

MARIANA REZENDE BANDEIRA DE MELLO

**Avaliação Imunofenotípica, Estudo do Índice
de DNA e de Alterações Moleculares em
Células Blásticas de Pacientes Portadores de
Leucemia Linfóide Aguda Diagnosticados na
Fundação Hemope**



UNICAMP

Campinas

2007

Avaliação Imunofenotípica, Estudo do Índice de DNA e de Alterações Moleculares em Células Blásticas de Pacientes Portadores de Leucemia Linfóide Aguda Diagnosticados na Fundação Hemope

Aluna: Mariana Rezende Bandeira de Mello

Orientadora: Prof Dra. Irene G.H. Lorand-Metze

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós- Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de Ciências Básicas.

Campinas

2007

*FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP*

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M489a Mello, Mariana Rezende Bandeira de
Avaliação imunofenotípica, Estudo do índice de DNA e de alterações moleculares em células blásticas de pacientes portadores de leucemia aguda diagnosticados na Fundação Hemope / Mariana Rezende Bandeira de Mello. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Irene Lorand-Metze
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucemia linfóide aguda. 2. Citometria de fluxo. 3.
Diagnóstico. I. Lorand-Metze, Irene. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Phenotypic and molecular features of acute Lymphoblastic leukemia in Recife - PE

Keywords: • Acute Lymphoblastic leukemia
• Flow cytometry
• Diagnostic

Área de concentração : Ciências Básicas

Titulação: Mestrado em Clínica Médica

Banca examinadora: Profa. Dra. Irene Lorand-Metze

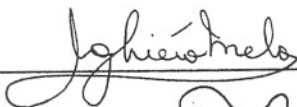
Prof Dr Fernando Ferreira Costa
Profa. Dra. Ligia Niéro-Melo

Data da defesa: 29-01-2007

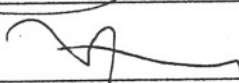
Banca examinadora da tese de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Irene G. H. Lorand Metze

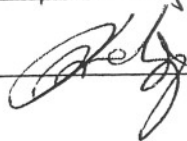
Professora Doutora Ligia Niero Melo



Professor Doutor Fernando Ferreira Costa



Professora Doutora Irene Gyongyvér Heimarie Lorand Metze



Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/01/2007

200728521

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Arquimedes e Elizabeth, por tudo que fizeram por mim. Pelo esforço, incentivo e apoio para que eu chegasse até aqui. Pela lição de vida que me ensinam até hoje.

Ao meu marido, Marcos André, pelo estímulo, paciência e muito amor.

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Irene**, pela orientação, compreensão, paciência, dedicação, amizade, profissionalismo e por todos os ensinamentos transmitidos durante os anos de convivência.

Ao **Dr. Konradin**, pela dedicação e colaboração na realização deste trabalho.

À **Fernanda**, pela ajuda, incentivo, disponibilidade em ensinar. Pelo bom humor e pelos bons momentos de convívio no laboratório.

Aos amigos do laboratório de marcadores celulares, **Alan, Suiellen, Eliane e Soraia**, pelos prazerosos momentos compartilhados. Por estarem sempre dispostos a ajudar e ensinar.

À **Secretária Nicete**, pelo fácil acesso, simpatia e competência.

À **Arlete e Leonardo**, pelo apoio didático, sempre ajudando na confecção de posters e aulas.

Aos **secretários da Pós-graduação**, pelas orientações até o término da tese.

À **Dra. Cintia**, pela ajuda e orientações no início deste trabalho.

Aos amigos do Hemope, **Anelita, Amélia, Dr Raul, Fárida e Washigton**, pela amizade, disponibilidade e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À **Michelline**, por sua participação direta neste trabalho, sempre prestativa. Pelo desempenho e disponibilidade na coleta do material e busca de prontuários.

Aos amigos do Boldrini, **Andrés, Marcela e Ana Luíza**, pelos ensinamentos na biologia molecular. Por serem muito receptivos e colaborativos.

Aos amigos do IMIP, **Teresa Santiago, Ester e Veruska**, pela competência nos ensinamentos da citometria e pelo fácil acesso, sempre prestativos e dispostos a colaborar.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Arquimedes e Elizabeth, pelos exemplos de honestidade, dignidade, respeito, luta e perseverança. Por nunca medirem esforços para meus estudos e para minha felicidade. Pelo grande amor que me dedicam.

Às minhas irmãs, Luciana e Paula, pelo incentivo e companheirismo. Por termos nos tornados mais amigas. E pelo amor que agora conseguimos declarar umas as outras.

Ao meu marido, Marcos André, pelo amor, amizade, compreensão, paciência e incentivo. Por sempre está ao meu lado em qualquer situação.

Aos meus tios, Ernesto e Margareth, e primos, Eduarda, Marcela e José Ernesto, por estarem sempre presentes em minha vida. Pelo amor que demonstram por mim e que é recíproco.

À minha avó Lígia, por confiar e torcer sempre por mim. Por me fazer presente em suas orações.

À minha avó, Almarinda, mesmo não estando mais entre nós, está sempre olhando por mim e me protegendo. Por ter me deixado várias lições de vida, das quais, uma das mais importantes é: demonstrar seu amor a quem você ama e dizer isso a elas sem ter vergonha porque um dia pode ser muito tarde.

Aos amigos em Campinas, **Dulcinéia, Sheley, Carol, Ângela, Ucha, Anderson, Magnun e Emanuel**, sempre dispostos a colaborar, pelas dicas e ajudas e pelos momentos de descontração.

Aos amigos de Recife, **Liciane, Kaliny, Jemima, Pollyanna, Shana e Antônio Roberto**, que mesmo à distância em ajudaram e me incentivaram.

A todos meus familiares, por todo carinho e amor a mim dispensado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUÇÃO.....	14
1.1- Leucemia Linfóide Aguda.....	15
1.2- Critérios Diagnósticos e Subtipos	16
1.3- Características Genéticas e Moleculares	18
1.4- Ploidia Celular.....	21
1.5- Fatores Prognósticos	22
OBJETIVOS.....	25
PACIENTES E MÉTODOS.....	27
3.1- Critérios de Inclusão e Exclusão	28
3.2- Diagnóstico de LLA	28
3.3- Tratamento Realizado	28
3.4- Reavaliação	28
3.5- Técnicas.....	29
3.6- Coleta dos Dados.....	34
3.7- Aspectos Éticos	34
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

BD - Becton Dickinson
BFM - Berlin-Frankfurt-Munster
CCG - Children's Cancer Group
CD - Cluster Differentiation
cDNA - DNA Complementar
cit – Citoplasmático
DEPC – Dietilpirocarbonato
DNA – Ácido Desoxiribonucléico
DRM - Doença Residual Mínima
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
EGIL - Immunological Classification of Leukemias
FAB - Franco, Americano e Britânico
FITC - Isitiocianato de Fluoresceína
FSC - Forward Scatter
GBTLI – Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Infantis
GMALL - German Multicenter Trials for Adult ALL
Hemope – Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
Hyper CVAD – Hyperfractionated Cyclophosphamide, Vincristine, Doxorubicin, and Dexamethasone
Ig – Imunoglobulina
IMF - Intensidade Média de Fluorescência
kb - Kilo Bases
kDa – Kilo Daltons
LLA – Leucemia Linfóide Aguda
LMC - Leucemia Mielóide Crônica
M-BCR - Major Breakpoint Cluster Region
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
MO - Medula Óssea
MPO – Mieloperoxidase

OMS - Organização Mundial de Saúde
pb – Pares de Base
PBS - Tampão Fosfato
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PE – Ficoeritrina
Ph – Philadelphia
POG - Pediatric Oncology Group
RNA – Ácido Ribonucléico
RT – Transcriptase Reversa
s – Superfície
SLE - Sobrevida Livre de Eventos
SNC – Sistema Nervoso Central
SP - Sangue Periférico
SSC - Side Scatter
t – Translocação
TCR - Receptores de Células T
TMO - Transplante de Medula Óssea
UKALL – United Kingdom Studies for Adult ALL

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo de LLA T com CD3 e CD7 positivos.....	30
Figura 2 - Exemplo de LLA pré B com CD45, CD19, CD10, CD22, HLA-DR, CD79a _{cito} e IgM _{cito} positivos.	30
Figura 3 - Histograma de paciente hiperdiplóide com índice de DNA = 1,26 (63,67% população diplóide e 36,33% aneuplóide) e índice de proliferação baixo (total de fase S = 3,66%).	32
Figura 4 - Resultados da detecção do rearranjo BCR/ABL p190 através do método RT/PCR. M = Marcador de 100 pb; P1 a P6 = Pacientes; C1 a C6 = Controle interno (ABL); C+ = Controle positivo; H ₂ O = Controle branco.....	34
Figura 5 - Frequência quanto ao imunofenótipo dos pacientes adultos (A) e crianças (B).	37
Figura 6 – Distribuição dos casos quanto à idade.	37
Figura 7 – Distribuição dos casos quanto à contagem de leucócitos.	38
Figura 8 – Distribuição dos casos quanto à intensidade do CD45.....	39
Figura 9 - Distribuição quanto ao IMF CD45 x IMF CD19.....	41
Figura 10 - Distribuição quanto ao IMF CD34 x IMF CD10.....	42
Figura 11 - Distribuição quanto ao IMF CD19 x IMF CD79a _{cit.}	42
Figura 12 - Distribuição quanto ao IMF CD34 x IMF IgM _{cit.}	43

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Classificação das LLAs B de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS).</i>	16
<i>Tabela 2 - Classificação das LLAs B segundo a classificação EGIL.</i>	17
<i>Tabela 3 - Classificação das LLAs T segundo a classificação EGIL.</i>	17
<i>Tabela 4 - Classificação das LLAs T baseado no protocolo do grupo GMALL.</i>	18
<i>Tabela 5 - Anticorpos monoclonais usados para imunofenotipagem.</i>	31
<i>Tabela 6 - Sequência dos primers utilizados na RT- PCR para o estudo dos rearranjos gênicos.</i>	33
<i>Tabela 7 - Sequência dos primers utilizados na RT- PCR para controle interno (ABL).</i>	34
<i>Tabela 8 - Frequência quanto à faixa etária e sexo.</i>	36
<i>Tabela 9 - Frequência quanto ao imunofenótipo dos pacientes separados pelos grupos etários.</i>	36
<i>Tabela 10 - Frequência quanto a leucometria.</i>	38
<i>Tabela 11 – Dados clínicos e hematológicos dos pacientes com LLA T</i>	39
<i>Tabela 12 – Dados clínicos e hematológicos dos pacientes com LLA B.</i>	40
<i>Tabela 13 - Índice de proliferação dos pacientes com LLA.</i>	43
<i>Tabela 14 - Frequência dos rearranjos gênicos encontrados.</i>	44

RESUMO

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) representa 75–80% dos casos de leucemia em crianças e apenas 20% das leucemias do adulto. Certas características clínicas e laboratoriais têm valor prognóstico e servem para estratificá-los em grupos de risco para tratamento. O diagnóstico da LLA é baseado principalmente nas suas características fenotípicas que permitem definir a linhagem, o grau de maturação, bem com, assincronismos de maturação que permitem diferenciar blastos leucêmicos de precursores linfóides normais, o que é muito útil na detecção de doença residual mínima. Nosso objetivo foi estudar as características biológicas da LLA (características fenotípicas, moleculares e ploidia) em pacientes (adultos e crianças) atendidos na Fundação Hemope. Foram utilizados um painel de triagem de anticorpos monoclonais e 2 secundários (para LLA-B e LLA-T). Todos os casos foram analisados no Paint-a-Gate para estudo da intensidade média de fluorescência (IMF). Pesquisamos os rearranjos *BCR/ABL* p190 e p210, *AF4/MLL*, *E2A/PBX1* e *TEL/AML1*. Foram analisados 49 pacientes onde 18 eram crianças (≤ 18 anos) e 31 adultos (> 18 anos). Dos casos estudados 11 foram LLA-T (6 pré-T e 5 LLA-T) com mediana de idade de 19 anos. E 38 foram LLA-B (7 pré-pré-B, 15 B comum e 13 pré B e 3 sem classificação) com mediana de idade de 29 anos. O rearranjo *BCR/ABL* foi encontrado em 5 pacientes, sendo 4 *BCR/ABL* p190 e 1 *BCR/ABL* p210. Dois pacientes apresentaram o rearranjo *E2A/PBX1* e 2 o *AF4/MLL*. Não foi encontrado nenhum caso com o rearranjo *TEL/AML1*. Quanto ao índice de DNA, 5 pacientes foram hiperdiplóides e 42 diplóides. A porcentagem de células em Fase S não variou entre crianças e adultos nem entre as LLAs B e T. Concluímos que os anticorpos utilizados foram suficientes para classificar imunologicamente os casos. A análise quantitativa expôs mais os assincronismos de maturação. A frequência encontrada de casos hiperdiplóides foi semelhante à literatura. A taxa de proliferação foi muito variável, mas não teve relação com a idade, nem com o tipo de LLA. Os rearranjos encontrados apresentaram associação com os subtipos de LLA conforme descrito na literatura. Embora, a frequência de adultos com *BCR/ABL* tenha sido abaixo da relatada.

