	28	5	33	p = 0,125 ¹ OR = 2,427 IC95%: 0,766 – 7,686
Não	30	13	43	
Total	58	18	76	
2. Hepatomegalia				
Sim	39	9	48	p = 0,295 ² OR = 2,05 IC95%: 0,62– 6,86
Não	19	9	28	
Total	58	18	76	
3. Esplenomegalia				
Sim	36	8	44	p = 0,293 ² OR = 2,05 IC95%: 0,62– 6,82
Não	22	10	32	
Total	58	18	76	
4. Infiltração de SNC				
1	53	17	70	p = 0,743 ³
2	1	0	1	
3	4	1	5	
Total	58	18	76	
5. Envolvimento de Mediastino				
Sim	8	1	9	p = 0,677 ² OR = 2,720 IC95%: 0,317 – 23,361
Não	50	17	67	
Total	58	18	76	
6. LDH				
<1.000	31	6	37	p = 0,135 ² OR = 2,30 IC95%: 0,67 – 8,06
>1.000	27	12	39	
Total	58	18	76	
7. Leucemias com massa tumoral				
Sim	48	9	57	p = 0,01 ² OR = 4,8 IC95%: 1,33– 17,81
Não	10	9	19	
Total	58	18	76	
8. LLA-B com massa tumoral				
Sim	41	8	49	P = 0,011 ² OR: 4,61 IC95%: 1,23 – 17,79
Não	10	9	19	
Total	51	17	68	
9. LLA- T com massa tumoral				
Sim	8	8	8	* não realizado
Não	0	0	0	
Total	8	8	8	

Fonte: primária 1 – Teste de Qui-quadrado; 2 – Teste exato de Fisher; 3 – Teste da razão de máxima verossimilhança

4.6 Expressão da L-selectina nas LLAs

A expressão da L-selectina nas leucemias estudadas foi de 58% e a média do IMF de 130,63±13,80.

Conforme demonstrado na tabela 16, as LLA-T apresentam a expressão da L-selectina (positividade e IMF) mais elevada que na LLA-B.

Tabela 16 – Expressão da L-selectina nas LLAs. Fortaleza, 2009.

LLA (n=76)	LLA - B (n=68)	LLA - T (n=8)
*58%	54,4%	87,5%
**130,63±13,80	115,90±12,75	272,33±52,72

* porcentagem de casos positivos ** IMF

4.6.1 Expressão da L-selectina e fatores prognósticos nas LLAs

A relação entre os fatores prognósticos das LLAs (idade, sexo, risco, leucometria ao diagnóstico) e a expressão da L-selectina é demonstrada na tabela 17. Não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa entre as variáveis analisadas ($p > 0,05$).

Tabela 17 – Análise da associação entre a positividade da L-selectina e os fatores prognósticos das LLAs. Fortaleza, 2009.

Variáveis	L-selectina			Estatísticas
	Positivo	Negativo	Total	
1. Idade				
1-9 anos	35	22	57	p = 0,283 ¹ OR = 1,77* IC 95%: 0,55 – 5,71
<1 a e > 9 a	9	10	19	
Total	44	32	76	
1. Sexo				
Masculino	30	20	50	p = 0,606 ¹ OR = 1,286* IC 95%: 0,494 – 3,346
Feminino	14	12	26	
Total	44	32	76	
3. Risco				
Alto Risco	23	12	35	p = ,202 ¹ OR = 1,825* IC 95%: 0,721 - 4,620
Baixo Risco	21	20	41	
Total	44	32	76	
4. Leucometria ao diagnóstico				
< 50.000	32	28	60	p = 0,11 ¹ OR = 0,38* IC 95%: 0,09 – 1,98
> 50.000	12	4	16	
Total	44	32	76	

Fonte: primária 1 – Teste de Qui-quadrado; * razão de prevalências.

4.6.2 Expressão da L-selectina e Classificação FAB, EGIL e citogenética das LLAs

Na análise da expressão da L-selectina na classificação FAB observou-se que pacientes com LLA L1 apresentaram uma positividade de 55% e LLA L2 de 69%, porém não estatisticamente significativa ($p=0,539$).

Em relação à classificação imunofenotípica a LLA-B apresentou uma expressão da L-selectina de 54,4% e a média de IMF de $115,90 \pm 12,75$, enquanto na LLA-T a positividade foi de 87,5% e a média de IMF de $272,33 \pm 52,72$. Houve uma maior expressão da L-selectina no imunofenótipo T. A expressão da L-selectina nas LLA-T foi estatisticamente significativa ($p=0,004$) quando se compara as médias do IMF (Tabelas 18 e 19). Como se observa na tabela 18, a análise estatística dos subtipos EGIL BI a BIII e TI a TIV e do IDNA não mostrou associação significativa com a expressão da L-selectina ($p > 0,05$).

Tabela 18 – Análise da associação entre a positividade da L-selectina segundo a Classificação FAB, EGIL e citogenética das LLAs. Fortaleza, 2009.

Variáveis	L-selectina			Estatísticas
	Positivo	Negativo	Total	
1. Morfologia FAB				
L1	35	28	63	p = 0,539 ² OR = 0,556 IC 95%: 0,155 - 1,995
L2	9	4	13	
Total	44	32	76	
2. Imunofenótipo				
B	37	31	68	p = 0,128 ² OR = 0,171 IC 95%: 0,020 - 1,462
T	7	1	8	
Total	44	32	76	
4. Classificação EGIL				
BI	1	1	2	p = 0,355 ³
BII	18	17	35	
BIII	18	13	31	
TII	3	0	3	
TIII	3	1	4	
TIV	1	0	1	
Total	44	32	76	
3. CD10				
Positivo	37	31	68	p = 0,128 ² OR = 0,171 IC 95%: 0,020 - 1,462
Negativo	7	1	8	
Total	44	32	76	
4. Índice de DNA				
Hiperdiplóide	8	6	14	p = 0,897 ¹ OR = 0,923 IC 95%: 0,273 - 3,118
Diplóide	26	18	44	
Total	34	24	58	

Fonte: primária 2 – Teste exato de Fisher; 3 - Teste da razão de máxima verossimilhança; * razão de prevalências.

Tabela 19 – Análise de diferença de média/ mediana do IMF da L-selectina segundo Classificação FAB, EGIL e citogenética das LLAs. Fortaleza, 2009.

Variáveis	N	Média	Desvio padrão	Valor p
Morfologia FAB				
L1	63	38,03	2396,00	0,684 ¹
L2	13	40,77	530,00	
Imunofenótipo				
B	68	36,03	2450,00	0,004 ¹
T	8	59,50	476,00	
Índice de DNA				
Hiperdiplóide	14	30,79	431,00	0,744 ¹
Diplóide	44	29,09	1280,00	
Fonte: primária	1 - Teste de Mann-Whitney			

4.6.3 Expressão da L-selectina e avaliação da resposta ao tratamento

Dentre os fatores prognósticos relacionados ao tratamento (contagem de leucócitos e blastos no D8 e avaliação da MO no D28) a intensidade da expressão da L-selectina não se relacionou com a resposta ao tratamento de indução ($p > 0,05$), conforme demonstrado na tabela 20.

Tabela 20 – Análise da associação entre a positividade da L-selectina e a resposta ao tratamento de indução das LLAs. Fortaleza, 2009.

Variáveis	L-selectina			Estatísticas
	Positivo	Negativo	Total	
1. Leucometria D8				
< 5.000	37	29	66	p = 0,405 ¹ OR = 0,55 IC 95%: 0,102 – 2,66
> 5.000	7	3	10	
Total	44	32	76	
2. Blastos D8				
< 1.000	40	32	72	p = 0,133 ² OR = 0,56 IC 95%: 0,45- 0,68
> 1.000	4	0	4	
Total	44	32	76	
3. Medula Óssea D28				
M1	39	32	71	p = 0,104 ³
M2	1	0	1	
M3	3	0	3	
Total	43	32	75	
4. Status				
Vivo	39	30	69	p = 0,692 ² OR = 0,520 IC 95%: 0,094 - 2,868
Morto	5	2	7	
Total	44	32	76	

1 – Teste de Qui-quadrado; 2 – Teste exato de Fisher; 3 – Teste da razão de máxima verossimilhança.

Em relação à sobrevida global dos pacientes com positividade para a L-selectina (figura 9), não foi estatisticamente significativa ($p=0,502$).

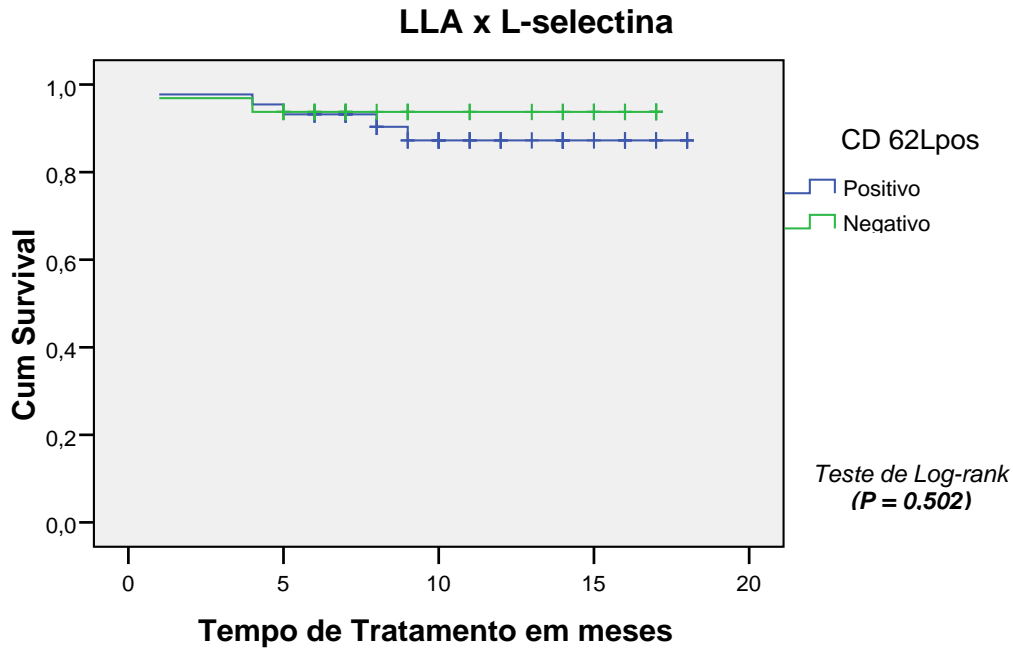


Figura 9 - Correlação da L-selectina com a sobrevida global pela Curva de Kaplan-Meier nos 76 pacientes com LLA.

4.6.4 Expressão da L-selectina no acometimento extramedular e nas formas tumorais das LLAs

No acometimento extramedular (ganglionar, esplênico, hepático, mediastinal e de SNC) das LLAs foi observado uma expressão da L-selectina em torno de 60%, porém não estatisticamente significativa ($p>0,05$) quando analisado separadamente cada tipo de acometimento extramedular (tabela 21).

Dos 57 pacientes que apresentavam massa tumoral, 32 (56%) apresentam positividade para a L-selectina, enquanto que os pacientes sem massa tumoral apresentam uma positividade de 63%. A expressão da L-selectina nos linfoblastos dos pacientes que apresentam massa tumoral e não tumoral não foi estatisticamente significativa ($p=0,778$).

Tabela 21 – Análise da associação entre a positividade da L-selectina e o acometimento extramedular e formas tumorais das LLAs. Fortaleza, 2009.

Variáveis	L-selectina			Estatísticas
	Positivo	Negativo	Total	
1. Linfadenomegalia				
Sim	20	13	33	p = 0,675 ¹ OR = 1,218 IC 95%: 0,484 - 3,062
Não	24	19	43	
Total	44	32	76	
2. Hepatomegalia				
Sim	28	20	48	p = 0,889 ² OR = 1,05 IC 95%: 0,37- 2,99
Não	16	12	28	
Total	44	32	76	
3. Esplenomegalia				
Sim	24	20	44	p = 0,646 ¹ OR = 0,72 IC 95%: 0,26 - 2,02
Não	20	12	32	
Total	44	32	76	
4. Envolvimento de Mediastino				
Sim	7	2	9	p = 0,288 ² OR = 2,838 IC 95%: 0,549 - 14,682
Não	37	30	67	
Total	44	32	76	
5. Infiltração de SNC				
1	40	30	70	p = 0,572 ³
2	1	0	1	
3	3	2	5	
Total	44	32	76	
6. LDH				
<1.000	22	15	37	p = 0,787 ² OR = 1,13 IC95%: 0,41-3,12
>1.000	22	17	39	
Total	44	32	76	
7. Leucemias com massa tumoral				
Sim	32	25	57	p = 0,788 ¹ OR = 0,72 IC 95%: 0,22- 2,44
Não	12	7	19	
Total	44	32	76	

Fonte: primária 1 – Teste de Qui-quadrado; 2 – Teste exato de Fisher; 3 – Teste da razão de máxima verossimilhança.