ABSTRACT

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is a disease that occurs primarily in children (75-80%) and represents only 20% of adults' leukemia. Some clinical and laboratorial research have focused on stratifying patients into various risk groups based on known prognostic features that play a critical role in directing therapy for ALL. We have studied biological characteristics of ALL (adults and children) of patients attended on Hemope Foundation from March 2004 to March 2006. The immunophenotyping at diagnosis was performed by a dual color two stage protocol. Expression of each antigen studied was measured by mean fluorescence intensity (MFI) by flow cytometry using the Paint-a-gate software. RT-PCR was performed to detect specific molecular alterations. We analyzed 49 patients: 18 children (≤ 18 years old) and 31 adults. Eleven were T ALL with median age of 19 years and 38 were B ALL (7 pre-pre B, 15 common, 13 pre B and 3 without classification) with median age of 29 years. Concerning gene rearrangements, *BCR/ABL* was detected in 5 patients (4 *BCR/ABL* p190 and 1 *BCR/ABL* p210), *E2A/PBX1* in 2 patients and *AF4/MLL* in 2 patients. *TEL/AML1* couldn't be found in any case examined. Hyperdiploidy was observed in 5 patients. The percentage of cells in phase S showed a large variation, but did not differ in children or adults nor between B ALL and T ALL. Our results show that the antibodies used were sufficient to classify the cases. The quantitative approach was able to disclose better the maturation abnormalities of the leukemic blasts. The frequency of hyperdiploid cases was similar to that found in the literature. The proliferation rate was variable but had no relationship with age and ALL type. The molecular aberrations were associated with specific ALL subtypes, as already described in the literature. Even so, the frequency of *BCR/ABL* in adults was diminished.

Introdução

1.1- Leucemia Linfóide Aguda

As leucemias correspondem a 30% dos cânceres em pediatria e constituem as neoplasias mais freqüentes em indivíduos com menos de 15 anos. A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) representa 75–80% de todos os casos de leucemia em crianças (RIBEIRO, 2001) e apenas 20% em adultos (BARRIOS, 2001).

A LLA pode ser definida como uma proliferação clonal maligna de células precursoras linfóides de etiologia desconhecida que leva à substituição da hematopoiese normal por células linfóides imaturas capazes de infiltrar linfonodos, baço, fígado e outros órgãos, freqüentemente seguida de neutropenia, anemia e plaquetopenia no sangue periférico (SP) (MARTINS E FALCÃO, 2000; PELLOSO, 2003).

A transformação maligna pode ocorrer durante qualquer estágio de diferenciação das células blásticas, o que explica a heterogeneidade da doença (BERG, 1992). Para um melhor diagnóstico e classificação são realizados estudos da morfologia, citoquímica, cariótipo e imunofenotipagem (CHANG, 2004). A LLA é considerada como modelo de sucesso em oncologia clínica e a primeira doença maligna disseminada a responder consistentemente à quimioterapia (MAUER, 1995).

As tentativas de aumentar ainda mais as taxas de cura com o uso de transplante de células-tronco hematopoiéticas têm melhorado a sobrevida de alguns subtipos de LLA, sugerindo ser improvável que a intensificação dos tratamentos atuais aumente substancialmente as taxas de curas e que ao contrário eleve a mortalidade relacionada ao surgimento de seqüelas tardias graves, tais como, as malignidades secundárias. Assim, a melhor esperança para um progresso contínuo repousa em uma maior compreensão da patogênese da LLA e da base para a resistência à quimioterapia (PUI, 2004).

Estratégias atuais estão sendo estudadas para realçar a eficácia e a redução da toxicidade da terapia e isto é baseado no melhor entendimento do mecanismo celular e efeitos anti-leucêmicos (KAGER, 2005).

Vários estudos tentam identificar características clínicas e biológicas que se correlacionam com o prognóstico com o objetivo de incorporá-las dentro do sistema de classificação de risco usado para definir a estratégia terapêutica (SMITH, 1996). Desta forma os pacientes considerados de baixo risco recebem tratamento menos intensivo,

enquanto aqueles de maior risco de falha são tratados de modo mais agressivo (FRIEDMANN, 2000; PUI, 1995; PUI, 1998).

A avaliação atual das LLAs baseia-se principalmente na identificação de achados relacionados com o prognóstico e que permitam a detecção precoce da recaída da doença (PUI, 2004). Para a investigação laboratorial da LLA existem quatro métodos importantes: morfológico, imunofenotípico, citogenético e molecular. Esses métodos são geralmente complementares e apresentam graus diferentes de especificidade, sensibilidade e facilidade de uso.

1.2- Critérios Diagnósticos e Subtipos

O impacto da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico e manejo das leucemias agudas tem se expandido rapidamente (SCHABATH, 2003). O estudo do imunofenótipo das leucemias agudas é de grande importância para o diagnóstico, classificação, prognóstico, tratamento e investigação de doença residual mínima (DRM) (DI BONA, 2002; RILEY, 2002; BENE, 2005).

A positividade dos marcadores pode ser medida pela porcentagem de células, geralmente mais utilizada, e/ou pela intensidade de fluorescência expressa pelos marcadores. A intensidade média de fluorescência (IMF) descreve melhor a distribuição dos antígenos nas células leucêmicas do que a porcentagem, e é utilizada por diversos autores (RASPADORI, 1997; REGO, 1999).

As LLAs de origem B (LLA B) podem ser definidas por no mínimo a expressão de dois antígenos para esta linhagem, tais como CD79a cit, CD19 ou CD22. Estas por sua vez se dividem, de acordo com o grau de diferenciação celular, em subgrupos como descritos na tabela 1 (BRUNNING, 2001).

Tabela 1 - Classificação das LLAs B de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS).

	TdT	CD19	CD79a _{cito}	CD22 _{cito}	CD34	CD10	HLA-DR	Ig _{cito}	Ig _s
Pré-pré B	+	+	+	+	+	-	+	-	-
B comum	+	+	+	+	-/+	+	+	-	-
Pré B	+	+	+	+	-	+	+	+	-
B madura	+	+	+	+	-	+/-	+	-/+	+

Baseado nas etapas de maturação e diferenciação dos antígenos o European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL) propôs em 1995 a classificação para LLA B mostrada na tabela 2 (BENE, 2005).

Tabela 2 - Classificação das LLAs B segundo a classificação EGIL.

	CD79a_{cito}, CD19, CD 22_s ou cit	CD10	Ig_{cito}	Ig_s
B-I	+	-	-	-
B-II	+	+	-	-
B-III	+	+	+	-
B-IV	+	+	+	+

A subclassificação da LLA de origem T (LLA T) não é tão bem estabelecida como na LLA de origem B. Porém baseadas na diferenciação tímica normal podem ser divididas em Pró-T (CD7+, CD3cit+), Pré-T (CD2+, CD5+ e/ou CD8+), T cortical (CD1a+) e T madura (CD3_s+, CD4+ ou CD8+). Nesses 2 últimos grupos a expressão do CD3_s podem estar associados com a expressão dos Receptores de Células T (TCR) Alfa/Beta ou Gama/Delta (ORFAO, 2004).

A classificação EGIL também considera 4 subtipos de LLA T, como descrito na tabela 3 (BENE, 2005).

Tabela 3 - Classificação das LLAs T segundo a classificação EGIL.

	CD7	CD3_{cit}	CD2, CD5, CD8	CD1a	CD3_s+/CD1a-
T-I	+	+	-	-	-
T-II	+	+	+	-	-
T-III	+	+	+	+	-
T-IV	+	+	+	-	+

Baseado no protocolo do grupo alemão GMALL (HOELZER, 1988) pode-se construir uma tabela de classificação imunológica para LLA T (Tabela 4).

Tabela 4 - Classificação das LLAs T baseado no protocolo do grupo GMALL.

	CD7	CD3c	CD5	CD2	CD1a	CD3s
Pré-T	+	+	+/-	-	-	-
T Cortical	+	+	+	+	+	-/+
T Madura	+	+	+	+	-	+

Em geral, a subdivisão na LLA T não tem sido clinicamente útil (CAMPANA, 2000). Em contraste do observado na LLA de células precursoras B, não há associação entre a classificação imunológica da LLA T e genótipos específicos da célula T ou com o prognóstico (ORFAO, 2004; BRUNNING, 2001).

Béné (2005) sugere um painel extenso de anticorpos: CD10, CD19, CD20 e CD22, para linhagem B; CD1, CD2, CD3, CD5 e CD7, para linhagem T e CD13, CD14, CD15, CD33, CD117 e MPO, para a linhagem mielóide.

Outros autores sugerem a realização de um painel de triagem para definição de linhagem e anticorpos adicionais para identificar estágios de maturação, fatores prognósticos ou fenótipos aberrantes para monitorização de DRM (CAMPANA, 2000; THALHAMMER-SCHERRER, 2002; PEREIRA, 2006).

De acordo com a Primeira Conferência Latino-Americana de Consenso para Classificação Imunológica das Leucemias foi sugerido um painel mínimo de anticorpos dividido em anticorpos para definição de linhagem: B - CD79a cit/CD19; T – CD3c/CD7; Mielóide – MPOcit/CD13/CD33 e anticorpos de maturação: B e T – CD34/TdT; Mielóide – CD34/CD15/HLA-DR (PIEDRAS, 2000).

Há grande divergência quanto ao painel de anticorpos usado para diagnóstico e classificação das leucemias agudas, ficando a escolha dos antígenos estudados a critério de cada serviço.

1.3- Características Genéticas e Moleculares

Alterações cromossômicas podem ser numéricas ou estruturais (BERG, 1992). Aproximadamente um terço dos casos de LLA mostram alterações citogenéticas balanceadas. Quatro translocações principais têm sido observadas e cada uma define um subconjunto biológico único de pacientes com alterações genéticas.

Rearranjo *E2A/PBX1*

A t(1;19)(q23;q13) é a marca de várias LLAs pré-B e caracterizada pela fusão dos genes *E2A* e *PBX1*. Esta translocação envolve o gene *E2A* no cromossomo 19 e o gene *PBX1* (também conhecido como PRL) no cromossomo 1, formando um gene híbrido *E2A/PBX1* que produz uma proteína oncogênica (VAN DONGEN, 1999). O gene *E2A* codifica fatores de transcrição essenciais para a linfopoiese normal e a regulação do desenvolvimento da célula B (FARIAS, 2004), enquanto que o *PBX1* é um gene homeobox de função desconhecida (RAIMONDI, 1993). A estrutura da proteína transcrita no rearranjo *E2A-PBX1* sugere que elas ativam expressão de genes na via pela ativação do domínio *E2A*, contribuindo assim para uma transformação maligna de células pré-B ou outros progenitores (RAIMONDI, 1993).

Este rearranjo geralmente confere prognóstico adverso e diferentemente do cromossomo Ph⁺, perde seu significado prognóstico com a intensificação do tratamento (RAIMONDI, 1993). Esta translocação está presente em 5 a 6% dos casos de LLA pediátrica e em aproximadamente 3% em adulto (VAN DONGEN, 1999; FRIEDMANN, 2000).

Este subtipo de leucemia representa aproximadamente 25% de leucemias de células pré-B e 5% de LLA global na infância e adulto (WIEMELS, 2002). Sua frequência também tem sido relatada esporadicamente em LLA pré-pré-B e LLA B comum (<1%), bem como em casos raros de LLA-T (VAN DONGEN, 1999).

Rearranjo *AF4/MLL*

Translocações no gene *MLL* no 11q23, mais comumente t(4;11)(q21;q23), são vistas em vários casos de lactentes com LLA com mais de 30 genes parceiros envolvidos descritos em rearranjos do gene *MLL*. Independentemente do gene parceiro, os casos com rearranjo do *MLL* apresentam uma resposta ruim à quimioterapia convencional e estão associados com pior prognóstico. Em crianças mais velhas o impacto negativo do 11q23 é menor apesar de ainda definir um subgrupo de alto risco (BEHM, 1996; CARROL, 2003). A maioria dos estudos tem mostrado que translocações envolvendo o cromossomo 11q23 ocorrem em aproximadamente 60% das LLAs dos lactentes (<1 ano), 2% dos casos em crianças e entre 3 a 6% em adultos. As células blásticas são na maioria das vezes pré-pré-B,

podendo também apresentar expressão anômala de antígenos mielóides (HARRIS, 2000; JENNINGS, 1997; VAN DONGEN, 1999; FRIEDMANN, 2000).

Rearranjo *BCR/ABL*

O cromossomo Philadelphia é derivado da t(9;22)(q34;q11). Essa anormalidade é observada em mais de 95% das Leucemias Mielóides Crônicas (LMC), em 3 a 5% das LLAs da criança e em até 20% dos adultos com LLA. O transcrito resultante da fusão *BCR/ABL* tem a atividade da tirosina quinase alterada (CARROLL, 2003). Nesta translocação, o protooncogene *ABL* é translocado do braço longo do cromossomo 9 junto ao gene *BCR* do cromossomo 22, resultando na formação de um gene quimérico *BCR-ABL*. Há dois tipos principais de transcritos que representam diferentes posições do ponto de quebra no gene *BCR*. Na maioria dos casos de LMC e em aproximadamente metade das LLAs de adultos, o ponto de quebra se localiza no *major breakpoint cluster region* (M-*BCR*). Esses transcritos de 8.5 kb (kilo bases) codificam uma proteína híbrida de cerca de 210 kDa que possui uma elevada atividade tirosinoquinase (FARIAS, 2004). Nos casos *BCR/ABL* positivos cerca de metade dos casos de adultos e na maioria dos casos pediátricos, observa-se uma proteína quimérica *BCR-ABL* diferente que codifica um proteína híbrida de 190 kDa com uma atividade transformadora mais intensa que o da proteína p210 (FARIAS, 2004). Esta fusão gênica também pode codificar uma outra proteína híbrida de 230 kDa, porém não é encontrada com frequência nessas leucemias.

Na LLA, a presença do cromossomo Ph prediz uma alta incidência de falha na indução e recaída após a quimioterapia (KURZROCK, 2003). O uso de um inibidor de quinase, como o mesilato de imatinib tem mostrado eficácia passageira na LLA Ph⁺. Entretanto, a sua administração em conjunto com a quimioterapia está atualmente sendo avaliada na LLA (CARROLL, 2003). Apesar de existir um grupo de pacientes Ph⁺ e baixa contagem de leucócitos que pode ser curado com quimioterapia, para a maioria destes pacientes esta translocação está associada a um pior prognóstico com a terapia convencional ou mesmo a sua intensificação (RIBEIRO, 1997). A eficácia do transplante de medula óssea (TMO) em primeira remissão tem sido estudada.

Ao contrário das outras características citogenéticas que perdem o significado prognóstico com o avanço e intensificação da terapia, o cromossomo Ph⁺ se mantém como

um indicador de pior prognóstico (FRIEDMANN, 2000). A Sobrevida Livre de Eventos (SLE) em 5 anos deste subgrupo continua sendo de cerca de 30% (FARIAS, 2004).

Rearranjo *TEL/AML1*

A translocação mais comum na LLA é a t(12;21)(p13;q22), identificada em aproximadamente 25% dos casos de células precursoras B em crianças e <5% nos adultos, utilizando-se técnicas de triagem molecular (FARIAS, 2004). Essa translocação funde o locus *TEL* no braço curto do cromossomo 12 (também chamado *ETV6*) com o gene *AML1* do cromossomo 21 (também chamado *CBFA2* ou *RUNX1*). Muitos estudos têm demonstrado que pacientes com a translocação *TEL/AML1* evoluem extremamente bem. Porém, resultados do grupo BFM (Berlin-Frankfurt-Munster) mostraram que a incidência dessa translocação nos casos de recaída foi idêntico ao que se encontrava ao diagnóstico inicial. As recaídas tendem a ocorrer tarde e a recuperação tem sido extremamente boa. Diferenças na terapia podem ser a causa dessa discrepância. Estudos *in vitro* mostram sensibilidade única de blastos *TEL/AML1*+ para asparaginase e protocolos que contém terapia intensificada com esse agente pode vir a ser particularmente proveitosa para esse subgrupo de pacientes (CARROLL, 2003). A presença do rearranjo *TEL/AML1* é uma das características para classificar o paciente em LLA de “baixo risco” tanto em crianças quanto em adultos.

1.4- Ploidia Celular

A atividade proliferativa de um tecido é o resultado direto de sinais estimuladores e inibidores de seu crescimento. Nos cânceres estas mensagens resultam da ativação de oncogenes e provavelmente inativação de um ou mais genes supressores de tumor. A razão de crescimento de um tumor não é só consequência de sua atividade proliferativa, mas também depende do número de células capazes de entrar em morte celular programada (apoptose) e necrose. A proliferação tem sido mais estudada que a apoptose e pode ser usada para prever evolução, manejo do paciente e seleção do tratamento (BERG, 1992; FRIEDMANN, 2000).

O índice de DNA é a razão entre o conteúdo de DNA de células leucêmicas em G0/G1 versus o conteúdo de DNA de células normais em G0/G1 (FRIEDMANN, 2000).

Aproximadamente um terço dos casos de LLA mostram um aumento no número de cromossomos, isto é, hiperdiploidia (≥ 50 cromossomos). Esses blastos compõem um subconjunto biológico associado com aumento da apoptose *in vitro* e sensibilidade a uma variedade de agentes quimioterápicos. Bons resultados são caracteristicamente observados em pacientes cujos blastos abrigam essas características (sobrevida livre de eventos 75-90%). Em contraste, presença de blastos hipodiplóides, com menos que 45 cromossomos, estão associados a um prognóstico pior e são considerados relativamente raros (CARROL, 2003; FARIAS, 2004; NYGAARD, 2006).

1.5- Fatores Prognósticos

Diversas variáveis clínicas e laboratoriais têm valor prognóstico e servem para estratificar os pacientes em grupos de risco, o que tem se tornado elemento essencial para o desenho e avaliação dos tratamentos atuais.

Variáveis Clínicas

* Idade – Existe uma relação entre a idade ao diagnóstico e o prognóstico. Crianças com menos de dois anos e aquelas maiores de dez anos tem relativamente pior prognóstico. Lactentes tendem a apresentar fatores de risco considerados desfavoráveis, tais como: altas contagens de leucócitos, grandes organomegalias, trombocitopenia, infiltração do Sistema Nervoso Central (SNC), doença residual do Dia 14 (D14) da indução e anormalidades estruturais do cromossomo 11 (MARGOLIN, 1997).

* Sexo – Em estudos anteriores do Pediatric Oncology Group (POG) o sexo masculino tem sido consistentemente considerado como uma característica prognóstica adversa. Os mais recentes trabalhos do Children's Cancer Group (CCG), entretanto, não têm mostrado o sexo como uma variável estatisticamente significativa. Isto porque estas discrepâncias são tratamento-dependente e mudam com os avanços da terapia (SHUSTER, 1998; STEINHERZ, 1998; FRIEDMANN, 2000).

* Raça – É considerada freqüentemente como fator prognóstico. No passado crianças negras mostravam remissão após a indução numa taxa significativamente menor (MARGOLIN, 1997).

* Estado Nutricional – Alguns estudos têm demonstrado que pacientes desnutridos toleram menos a quimioterapia (MARGOLIN, 1997; VIANA, 1994). Viana *et al* sugerem que

fatores nutricionais e socioeconômicos devem ser considerados no prognóstico de crianças com leucemia de países em desenvolvimento.

* Infiltração do SNC – A presença de doença no SNC ao diagnóstico é também um fator prognóstico adverso apesar da intensificação da terapia com adicional terapia intratecal e irradiação do SNC (CARROLL, 2003).

* Resposta ao Tratamento – A resposta à terapia vem emergindo como importante fator prognóstico. Doença residual no D14 da indução é por si só um importante fator de risco. A proporção de blastos na medula óssea (MO) no D7 e no SP no D8, também vem sendo considerados como fatores prognósticos (MARGOLIN, 1997).

Variáveis Laboratoriais

* Leucometria – A leucometria é talvez o principal fator prognóstico identificado, mantendo-se importante após ajustamento de outros critérios. Existe uma relação linear entre a contagem inicial dos leucócitos e o prognóstico. Pacientes com contagem maior que $50.000/\text{mm}^3$ tem particularmente mais chance de recaída (FRIEDMANN, 2000).

* Citomorfolgia - O grupo FAB (Franco, Americano e Britânico) classificou as LLAs de acordo com as características morfológicas em L₁, L₂ e L₃. Como a classificação FAB não prevê características de imunofenotipagem, alterações citogenéticas ou comportamento clínico da doença há consenso em que a tradicional classificação L₁, L₂ e L₃ seja modificada para LLA derivada de células precursoras de células B e LLA derivada de células T. O novo consenso também recomenda valorizar e incluir na classificação a informação prognóstica advinda da citogenética (BARRIOS, 2001).

Atualmente, a classificação é dada pela imunofenotipagem de acordo com o grau de maturação dos blastos leucêmicos. A importância da citomorfolgia, hoje em dia, se dá pelo estudo de características morfométricas e de textura da cromatina. Adam *et al* mostraram que a dimensão fractal da cromatina nuclear é um fator prognóstico na LLA B.

* Imunofenótipo – Uma das grandes importâncias do imunofenótipo é que algumas expressões antigênicas parecem sinalizar para existência de uma alteração citogenética específica. Por outro lado, a avaliação do imunofenótipo ao diagnóstico é necessária para avaliação de DRM (RIBEIRO, 2001). Outro fator de grande importância é que altos níveis

de expressão do CD45 associa-se a um prognóstico desfavorável (ADAM, 2006; NAKAMURA, 2001).

* Índice de DNA – São considerados de bom prognóstico os casos que apresentam índice de DNA $\geq 1,16$ que corresponde a hiperdiploidia (≥ 50 cromossomos). Casos com índice de DNA $< 1,00$ são os casos hipodiplóides e são relacionados com prognóstico ruim.

* Alterações Genéticas – Análises citogenéticas e moleculares fornecem informações da importância diagnóstica e prognóstico para LLA. Por exemplo, a presença do rearranjo *TEL/AML1* está relacionada com prognóstico favorável, enquanto que, a presença dos rearranjos *BCR/ABL*, *E2A/PBX1* e *AF4/MLL* estão relacionados prognóstico ruim (KUCHINSKAYA, 2005; FRIEDMANN, 2000; VAN DONGEN, 1999; CARROL, 2003).

Objetivos

Objetivo Geral

Estudar as características biológicas da LLA (adultos e crianças) e sua influência na resposta terapêutica de pacientes atendidos na Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco - Hemope.

Objetivos Específicos

- 1- Estudar as características fenotípicas e sua distribuição.
- 2- Estudar o ciclo celular e ploidia dos pacientes.
- 3- Estudar os rearranjos *BCR/ABL* p190 e p210, *AF4/MLL*, *E2A/PBX1* e *TEL/AML1* por Biologia Molecular e sua frequência em crianças e adultos.

Pacientes e Métodos

3.1- Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídos no estudo todos os pacientes admitidos de Março/2004 a Março/2006, na Fundação Hemope com diagnóstico de LLA. Foram excluídos do estudo aqueles pacientes que se recusaram ou que os responsáveis não permitiram a entrada no estudo; pacientes com diagnóstico de leucemia bifenotípica; e/ou pacientes que utilizaram corticóide sistêmico antes do diagnóstico de LLA.

3.2- Diagnóstico de LLA

Ao diagnóstico foram avaliados:

- Hemograma.
- Mielograma.
- Imunofenotipagem.
- Estudo da ploidia celular e índice de proliferação.
- Estudo dos rearranjos moleculares.

O diagnóstico de LLA foi baseado na presença de uma população anômala de blastos na MO (>20%), Sudan e α -naftil-acetato esterase negativos. Estes casos foram então considerados para imunofenotipagem.

3.3- Tratamento Realizado

Os protocolos de tratamento para LLA utilizados pela Fundação Hemope são o GBTLI/93 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA PEDIÁTRICA, 1993) para crianças (≤ 18 anos) e nos casos de recaída o BFM-90 (SACKMANN-MURIEL, 1999) e nos adultos o UKALL XII (ROWE, 2005) e nos casos de recaída o Hyper CVAD (KANTARJIAN, 2000). Os casos de LLA B e T são tratados utilizando o mesmo protocolo de acordo com a idade.

3.4- Reavaliação

Após início do tratamento foram analisados os hemogramas dos pacientes para saber o tempo de desaparecimento dos blastos do sangue periférico. Também foi realizado mielograma no 22º ou 29º dia após início do tratamento, de acordo com o protocolo utilizado, para análise de remissão.

3.5- Técnicas

* Imunofenótipo – Os critérios de classificação quanto ao imunofenótipo das LLAs B utilizados neste trabalho são os mesmos seguidos pela OMS (BRUNNING, 2001).