4.7 Análise multivariada dos fatores prognósticos das LLAS estudadas

No modelo de Cox multivariável ajustado (tabela 22), os fatores prognósticos, significativamente associados à sobrevida foram: contagem de leucócitos ($p=0,03$), sexo ($p=0,028$), classificação do risco ($p=0,012$), EGIL T ($p=0,017$), baço maior que 3 cm ($p=0,009$), e o CD62LIMF ($p=0,023$).

A comparação entre os riscos relativos mostra que o risco é maior para o sexo masculino para indivíduos previamente classificados como alto risco (quatro vezes maior quando comparado aos indivíduos de baixo risco), que apresentavam baço maior ou igual a 3 cm e com índices maiores de CD62LIMF.

Tabela 22 – Resultados do modelo de riscos proporcionais de Cox dos fatores prognósticos das LLAs estudadas. Fortaleza, 2009.

Variáveis na equação	B	Valor p	Risco Relativo (RR)	IC 95,0% para RR	
				Inferior	Superior
Sexo	-0,820	0,028	0,440	0,212	0,916
Idade (< 1 ano e > 9 anos)	-0,343	0,584	0,710	0,208	2,419
FAB	-0,783	0,107	0,457	0,177	1,183
Risco	1,421	0,012	4,143	1,372	12,507
IDNA	0,423	0,338	1,527	0,642	3,628
Baço (≥3cm)	1,265	0,009	3,543	1,363	9,208
Leucócitos em D0	0,000	0,030	1,000	1,000	1,000
Leucócitos em D8	0,000	0,056	1,000	1,000	1,000
Blastos em D8	-0,048	0,342	0,953	0,863	1,052
CD44IMF	-0,003	0,163	0,997	0,994	1,001
CD62LIMF	-0,004	0,023	0,996	0,992	0,999
Egil (Grupo T)		0,017			
Grupo B1	-1,071	0,421	0,343	0,025	4,662
Grupo B2	-2,004	0,056	0,135	0,017	1,056
Grupo B3	-2,644	0,009	0,071	0,010	0,521
SNC (Grupo 3)		0,230			
Grupo 1	0,649	0,442	1,913	0,366	10,006
Grupo 2	-1,767	0,284	0,171	0,007	4,330

5 DISCUSSÃO

5.1 Características clínicas, laboratoriais e fatores prognósticos das LLAs

A LLA na criança não é uma doença única, mas um grupo de doenças com uma variedade de apresentações clínicas, evolução e diversas aberrações genéticas nos blastos leucêmicos.

A estratificação da LLA utiliza critérios clínicos (idade, sexo), laboratoriais (contagem de leucócitos ao diagnóstico, presença blastos no SP e líquido), características imunofenotípicas, citogenéticas e moleculares dos blastos, assim como a resposta ao tratamento de indução (FRIEDMANN e WEINSTEIN, 2000; SMITH *et al.*, 1996).

Em relação à idade, os resultados do estudo foram semelhantes aos encontrados no Protocolo GBTLI-93 e na literatura: 2,6% abaixo de um ano, 75% entre um e nove anos e 22,4% acima de nove anos. O grupo de maior frequência (entre um e nove anos) associa-se aos fatores prognósticos mais favoráveis. Nessa faixa etária, a SLE em seis anos, no Protocolo GBTLI-93, foi superior a dos pacientes com idade superior a 10 anos (73% vs. 59%) (Protocolo GBTLI-93).

No estudo foram encontrados dois lactentes com idade inferior a 12 meses. Esses pacientes apresentaram uma associação com fatores prognósticos desfavoráveis como a alta leucometria inicial, imunofenótipo BI (Pró-B), hepatoesplenomegalia e pouca resposta ao tratamento de indução. Resultados concordantes com a literatura (BASSO *et al.*, 1992; PUI *et al.*, 1995). Os lactentes apresentam maior risco para recaída e necessitam de tratamento mais intensivo. Em muitos grupos internacionais e alguns nacionais esses pacientes são tratados com protocolos específicos, baseados em maior intensidade de tratamento, (RUBNITZ *et al.*, 1994).

Dos pacientes analisados, 17 (23%) foram crianças com idade acima de nove anos: achados semelhantes ao Protocolo GBTLI-93. Historicamente, adolescentes e adultos jovens têm maior taxa de recaída e sobrevida diminuída, quando comparados a crianças entre um e 10 anos (PUI *et al.*, 1999). Resultados mais desfavoráveis nesse grupo podem decorrer da associação com outros fatores de

pior prognóstico como altas leucometrias, alterações citogenéticas e imunofenótipo T.

Há discussões na literatura em relação ao melhor protocolo para tratar tais adolescentes. Alguns autores relatam que esse grupo quando tratados com protocolos pediátricos de alto risco respondem melhor ao tratamento e apresentam maior taxa de remissão contínua. A evolução mais favorável parece estar relacionada com a seleção das drogas e a maior dose-intensidade dos protocolos pediátricos (BOISSEL *et al.*, 2003; NACHMANN, 2005).

No presente estudo, 65,8% dos casos foram do sexo masculino e a razão sexo masculino/ feminino encontrada foi de 1,9, semelhante à encontrada por Rego *et al.* (1996), no entanto, acima dos resultados do Protocolo GBTLI-93 que foi de 1,0. Trabalhos realizados em Pernambuco e na Bahia encontraram nas LLAs um predomínio do sexo masculino, semelhantes aos encontrados em nosso estudo (BARRETO, 2001; LEITE *et al.*, 2007). Relatos de largas séries internacionais confirmam que há discreto predomínio da doença no sexo masculino, porém frequências variáveis são descritas por diferentes autores, como Ma *et al.*, em 1997, na China, com 65,7% e Udayakumar *et al.*, em 2007, com 63,8%.

O estudo BFM-90 em LLA de linhagem B demonstrou que o sexo feminino apresenta uma evolução favorável com SLE de 82% *versus* 75% em meninos (SCHRAPPE *et al.*, 2000). No estudo XIII A do Saint Jude Children's Research Hospital (SJCRH), Pui *et al.* (1999) também mostraram uma melhor sobrevida para o sexo feminino (84% vs. 71%). Esse fato pode ser parcialmente explicado pela maior apresentação de LLA-T, IDNA mais desfavorável e a presença de maiores recidivas testiculares em meninos. Estudos do *Pediatric Oncology Group* (POG) com LLA de linhagem B também demonstraram prognóstico desfavorável para o sexo masculino (SHUSTER *et al.*, 1998).

Os Critérios de risco adotados pelo GBTLI foram utilizados em nosso estudo para a estratificação dos grupos de risco, nos quais utilizam a idade e a leucometria ao diagnóstico associada à resposta a terapia de indução no D8 e D28. Alterações citogenéticas e moleculares, apesar de importantes fatores prognósticos, não foram utilizadas na estratificação dos grupos de risco no GBTLI e em nosso estudo. Quanto ao risco 54% dos pacientes apresentou RB e 46% AR, achados semelhantes aos resultados nacionais do GBTLI-93 e 99.

Em relação às características clínicas, os achados mais frequentes ao diagnóstico foram a hepatomegalia (63%), seguida da esplenomegalia (58%) e linfadenomegalia (44%), o que está de acordo com outros relatos da literatura (CONTER *et al.*, 2004).

A frequência da infiltração do SNC (SNC-3) encontrada foi de 6,5% (5/76), semelhante (6,7%) a estudos de Barreto (2001), na Bahia, porém superior aos resultados nacionais utilizando o GBTLI-93 e 99 que apresentaram percentuais de 1,7% e 2,4%, respectivamente. Esse fato pode ser parcialmente decorrente do tamanho de nossa amostra. Estudos internacionais relatam uma frequência que varia de 0,6% a 12,4% (SILVERMAN *et al.*, 2001). A análise do líquido de um paciente demonstrou mais de 5 blastos/mm³ ao diagnóstico, caracterizado como SNC-2. Pacientes com tal achado ou com punção lombar traumática apresentam maior risco de recaída no SNC (GAJJAR *et al.*, 2000).

Quanto ao hemograma inicial, a maioria dos pacientes (85%) apresentou hemoglobina (Hb) abaixo de 11 g/dl e anemia normocrômica e normocítica. A contagem de plaquetas abaixo de 20.000/mm³ foi evidenciada em 10,5% dos casos e não estava associada a hemorragias importantes no momento do diagnóstico. Esses dados estão de acordo com relatos da literatura (CONTER *et al.*, 2004; TEUFFEL *et al.*, 2008).

No presente estudo a média de Hb ao diagnóstico da LLA-T ($10,8 \pm 2,45$) foi superior a da LLA-B ($7,9 \pm 2,55$; tabela 8), dados concordantes com a literatura. Alguns autores relatam que ao diagnóstico, os níveis mais baixos de Hb estão associados à doença em estágio mais avançado (TEUFFEL *et al.*, 2008).

Em 67% dos hemogramas analisados foram encontrados blastos no esfregaço do sangue periférico. O hemograma apresentou-se normal em 4% dos casos. Nos pacientes com hemograma normal, com suspeita de leucemias agudas, a história clínica e o exame físico minucioso poderão nos orientar quanto à indicação do mielograma para a confirmação diagnóstica.

No trabalho, 16 pacientes (21%) apresentaram leucometria inicial maior que 50.000/mm³, considerado um fator prognóstico adverso, que os caracteriza como pacientes de alto risco para recaída. Essa frequência é um pouco menor que dados do Protocolo Brasileiro GBTLI (26%), porém são semelhantes a estudos internacionais que evidenciam leucocitose maior que 50.000/mm³ em cerca de 20% dos casos (CHESSELS *et al.*, 1995; SILVERMAN *et al.*, 2001).

A leucometria elevada ao diagnóstico está relacionada à massa tumoral, ao tamanho da massa mediastinal, hepatoesplenomegalia e adenomegalias. Geralmente está associada a fatores de alto risco como as translocações cromossômicas desfavoráveis t(4;11) e t(9;22) (RAIMOND *et al.*, 1990; SMITH *et al.*, 1996).

Deve ser enfatizada a importância da leucometria para a estimativa global da sobrevida dos pacientes. Dados do Protocolo GBTLI-93 relatam que pacientes com leucócitos $< 50.000/\text{mm}^3$ apresentam uma SLE de $72\% \pm 3\%$, enquanto que pacientes com leucócitos $> 50.000/\text{mm}^3$ apresentam uma SLE significativamente menor ($55\% \pm 6\%$) (Protocolo GBTLI-93).

Em relação ao imunofenótipo, 89,5% dos pacientes apresentavam LLA de linhagem B, pouco acima dos resultados do Protocolo GBTLI-93 (87%). A maioria dos casos foi LLA B comum (51,5%) e LLA pré B (45,5%). A LLA-T foi encontrada em 10,5% dos casos, frequência pouco abaixo do Protocolo GBTLI-93 (13%), porém em concordância com estudos nacionais e internacionais que a frequência da LLA-T varia de 7,4% a 16,4% (CONTER *et al.*, 2004; GOLDBERG *et al.*, 2003; (SILVERMAN *et al.*, 2001).

No estudo em questão, a LLA -T foi mais frequente em meninos, maiores de nove anos de idade, com alta contagem de leucócitos ao diagnóstico, maior envolvimento mediastinal e do SNC. A maioria dos casos de LLA-T (75%) apresentou CD10 negativo. Houve uma associação de fatores desfavoráveis nesse grupo de pacientes. Em alguns protocolos, a LLA-T é considerada como alto risco para recaída. Em estudos de Goldberg *et al.* (2003) crianças com LLA-T apresentaram maior risco para falha na indução, para recaída precoce e recaída isolada do SNC.

Atualmente com o uso de tratamentos mais agressivos, a LLA-T já não apresenta um prognóstico tão reservado (CHAN, 2002). O grupo americano Dana-Farber publicou um estudo com 1225 crianças com LLA, das quais 125 (10,2%) apresentaram imunofenótipo T e não demonstrou diferenças na sobrevida entre os pacientes com esse imunofenótipo em relação aqueles com LLA de precursor B (GOLDBERG *et al.*, 2003). Em nosso estudo foi evidenciada uma menor sobrevida dos pacientes com LLA-T (figura 4), que não foi estatisticamente significativa ($p=0,087$). No Protocolo GBTLI-93 foi relatado uma menor SLE em seis anos, 44% na LLA-T comparados a 72% de SLE na LLA-B.

Na casuística estudada, 97% dos pacientes expressaram CD10. Essa porcentagem pode ser explicada porque na maioria dos pacientes com LLA de linhagem B predomina os subtipos B comum ou pré-B, que apresentam elevada expressão de CD10. Campana e Behm (2000) relataram que o CD10 está expresso em 95% das LLA comum e em 98% na LLA pré-B.

Em relação à LLA-T somente 25% dos casos expressarem o CD10. Pui *et al.* (1993) publicaram que entre 40% e 45% das LLA-T expressam CD10. No entanto, estudo realizado por Udayakumar *et al.* (2007) evidenciou expressão de CD10 em apenas 30% dos pacientes. A baixa expressão encontrada em nosso estudo pode ter sido mascarada pelo pequeno número de casos de LLA-T (n=8) na amostra estudada. Pacientes com LLA-T com fenótipo CD10 positivo apresentaram uma SLE em seis anos em torno de 74%, contra 34% dos casos negativos.