De cada paciente foram coletadas amostras de MO ou de SP (em casos de dificuldade de coleta da amostra de MO ou em alguns casos com mais de 70% de blastos no SP) em tubos contendo heparina como anticoagulante. As células mononucleares foram separadas por gradiente de concentração utilizando Ficoll-Hypaque. Essas células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 e contadas em contador eletrônico para ajuste em concentração aproximada de 2×10^6 células/ml. Em seguida, para cada tubo teste com 100 µl de PBS enriquecido com EDTA, azida e albumina, incubou-se 100 µl dessa suspensão de células junto com os anticorpos monoclonais. A incubação foi realizada no escuro, durante 20 minutos, e após lavagens com solução tampão de PBS e centrifugação as células foram ressuspensas em solução de paraformaldeído a 1%.

Na pesquisa de antígenos intracitoplasmáticos as células foram incubadas com uma solução permeabilizante por 10 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação as células foram lavadas duas vezes com Tween 20 (0,5%) e ressuspensas com 200 µl dessa mesma solução. Em seguida, foram incubados os anticorpos monoclonais. A incubação foi realizada no escuro, durante 20 minutos, e após lavagens com Tween 20 (0,5%) as células foram ressuspensas em solução de paraformaldeído a 1%.

Para tipagem das LLAs foi usada imunofenotipagem com um painel de duas cores montado de acordo com o princípio de verificar assincronismo de maturação. O painel primário foi composto por: CD45/CD19, CD10/CD34, HLA-DR/CD22, CD3/CD13 e CD7/CD33, todos em membrana. Nos casos de linhagem linfóide B foi feito um painel secundário com IgM_s, IgM_{cito}/CD79a_{cito} e Kappa/Lambda (membrana e citoplasma). Nos casos de linhagem linfóide T o painel secundário foi composto por CD5, CD1a e CD4/CD8. A seleção da população analisada foi feita utilizando o plot FSCxSSC, fazendo-se a gate na população majoritária homogênea (Figuras 1 e 2).

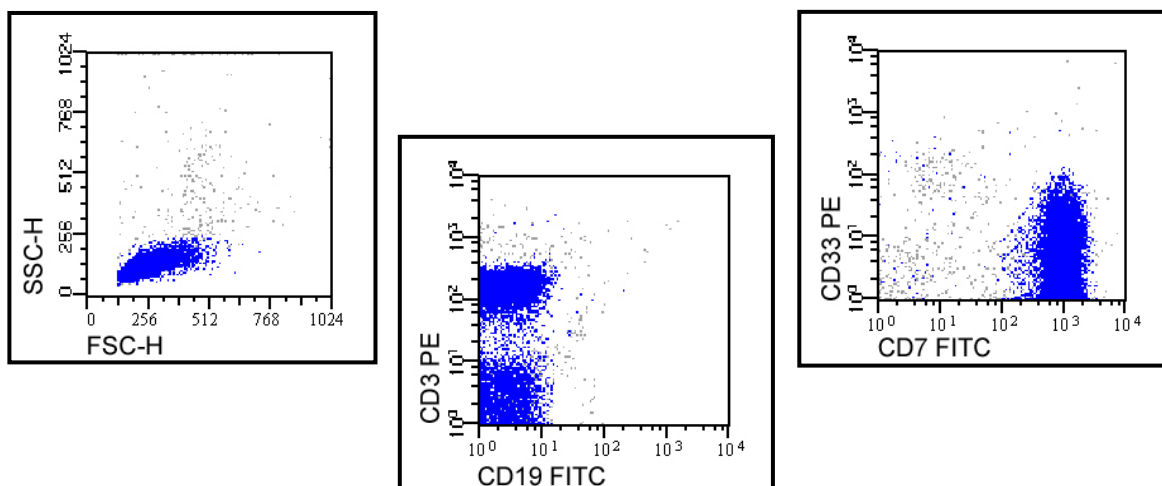


Figura 1 - Exemplo de LLA T com CD3 e CD7 positivos.

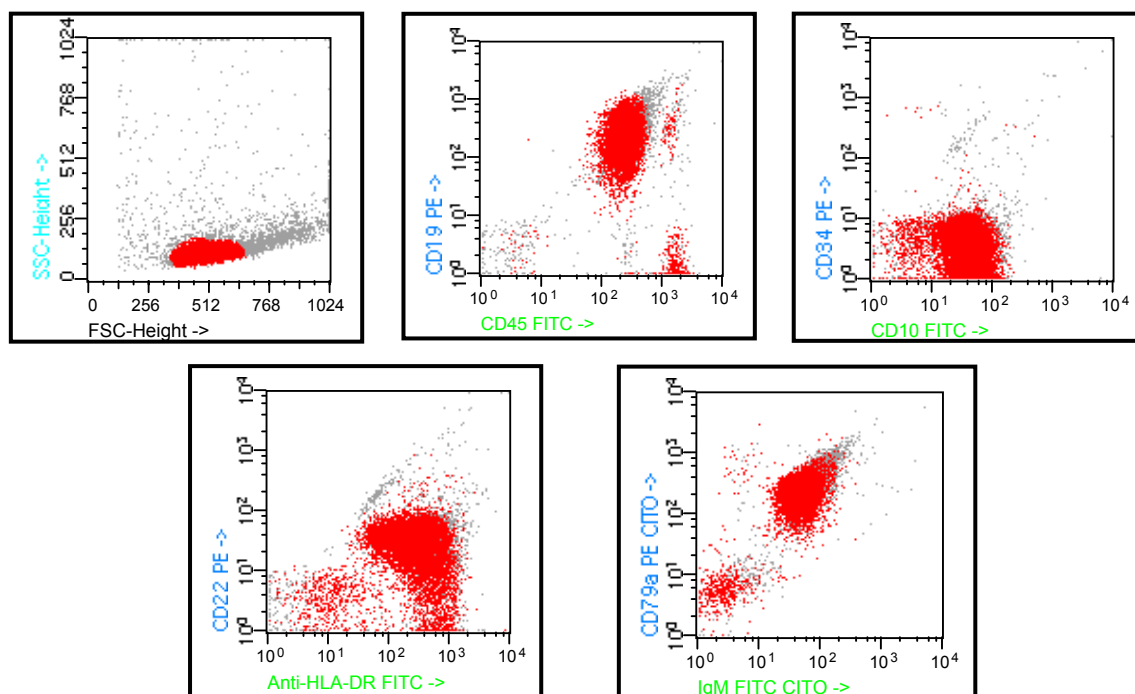


Figura 2 - Exemplo de LLA pré B com CD45, CD19, CD10, CD22, HLA-DR, CD79a_{cito} e IgM_{cito} positivos.

O painel primário foi utilizado para definição da linhagem celular e o secundário direcionado para os marcadores específicos de cada linhagem, com o fim de estudar o grau de maturação celular.

Foi realizada a aquisição de 10.000 eventos em cada tubo, efetuada em citômetro de fluxo, modelo FACs Calibur™ (Becton-Dickinson, San Jose – Califórnia -USA), utilizando o programa Cell-Quest™ (BD). A análise foi realizada no programa Paint-a-Gate™ (BD) considerando-se a população majoritária. A IMF foi mediada em unidades arbitrárias.

A tabela 5 mostra os anticorpos monoclonais utilizados.

Tabela 5 - Anticorpos monoclonais usados para imunofenotipagem.

Marcadores	Fluorocromos	Fabricante
CD1a	FITC	BD/Pharmingen
CD3	FITC	BD/Pharmingen
CD7	FITC	BD/Pharmingen
CD4	FITC	Beckman Coulter
CD5	FITC	BD/Pharmingen
CD8	PE	Beckman Coulter
CD10	FITC	BD/Pharmingen
CD13	PE	Beckman Coulter
CD19	PE	Beckman Coulter
CD22	PE	BD/Pharmingen
CD33	PE	BD/Pharmingen
CD34	PE	BD/Pharmingen
CD45	FITC	BD/Pharmingen
CD79a	PE	Dako
HLA-DR	FITC	Beckman Coulter
IgM	FITC	BD/Pharmingen
Lambda	FITC	BD/Pharmingen
Kappa	FITC	BD/Pharmingen

* Índice de DNA e Porcentagem de Células em Fase S

Para análise da ploidia de DNA e da proliferação a amostra foi incubada com solução lisante de Cloreto de Amônio à temperatura ambiente, no escuro, por 10 minutos. Após centrifugação as células foram lavadas com 2 ml de FACS Flow e ressuspensas com 500 µl de Iodeto de Propídio e 10 µl de RNAase. A amostra foi incubada à temperatura ambiente, no escuro, durante 30 minutos. E após a incubação permaneceu na geladeira por pelo menos 10 minutos antes de fazer a leitura.

Foi realizada a aquisição de 20.000 eventos das amostras, efetuada em citometro de fluxo, modelo FACs Calibur™ (Becton-Dickinson, San Jose – Califórnia -USA), utilizando o programa Cell-Quest™ (BD) e a análise no programa ModFit™ (BD) (Figura 3).

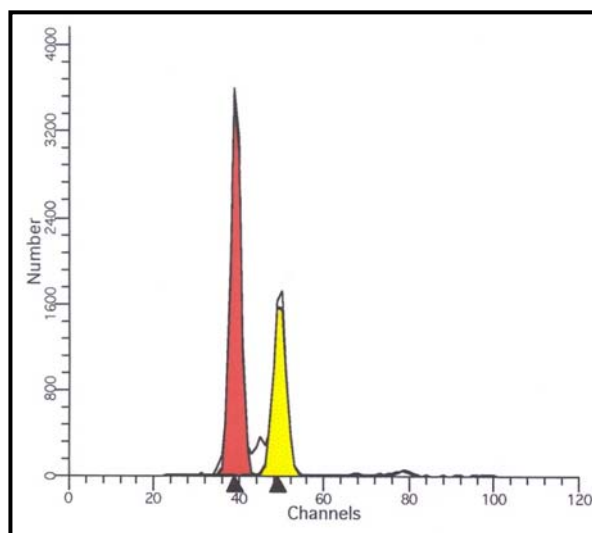


Figura 3 - Histograma de paciente hiperdiploide com índice de DNA = 1,26 (63,67% população diplóide e 36,33% aneuplóide) e índice de proliferação baixo (total de fase S = 3,66%).

* Análise das Alterações Cromossômicas por Biologia Molecular

Após coleta e separação da camada leucocitária por centrifugação, o RNA total foi isolado através da técnica do Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), purificado e armazenado em freezer a -80°C . A quantificação do RNA foi realizada através de leitura espectrofotométrica. Para avaliar a qualidade do RNA foi feita corrida em gel de agarose a 1,5% para detecção das bandas e visualização de uma possível degradação do RNA.

O método utilizado para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi à RT-PCR com a utilização da enzima transcriptase reversa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), *random primers* (BioLabs, Beverly, MA, USA), dNTP's (Pharmacia, Piscataway, NJ, EUA), água Milli-Q tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato) e tampão 5x. As condições de transcrição foram: temperatura ambiente por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos.

Um volume de 2µl do cDNA foi submetido à amplificação em termociclador (Flexigene - Techne) sob as seguintes condições: 94°C por 30''; 34 ciclos de 94°C por 30'', 65°C por 30'', 72°C por 30''; 1 ciclo de 72°C por 7''. A reação de PCR foi realizada com a enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), *primers* (Tabela 6), dNTP's (Pharmacia, Piscataway, NJ, EUA), MgCl₂, água Milli-Q tratada com DEPC e tampão 10x.

Tabela 6 - Sequência dos *primers* utilizados na RT-PCR para o estudo dos rearranjos gênicos.

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' – 3')</i>
BCR-b1-A	GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC
BCR-e1-A	GACTGCAGCTCCAATGAGAAC
ABL-a3-B	GTTTGGGCTTCACACCATTCC
MLL – A	CCGCCTCAGCCACCTAC
AF4 – B	TGTCACTGAGCTGAAGGTCG
E2A – A	CACCAGCCTCATGCACAAC
PBX – B	TCGCAGGAGATTCATCACG
TEL – A	CGT GGA TTT CAA ACG TCC A
AML1 – B	CGC CTC GCT CAT CTT GCC TG

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídio, para separação das bandas e visualizados à luz ultravioleta. A interpretação dos resultados foi realizada após foto documentação e análise das bandas com marcador de peso molecular de 100 pares de bases – pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Controles internos com o gene ABL (Tabela 7) de cada indivíduo e controles positivos de linhagem celular (K562, RS4, 697 e REH) ou amostra de paciente (*BCR/ABL*

p190) foram utilizados nas reações de RT-PCR para validar a amplificação. Controle com água também foi utilizado para avaliar qualquer possível contaminação (Figura 4).

Tabela 7 - Seqüência dos *primers* utilizados na RT- PCR para controle interno (ABL).