O IDNA foi realizado em 58 pacientes. Quanto à ploidia, 14 deles (24%) apresentaram blastos hiperdiplóides, sendo 11 hiperdiplóides com IDNA $\geq 1,16$. Raimond *et al.* (1996) encontraram uma frequência de alta hiperdiploidia (maior que 51 cromossomos e IDNA $\geq 1,16$) nas LLAs de linhagem B em 30% dos pacientes pediátricos e os associou com baixo risco de recaída e um prognóstico bastante favorável. Achado semelhante ao de Udayakumar *et al.* (2007) que encontraram hiperdiploidia em 29,7% dos pacientes estudados. O POG e outros grupos de estudos das LLAs reportaram que blastos com IDNA entre 1,16 e 1,6 estão associados a prognóstico favorável (TRUEWORTHY *et al.*, 1992, ARICÓ *et al.* 2008).

No presente estudo, no grupo de pacientes hiperdiplóides com IDNA $\geq 1,16$ foi encontrada uma forte associação de fatores de bom prognóstico (idade entre 2 e 7 anos, leucócitos abaixo de $20.000/\text{mm}^3$, imunofenótipo B e CD 10 positivo), baixo risco para recaída (93% dos pacientes de RB) e uma boa resposta ao tratamento de indução. No final da indução, esses pacientes apresentaram remissão completa, sem recidiva precoce e todos estavam vivos, portanto, um grupo de prognóstico bastante favorável. Esses achados corroboram estudos de Aricó *et al.* (2008) que analisaram o IDNA em 1669 pacientes e encontraram hiperdiploidia $\geq 1,16$ em 19% dos pacientes e maior frequência nos pacientes com idade entre um e cinco anos e leucócitos abaixo de $20.000/\text{mm}^3$ ao diagnóstico e forte associação com fatores prognósticos favoráveis.

A boa evolução e prognóstico favorável dos pacientes com blastos hiperdiplóides são provavelmente decorrentes de uma combinação de fatores: o

acúmulo de metotrexate e de seus metabólitos ativos (poliglutamatos) com sensibilidade aumentada aos antimetabólitos, maior porcentagem de células na fase S de divisão celular, resultando em maior sensibilidade aos quimioterápicos ciclo celular específicos e blastos mais susceptíveis a sofrerem apoptose (LOOK *et al.*,1985; TRUEWORTHY *et al.*,1992).

A hipodiploidia é rara em crianças com LLA. Em nosso estudo não foram encontrados casos hipodiplóides. Pui *et al* (2004) encontraram uma frequência de hipodiploidia em 1% nas crianças com LLAs. Em estudo de Nachman *et al.* (2007) foi evidenciado que crianças e adolescentes com LLA e hipodiploidia (menos de 44 cromossomos) estavam associados a fatores de pior prognóstico e apresentaram evolução desfavorável.

A análise IDNA por citometria de fluxo é um método simples e rápido, relativamente barato. Udayakumar *et al.*, em 2007, demonstraram uma boa correlação e concordância da ploidia por citogenética e pela citometria de fluxo. Esse método poderia ser utilizado como fator prognóstico na maioria dos serviços brasileiros para a caracterização dos grupos de risco nas LLAs.

Outros fatores prognósticos importantes são o regime terapêutico empregado e a avaliação da resposta ao tratamento de indução (PINKEL, 1996). Muitos estudos evidenciaram que a resposta durante as primeiras semanas do tratamento está significativamente associada ao prognóstico (COUSTAN-SMITH *et al.*, 2002). Essa monitorização da resposta está sendo utilizada para a decisão terapêutica em diversos protocolos nacionais e internacionais, pois reflete a sensibilidade dos linfoblastos as drogas quimioterápicas, a farmacodinâmica e a farmacogenética do hospedeiro.

Em nosso estudo, a resposta ao tratamento de indução foi avaliada pela contagem de leucócitos e blastos no D8 e a avaliação da remissão na MO do D28. Em 5% da população estudada foram encontrados no D8 blastos $>1.000/\text{mm}^3$ e leucócitos $> 5.000/\text{mm}^3$, considerados como respondedores lentos e espera-se que esse grupo de pacientes apresente um prognóstico significativamente pior. No GBTLI-99 foram encontrados 5% dos pacientes com blastos $< 1000/\text{mm}^3$ e leucócitos $> 5.000/\text{mm}^3$ no D8 e esses pacientes apresentaram menor SLE $52\% \pm 8,5\%$ e $45\% \pm 2\%$, respectivamente (Protocolo GBTLI, 2000).

Pacientes com blastos persistentes no SP, no sétimo ao décimo dia após o início da indução, apresentam alto risco para a recaída quando comparados a pacientes sem blastos nesse período (COUSTAN-SMITH *et al.*, 2002; GRIFFIN *et al.*, 2000).

Em estudos do Protocolo GBTLI-99 foi evidenciado que na análise multivariada a contagem global dos leucócitos no D8 maior que 5.000/mm³ esta associado a maior risco de recaída e tem um impacto na SLE maior que a contagem leucocitária inicial.

Quanto à avaliação da remissão no D28, o percentual de remissão obtido (95%) é semelhante aos resultados do GBTLI-93 e de estudos internacionais, os quais mostram uma remissão contínua de 95% a 98% (SCHRAPPE *et al.*, 2000; SILVERMAN *et al.*, 2001).

Os óbitos na indução ocorreram em 2,6% dos casos, resultado semelhante ao do GBTLI-93 (3%) e superior a estudos em países desenvolvidos, cujo percentual de óbitos nessa fase variou de 0,5% a 1,4% (GOLDBERG *et al.*, 2003; RUBNITZ *et al.*, 2004; SILVERMAN *et al.*, 2001). A taxa de óbitos na indução, um pouco mais elevada no GBTLI e em nosso estudo pode ser decorrente de complicações infecciosas e maior toxicidade a quimioterapia na fase de indução.

Os parâmetros clínicos e laboratoriais das LLAs estudadas, em sua grande maioria, assemelham-se aos resultados do estudo do GBTLI e da literatura.

5.2 Expressão da L-selectina e do CD44 nas LLAs

Nos processos leucêmicos, a expressão da L-selectina e do CD44 se correlacionam com o aumento do número de células blásticas no sangue periférico, assim como na predisposição das mesmas migrarem para outros órgãos como o SNC, testículos e mediastino, fato frequente na evolução das leucemias. Há relatos que a alteração na expressão ou função das MA dos linfoblastos pode contribuir no comportamento biológico e evolução das leucemias agudas (CAVALCANTI-JÚNIOR *et al.*, 1997; LIESVELD, 1997)

A expressão dessas MA foi avaliada por citometria de fluxo, nas 76 amostras de MO dos pacientes com LLA. Os parâmetros analisados foram a positividade e a intensidade média de fluorescência (IMF) expressa pelos marcadores. A IMF é um

parâmetro quantitativo que descreve melhor a distribuição dos antígenos na superfície das células leucêmicas. Esse parâmetro parece ser mais fidedigno que a simples ausência ou presença das MA nas células estudadas (ANGELOPOULOU *et al.*, 1999; BOROWITZ *et al.*, 1997).

5.2.1 Expressão do CD44 nas LLAs

Na leucemogênese, a expressão do CD44 parece estar relacionada à biologia dos blastos, a contagem inicial de leucócitos, a presença de blastos no sangue periférico e a doença extramedular (LIESVELD, 1997).

A expressão do CD44 nas leucemias estudadas foi de 75% e a média do IMF de $127,52 \pm 10,84$ (tabela 10). Os resultados obtidos evidenciam a expressão elevada nas LLA-B e T.

Neste estudo observou-se uma maior expressão do CD44 na LLA-T (87,5%; IMF= $150,44 \pm 20,29$), porém sem diferenças significativas entre os subtipos da LLA-T. Esses resultados estão em conformidade com os estudos de Binhara (2001, 2002) que encontrou maior expressão na LLA-T (92%; IMF= $169,12 \pm 155,29$). Por outro lado, em estudos de Cavalcanti-Júnior *et al.* (1997) foi observado uma maior expressão na LLA-B (80,7%) comparado a LLA-T (72,5%).

Nas leucemias de linhagem B, Zittermann *et al.* (2001) relataram que a modulação do CD44 correlacionava-se com fenótipos representando os diferentes estágios de maturação da célula B, podendo afetar o potencial de disseminação dessas células.

Em relação aos fatores prognósticos das LLAs (idade, sexo, grupo de risco, leucometria ao diagnóstico, classificação FAB e subtipos EGIL) e os fatores relacionados à resposta ao tratamento de indução, a expressão do CD44 foi encontrada em 70% a 80% dos casos, porém sem correlação estatisticamente significativa. Esses achados vão ao encontro de estudos de Mengarelli *et al.* (2001) que, apesar de evidenciar uma maior expressão do CD44 nas leucemias (84,2%), não encontraram correlação significativa com os fatores prognósticos, evolução e maior risco de recidiva nas LLAs. Resultados diferentes foram observados por Oh *et al.* (2003) que relataram a associação do CD44 a uma evolução desfavorável em 86 pacientes com LLA.

Na análise da expressão do CD44 em relação ao IDNA foi encontrada uma positividade de 100% nos pacientes hiperdiplóides, enquanto que nos pacientes diplóides foi de 72% ($p=0.028$; tabela 12). Quando se correlaciona a IMF do CD44 com o IDNA, observa-se que a média do IMF nos blastos hiperdiplóides (185,40) é superior a média dos blastos diplóides ($p=0,034$; tabela12).

Há poucos relatos na literatura relacionando o CD44 e a citogenética. Mengarelli *et al.* (2001) não encontraram correlação da expressão do CD44 com translocações cromossômicas como a t(9;21) e t(4;11) das LLAs. Em nossa revisão da literatura, não foram encontrados relatos sobre correlação da expressão do CD44 com o IDNA.

Em nosso estudo, pacientes com LLA com massas tumorais apresentaram uma maior expressão do CD44 (84%) em relação à LLA sem massas tumorais (52%), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,01$). Pacientes que apresentaram massas tumorais têm quase cinco vezes mais chances de expressar o CD44 que os pacientes sem massas tumorais (OR=4,8).

Quando as LLAs foram estratificadas pelo imunofenótipo, pacientes com LLA-B com massas tumorais apresentaram 84% de linfoblastos CD44 positivos, mantendo a significância estatística ao nível de 1%. Em relação aos pacientes com LLA-T com massas tumorais, todos os oito pacientes apresentaram 100% de linfoblastos CD44 positivos, no entanto, houve limitação da aplicação de testes estatísticos em decorrência do pequeno tamanho da amostra ($n=8$).

Esses resultados corroboram com os resultados de Cavalcanti-Júnior *et al.* (1997) que encontraram a expressão do CD44 na LLA-B com infiltração tumoral de 93,7% e na LLA-T de 86%, principalmente nas LLAs com grandes massas abdominais e mediastinais. Nahla *et al.* (2003) também encontraram a expressão do CD44 em 90% das LLAs e uma forte associação com LLA com grandes massas tumorais (massa mediastinal, organomegalias e infiltração de SNC), porém sem correlação com fatores prognósticos desfavoráveis (leucócitos > 50.000/mm³, LLA-T, MO infiltrada no D15).

As LLAs com massas tumorais estão relacionadas a uma evolução desfavorável, com maior risco de recaídas extramedulares e falha de tratamento de indução, sendo mais frequentemente encontradas na LLA - T (STEINHERZ *et al.*, 1998).

Sabe-se que as grandes massas tumorais nas leucemias é um marcador de suas características biológicas, porém seu valor prognóstico independente não é fácil de estabelecer, devido à forte associação com alta leucometria e imunofenótipo T (STEINHERZ, 1998).

Pacientes com LLA com alta contagem de leucócitos apresentam uma doença rápida com uma alta taxa de proliferação dos blastos. Esses leucócitos e blastos elevados podem estar associados à carga tumoral ou “*Tumor burden*”, aumentando o risco de recaída e evolução desfavorável nas LLAs. Nos pacientes estudados foi observado que 77% dos linfoblastos circulantes expressavam CD44, como relatado na literatura (CAVALCANTI-JÚNIOR *et al.*, 1997; KOOPMAN *et al.*, 1994).

É importante ressaltar que em alguns estudos demonstra-se a importância de diferentes isoformas do CD44, relacionando-as aos eventos fisiopatológicos na disseminação das leucemias agudas (BENDALL *et al.*, 2004; PONTA *et al.*, 2003). A expressão elevada da isoforma CD44v4 foi encontrada na LLA-T com grandes massas tumorais. Em nosso estudo não foram avaliadas as isoformas do CD44.

KHAN *et al.*, (2008) estudaram a expressão do CD44 e a isoforma CD44v6 por citometria de fluxo em pacientes com LLA e demonstraram que a expressão do CD44 está associada a recaída e é um fator independente da idade e contagem de leucócitos. No entanto, a expressão elevada do CD44v6 não está associada a recaída.

Os achados de nosso estudo e os relatados na literatura sugerem que o CD44 pode estar envolvido na patogênese da LLA com grandes massas tumorais, facilitando a passagem de blastos para os diferentes tecidos resultando na proliferação e disseminação extramedular da doença. Na disseminação metastática das células tumorais a firme aderência ao endotélio parece ser mediada principalmente pelo CD44 e suas isoformas, como já foi observado nos linfomas. Há relatos na literatura que as leucemias linfóides crônicas e linfomas com fenótipo CD44 positivos também possuem características clínicas distintas e apresentam maior frequência de massas tumorais, infiltração de SNC e má resposta ao tratamento (KOOPMAN *et al.*, 1994).

Os resultados deste trabalho e de estudos anteriores indicam que é oportuno considerar que o CD44 possa ser empregado como marcador adicional na monitorização do prognóstico e na avaliação dos mecanismos de evolução patológica das LLAs. Estudos adicionais são necessários para melhor

esclarecimento dos mecanismos da regulação da expressão do CD44 na superfície das células e de suas formas solúveis.

Estudos mais recentes relatam que os anticorpos anti-CD44 podem efetivamente suprimir a proliferação e induzir diferenciação ou a apoptose dos blastos de alguns subtipos de leucemias. Neste sentido, estudos em fases preliminares utilizando o CD44 como alvo terapêutico têm sido realizados (LIU e JIANG, 2006). Acredita-se que novas pesquisas clínicas sejam necessárias para se descobrir o real valor do CD44 e de seus anticorpos monoclonais no diagnóstico, nos processos metastáticos, no prognóstico e terapia das neoplasias hematológicas.

5.2.2 Expressão da L-selectina nas LLAs

A expressão da L-selectina nas leucemias, tanto na forma ligada à membrana como na sua forma solúvel, foi analisada por vários autores. Há relatos na LMA, porém nas LLA-B e T a literatura é escassa (EXTERMANN,1998; HAFEZ *et al.*, 2003; OLEJNIC, 1999; STUCKI *et al.*, 2001)

Existem poucos estudos da L-selectina em neoplasias linfóides em crianças. Yari *et al.* (2001) estudaram a expressão das MA em linfomas não Hodgkin em crianças e evidenciaram a expressão da L-selectina em 63% dos casos. Nos linfomas linfoblásticos a positividade foi de 75% e estava associada à forma disseminada da doença.

Há poucos estudos sobre a expressão da L-selectina e seu significado clínico e prognóstico nas LLAs. A expressão aumentada pode estar relacionada à doença extramedular, principalmente na infiltração de SNC.

Em estudos com LMA, Stucki *et al.* (2001) descrevem a importância dos receptores de adesão e citocinas secretados pelos mieloblastos nos fenômenos da leucostase e infiltração tecidual das células leucêmicas. Os mieloblastos podem ativar as células endoteliais e promover sua própria adesão à parede vascular pela secreção de citocinas e ativação das células endoteliais pelos receptores de adesão. Dentre esses receptores, a L-selectina deve ter uma função na ligação dos blastos L-selectina positivos ao endotélio ativado. As diferenças na expressão das MA devem afetar o tráfico de mieloblastos e o prognóstico das leucemias.

No presente trabalho foi estudada a expressão da L-selectina nas LLAs com o objetivo de correlacioná-la com os achados clínicos, os fatores prognósticos, o

acometimento extramedular e as formas tumorais das LLAs. A expressão da L-selectina nas LLAs estudadas foi de 58% e a média do IMF de $130,63 \pm 13,80$. A LLA-T apresentou expressão da L-selectina (87,5% e a média de $IMF=272,33 \pm 52,72$) mais elevada que a LLA-B (54,4% e a média de $IMF=115,90 \pm 12,75$). Essa expressão foi estatisticamente significativa ($p=0,004$) quando se compara as médias do IMF (Tabelas 16).

Em estudo realizado por Binhara (2002) foi demonstrada uma maior expressão da L-selectina na LLA-T (78%) comparado a 24% na LLA-B ($p < 0,05$). Esse autor enfatizou a relevância do achado, pois seria um dos primeiros trabalhos a avaliar a L-selectina na LLA-T. Em nosso estudo a expressão da L-selectina foi superior a encontrada por Binhara em 2002, tanto na LLA-T (87,5%) como na LLA-B (54,4%).

A análise dos subtipos FAB e EGIL (BI a BIII e TI a TIV) das LLAs não mostraram associação significativa com a expressão da L-selectina ($p > 0,05$). Esses resultados também foram demonstrados por outros autores (Binhara, 2001, 2002)

Em relação aos fatores prognósticos (idade, sexo, risco, leucometria ao diagnóstico), classificação FAB, IDNA, presença de doença extramedular e as formas tumorais das LLAs não houve correlação estatisticamente significativa com a expressão da L-selectina. Esses achados corroboram com os dados de Hafez *et al.* (2003) que relataram uma alta expressão da L-selectina nas LLAs, porém não mostraram correlação estatisticamente significativa com as formas de apresentação clínica, fatores prognósticos e doença extramedular.

Mengarelli *et al.* (2001) demonstraram a expressão da L-selectina em 24% das LLAs e também não encontraram correlação com fatores de alto risco: idade, leucometria inicial, infiltração do SNC e alterações cromossômicas. Nesse estudo, a expressão das MA foi considerada positiva quando estava acima de 30%. Em nosso estudo, o nível de corte foi acima de 20%, fato que poderia explicar parcialmente a maior expressão da L-selectina em nossos dados (54%).

A L-selectina também pode ser encontrada na forma solúvel (sL-selectina), porém parece não existir uma correlação da expressão celular da L-selectina com a forma solúvel (Hafez *et al.* 2003).

Altos níveis de sL-selectina estão presentes ao diagnóstico das leucemias de linhagem B e T em crianças. Olejnic (1999) observou que há uma diminuição significativa na concentração da sL-selectina quando no final da quimioterapia

intensiva os pacientes entram em remissão e aumenta na recaída. Sugerindo que a monitorização da sL-selectina pode ser útil na avaliação da atividade da leucemia.

Os níveis de sL-selectina na LLA apresentam uma forte correlação com a contagem de leucócitos, blastos no SP e MO. Blastos sL-selectina positivos apresentam maior chance de migrar para linfonodos, baço e fígado e estão relacionados a presença de massas tumorais. Pacientes com doença extramedular como linfadenomegalia generalizada, hepatoesplenomegalia, infiltração de SNC apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) da sL-selectina (EXTERMANN, 1998), porém em estudo de Hafez *et al.* (2003) a sL-selectina não apresentou correlação com as formas de apresentação clínica nem com a infiltração do SNC.

Uma associação significativa foi encontrada entre o nível de sL-selectina e a evolução clínica. Pacientes com o nível plasmático aumentado da sL-selectina apresentaram menor sobrevida global e maior risco de recaída e morte quando comparados a pacientes com níveis normais. (OLEJNIC *et al.*, 1999).

As selectinas estão envolvidas com a adesão de células tumorais ao endotélio nos processos de metastização. As selectinas podem ser usadas como prognóstico e possivelmente, como alvo terapêutico em neoplasias (KRAUSE e TURNER, 1999). Nos processos metastáticos estão associadas com extravasamento de células tumorais do sangue periférico para os tecidos. Acredita-se que esse movimento siga uma cascata molecular iniciada, em parte, pelos três membros da família das selectinas (E, P e L-selectina).

Recentes estudos têm demonstrado o envolvimento das selectinas na progressão de doenças como câncer e suas metástases, doenças inflamatórias e auto-imunes, assim como a utilização das selectinas e seus ligantes (anticorpos anti-selectinas, anticorpos anti-receptores, contrarreceptores e antagonistas das selectinas) como potenciais alvos terapêuticos no tratamento dessas doenças. (KNEUER *et al.*, 2006; BARTHEL *et al.*, 2007).

Belanger e St-Pierre (2005) demonstraram que as selectinas apresentam um papel importante no crescimento do linfoma de células T no timo e sua disseminação para órgãos periféricos e seus trabalhos sugerem que as selectinas induzem a expressão de genes que controlam os estágios avançados das metástases.

5.3 Análise multivariada dos fatores prognósticos e moléculas de adesão

Os fatores prognósticos na LLA da infância são dependentes de formas clínicas e laboratoriais ao diagnóstico, de características genéticas e moleculares das células leucêmicas e da resposta ao tratamento inicial.

A relativa ordem de significância e interrelação dessas variáveis são frequentemente dependentes do esquema de tratamento e necessitam de análises multivariadas para se identificar fatores prognósticos independentes (SCHRAPPE *et al.*, 2000; UCKUN *et al.*, 2001)

Para a estratificação dos grupos de risco das leucemias não há métodos de estratificação universalmente aceitos, porém na maioria dos estudos a idade, o sexo e a leucometria ao diagnóstico são fatores prognósticos consistentes.

No presente estudo, a análise multivariada, utilizando o modelo de regressão de Cox, foi realizada para determinar as covariáveis relacionadas com a sobrevida dos pacientes. Os fatores prognósticos significativamente associados à sobrevida foram: contagem de leucócitos ($p=0,03$), sexo ($p=0,028$), classificação do risco ($p=0,012$), imunofenótipo T ($p=0,017$), baço maior que 3 cm ($p=0,009$), sendo esses fatores já citados na literatura. Outros fatores como a classificação FAB, IDNA, Blastos no D8, CD44IMF não foram considerados fatores prognósticos independentes no estudo.

A comparação entre os riscos relativos mostra que o risco é maior para o sexo masculino, para indivíduos previamente classificados como alto risco (quatro vezes maior quando comparado aos indivíduos de baixo risco).

No Protocolo Brasileiro GBTLI, foram consideradas variáveis de alto risco na análise multivariada: idade, leucócitos $> 50.000\text{mm}^3$, blastos periféricos positivos no D8, leucometria $> 5.000/\text{mm}^3$ no D8 e imunofenotipagem T, e constatou-se que a presença de blastos periféricos positivos no D8 é um fator independente de mau prognóstico. Na análise do risco de recaída os lactentes e imunofenótipo T apresentam maior risco de recaída e pior prognóstico (PROTOCOLO GBTLI 93, 99).

Em estudo de Ishii *et al.* (2001) foram avaliadas 220 crianças com LLA. Na análise multivariada também foi demonstrado que a leucometria ao diagnóstico e o sexo foram fatores prognósticos independentes nos pacientes de alto risco.

Pacientes do sexo masculino e com leucócitos maiores que $50.000/\text{mm}^3$ apresentavam três vezes mais risco de recaída.

Hann *et al.* (2001) publicaram um estudo na tentativa de confirmar a importância de vários fatores prognósticos. Avaliaram 2.090 crianças com diagnóstico de LLA tratadas com o protocolo inglês MRC UKALL XI. A análise multivariada confirmou a influência da idade, sexo e contagem inicial de leucócitos no prognóstico, assim como a remissão completa no término do tratamento de indução. Pacientes com menos de 10 anos de idade e contagem de leucócitos menor que $50.000/\mu\text{l}$ apresentaram melhor sobrevida livre de eventos (69%), em cinco anos, enquanto que em maiores de 10 anos, com contagem de leucócitos maior que $50.000/\mu\text{l}$, a sobrevida foi de 39%. Nesse estudo as meninas também apresentaram melhor prognóstico que os meninos. Hiperdiploidia, com mais de 50 cromossomos também foi fator de bom prognóstico, no entanto, as organomegalias, classificação FAB, infiltração de SNC ao diagnóstico e características imunofenotípicas não tiveram nenhuma influência no prognóstico.

Schultz *et al.* (2007) analisaram os fatores prognósticos do grupo POG e do Children's Cancer Group (CCG). Foram avaliadas, retrospectivamente, 6.238 crianças com diagnóstico de LLA de linhagem B, representando a maior análise de fatores prognósticos realizada até o momento, na tentativa de validar marcadores prognósticos identificados em amostras menores. Neste estudo, idade e contagem inicial de leucócitos apresentaram importância no prognóstico, porém sexo, raça, presença de hepatoesplenomegalia e massa mediastinal, assim como a classificação FAB não interferiram na resposta ao tratamento.

Em estudo de LEITE *et al.* (2007) foi evidenciado que na análise multivariada, segundo o modelo de Cox, as variáveis de maior impacto para a sobrevivência foram a faixa etária e a leucometria, porém a leucometria foi a única variável que apresentou significância estatística.

No presente estudo a intensidade média de fluorescência da L-selectina, na análise multivariada, se mostrou como um fator prognóstico independente ($p=0,023$), porém há poucos relatos na literatura. Novas pesquisas, com maior número de pacientes, serão necessárias para proporcionar mais subsídios para a determinação do real valor prognóstico da L-selectina, assim como o melhor entendimento do seu papel nos processos de disseminação e progressão das LLAs.

6 CONCLUSÕES

- A idade, sexo, leucometria ao diagnóstico, o IDNA, o imunofenótipo T e a resposta ao tratamento de indução foram fatores prognósticos importantes no estudo.

- Na análise multivariada, a leucometria ao diagnóstico, sexo, imunofenótipo T, a classificação de risco e a L-selectina foram considerados fatores prognósticos independentes que influenciaram na sobrevida das LLAs estudadas.