<i>Primer</i>	Seqüência (5' – 3')
ABL1	TGATTATAGCCTAAGACCCGGA
cABL2	ACTGAAGCCGCTCGTTGGAAGTCCAA

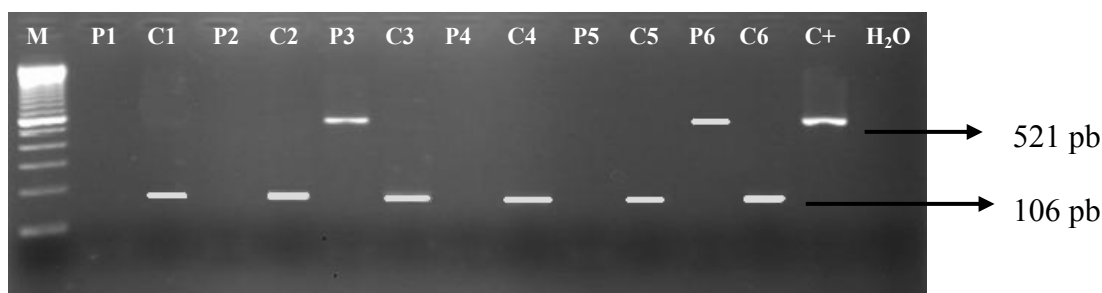


Figura 4 - Resultados da detecção do rearranjo *BCR/ABL* p190 através do método RT/PCR. M = Marcador de 100 pb; P1 a P6 = Pacientes; C1 a C6 = Controle interno (ABL); C+ = Controle positivo; H₂O = Controle branco.

3.6- Coleta dos Dados

A coleta dos dados foi feita a partir do prontuário do paciente e laudos dos exames. Dados laboratoriais e clínicos foram anotados e armazenados em planilhas, tais como: idade, sexo, sobrevida global, situação, hemoglobina, leucócitos, plaquetas, blastos no SP e na MO, tipo da LLA, índice de DNA, % fase S, rearranjos e IMF dos anticorpos (Anexos).

3.7- Aspectos Éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética da Fundação Hemope. As amostras foram coletadas ao diagnóstico, após consentimento e os resultados dos testes foram disponibilizados para os prontuários dos pacientes.

Resultados

Foram estudados 49 pacientes diagnosticados com LLA admitidos na Fundação Hemope no período de Março de 2004 a Março de 2006.

Dos pacientes estudados 31 eram adultos com mediana de idade de 34 anos (19-74) e 18 eram crianças com mediana de idade de 13 anos (2-18). Do grupo pediátrico apenas 4 tinham idade abaixo de 10 anos (Tabela 8).

Tabela 8 - Frequência quanto à faixa etária e sexo.

Faixa Etária	Sexo		Total
	Masculino	Feminino	
1 a 9 anos	02	02	04
10 a 18 anos	08	06	14
> 19 anos	17	14	31
Total	27	22	49

Com relação ao imunofenótipo (Tabela 9 e Figuras 5A e 5B) no grupo de adultos 6 pacientes foram LLA T e 25 LLA B, enquanto que nas crianças 5 foram LLA T e 13 LLA B. O subtipo mais comum em crianças foi a LLA B comum, e nos adultos a LLA pré B.

Tabela 9 - Frequência quanto ao imunofenótipo dos pacientes separados pelos grupos etários.

Tipo LLA	0 – 18 anos	> 19 anos	Total
Pré-pré B	0	7	7
B comum	7	8	15
Pré B	4	9	13
B sem classif.	2	1	3
LLA T	5	6	11
Total	18	31	49

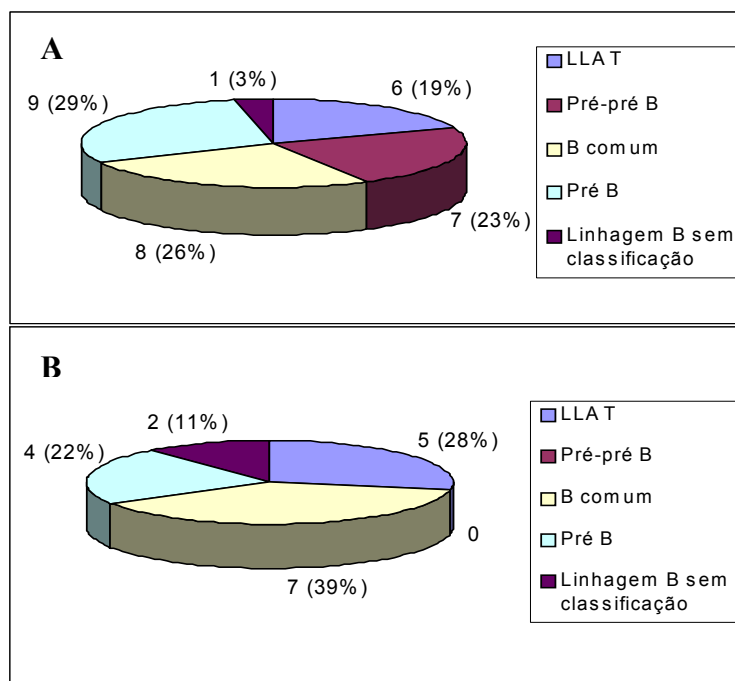


Figura 5 - Frequência quanto ao imunofenótipo dos pacientes adultos (A) e crianças (B).

Os casos de LLA T concentraram-se nos casos de adolescentes e adultos jovens. Enquanto que nos casos de LLA B houve uma maior variabilidade encontrando casos de 2 a 74 anos (Figura 6).

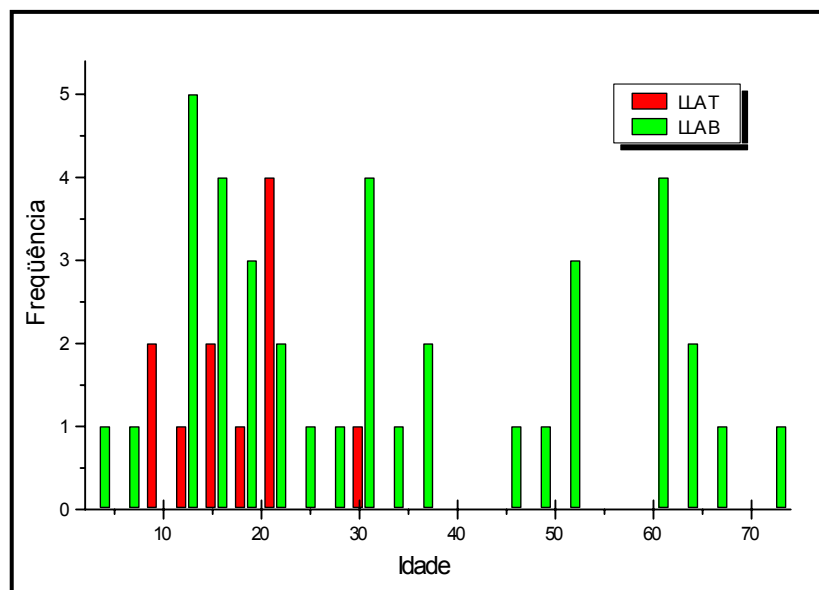


Figura 6 – Distribuição dos casos quanto à idade.

Em relação a leucometria a maioria dos pacientes apresentou contagem elevada (Tabela 10). Mais da metade dos casos de LLA T (7/11) apresentou contagem de leucócitos acima de $50,0 \times 10^9/l$ (Figura 7).

Tabela 10 - Frequência quanto a leucometria.

Leucometria ($\times 10^9/l$)	Idade		Total
	Adulto	Criança	
< 10,0	12	3	15
10,0 a 50,0	9	3	12
> 50,0	10	12	22
Total	31	18	49

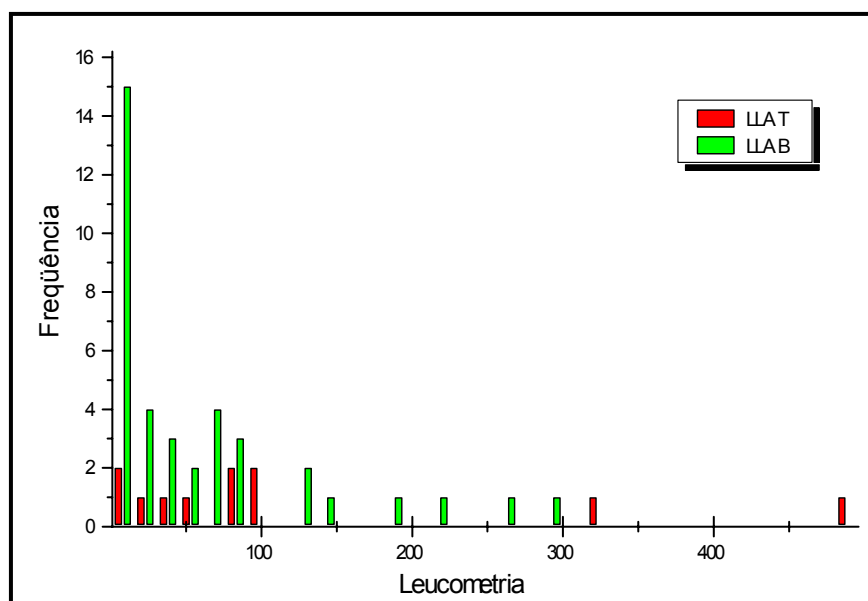


Figura 7 – Distribuição dos casos quanto à contagem de leucócitos.

Quanto ao IMF do CD45 os casos de LLA B apresentam CD45 mais fracos. Enquanto nos casos de LLA T apenas 1 caso foi considerado negativo e alguns casos apresentaram intensidade forte (Figura 8).

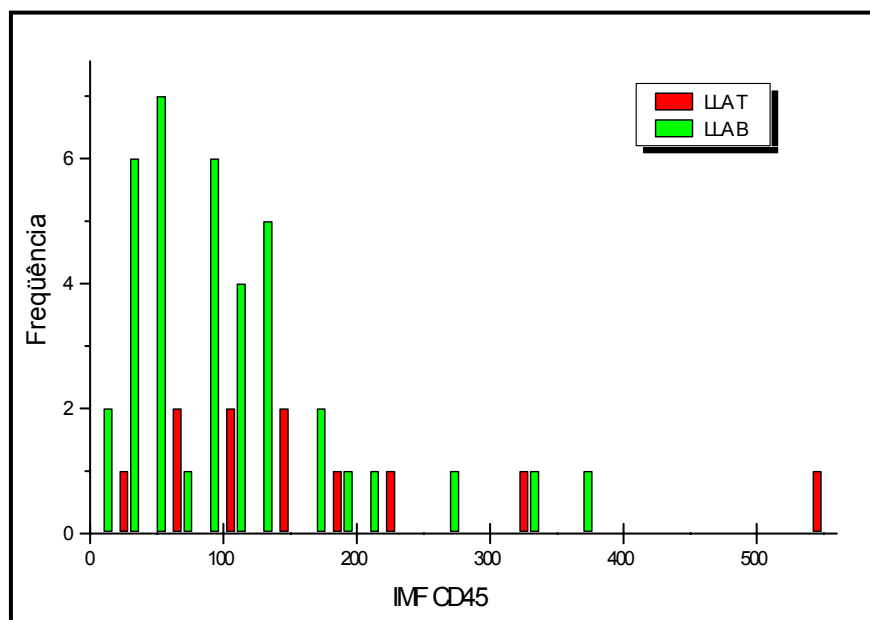


Figura 8 – Distribuição dos casos quanto à intensidade do CD45.

Foram a óbito 9 pacientes (7 LLA B e 2 LLA T) durante o 1º mês após o diagnóstico, 8 (6 LLA B e 2 LLA T) durante os 2º e 3º meses e 15 (14 LLA B e 1 LLA T) após o 3º mês.

LLA T

As características clínicas e hematológicas dos pacientes com LLA T estão representadas na Tabela 11.

Tabela 11 – Dados clínicos e hematológicos dos pacientes com LLA T.

	Mediana	Variação
Idade	19	8-29
Masculino/Feminino	7/4	
Hemoglobina (g/dl)	8,0	3,3-14,1
Leucócitos ($\times 10^9/l$)	81,5	5,3-485,5
Plaquetas ($\times 10^9/l$)	30,0	13,0-167,0

Todos os pacientes LLA T foram positivos para o CD7 que foi considerado o padrão ouro para o diagnóstico. O CD3_s foi positivo em 6 pacientes. O CD3_{cit} foi feito em apenas 6 pacientes, pois não fazia parte do painel previamente estabelecido, e 5 deles foram considerados positivos. Em 9 pacientes foi encontrado o CD5, enquanto que o CD1a em apenas 3 casos. A co-expressão CD4/CD8 esteve presente em 2 casos. Apenas 1 caso teve expressão anômala do CD13.

Não foram encontrados nenhum caso aneuplóide e nenhum caso com a presença de alguma das alterações moleculares pesquisadas.

Nos casos de LLA T o número de leucócitos teve correlação com o HLA-DR e com o CD7 ($r=-0,667$ e $p=0,050$; $r=0,618$ e $p=0,021$; respectivamente). O HLA-DR teve uma correlação negativa com o CD7 ($r=-0,704$ e $p=0,038$).

LLA B

As características clínicas e hematológicas dos pacientes com LLA B estão representadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Dados clínicos e hematológicos dos pacientes com LLA B.

	Mediana	Varição
Idade	29	2-74
Masculino/Feminino	19/19	
Hemoglobina (g/dl)	7,5	2,2-15,1
Leucócitos (x10⁹/l)	32,7	1,1-300,4
Plaquetas (x10⁹/l)	34,5	7,0-298,0

Todos os casos de LLA B foram positivos para o CD19. O CD79a_{cit} foi positivo em 30 (85,7%) casos. Em 5 (14,3%) casos a expressão do CD79a_{cit} foi muito baixa (IMF<30). Quatro (10,5%) pacientes não expressaram CD45 e 47,4% dos casos mostrou expressão do CD45 fraca quanto ao IMF (30,7-51,7). Foi encontrada expressão anômala de CD33 em 7 (29,2%) casos e nenhum caso teve expressão do CD13.

Em 3 (8,1%) pacientes foi encontrada dissociação de maturação mostrando IMF CD19 forte e IMF CD45 fraco (Figura 9) e 5 (13,2%) pacientes apresentando IMF CD34 fraco e IMF CD10 fraco (Figura 10). Em relação ao IMF CD19 e IMF CD79a_{cit} encontrou-

se um perfil esperado (Figura 11), mas o IMF do CD79a_{cit} foi sempre mais baixo. Quanto ao IMF CD34 x IMF IgM_{cit} em 72,2% dos pacientes foi encontrada uma distribuição esperada com IMF CD34 fraco e IgM_{cit} forte e vice-e-versa (Figura 12).

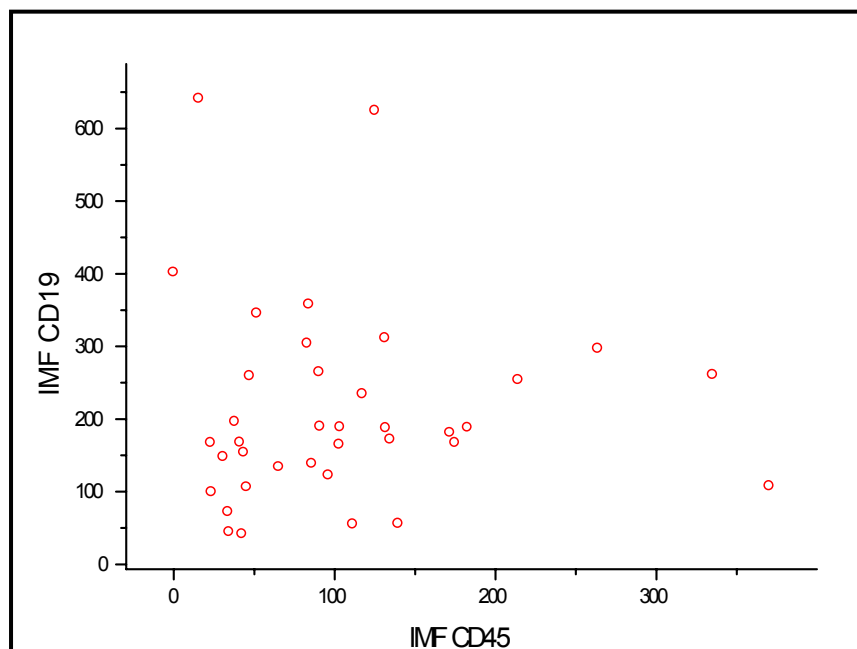


Figura 9 - Distribuição quanto ao IMF CD45 x IMF CD19.

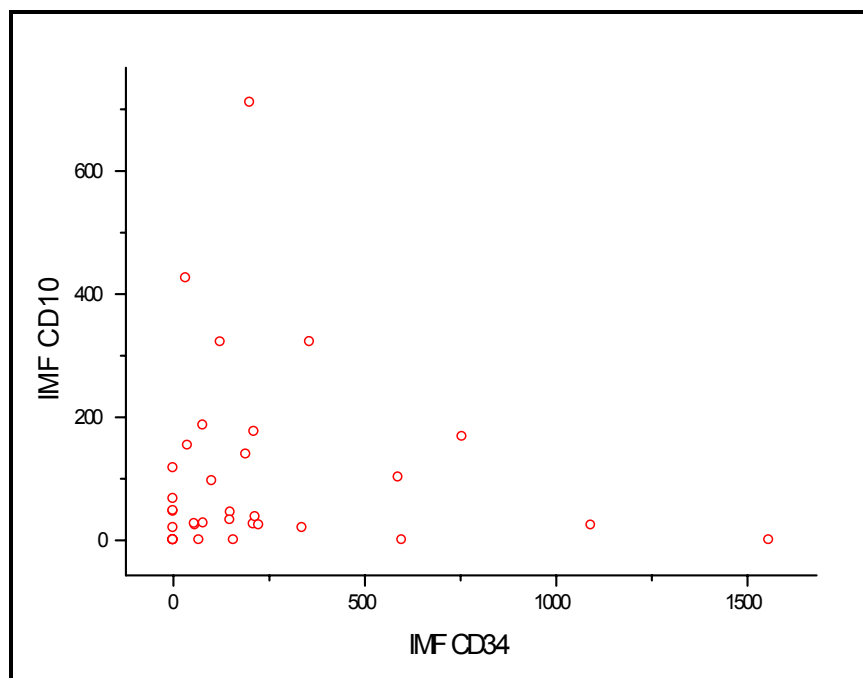


Figura 10 - Distribuição quanto ao IMF CD34 x IMF CD10.

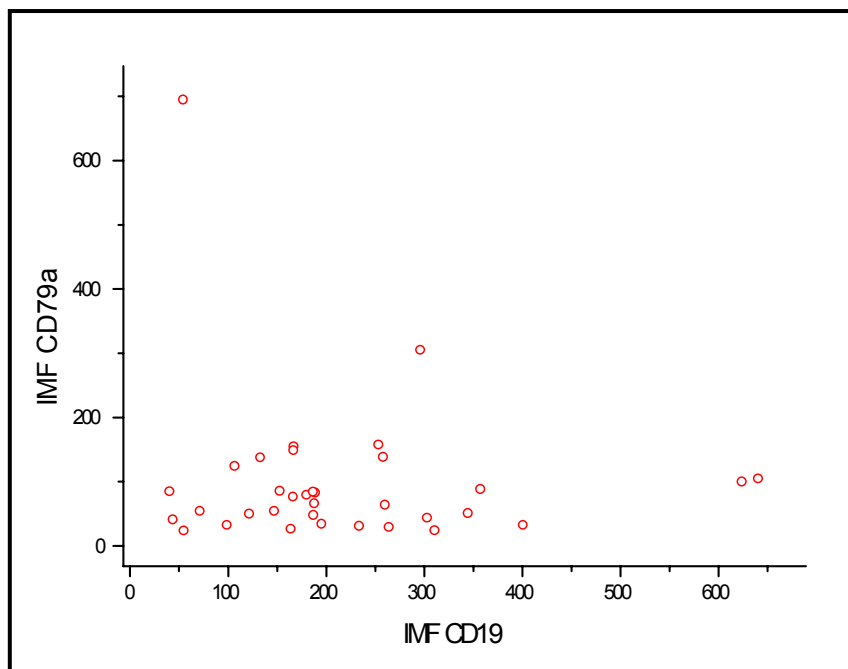


Figura 11 - Distribuição quanto ao IMF CD19 x IMF CD79a_{cit}.

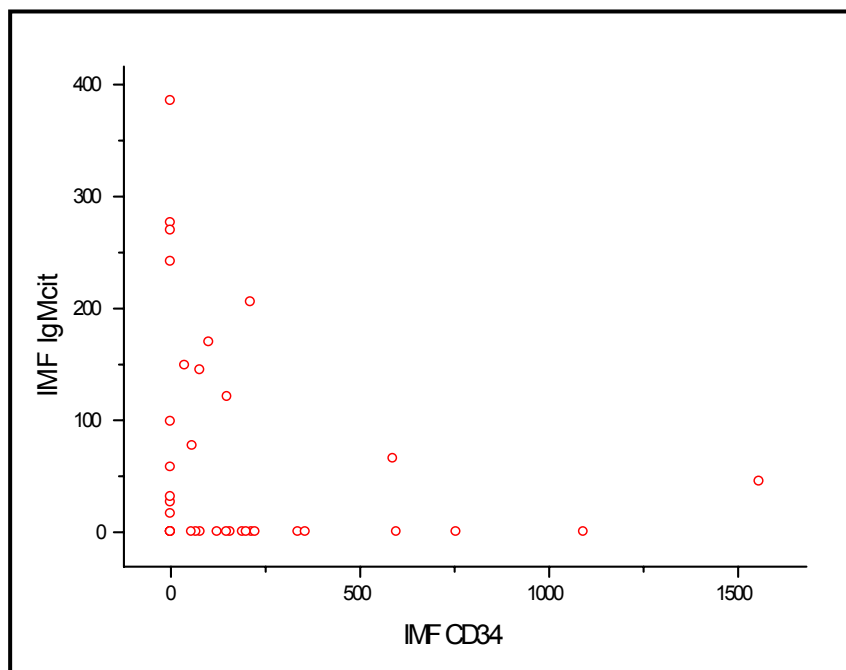


Figura 12 - Distribuição quanto ao IMF CD34 x IMF IgM_{cit}.

Quanto ao índice de DNA, foram encontrados 5 casos hiperdiplóides e 42 diplóides. Os casos hiperdiplóides foram 2 (11,8%) crianças e 3 (10%) adultos. Não foram encontrados casos hipodiplóides.

A porcentagem de células em Fase S foi muito heterogênea e não variou entre os grupos de crianças e adultos nem entre os grupos de LLA B e LLA T (Tabela 13).

Tabela 13 - Índice de proliferação dos pacientes com LLA.

	Mediana % Fase S	Variação
Crianças	2,10	0,4-12,6
Adultos	1,88	0,1-17,0
LLA B	2,02	0,18-17,02
LLA T	1,82	0,1-15,09

A pesquisa dos rearranjos gênicos foi realizada em 45 pacientes (Tabela 14). Cinco foram positivos para o rearranjo *BCR/ABL*, sendo 4 para *BCR/ABL* p190 e 1 *BCR/ABL* p210. Dois pacientes foram positivos para o rearranjo *E2A/PBX1* e 2 para *AF4/MLL*. Não foi encontrado nenhum caso positivo para o rearranjo *TEL/AML1*.

Tabela 14 - Frequência dos rearranjos gênicos encontrados.

	Faixa Etária	n	Fenótipo
<i>BCR/ABL</i>	Criança	1	Pré B
	Adulto	4	B comum e pré B
<i>E2A/PBX1</i>	Adulto	2	Pré B
<i>AF4/MLL</i>	Criança	1	Pré-pré B
	Adulto	1	Pré-pré B

Nos casos de LLA B o CD45 teve correlação com o número de leucócitos e com o CD10 ($r=0,298$ e $p=0,034$; $r=-0,297$ e $p=0,034$; respectivamente). O HLA-DR teve uma correlação com o CD19 ($r=0,460$ e $p=0,006$). O CD34 teve correlação com o CD10, com o CD22 e com a IgM_{cit} ($r=0,272$ e $p=0,049$; $r=0,309$ e $p=0,033$; $r=-0,363$ e $p=0,014$; respectivamente). E o CD79a_{cit} teve correlação com a IgM_{cit} ($r=0,440$ e $p=0,004$).

Discussão

Os resultados do grupo de adultos apresentados durante nosso período de estudo representam a cobertura da LLA na região do Recife, Pernambuco. No grupo infantil nossa amostragem não representa essa cobertura, pois as crianças com LLA também são atendidas em outros dois hospitais especializados em pediatria, diminuindo, assim, o número dos casos infantis atendidos pelo Hospital Hemope.

O painel utilizado mostrou efetividade no diagnóstico no sentido de separar LLA de origem B e T. Permitiu também classificar os casos segundo a OMS. A intensidade de fluorescência descreve melhor a distribuição dos antígenos nas células leucêmicas e é utilizado no estudo de DRM (BOROWITZ, 1997; REGO, 1999). Utilizando o IMF tivemos dificuldade em classificar alguns casos, por expor mais os assincronismos de maturação. O painel ideal seria com a utilização do CD45 como terceira cor para uma melhor seleção da população de blastos sem contaminação com células normais. Principalmente, nos casos de amostras hemodiluídas ou com baixa contagem de blastos é necessário identificar as células blásticas. O gráfico SSC x CD45 exhibe a marcação dos lugares dos linfócitos residuais, monócitos, polimorfonucleares e a posição específica das células blásticas, permitindo identificar a população dos blastos para análises com outros marcadores (BENE, 2005).