- O CD44 apresenta expressão aumentada nas LLAs estudadas, porém não houve correlação estatisticamente significativa com os fatores prognósticos: idade, sexo, leucometria inicial, imunofenotipagem, nível de LDH e resposta ao tratamento de indução ($p > 0,05$).

- O CD44 apresenta a expressão aumentada na LLA com massas tumorais e parece correlacionar-se com os mecanismos de disseminação extramedular dos linfoblastos.

- A correlação da L-selectina com os fatores prognósticos (idade, sexo, leucometria inicial, Índice de DNA, nível de LDH e resposta ao tratamento de indução) nas LLAs não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

- A L-selectina apresenta expressão aumentada nas LLAs estudadas, principalmente nas LLA-T ($p = 0,004$). Esses achados indicam que futuros estudos com um maior número de pacientes serão necessários para estabelecer uma correlação clínico-patológica, e seu possível valor prognóstico, nas LLA-T.

REFERÊNCIAS

ANGELOPOULOU, M. K.; KONTOPIDOU, F. N.; PANGALIS, G. A. Adhesion molecules in B-chronic lymphoproliferative disorders. **Semin. Hematol.**, v. 36, n. 2, p. 178-187, 1999.

ANJOS, A. R.; ALVARES-SILVA, M.; BORELLI, P. Interações de células leucêmicas com proteínas da matriz extracelular. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 26, n. 3, p. 206-211, 2004.

ARICÓ, M.; VALSECCHI, M. G.; RIZZARI, C.; BARISONE, E.; BIONDI, A.; CASALE F. Long-term results of the AIEOP-ALL-95 Trial for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: insight on the prognostic value of DNA index in the framework of Berlin-Frankfurt-Munster based chemotherapy. **J. Clin. Oncol.**, v. 26, p. 283-289, 2008.

BAIN, B.J.; BARNETT, D.; LINCH, D.; MATTUTES, E. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders. **Clin. Lab. Haem.**, v. 24, p.1-13, 2002.

BARRETO L. H. S. Estudo de sobrevivência em crianças portadoras de leucemia linfoblástica aguda. [dissertação mestrado]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2001.

BARTHEL, S. R.; GAVINO, J. D.; DESCHENY, L.; DIMITROFF C. J. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and Cancer. **Expert. Opin. Ther. Targets.** v. 11, n. 11, p. 1473-1491, 2007.

BASSO, G.; PUTTI, C.; CANTU-RAJNOLDI A. The immunophenotype in infant acute lymphoblastic leukemia: correlation with clinical outcome: an Italian multicentre study (AIEOP). **Br J Haematol.**, v. 81, p. 184-191, 1992.

BATHIA, S.; ROBINSON, L. Epidemiology of leukemia in childhood. In: NATHAN, D. G.; ORKIN, S. H.; GINSBURG, D.; LOOK, A. T. (Ed.). **Nathan and Oski's Hematology of Infancy and childhood**. 6th ed. Philadelphia: Saunders, 2003. p.1081-1100.

BELANGER, S. D.; ST-PIERRE, Y. Role of selectins in the triggering, growth and dissemination of T-lymphoma cells: implication of L-selectin in the growth of thymic lymphoma. **Blood**, v. 105, n. 12, p. 4800-4806, 2005.

BENDALL, L. J.; NILSSON, S. K.; KHAN, N. I.; JAMES, A.; BONNET, C.; LOCK, R. B.; PAPA, R.; BRADSTOCK, K. F.; GOTTLIEB, D. J. Role of CD44

variant exon 6 in acute lymphoblastic leukemia: association with altered bone marrow localization and increased tumour burden. **Leukemia**, v.18, p.1308–1311, 2004.

BENE, M. C.; BERNIER, M.; CASTODI, G.; KNAPP, W.; LUDWIG, W. D.; MATUTES, E.; ORFÃO, A.; VANT, V. M. B. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. **Leukemia**, v. 9, p.1783-1786, 1995.

BENNETT, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M. T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) cooperative group. **Br. J. Haematol.**, v. 33, p. 451-458, 1976.

BENNETT, J. M. World Health Organization classification of the acute leukemias and myelodysplastic syndrome. **Int. J. Hematol.**, v. 72, p.131-133, 2000.

BINHARA, I. M.; FERNANDES, M.; RUBENS, C. V.; ZYNGIER, S. B. Expressão da L-Selectina (CD62L) em leucemias linfoblásticas agudas. **Monograf. Esc. Bras. Hematol.**, v.8, p. 204, 2001.

BINHARA, I. M. Expressão das moléculas de adesão em leucemias agudas e em indivíduos normais. 2002, 121f. **Tese** (Doutorado em Farmacologia). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2002.

BIONDI, A.; CIMINO, G.; PIETERS, R.; PUI, C. H. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. **Blood**, v. 96, n.1, p. 24-33, 2000.

BOISSEL, N.; AUCLERC, M. F.; LHÉRITIER, V.; THOMAS, X.; LEBLANC, T. Should adolescents with acute lymphoblastic leukemia be treated as old children or young adults? Comparison of the French FRALLE-93 and LALA-94 trials. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, n. 5, p.774-780, 2003.

BONFANTI, R.; FURIE, B.; WAGNER, D. D. PADGEM (GMP-140) is a component of Weibel-Palade of human endothelial cells. **Blood**, v. 73, p. 1109,1989.

BORLAND, G.; ROSS, J. A.; GUY, K. Forms and fuction of CD44. **Immunology**, v. 93, p. 139-148, 1998.

BOROWITZ, M. J.; GUENTHER, K. L.; STELZER, G. T. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometry analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blast in three-colour analysis. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 100, p. 534-540, 1993.

BOROWITZ, M. J.; SHUSTER, J.; CARROLL, A. J.; LOOK, T. A.; CAMITTA, B.; MAHONEY, D.; LAUER, S.; PULLEN, D. J. Prognostic Significance of Fluorescence Intensity of Surface Marker Expression in Childhood B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. A Pediatric Oncology Group Study. **Blood**, v. 89, n.11, p. 3960-3966, 1997.

BOROWITZ, M. J.; MEENAKSHI, D.; STEPHEN, P. H.; BOWMAN, W. P.; ANDREW, J. C.; WILLIAM, L. C.; STEPHEN, L.; PAUL, L. M.; VISWANATHA, D.; WILLMAN, C. L.; CAMITTA, B. M. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5477-5485, 2008.

BRANDALISE, S.; ODONE, S.; PEREIRA, W.; ANDREA, W.; ZANICHELLI, M.; ARANEGA, V. Treatment results of 3 consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols – GBTLI-80, GBTLI-82 and GBTLI- 85. **Leukemia**, v. 7 (suppl.2), p. 142-145, 1993.

BRANDALISE S. R. Comparison of intermittent versus continuous methotrexate plus 6-MP in maintenance regimen for standard risk acute lymphoblastic leukemia in children (GBTLI ALL-99). **J. Clin. Oncol.**, v. 25 Suppl 18, S95, 2007.

CAMITTA, B. M.; PULLEN, J.; MURPHY, S. Biology and treatment of acute lymphocytic leukemia in children. **Semin. Oncol.**, v.24, p. 83-91,1997.

CAMPANA, D. Determination of minimal residual disease in leukemia patients. **Br. J. Haematol.**, v. 121, n. 6, p. 823-838, 2003.

CAMPANA, D.; BEHM, F. G. Immunophenotyping of leukemia. **J. Immunol. Methods**, v. 243, p. 59-75, 2000.

CARLOS, T. M.; HARLAN, J. M. Leukocyte-Endothelial Adhesion Molecules. **Blood**, v. 84, n. 7, p. 2068-2101, 1994.

CAVALCANTI-JÚNIOR, G. B.; SAVINO, W.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. CD44 expression in T-cell lymphoblastic leukemia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 2259-2266, 1994.

CAVALCANTI-JÚNIOR, G. B.; SAVINO, W.; MAIA, R. C.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. Correlação entre a expressão celular do CD44 e formas tumorais das leucemias linfoblásticas. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 43, n. 1, p.9-20, 1997.

CHAN, K. W. Acute lymphoblastic leukemia. **Curr. Probl. Pediatr.**, v. 32, p. 40-49, 2002.

CHARRAD, R. S.; LI, Y.; DELPECH, B.; BALITRAND, N.; CLAY, D.; JASMIN, C.; CHOMIENNE, C. Ligation of the CD44 adhesion molecule reverses blockage of differentiation in human acute myeloid leukemia. **Nat. Med.**, v. 5, p. 669-676, 1999.

CHEN, J. S.; COUSTAN-SMITH, E.; SUSUKI, T.; NEALI, G. A.; MIHARA, K.; PUI, C. H.; CAMPANA, D. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 97, n.7, p. 2115-2120, 2001.

CHESSELLS, J. M.; RICHARDS, S. M.; BAILEY, C.; LILLEYMAN, J. S.; EDEN, O. B. Gender and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukaemia: report from the MRC UKALL trials. **Br. J. Haematol.**, v. 89, n. 2, p. 364-372, 1995.

CHESSELLS, J. M. Recent advances in management of acute leukemia. **Arch. Dis. Child**, v. 82, p. 438-442, 2000.

CICHY, J.; PURE, E. The liberation of CD44. **J. Cell Biol.**, v.161, p. 839-843, 2003.

COLLARES-BUZATO, C. B. Junções Celulares. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A Célula 2001**. São Paulo: Manole, p. 57-76, 2001.

CONTER, V.; RIZZARI, C.; SALA, A.; CHIESA, R.; CITTERIO, M.; BIONDI, A. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Orphanet Encyclopedia**. Dec. 2004. Disponível em: <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-ALL>. Acesso em: 06/05/2008.

COPELAN, E. A., MCGUIRE, A. The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. **Blood**, v. 85, p. 1151- 1168, 1995.

COUSTAN-SMITH, E.; SANCHO, J.; HANCOCK, M. L.; RAZZOUK, B. I.; RIBEIRO, R. C.; RIVERA, G. K. Prognostic significance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 100, p. 52-58, 2002.

COX, D. R. Regression models and life tables. **J. R. Stat. Soc.**, v. 34, p. 187, 1972.

CRIST, W.; BOYETT, J.; PULLEN, J.; VAN E. J.; VIETTI, T. Clinical and biologic features predict poor prognosis in acute lymphoid leukemias in children and adolescents: a Pediatric Oncology Group review. **Med. Pediatr. Oncol.**, v. 14, n. 3, p. 135-139, 1986.

DÖRDELMANN, M.; REITER, A.; BORKHARDT, A. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 94, n. 4, p. 1209-1217, 1999.

DREYFUSS, J. L.; OLIVEIRA, J. S. R. Matriz extracelular e enzimas degradatórias na hematopoese e doenças onco-hematológicas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 30, n. 5, p. 398-405, 2008.

DRILLENBURG, B.; PALS, T. S. Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. **Blood**, v. 95, p. 1900-1910, 2000.

DWORZAK, M. N.; FRÖSCHL, G.; PRINTZ, D.; MANN, G.; POTSCGER, U. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 99, p.1952-1958, 2002.

EXTERMANN, M.; BACCHI, M.; MONAI, N.; FOPP, M.; FEY, M.; TICHELLI, A.; SCHAPIRA, M.; SPERTINI, O. Relationship Between Cleaved L-Selectin Levels and the Outcome of Acute Myeloid Leukemia. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3115-3122. 1998.

FOON, K. A.; TODD, E. D. Immunological classification of leukemia and lymphomas. **Blood**, v. 68, p. 1-31, 1986.

FRENETTE, P. S.; WAGNER, D. D. Adhesion Molecules - Part I. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, n. 23, p. 1526-1529, 1996.

FRIEDMANN, A. M.; WEINSTEIN, H. J. The role of prognostic features in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Oncologist**, v. 4, n. 5, p. 321-328, 2000.

GAJJAR, A.; RIBEIRO, R.; HANCOCK, M. L.; RIVERA, G. K.; MAHMOUD, H.; SANDLUND, J. T.; CRIST, W. M.; PUI, C. H. Persistence of circulating blasts after 1 week of multiagent chemotherapy confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 86, p. 1292-1295, 1995.

GAJJAR, A.; HARRISON, P. L.; SANDLUND, J. T.; BOYETT, J. Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 96, n. 10, p. 3381-3384, 2000.

GAYNON, P. S.; DESAI, A. A.; BOSTROM, B. C.; HUTCHINSON, R. J.; LANGE, B. J.; NACHMAN, J. B.; REAMAN, G. H.; SATHER, H. N.; STEINHERZ, P. G.; TRIGG,

M. E.; TUBERGEN, D. G.; UCKUN, F. M. Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: a review. **Cancer**, v. 80, p. 1717-1726, 1997.

GEIJTENBEEK, T. B.; VAN KOOYK, Y.; VAN VLIET, S. J. High frequency of adhesion defects in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 94, p.754-764, 1999.

GREAVES, M. F.; ALEXANDER, F. E. An infectious etiology for common acute lymphoblastic leukemia in childhood ? **Leukemia**, v. 7, n. 3, p. 349-360,1993.

GREAVES, M. F. Childhood leukaemia. **Br. Med. J.**, v. 324, p. 383-387, 2000.