O estudo do imunofenótipo tem sido essencial no diagnóstico da LLA. Durante as duas últimas décadas, a imunofenotipagem na LLA era aplicada principalmente para distinguir LLA de LMA, para indicar a linhagem dos blastos leucêmicos e para examinar o padrão da expressão do antígeno de membrana na resposta ao tratamento. Adicionalmente, na observação de que blastos leucêmicos frequentemente apresentam expressão de antígenos aberrantes ou assincronismos comparado com a diferenciação da célula hematopoiética normal, as características fenotípicas associadas à leucemia tem sido rotineiramente usadas na detecção de DRM na LLA. Mais recentemente, a imunofenotipagem em conjunto com estudos citogenéticos e moleculares tem encontrado associações significantes entre características imunofenotípicas e anormalidades cromossômicas numéricas e/ou estruturais que tem contribuído para uma classificação mais refinada, especialmente nas LLAs de células precursoras B (SCHABATH, 2003; GARCIA VELA, 2000; DI BONA, 2002; RILEY, 2002; ORFAO, 2004; BENE, 2005).

A LLA T não tem sido associada com características genéticas específicas (ORFAO, 2004; BRUNNING, 2001). As LLAs T são caracterizadas por altas contagem de

leucócitos ao diagnóstico, freqüente presença de massa mediastinal e envolvimento com SNC (HOELZER, 2002; BRUNNING, 2001). No nosso estudo 63,6% dos casos de LLA T apresentaram contagem de leucócitos $> 50,0 \times 10^9/l$. Em nenhum caso foi encontrado presença dos rearranjos pesquisados e nem aneuploidias, que normalmente são encontradas nas LLAs de células precursoras B.

Foi possível definir a linhagem celular com o painel primário em 100% dos casos de LLA T. O CD7 foi mais efetivo que o CD3_s para o diagnóstico desses casos. Isso se deve porque o marcador que aparece mais precocemente nas células T é o CD3 intracitoplasmático e o CD7 de superfície. O CD3_s só aparece no estágio mais maduro das células T (BENE, 2005). Por isso, estamos incluindo o CD3_{cito} no nosso painel de rotina para diagnóstico da LLA T.

O CD5 esteve presente em 9 pacientes. Riley *et al* (2002) mostraram que em pacientes com leucócitos periféricos abaixo de $50,0 \times 10^9/l$ o CD5 foi um fator importante na SLE. O CD1a foi encontrado em apenas 3 casos de LLA T. Estudos recentes em crianças e adultos tem mostrado que pacientes com LLA T CD1a+ apresentam melhor resposta ao tratamento (SCHABATH, 2003).

O fenótipo aberrante encontrado nos casos de LLA T foi o marcador de linhagem cruzada CD13. Outros autores encontraram expressão desse marcador em cerca de 50% dos casos (BABUSIKOVA, 2002; GARCIA VELA, 2000). Kalem *et al* (2003) encontraram 4,3% dos casos de LLA T com expressão do CD33 e nenhum caso expressou o CD13.

Com o painel primário foi possível definir a linhagem celular de todas as LLAs B. O painel secundário foi muito útil para a classificação dos subtipos. A maioria dos casos teve imunofenótipo de LLA B comum e LLA pré B, assim como descritos em vários estudos (REGO, 1995; GARCIA VELA, 2000; REGO, 2003; FORESTIER, 2006; MARTINEZ, 2006). Nesse estudo foi possível observar que não é necessária a marcação de Kappa e Lambda, onde, esses marcadores são indispensáveis nas doenças hematológicas mais maduras. Nas LLAs é necessário a pesquisa de IgM citoplasmática e de superfície para classificação quanto ao grau de maturação.

A maioria dos pacientes mostrou expressão do IMF do CD45 fraca. Nakamura *et al* (2001) e Adam *et al* (2006) descreveram que altos níveis de expressão do CD45 correlacionam com pior prognóstico. O Pediatric Oncology Group (POG) também estudou

a intensidade do CD45 em crianças com LLA B e mostraram que a positividade >75% correlacionou com pior prognóstico para crianças maiores que um ano de idade (RILEY, 2002). A perda da expressão de CD45 é um fator prognóstico favorável em crianças, por apresentarem melhor resposta a quimioterapia, contagem mais baixa de leucócitos, hiperdiploidia (>50 cromossomos) e índice de DNA ≥ 1.16 (BOROWITZ, 1997).

A expressão aberrante de CD33 foi encontrado em 29,2% dos nossos casos de LLAs B. Den Boer *et al* (1999) descreveram expressão de marcadores mielóides em 36% das LLAs. Kaleem *et al* (2003) encontraram expressão do CD33 e do CD13 em 9% cada. Já García Vela *et al* (2000) observaram em 47% dos casos de LLA B expressão desses marcadores, sendo 85% de CD13 e 75% de CD33. A incidência de expressão aberrante nas LLAs varia de 7 a 75%. Essas discrepâncias podem ser devido à utilização de diferentes fluorocromos (GARCIA VELA, 2000).

Encontra-se uma frequência de hiperdiploidia (>50 cromossomos) de 4-9% em adultos e 14-27% em crianças com LLA (FADERL, 1998), semelhante à encontrada no nosso estudo. Não encontramos casos hipodiplóides. Pui *et al* (2004) encontraram uma frequência de hipodiploidia em 1% nas crianças e 2% nos adultos. A hipodiploidia é relativamente rara tanto em crianças quanto em adultos com LLA e está relacionada a um pior prognóstico (FARIAS, 2004).

As LLAs com fusão gênica *TEL/AML1* são encontradas numa frequência de 15-24% em crianças e 2-3% em adultos e usualmente são do tipo B comum ou pré-B (PUI, 2004; EMERENCIANO, 2005). Não encontramos nenhum caso dessa fusão no nosso estudo. Num trabalho realizado por Magalhães *et al* (2000) em 67 crianças com LLA do sudeste do Brasil foi encontrada uma frequência (20%) do rearranjo *TEL/AML1* similar a relatada predominantemente em populações caucasóides. Segundo os resultados do Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Infantis de pacientes incluídos no protocolo GBTLI/93 foi encontrado 19,2% desse rearranjo nas crianças com LLA (dados não publicados). Estudos realizados na Índia por Hill *et al*, Inamdar *et al* e Siraj *et al* acharam uma baixa frequência (4,8%; 8,7% e 7%, respectivamente) em pacientes pediátricos com LLA B. No estudo realizado por García-Sanz *et al* na Espanha, usando RT-PCR e FISH em 38 amostras de crianças com LLA, nenhum paciente apresentou o rearranjo *TEL/AML1*. Em contraste, estudos realizados na população chinesa por Liang *et al* e Tsang *et al*

encontraram alta frequência desse rearranjo (17% e 17,9%, respectivamente). Há variações geográficas na presença desse rearranjo nas LLAs (HILL, 2005). Como o pico de incidência desse rearranjo está entre 2-7 anos e só tivemos 2 pacientes dentro dessa faixa etária seria necessário um número maior de crianças para ter certeza de qual a frequência do rearranjo *TEL/AML1* na população de Pernambuco e também possíveis variações geográficas que possam a vir ocorrer nas diferentes regiões do Brasil.

Encontramos 6,9% do rearranjo *E2A/PBX1* em adultos com LLA, todos com fenótipo pré-B. Pacientes com a presença desse rearranjo têm resposta ruim ao tratamento padrão. No entanto, tratamento com quimioterapia intensificada tem mostrado resultados melhores que pode amenizar ou anular o impacto de prognóstico adverso da *t(1;19)* (FROST, 2004). Esse tipo de translocação está associada quase exclusivamente a LLA pré-B (APLAN, 2006). A *t(1;19)* é detectada em aproximadamente 5-6% das crianças e em menos que 5% dos adultos com LLA (FADERL, 1998).

O cromossomo Philadelphia *t(9;22)* derivado da fusão *BCR/ABL* é associado, particularmente, a prognóstico ruim. LLA *BCR/ABL+* é considerada de alto risco e normalmente ocorre em adultos (HOTFILDER, 2005). A presença do rearranjo *BCR/ABL* é um fator prognóstico negativo importante e sua ocorrência é comum na LLA de células precursoras B (B comum e pré-B) (GLEISSNER, 2002). Encontramos uma frequência em crianças semelhante à descrita por alguns estudos. Embora, a frequência em adultos tenha sido um pouco abaixo da mencionada na literatura (FADERL, 1998; VAN DONGEN, 1999; KUCHINSKAYA, 2005). No estudo de pacientes incluídos no protocolo GBTLI/93 foi encontrada uma frequência baixa (1,4%) nas crianças com LLA (dados não publicados).

Pacientes com LLA B *AF4/MLL+* também são considerados de pior prognóstico. Embora, translocações no gene *MLL* são raramente associadas com a LLA T, esses pacientes apresentam bom prognóstico. A presença desse rearranjo tem sua maior frequência em menores de 1 ano (HOTFILDER, 2005; APLAN, 2006). Esse tipo de leucemia é predominantemente associado a LLA pré-pré-B (EMERENCIANO, 2005). Geralmente é encontrado em pacientes com altas contagem de leucócitos, organomegalias e envolvimento no SNC (FADERL, 1998). No nosso estudo a frequência de casos *AF4/MLL+* em adultos foi semelhante à descrita em outros estudos e nas crianças encontramos uma frequência um pouco mais alta (FADERL, 1998; VAN DONGEN, 1999;

GLEISSNER, 2005). Os resultados do estudo do Grupo Brasileiro (GBTLI/93) também mostram uma frequência mais alta (4,1%) nas crianças com LLA (dados não publicados).

Seria necessário aumentar o número de casos e principalmente o tempo de observação para estudarmos melhor os parâmetros por nós analisados na sobrevida dos pacientes.

Conclusões

- Os anticorpos utilizados foram suficientes para classificar imunologicamente os casos.
- Com a análise no Programa Paint-a-Gate foi possível classificar as LLAs utilizando o IMF.
- O CD7 foi mais efetivo que o CD3s para o diagnóstico das LLA T.
- A frequência encontrada de casos hiperdiplóides foi semelhante à mencionada na literatura.
- A taxa de proliferação foi muito variável, mas não teve relação com a idade, nem com o tipo de LLA.
- Os rearranjos encontrados apresentaram associação com os subtipos de LLA conforme descrito na literatura. Embora, a frequência de adultos com *BCR/ABL* tenha sido abaixo da relatada.

Referências Bibliográficas

ADAM, R.L.; SILVA, R.C.; PEREIRA, F.G. *et al.* The Fractal Dimension of Nuclear Chromatin as a Prognostic Factor in Acute B-Precursor Lymphoid Leukemia. **Cell Oncol**, v. 28, p. 55-59, 2006.

APLAN, P.D. Chromosomal translocations involving the MLL gene: molecular mechanisms. **DNA Repair (Amst)**. v. 5, p. 1265-1272, 2006.

BABUSIKOVA, O.; TOMOVA, A. The analogy in cell immunophenotype and parameters of cell cycle of ectopic thymus, normal thymus, and some acute lymphoblastic leukemia of T-phenotype. **Neoplasma**. v. 49, p. 312-318, 2002.

BARRIOS, C.D.; LAKSA D. Leucemia Linfóide Aguda no Adulto. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI R. **Hematologia. Fundamentos e Práticas**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2001. Cap. 45, p. 477-485.

BEHM, F. G.; RAIMONDI, S. C.; FRESTEDT, J.L. *et al.* Rearrangement of the *MLL* Gene Confers a Poor Prognosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, Regardless of Presenting Age. **Blood**. v. 87, n. 7, p. 2870-2877, 1996.

BENE M.C. Immunophenotyping of acute leukaemias. **Immunol Lett**, v. 98, p. 9-21, 2005.

BERG, A. *et al.* Minimal Requirements for the Diagnosis, Classification and Evoluotion of the Treatment of Childhood Acute Limphoblastic Leukemia (ALL) in the “BFM Family” Cooperative Group. **Medical and Pediatric Oncology**. Federal Republic of Germany. v. 20, p. 497-505, 1992.

BOROWITZ, M.J.; SHUSTER, J.; CARROLL, A.J.; NASH, M.; LOOK, A.T.; CAMITTA, B.; MAHONEY, D.; LAUER, S.J.; 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, p. 3960-3966, 1997.

BRUNNING, R.D.; BOROWITZ, M.; MATUTES, E. *et al.* Precursor B-cell and T-cell neoplasms. In: JAFFE E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J.W. **Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press, 2001. 111-17.

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

CARROLL, W.L.; BHOJWANI, D.; MIN, D.J *et al.* Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology** (Am Soc Hematol Educ Program). p. 102-131, 2003.

CHANG, H.; SALMA, F.; YI, Q. *et al.* Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. **Leuk Res**, v. 28, p. 43-48, 2004.