GOLDBERG, J. M.; SILVERMAN, L. B.; LEVY, D. E.; DALTON, V. K.; GELBER, R. D.; LEHMANN, L.; COHEN, H. J.; SALLAN, S. E.; ASSELIN, B. L. Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium Experience. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, p. 3616-22. 2003.

GOODSELL, D. S. The molecular perspective: cadherin. **Stem Cells**, v. 20, p. 583-584, 2002.

GOODISON, S.; URQUIDI, V.; TARIN, D. CD44 cell adhesion molecules. **J. Clin. Mol. Phatol.**, v. 52, p.189-196, 1999.

GRIFFIN, T. C.; SHUSTER, J. J.; BUCHANAN, G. R.; MURPHY, S. B.; CAMITTA, B. M.; AMYLON, M. D. Slow disappearance of peripheral blood blasts is an adverse prognostic factor in childhood T cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. **Leukemia**, v. 14, n. 5, p. 792-795, 2000.

GÜNTHER, U.; STAUDER, R.; MAYER, B.; TERPE, H. J.; FINKE, L.; FRIEDRICHS K. Are CD44 variant isoformas involved in human tumour progression? **Cancer Surv.**, v. 24, p.19-42, 1995.

HAFEZ, F. M.; HASSAB, H.; MORAD, Z.; FARAG, E. A. CD54 and CD62L expression by lymphoid cells in acute lymphoblastic leukaemia in children. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 60, n. 3, p. 149-154, 2003.

HANN, I.; VORA, A.; HARRISON, G.; EDEN, O.; HILL, F.; GIBSON, B.; RICHARDS, S. Determinants of outcome after intensified therapy of childhood lymphoblastic leukaemia: results from Medical Research Council United Kingdom acute lymphoblastic leukaemia XI protocol. **Br. J. Haematol.**, v. 113, p. 103-114, 2001.

HARA, J.; MATSUDA, Y.; FUJISAKI, H.; TOKIMASA, S.; OHTA, H.; OSAGI, Y.; TAKAI, K. Expression of adhesion molecules in childhood B-lineage cell neoplasms. **Int. J. Hematol.**, v. 72, n.1, p. 69-73, July, 2000.

HAYNES, B. F.; TELEN, M. J.; HALE, L. P.; DENNING, S. M. CD44 a molecule involved in leukocyte adherence and T-Cell activation. **Immunol. Today**, v. 10, n. 12, p. 423-428, 1989.

HEEREMA, N. A.; JAMES, B. N.; HARLAND, N.; MARTHA G. S.; MEI, K. L. 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, n. 12, p. 4036-4046, Dec.1999.

HEROLD, R.; STIBENZ, D.; HARTMANN, R.; HENZE, G.; BUHRER, C. Soluble L-selectin (sCD62L) in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Br. J. Haematol.**, v. 119, n. 3, p. 677-684, Dec., 2002.

HILDEN, J. M.; DINNDORF, P. A.; MEERBAUM, S. O. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. **Blood**, v. 108, n. 2, p. 441-451, 2006.

HORST, E.; MEIJER, C. J.; RADASZKIEWICZ, T.; VAN DONGEN, J. J. Adhesion molecules in the prognosis of diffuse large-cell lymphoma: expression of a lymphocyte homing receptor (CD44), LFA-1 (CD11a/18), and ICAM-1 (CD54). **Leukemia**, v. 4, n. 8, p. 595-599,1990.

HUET, S.; GROUX, H.; CAILLOU, B. CD44 contribuites to T cell activation. **J. Immunol.**, p.143-798, 1989.

HYNES, R. O. Integrins: Versatility, modulation and signalling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, p.11-25, 1992.

ISHII E.; EGUCHI H.; MATSUZAKI A.; KOGA H.; YANAI F.; KURODA, Y.; KAWAKAMI, K.; OKAMURA, J. Outcome of acute lymphoblastic leukemia in children with AL90 regimen: Impact of response to treatment and sex difference on prognostic factors. **Med. Pediatr. Oncol.**, v. 37, p.10-19, 2001.

ISAACS H.J. Fetal and neonatal leukemia. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 25, p. 348-361, 2003.

JOHANSSON, B.; MOORMAN, A. V.; HAAS, O. A.; WATMORE, A. E.; CHEUNG, K. L.; SWANTON, S.; SECKER, W. L. Hematologic malignancies with t(4;11) (q21;q23) a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. European 11q23 Workshop participants. **Leukemia**, v. 12.n. 5, p. 779-787, 1998.

JACKSON, J. F.; BOYETT, J.; PULLEN, J.; BROCK, B.; PATTERSON, R. Favorable prognosis associated with hyperdiploidy in children with acute lymphocytic leukemia correlates with extra chromosome 6. A Pediatric Oncology Group study. **Cancer**, v. 66, p. 1183-1189, 1990

KANSAS, G. S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. **Blood**, v. 88, p.3259–3287, 1996.

KELLY, K. M.; LANGE, B. Oncology emergencies. **Ped. Clin. North Am.**, v. 44, p. 809-830, 1997.

KNEUER, C.; EHRHARDT, C.; RADOMSKI, M. W.; BAKOWSKY, U. Selectins-potential pharmacological targets? **Drug. Discov. Today**. v. 11, n. 21, p. 1034-1040, 2006.

KHAN, N. I.; CISTERNE, A.; DEVIDAS, M.; SHUSTER, J.; HUNGER, S. P.; SHAW, P. J.; BRADSTOCK, K. F.; BENDALL, L. J. Expression of CD44, but not CD44v6, predicts relapse in children with B cell progenitor acute lymphoblastic leukemia lacking adverse or favorable genetics. **Leuk. Lymphoma**, v. 49, p. 4, p. 710-718, Apr., 2008.

KILLICK, S.; MATUTES, E.; POWLES, R. L. Outcome of biphenotypic acute leukemia. **Haematologica**, v. 84, p. 699-706, 1999.

KOOPMAN, G.; GRIFFIOEN, A. W.; PONTA, H.; HERRICH, P. CD44-splice variants expression on lymphocytes in neoplasia. **Res. Immunol.**, v. 9, n. 144, p. 750-754, 1994.

KRAUSE, T.; TURNER, G. A. Are selectins involved in metastasis? **Clin. Exp. Metastasis**, v.17, n. 3, p. 83-92, May, 1999.

LEITE, E. P.; MUNIZ, M. T. C.; SOUTO, F. R.; BANDEIRA, F. M.; MELO, R. M. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, v. 7 , n. 4, p. 413-21, 2007.

LEGRAS, S.; GÜNTHER, U.; STAUDER, R.; CURT, F.; OLIFERENKO, S.; KLUIN-NELEMANS, H. A strong expression of CD44v6 correlates with shorter survival of patients with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 91, p. 3401–3413, 1998.

LESLEY, J.; HYMAN, R.; KINCADE P. W. CD44 and its interaction with extracellular matrix. **Adv. Immunol.**, v.54, p. 271-335, 1993.

LIESVELD, J. L. *Expression and function of adhesion* receptors in acute myelogenous leukemia. **Acta Haematol.**, v. 97, p. 53-62, 1997.

LIU, J.; JIANG, G. CD44 and Hematologic Malignancies Cellular & Molecular **Immunology**, v. 3, n. 5, p. 359-365, 2006.

LOCATELLI, F.; ZECCA, M.; MESSINA, C.; RONDELLI, R.; LANINO, E.; SACCHI, N. Improvement over time in outcome for children with acute lymphoblastic leukemia in second remission given hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. **Leukemia**, v. 16, p. 2228-2237, 2002.

LOOK, A. T.; ROBERSON, R. K.; WILLIAMS, D. L. Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 65, p.1079-1086, 1985.

MA, S. K.; CHAN G. C. F. ; HA S. Y. ; CHIU D. C. K. ; LAU Y. L.; CHAN L. C. Clinical presentation, hematologic features and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia: a review of 73 cases in Hong Kong. **Hematol. Oncol.**, v. 15, p. 141-49, 1997.

MAGALHÃES, I. Q.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S.; BENNETT, C. A.; CORDOBA, J. C.; DOBBIN, J.; FORD, A. M.; GREAVES, M. F. TEL-AML1 fusion gene frequency in pediatric acute lymphoblastic leukaemia in Brazil. **Br. J. Haematol.**, v. 111, p. 204-207, 2000.

MAHONEY, M. C.; MOYSICH, K. B.; MCCARTHY, J. R.; MCDONALD, R. C.; DAY, R. W.; STEPANENKO, V. F. The Chernobyl childhood leukemia study: background & lessons learned. **Environ. Health**, v. 3, n. 1, p.12-16, 2004.

MARIN, C.; MARTINEZ-DELGADO, B.; MELENDEZ, B.; LARRAYOZ, M. J.; MARTINEZ-RAMIREZ, A.; ROBLEDO, M.; CIGUDOSA, J. C.; CALASANZ, M. J.; BENITEZ, J. Multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of prognostically significant translocations in acute lymphoblastic leukemia. **Heamatologica**, v.86, p. 1254-1260, 2001.

MCEVER, R. P.; MOORE, K. M.; CUMMINGS, R. D. Leukocyte trafficking mediated by selectin carbohydrate interactions. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p.1025-1028, 1995.

MENGARELLI, A.; ZARCONE, D.; CARUSO, R.; TENCA G.; DE ROSSI, G. Adhesion molecule expression, clinical features and therapy outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Leuk. Lymphoma**, v. 40, p. 625-630, 2001.

MÖRICKE, A.; ZIMMERMANN, M.; REITER, A. RIEHM, H.; SCHRAPPE, M. Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia: data from the trials ALL-BFM 86, 90, and 95. **Klin. Padiatr.**, v. 217, n. 6, p. 310-320, Nov., 2005.

MUDRY, R. E.; FORTNEY, J. E.; YORK, Y. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. **Blood**, v. 96, p. 1926-1932, 2000.

NACHMAN, J. B.; SATHER, H. N.; SENSEL, M. G.; TRIGG, M. E.; CHERLOW, J. M.; LUKENS, J. N.; WOLFF, L.; UCKUN, F. M.; GAYNON, P. S. Augmented post-induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, p. 1663-1671, 1998.

NACHMAN, J. Clinical characteristics, biologic features and outcome for young adult patients with acute lymphoblastic leukaemia. **Br. J. Haematol.**, v. 130, n. 2, p. 166-173, July, 2005.

NACHMAN, J. B.; HEEREMA, NYLA, A. ; SATHER, H.; CAMITTA, B.; FORESTIER, E.; HARRISON, C. J.; SCHRAPPE, M.; PUI, C. H.; BASSO, G.; SILVERMAN, L. B.; JANKA-SCHAUB, G. E. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 110, n. 4, Aug., 2007.

NAHLA, M.; NAYERA, H.; EMAN, A.; FAYEK, M. G. **CD44 Expression and Soluble CD44** as a Potential Marker of Tumor Load in Pediatric Acute leukemia. **J. Egyptian Nat. Cancer Inst.**, v.15, n.2, p. 129-135, June, 2003.

NAOR, D.; SIONOV, R. V.; ISH-SHALOM, D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. **Adv. Cancer Res.**, v. 71, p.241-319, 1997.

OLEJNIK, I. Serum soluble L-selectin in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr. Int.**, v. 41, n.3 , p. 246-248, June, 1999.

OH, E. J.; KAHNG, J.; KIM, Y.; MYUNGSHIN K.; JIHYANG L. Expression of functional markers in acute lymphoblastic leukemia. **Leuk. Res.**, v. 27, p.903-908, 2003.

PINKEL, D. Selecting treatment for children with acute lymphoblastic leukemia. **J. Clin. Oncol.**, v.14, p.4-6,1996.

PAPAYANNOPOULOU, T.; CRADDOCK, C. Homing and trafficking of hemopoietic progenitor cells. **Acta Haematol.**, v. 97, p. 97-109, 1997.

PONTA, H.; SHERMAN, L.; HERRLICH, P. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 4, p. 33–45, 2003.

PROTOCOLO DO GRUPO BRASILEIRO PARA O TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NA INFÂNCIA - GBTLI - LLA-93. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica, 1993.

PROTOCOLO DO GRUPO BRASILEIRO PARA O TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NA INFÂNCIA - GBTLI - LLA-99. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica, Setembro, 2000.

PUI, C. H.; DODGE, R. K.; DAHL, G. V.; RIVERA, G.; LOOK, T.; KALWINSKY, D.; BOWMAN, P. L.; OCHS, J.; MURPHY, S. B. Serum lactic dehydrogenase level has prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 66, p.778-782, 1985.

PUI, C. H.; BEHM, F.; CRIST, W. M. Clinical and biological relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 82, n. 2, p. 343-362, 1993.

PUI, C. H.; KANE, J.R.; CRIST, W. M. Biology and treatment of infant leukemia. **Leukemia**, v.9, p.762-769, 1995.

PUI, C. H. Acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr. Clin. North Am.**, v. 44, p. 831-846, 1997.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Acute lymphoblastic leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, p. 605-615, 1998.

PUI, C. H.; BOYETT, J. M.; RELLING, M. V.; RIVERA, G. K.; BEHM, F. G.; SANDLUND, J. T.; RIBEIRO, R. C.; RUBNITZ, J. E.; GAJJAR, A.; EVANS, W. E. Sex Differences in Prognosis for Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. **J. Clin. Oncol.**, v. 17, n. 3, p. 818-24, Mar. 1999.

PUI, C. H.; CAMPANA, D.; EVANS, W. E. Childhood acute lymphoblastic leukaemia - current status and future perspectives. **Lancet Oncol.**, v.2, p. 597–607, 2001.

PUI, C. H.; RELING, M. V.; DOWNING, J. R. Acute Lymphoblastic Leukemia **N. Engl. J. Med.**, v. 8, n. 350, p. 1535 -1548, Apr. 2004.

PUI, C. H.; SANDLUND, J. T.; CAMPANA, D.; RIVERA, G. K.; RIBEIRO, R. C.; RUBNITZ, J. E. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. **Blood**, v. 104, n. 9, p. 2690-2696, 2004.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, n. 2, p. 166-178, 2006.

RADICH, J. P. Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 15, p.21-36, 2001.

RAIMONDI, S. C.; BEHM, F. G.; ROBERSON P. K.; PUI, C. H.; CRIST, W. M. Cytogenetics of pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia with emphasis on prognostic implications of the t(1;19). **J. Clin. Oncol.**, v. 8, n. 8, p.1380-1388, 1990.

RAIMONDI, S. C.; PUI, C. H.; BEHM, F. G.; HANCOCK, M. L.; RIVERA, G. K. Heterogeneity of hyperdiploid (51-67) childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 10, p. 213-224, 1996.

RAINER, T. H. L-selectin in health and disease. **Resuscitation**, v. 52, p.127-114, 2002.

REGO, E. M.; GARCIA, A. B.; VIANA, S. R.; FALCAO, R. P. Characterization of acute lymphoblastic leukemia subtypes in Brazilian patients. **Leuk. Res.**, v. 20, n. 4, p. 349-355, April 1996.

REUSS-BORST, M. A.; KLEIN, G.; WALLER, H. D.; MULLER, C.A. Differential expression of adhesion molecules in acute leukemia. **Leukemia**, v. 9, p. 869-874, 1995.

RIBEIRO, R. C. Leucemia linfóide aguda na infância e adolescência. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 487-518.

RIBEIRO, R. C.; PUI, C. H. Prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Hematol. Pathol.**, v 7, n. 3, p. 121-142, 1993.

RISTAMAKI, R.; JOENSU, H.; LAPPALAINEN, K. Elevated serum CD44 level is associated with unfavorable outcome in Non Hodgkin's lymphomas **Blood**, v.90, p. 4039-4045, 1997.

ROSS, J. A.; DAVIES, S. M.; POTTER, J. D. Epidemiology of childhood leukemia, with a focus on infants. **Epidemiol. Rev.**, v. 16, n. 2, p. 243-272, 1994.

RUBIO, M. T.; DHEDIN, N.; BOUCHEIX, C.; BOURHIS, J. H.; REMAN, O; BOIRON, J. M. ; GALLO, J. H.; LHERITIER, V.; THOMAS, X.; FIERE, D.; VERNANT, J. P. Adult T-biphenotypic acute leukaemia: clinical and biological features and outcome. **Br. J. Haematol.**, v. 123, n. 5, p. 842-849, . Dec., 2003.

RUBNITZ, J. E.; LINK, M. P.; SHUSTER, J. J. Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v. 84, n. 2, p. 570-573, 1994.

RUBNITZ, J. E.; CAMITTA, B. M.; MAHMOUD, H. Childhood acute lymphoblastic leukemia with the MLL-ENL fusion and t(11;19)(q23;p13.3) translocation. **J. Clin. Oncol.**, v.17, n. 1, p.191-196, 1999.

RUBNITZ, J. E.; LENSING, S.; ZHOU, Y.; SANDLUND, J. T.; RIBEIRO, R. C.; PUI, C. H. Death during Induction Therapy and First Remission of Acute Leukemia in Childhood: The St. Jude Experience. **Cancer**, v. 101, n. 7, 2004.

SACHS, L. The adventures of a biologist: prenatal diagnosis, hematopoiesis, leukemia, carcinogenesis and tumor suppression. **Adv. Cancer Res.**, v. 66, p.1-40. 1995.

SACKSTEIN, R.; FU, L.; ALLEN, K. L. A hematopoietic cell L-selectin ligand exhibits sulfate-independent binding activity. **Blood**, v.89, p. 2773-2781, 1997.

SCHRAPPE, M.; CAMITTA, B.; PUI, C. H.; EDEN, T.; GAYNON, P.; GUSTAFSSON, G.; JANKA-SCHAUB, G. E.; KAMPS, W.; MASERA, G.; SALLAN, S.; TSUCHIDA, M.; VILMER, E. Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 14, p.2193-2194, 2000.

SCHRAPPE, M. Prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Indian J. Pediatr.**, v. 70, p. 817-824, Oct. 2003.

SCHULTZ, K. R.; MASSING, B.; SPINELLI, J. J.; GAYNON, P. S.; WADSWORTH, L. Importance of the day 7 bone marrow biopsy as a prognostic measure of the

outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. **Med. Pediatr. Oncol.**, v.29, p. 16-22, 1997.

SCHULTZ, K. R.; PULLEN, D. J.; SATHER, H. N.; SHUSTER, J. J.; DEVIDAS, M.; BOROWITZ, M. J.; CARROLL, A. J. Risk and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). **Blood**, v. 109, p. 926-935, 2007.

SCRIDELI, C. A.; KASHIMA, S.; CIPOLLOTTI, R.; DEFAVERY, R.; BERNARDES, J. E.; TONE, L. G. Minimal residual disease in Brazilian children with acute lymphoid leukemia: comparison of three detection methods by PCR. **Leuk. Res.**, v. 26, p. 431-438, 2002.

SCRIDELI, C. A.; QUEIROZ, R. P.; BERNARDES, J. E.; DEFAVERY, R.; VALERA, E. T.; TONE, L. G. Use of simplified strategies to evaluate early treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leuk. Res.**, v. 30, n. 8, p.1049-1052, 2006.

SHAH, N.; OSETH, L.; LEBIEN, T. W. Development of a model for evaluating the interaction between human pre-B acute lymphoblastic leukemic cells and the bone marrow stromal cell microenvironment. **Blood**, v. 92, p. 3817–3828, 1998.

SHUSTER, J. J.; WACKER, P.; PULLEN, J. Prognostic significance of sex in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. **J. Clin. Oncol.**, v. 16, n. 8, 2854-2863, 1998.

SILVERMAN, L. B.; GELBER, R. D.; DALTON, V. K.; COHEN, H. J.; CASSADY, J. R. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. **Blood**, v. 97, p. 1211–1218, 2001.

SILVERMAN, L. B.; SALLAN, S. E. Acute lymphoblastic leukemia. In: NATHAN, D. G.; ORKIN, S. H.; GINSBURG, D.; LOOK, A. T. (Ed.). **Nathan and Oski's Hematology of Infancy and childhood**. 6th ed. Philadelphia: Saunders, 2003. p.1135-1166.

SMITH, M.; ARTHUR, D.; CAMITTA, B.; CARROLL, A. J.; CRIST, W.; GAYNON, P. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. **J. Clin. Oncol.**, v. 14, p. 18-24, 1996.

SPERTINI, O.; PATRIZIA, C.; ANNE-SOPHIE, C.; JACQUES, H.; JEAN, J.; VON FLIEDNER, V. High levels of the shed form of L-selectin inhibit blast cell adhesion to activated endothelium. **Blood**, v. 84, p. 1249-1256, 1994.

SUAREZ, C. R.; ANDREEFF, M.; MILLER, D. R. Serum LDH values in childhood acute leukemias and non-Hodgkin's lymphoma. **Med. Pediatr. Oncol.**, v. 12, p.89, 1984.

STEINHERZ, P. G.; GAYNON, P. S.; BRENNEMAN, J. C.; CHERLOW, J. M.; GROSSMAN, N. .; KERSEY, J. H.; TRIGG, M. E.; UCKUN, F. M.; BLEYER, W. A. Treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia with bulky extramedullary disease and T-cell phenotype or other poor prognostic features: randomized controlled trial from the Children's Cancer Group. **Cancer**, v. 82, p. 600-612, 1998.

STREETER, P. R.; BERG, E. L.; ROUSE, B. T.; BUTCHER, E. C. A tissue specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. **Nature**, v. 331, p. 341-346, 1988.

STUCKI, A.; RIVIER, A. S.; GIKIC, M.; MONAI, N.; SPERTINI, O. Endothelial cell activation by myeloblasts: molecular mechanisms of leukostasis and leukemic cell dissemination. **Blood**. v. 97, n. 7, p. 2121-2129, April, 2001.

TAÇYILDIZ, N.; CAVDAR, A. O.; YAVUZ, G.; GÖZDAŞOĞLU, S.; UNAL, E.; ERTEM, U.; DURU, F.; IKINCIÖGULLARI, A.; BABACAN, E.; KUZU, I.; CIN, S. Serum levels and differential expression of CD44 in childhood leukemia and malignant lymphoma: correlation with prognostic criteria and survival. **Pediatr. Int**, v. 43, n. 4. p. 354-360, Aug., 2001.

TAKEUCHI, M.; TANIZAWA, A.; FUKUMOTO, Y.; KIKAWA, Y. Serum soluble CD44 in pediatric patients with acute leukemia. . **J. Pediatr. Hematol. Oncol.** v. 21, n. 5, p. 384-388, 1999.

TEROL, M. J.; LOPEZ-CUILLERMO, A; BOSCH, F. Expression of the adhesion molecule ICAM-1 in non-Hodgkin's lymphoma: Relationship with tumor dissemination and pronostic importance. **J. Clin. Oncol.**, v. 16, p. 35, 1998.

TEUFFEL, O.; STANULLA, M.; CARIO, G.; LUDWIG, W. D.; ZIMMERMANN, M.; SCHRAPPE, M.; NIGGLI, F. K. Anemia and survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 93, n. 11, p. 1652-1657, 2008.

THOMAS, X.; ANGLARET, B. Cell adhesion molecules: expression and function in acute myeloid leukemia. **Bull. Cancer**, v. 86, p. 265-277, 1999.

TRUEWORTHY, R.; SHUSTER, J.; LOOK, T. Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. **J. Clin. Oncol.**, v. 10, n. 4, p. 606-613, 1992.

UCKUN, F. M.; PALLISGAARD, N.; HOKLAND, P. Expression of TEL-AML1 fusion transcripts and response to induction therapy in standard risk acute lymphoblastic leukemia. **Leuk. Lymphoma**, v. 42, n.1, p. 41-56, 2001.

UCKUN, M.; SENSEL, M. G; SUN, L.; STEINHERZ, P. G.; TRIFF, M. E; HEEREMA, A; SATHER, N; REAMAN, G. H.; GAYNON, P. S. Biology and treatment of Childhood T- acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 86, p.113-120, 2001.

UDAYAKUMAR, A. Cytogenetic profile of childhood acute lymphoblastic leukemia in Oman. **Arch. Med. Res.**, v..38, p.305-312, 2007.

VARKI, A. Selectin ligands: will the real ones please stand up? **J. Clin. Invest.**, v.100, p. S31–S40, 1997.

VESTWEBER, D.; BLANKS, J. E. Mechanisms That Regulate the Function of the Selectins and Their Ligands. **Physiol. Rev.**, v. 79, n. 1, p.181-213, 1999.

VERFAILLIE, C. M.; PROSPER, F. Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors. **J. Leukoc. Biol.**, v. 69, p. 307-316, 2001.

VIANA, M. B. Leucemias e linfomas pediátricos. In: MURAD, A. M. (Ed.). **Oncologia: Bases clínicas do tratamento**. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan, 1996, p. 372-383.

YARI, N.; MÜNNEVER, B.; EMIN, K.; HANDE, C. Expression of Adhesion Molecules LFA-1, ICAM-1, CD44 and L-selectin in Childhood Non-Hodgkin Lymphomas. **Med. Pediatr. Oncol.**, v. 36, n. 3, p. 359-364, March, 2001.

WANDELL, T. K.; FIALKOV, L.; CHAN, C. K.; KASHIMOTO, T. H. Signaling function of L-selectin. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 25, p. 15403-15411, 1995.

WILLIAMS, A. F.; BARCLAY, A. N. The immunoglobulin superfamily-Domains for cell surface recognition. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 381-405, 1988.

WIERSMA, S. R.; ORTEGA, J.; SOBEL, E.; WEINBERG, K. I. Clinical importance of myeloid-antigen expression in acute lymphoblastic leukemia of childhood. **N. Engl. J. Med.**, v. 324, p. 800-808, 1991.

ZHU, Y. M.; ZHAO, W. L.; FU, J.F.; SHI, J. Y.; PAN, Q.; HU, J.; GAO, X. D. NOTCH1 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance and implication in multifactorial leukemogenesis. **Clin. Cancer Res.**, v.12, n.10, p. 3043-3049, 2006.

ZITTERMANN, S. I.; ACHINO, B. I.; AGRIELLO, E. E.; HALPERIÂN, N.; RAMHORST, R. E.; FAINBOIM, L. Modulation of CD44 in acute lymphoblastic leukemia identifies functional and phenotypic differences of human B cell precursors. **Eur. J. Haematol.**, v. 66, p. 377-382, 2001.

APÊNDICES

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Participação no Estudo - Expressão das moléculas de adesão L-selectina e CD44 na LLA em crianças e adolescentes.

Eu, como responsável do menor _____ afirmo que fui devidamente informado pelo médico do Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital _____ que meu filho(a) apresenta Leucemia Linfóide Aguda. Também fui esclarecido(a) sobre o modo e os possíveis efeitos indesejáveis do tratamento com o Protocolo _____ e as possíveis chances de cura que são esperadas com esse tratamento.

Afirmo que fui esclarecido(a) que no sangue e/ou medula óssea colhidos para a confirmação do diagnóstico do meu filho(a), serão realizados testes laboratoriais adicionais para a pesquisa com as moléculas de adesão, portanto não sendo necessária colheita adicional de sangue e/ou medula óssea. Não haverá desconforto e nem risco adicional para o paciente.

Estou consciente que a participação de minha criança neste estudo é voluntária. A recusa na participação não levará nenhum prejuízo para o tratamento da criança e nem nos cuidados médicos com a mesma. A identidade da criança não será revelada em publicações. Os registros dos dados serão confidenciais e todas as avaliações serão feitas respeitando o segredo profissional e a proteção dos dados pessoais do paciente.

EU li as informações acima (ou foram lidas para mim) e todas as minhas perguntas foram respondidas para a minha satisfação. Com minha assinatura declaro que estarei de acordo com o uso do sangue e/ou medula óssea de meu filho(a) e permito que dos dados clínicos e laboratoriais sejam utilizados na realização do referido estudo.

Local _____

Data _____

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador

Assinatura do paciente (maior 12 anos)

Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Participação no Estudo - Expressão das moléculas de adesão L-selectina e CD44 na LLA em crianças e adolescentes (população pediátrica normal).

Eu como responsável do menor _____ afirmo que fui devidamente informado sobre o referido estudo.

Eu autorizo a participação de meu filho(a) neste estudo, para a determinação da expressão dessas moléculas de adesão na população pediátrica normal, a fim de serem comparados com o grupo de pacientes com LLA.

Fui esclarecido que será realizado a coleta adicional de 3ml de sangue por punção venosa em meu filho(a), juntamente com os exames laboratoriais que o mesmo irá colher neste momento, não acarretando nenhum desconforto ou risco adicional para a minha criança.

Estou consciente que a participação neste estudo é voluntária. A identidade da criança não será revelada em publicações. Os registros dos dados serão confidenciais e todas as avaliações serão feitas respeitando o segredo profissional e a proteção dos dados pessoais do paciente.

EU li as informações acima (ou foram lidas para mim) e todas as minhas perguntas foram respondidas para a minha satisfação. Com minha assinatura declaro que estarei de acordo com a coleta adicional de sangue e que também permito que os dados clínicos e laboratoriais de meu filho sejam utilizados na realização do referido estudo.

Local _____ Data _____

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador

Assinatura do paciente (maior 12 anos)

Apêndice C

EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO L-SELECTINA E DO CD 44 NA LLA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES

Ficha clínica e laboratorial

1. Instituição: HC-ICC <input type="checkbox"/> HIAS <input type="checkbox"/>		Data Diag - ___/___/___	
Médico <input style="width: 100%;" type="text"/>			
2. Nome Paciente <input style="width: 90%;" type="text"/>			RG. <input style="width: 10%;" type="text"/>
3. Sexo: Masc. () Fem. ()		4. Raça: Branca () Não Branca ()	
5. Data do nascimento: ___/___/___		6. Idade: _____ ano _____ meses	
7. Data início TTO: ___/___/___		8. Grupo de risco: AR () RB ()	
9. Peso ao diagnóstico: _____ Kg		10. EST: _____ cm	11. SC _____ m ²
12. Órgãos Acometidos		Outros (especificar)	
Testículos: Não () Sim ()		Baço: Não () Sim () _____ cm	Alargam. Mediastinal _____
SNC: Não () Sim ()		Fígado: Não () Sim () _____ cm	
		Adenomegalais: Não () Sim ()	

13. Resultado do Hemograma do D0	14. Resultado do Líquor Inicial D0
GB <input type="text"/> Blastos <input type="text"/> mm ³ <input type="text"/> %	GB <input type="text"/> Blastos <input type="text"/> Prot <input type="text"/>
Hb g/dl <input type="text"/> Ht% <input type="text"/> Plaq./mm ³ <input type="text"/>	Situação SNC 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/>

15. Bioquímica

	D0	D7	D14	D29	D43
Hb					
Ht					
GB/mm ³					
Blastos(%)					
Neut. Total					
Neut. (%)					
Plaq/mm ³					
Uréia					
Creatinina					
TGO					
TGP					
Na					
K					
Cálcio					
Fósforo					
ÁcidoÚrico					
LDH					
BTf					
Glicemia					
Sorologia					
MO					
LCR					

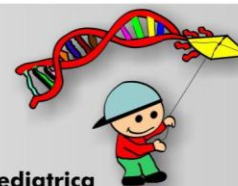
16 . Medula óssea				
MO - _____ Blastos _____ % L1 () L2 () L3 () B () T ()				
17. Citoquímicas				
PAS		Pero		Sudan
<input type="checkbox"/> Pos.	<input type="checkbox"/> Pos.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Fosf. ácida
<input type="checkbox"/> Neg.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
18. Imunofenotipagem				
Calla	CD2	CD3	CD5	CD7
() Pos ___ %	() Pos ___ %	() Pos _____%	() Pos ___ %	() Pos ___ %
() Neg.	() Neg.	() Neg.	() Neg.	() Neg.
() NR	() NR	() NR	() NR	() NR .
CD13	CD19	CD20	CD22	CD33
() Pos ___ %	() Pos ___ %	() Pos _____%	() Pos ___ %	() Pos ___ %
() Neg.	() Neg.	() Neg.	() Neg.	() Neg.
() NR	() NR	() NR	() NR	() NR .
(HLADR)	CD 44	CD 62L	CD _____	CD _____
() Pos ___ %	() Pos ___ %	() Pos _____%	() Pos ___ %	() Pos ___ %
() Neg.	() Neg.	() Neg.	() Neg.	() Neg.
() NR	() NR	() NR	() NR	() NR .
18. Índice de DNA				
Não realizado () Realizado () I DNA _____ I. Prol. _____				
19. Citogenética				
Não realizada () Realizada () Cromossomo Ph : () Pos. () Neg.				
Outras translocações _____ N° de cromossomos _____ Encontradas				

Apêndice D

Resumo do trabalho para o XXII SLAOP.



XXII Congreso Latinoamericano de Oncología Pediátrica
 I Congreso Latinoamericano de Psico-Oncología Pediátrica
 I Encuentro Latinoamericano de Enfermería en Oncología Pediátrica
 I Encuentro Latinoamericano de Equipos Multiprofesionales en Oncología Pediátrica
 I Encuentro Latinoamericano de Voluntarios y de la Asociación de Padres de Niños con Cáncer



São Paulo, 4 y 5 de Octubre 2009

EXPRESSÃO DA L-SELECTINA E DO CD44 EM LEUCEMIAS LINFÓIDES AGUDAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES

Daniel Willian LUSTOSA¹, Jesamar Correia de MATOS², Marcus Davis Machado BRAGA³, Francisco Valdeci de Almeida FERREIRA³.

1- Serviço de Oncologia Pediátrica - HC-ICC, Serviço de Hematologia HUWC-UFC. Fortaleza, Brasil; 2 - Centro de Referência do Diagnóstico do Câncer da Criança e do Adolescente Dr. Murilo Martins - HIAS. Fortaleza, Brasil; 3 - Departamento de Patologia e Medicina Legal – UFC. Fortaleza, Brasil.

Moléculas de adesão (MA) são glicoproteínas de membrana essenciais em vários processos biológicos: proliferação, diferenciação, expressão gênica, migração e apoptose. A expressão aumentada nas LLAs parece relacionar-se com o comportamento biológico, como nos mecanismos de disseminação extramedular dos linfoblastos, infiltração do SNC e formação de massas tumorais.

Objetivos - Analisar a expressão da L-selectina e do CD44 nas LLAs em crianças e adolescentes. Correlacioná-las com os fatores prognósticos (idade, sexo, leucometria, imunofenótipo, IDNA e resposta ao tratamento) e com suas formas extramedulares.

Material e Métodos – Foram avaliados 76 pacientes com LLA, tratados com o Protocolo GBTLI-LLA. O diagnóstico foi baseado em critérios FAB, imunofenotípicos (EGIL) e citogenéticos. A expressão das MA foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando tripla marcação com anticorpos monoclonais. Os parâmetros analisados foram positividade e intensidade média de fluorescência. Na análise estatística utilizou-se o software SPSS 16.0, com os testes de Qui-quadrado e de Mann-Whitney.

Resultados - A média de idade foi 6,3±0,5 anos (0,5-17), sendo 65% meninos. Quanto ao risco, 54% eram baixo risco e 46% alto risco e classificação FAB 83% subtipo L1 e 17% L2. Diagnóstico de LLA-B foi mais frequente com 89,5% dos casos. IDNA ≥ 1.16 foi encontrado em 24% dos pacientes e associou-se a bom prognóstico. Observou-se uma maior expressão do CD44 na LLA-T (87,5%/ IMF=150,44±20,29), porém sem significância estatística. LLAs com massa tumoral apresentaram 84% de expressão do CD44, quando comparada a 52% das LLAs sem massa tumoral ($p=0.01$; $OR=4,8$). Expressão aumentada da L-selectina na LLA-T (87,5%/IMF=272,33±52,72) foi estatisticamente significativa, comparado a LLA-B (54,5%/IMF=115,90±12,75). Não houve correlação entre os outros fatores prognósticos e essas MA.

Conclusão – A expressão da L-selectina e do CD44 estão aumentadas nas LLAs estudadas, principalmente na LLA-T. O CD44 correlacionou-se com LLAs com massas tumorais e parece estar relacionado aos mecanismos de disseminação extramedular dos linfoblastos

ANEXOS**Anexo A - Autorização CEP - HC-ICC**

HOSPITAL DO CÂNCER
INSTITUTO DO CÂNCER DO CEARÁ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Fortaleza, 28 de maio de 2008

Ao Pesquisador: Daniel William Lustosa de Souza
Ref. ao Projeto: 66/2007 - Expressão das moléculas de adesão CD44 e CD62L na Leucemia Linfóide Aguda em Crianças e Adolescentes.

Considerando o fato de o projeto de sua responsabilidade, acima referenciado, ter sido apresentado na reunião CEP, de 07/11/2007, recebendo parecer: **APROVADO COM PENDÊNCIA**, feitos os ajustes necessários, e já do conhecimento deste comitê, poderá o mesmo entrar em execução, a partir desta data.

Cordiais Saudações,

Marcelo Gurgel Carlos da Silva
Presidente do CEP/HC/ICC

Anexo B**Protocolo de Autorização do Comitê de Ética do HIAS****HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Rua Tertuliano Sales 544 – Vila União – Fortaleza – Ceará
FoneFax: (85) 3101.4212 – 3101.4263

Fortaleza, 06 de agosto de 2008.

Registro no CEP: 058/08

Data da Aprovação: 06/08/08

Título do Projeto: “Expressão das moléculas de adesão CD44 e CD62L na Leucemia Linfóide Aguda em crianças e adolescentes”

Pesquisador: Daniel Willian Lustosa de Sousa

Instituição / Serviço: Hospital Infantil Albert Sabin

Levamos ao conhecimento de V. S^a, que o Comitê de Ética em Pesquisa – COMEPE, do Hospital Infantil Albert Sabin – Secretaria da Saúde do Estado do Ceará, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, aprovou o projeto supracitado.

O pesquisador deverá apresentar uma cópia do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa.


Régina Lúcia Ribeiro Moreno
Coord. do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo C

Composição de soluções empregadas

1. Solução PBS-Azida-BSA

PBS 10x -----	100ml
EDTA -----	500mg
Azida -----	2g
BSA -----	20g
MilliQ qsp-----	1000ml
Ajuste do pH para 7,3	

2. Solução de lise para hemácias

NH ₄ Cl -----	0,829g
NaHCO ₃ -----	0,084g
EDTA dissódico -----	3,7mg
MilliQ qsp -----	100ml
Ajuste do pH para 7,3	

3. Solução tampão de lavagem

NaCl -----	0,82g
KCl -----	0,2g
KH ₂ PO ₄ -----	0,2g
NaH ₂ PO ₄ -----	1,13g
MilliQ qsp-----	1000ml
Ajuste do pH para 7,3	

4. Paraformaldeído a 1%

Paraformaldeído -----	1g
PBS 10x -----	10ml
MilliQ qsp-----	100ml
Ajuste do pH para 7,3	