DEN BOER M.L.; KAPAUN P.; PIETERS R.; KAZEMIER K.M.; JANKA-SCHAUB G.E.; VEERMAN A.J. Myeloid antigen co-expression in childhood acute lymphoblastic leukaemia: relationship with in vitro drug resistance. **Br J Haematol**. v. 105, p. 876-882, 1999.

DI BONA, E.; SARTORI, R.; ZAMBELLO, R. *et al.* Prognostic significance of CD56 antigen expression in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 87, p. 250-256, 2002.

EMERENCIANO, M.; ARIAS, D.P.A.; COSER, V.M. *et al.* Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia. **Pediatr Blood Cancer**. v. 47, p. 549-554, 2006.

FADERL, S.; KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z. Clinical Significance of Cytogenetic Abnormalities in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**. v. 91, n. 11, p.3995-4019, 1998.

FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M. Diagnóstico Laboratorial das Leucemias Linfóides Agudas. **Bras Patol Med Lab.** v. 40, n. 2, p. 91-8, 2004.

FORESTIER, E.; SCHMIEGELOW, K. The Incidence Peaks of the Childhood Acute Leukemias Reflect Specific Cytogenetic Aberrations. **J Pediatr Hematol Oncol.** v. 28, n. 8, p. 486-495, 2006.

FRIEDMANN, A.; WEINSTEIN, H. J. The Role of Prognostic Features in the Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Oncologist.** v. 5, p. 321-328, 2000.

FROST, B.M.; FORESTIER, E.; GUSTAFSSON, G. *et al.* Translocation t(1;19) is related to low cellular drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Leukemia.** v. 19, n. 1, p. 165-169, 2005.

GARCIA-SANZ, R.; ALAEJOS, I.; ORFAO, J.A. *et al.* Low frequency of the TEL/AML1 fusion gene in acute lymphoblastic leukaemia in Spain. **Br J Haematol.** v. 107, n. 3, p. 667-669, 1999.

GARCIA VELA, J.A.; MONTESERIN, M.C.; DELGADO, I.; BENITO, L.; ONA, F. Aberrant immunophenotypes detected by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma.** v. 36, p. 275-284, 2000.

GLEISSNER, B.; GOKBUGET, N.; BARTRAM, C. R. *et al.* Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. **Blood.** v. 99, n. 5, p. 1536-1543, 2002.

GLEISSNER, B.; GOKBUGET, N.; RIEDER, H. *et al.* CD10-pré-B Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is a High-Risk Subgroup of Adult ALL Associated with a High Frequency of MLL Aberrations: Result of the German Multicenter Trials for Adult ALL (GMALL). **Blood.** v. 106, n. 13, p. 4054-4056, 2005.

HARRIS, N. L.; JAFFE, E.S.; DIEBOLD, J. *et al.* The World Health Organization Classification of Hematological Malignancies Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House. Virginia. November 1997. **Mod Pathol.** v. 13, p. 193-207, 2000.

HILL, A.; SHORT, M.A.; VARGHESE, C. *et al.* The t(12:21) is underrepresented in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia in Kerala, Southern India. **Haematologica.** v. 90, n. 3, p. 414-416, 2005.

HOELZER, D.; THIEL, E.; LOFFLER, H. *et al.* Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. **Blood.** v. 71, n. 1, p. 123-131, 1988.

HOELZER, D.; GÖKBUGET, N.; OTTMANN, O. *et al.* Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology.** v. , p. 162-192, 2002.

HOTFINDER, M.; RÖTTGERS, S.; ROSEMAN, A. *et al.* Leukemic stem cells in childhood high-risk ALL/t(9;22) and t(4;11) are present in primitive lymphoid-restricted CD34+CD19- cells. **Cancer Res.** v. 65, n. 4, p. 1442-1449, 2005.

INAMDAR, N.; KUMAR, S.A.; BANAVALI, S. *et al.* Comparative incidence of the rearrangements of TEL/AML1 and ALL1 genes in pediatric precursor B acute lymphoblastic leukemias in India. **Int J Oncol.** v. 13, n. 6, p. 1319-1322, 1998.

JENNINGS, D.; FOON, K. Recent Advances in Flow Cytometry: Application to the Diagnosis of Hematologic Malignancy. **Blood.** v. 90, n. 8, p. 2863-2892, 1997.

KAGER, L.; CHEOK, M.; YANG, W. *et al.* Folate pathway Gene Expression Differs in Subtypes of Acute Lymphoblastic Leukemia and Influences Methotrexate Pharmacodynamics. **The Journal Clinical Investigation,** v. 115, n. 1, p. 110-117, 2005.

KALEEM, Z.; CRAWFORD, E.; PATHAN, M.H.; JASPEL, L.; COVINSKY, M.A.; JOHNSON, L.R.; WHITE, G. Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data. **Arch Pathol Lab Med.** v. 127, n. 1, p. 42-48, 2003.

KANTARJIAN, H.M.; O'BRIEN, S.; SMITH, T.L. *et al.* Results of treatment with hyper-CVAD, a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. **J Clin Oncol.** v. 18, n. 3, p. 547-561, 2000.

KUCHINSKAYA, E.; HEYMAN, M.; GRANDÉR, D. *et al.* Children and Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia have Similar Gene Expression Profiles. **Eur J Haematol.** v. 74, n. 6, p. 466-480, 2005.

KURZROCK, R.; KANTARJIAN, H.M.; DRUKER, B.J.; TALPAZ, M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. **Ann Intern Med.** v. 138, n.10, p.819-830, 2003.

LIANG, D.C.; CHOU, T.B.; CHEN, J.S. *et al.* High incidence of TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia in Taiwan. **Leukemia.** v. 10, n. 6, p. 991-993, 1996.

MAGALHÃES, I.Q.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S.; BENNETT, J.C. *et al.* TEL-AML1 fusion gene frequency in pediatric acute lymphoblastic leukaemia in Brazil. **Br J Haematol.** v. 111, n. 1, p. 204-207, 2000.

MARGOLIN, J. F.; POPLACK, D. Acute Lymphoblastic Leukemia. In: PIZZO, P. A.; POPLACK, D. **Principles and Pratic of Pediatric Oncology.** 3^a ed. Philadelphia: Lippencott – Raven, 1997. 1522p. Cap. 17, p. 409-469.

MARTINS, S.L.; FALCAO, R.P. Importance of immunophenotyping of leukemia myelocytic acute. **Rev Assoc Med Bras.** v. 46, p. 57-62, 2000.

MAUER, A. M. Acute Lymphocytic Leukemia. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLER, M. B. et al. **Williams Hematology**. 5^a ed. United States of America: McGraw-Hill, 1995, 1668p. Cap. 105, p. 1004-1016.

NAKAMURA, A; TSURUSAWA, M.; KATO. A. *et al.* Prognostic impact of CD45 antigen expression in high-risk, childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 42, n. 3, p. 393-398, 2001.

NYGAARD, U.; LARSEN, J.; KRISTENSE, T.D. *et al.* Flow cytometric DNA index, G-band karyotyping, and comparative genomic hybridization in detection of high hyperdiploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Pediatr Oncol**. v. 28, n. 3, p. 134-140, 2006.

ORFAO, A.; ORTUNO, F.; SANTIAGO M.; LOPEZ, A.; SAN MIGUEL, J. Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. **Cytometry A**. v. 58, n. 1, p. 62-71, 2004.

PELLOSO, L.A.;CHAUFFAILLE MDE, L.;GHANAME, F.S.;YAMAMOTO, M.;BAHIA, D.M.;KERBAUY, J. [Karyotype in acute myeloid leukemia: importance and type of aberrations in 30 patients at diagnosis]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 49, p. 150-455, 2003.

PEREIRA, F.G.; METZE, K.; COSTA, F.P. *et al* Phenotypic quantitative features of patients with acute myeloid leukemia. **Neoplasma**. v. 53, n. 2, p. 155-160, 2006.

PIEDRAS, J.; BARRALES-BENITEZ, O.; LOPEZ-KARPOVITCH, X. Classification of acute leukemias according to the first latin-american consensus conference for the immunophenotyping of leukemias. **Rev Invest Clin**. v. 52, p. 524-528, 2000.

PUI, C. H. Childhood Leukemias. Review Article. **N Engl J Med**. Memphis. v. 21, p. 1618-1629, 1995.

PUI, C.; EVANS, W. Acute Lymphoblastic Leukemia. **N Engl J Med**, v. 339, n. 9, p. 605-615, 1998.

PUI, C.H.; RELLING, M.V.; DOWNING, J.R. Mechanisms of Disease: Acute Lymphoblastic Leukemia. **N Engl J Med**. v. 350, p. 1535-1548, 2004.

RAIMONDI, S. Current Status of Cytogenetic Research in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**. v. 81, n. 9, p. 2237-2251, 1993.

RASPADORI, D.; LAURIA, F.; VENTURA, M.A. *et al.* Incidence and prognostic relevance of CD34 expression in acute myeloblastic leukemia: analysis of 141 cases. **Leuk Res**. v. 21, p. 603-607, 1997.

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, 1995.

REGO, E.M.; TONE, L.G.; GARCIA, A.B.; FALCAO, R.P. CD10 and CD19 fluorescence intensity of B-cell precursors in normal and leukemic bone marrow. Clinical characterization of CD10(+strong) and CD10(+weak) common acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res**. v. 23, p. 441-50, 1999.

REGO, M.F.N.; PINHEIRO, G.S.; METZE, K.; LORAND-METZE, I. Acute leukemias in Piaui: comparison with features observed in other regions of Brazil. **Braz J Med Biol**. v. 36, n. 3, p. 331-337, 2003.

RIBEIRO, R. C.; BRONISCER, A.; RIVERA, G. K. *et al.* Philadelphia Chromosome-positive Acute Lymphoblastic Leukemia in Children: Durable Responses to Chemotherapy Associated with Low Initial White Blood Cell Counts. **Leukemia**, v. 11, p. 1493-1496, 1997.

RIBEIRO, R. Leucemia Linfóide Aguda na Infância e Adolescência. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia. Fundamentos e Práticas**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2001. Cap. 46, p. 487-506.

RILEY, R.S.; MASSEY, D.; JACKSON-COOK, C. *et al.* Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am.** v. 16, p. 245-299, 2002.

ROWE, J.M.; BUCK, G.; BURNETT, A.K.; *et al.* Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. **Blood.** v. 106, p. 3760-3767, 2005.

SACKMANN-MURIEL, F.; FELICE, M.M.; ZUBIZARRETA, P.A. *et al.* Treatment Results in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia with a Modified ALL-BFM'90 Protocol: Lack of Improvement in High-Risk Group. **Leuk Res.** v. 23, p. 331-340, 1999.

SCHABATH, R.; RATEI, R.; LUDWIG, W.D. The prognostic significance of antigen expression in leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol.** v. 16, n. 4, p. 613-628, 2003.

SHUSTER, J. J.; BOYETT, J.; PULLER, J. *et al.* Prognostic Significance of Sex in Childhood B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. **J Clin Oncol.** v. 16, p. 2854-2863, 1998.

SIRAJ, A.K.; KAMAT, S.; GUTIERREZ, M.I. *et al.* Frequencies of the major subgroups of precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in Indian children differ from the West. **Leukemia.** v. 17, p.1192-1193, 2003.

SMITH, M.; ARTHUR, D.; CAMITTA, B. *et al.* Uniform Approach to Risk Classification and Treatment Assignment for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 14, n. 1, p. 18-24, 1996.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA PEDIÁTRICA GBTLI. **Protocolo de tratamento da leucemia linfóide aguda em crianças**. 1993.

STEINHERZ, P. G.; GAYNON, P. S.; BRENEMAM, J. C. *et al.* Treatment of Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia with Bulky Extramedullary Disease and T-cell Phenotype or Poor Prognostic Features: randomized controlled trial from the Children's Cancer Group. **Cancer**. v. 82, p. 600-612, 1998.

THALHAMMER-SCHERRER, R.; MITTERBAUER, G.; SIMONITSCH, I. *et al.* The immunophenotype of 325 adult acute leukemias: relationship to morphologic and molecular classification and proposal for a minimal screening program highly predictive for lineage discrimination. **Am J Clin Pathol**. v. 117, p. 380-389, 2002.

TSANG, K.S.; LI, C.K.; CHIK, K.W. *et al.* TEL/AML1 rearrangement and the prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia in Hong Kong. **Am J Hematol**. v. 68, p. 91-98, 2001.

VAN DONGEN, J. J.; MACINTYRE, E. A.; GABERT, J. A. *et al.* Standardized RT-PCR Analysis of Fusion Gene Transcripts from Chromosome Aberrations in Acute Leukemia for Detection of Minimal Residual Disease. **Leukemia**, v. 13, p. 1901-1928, 1999.

VIANA, M.B.; MURAO, M; RAMOS, G. *et al.* Malnutrition as a prognostic factor in lymphoblastic leukaemia: a multivariate analysis. **Arch Dis Child**. v. 71, n. 4, p. 304-310, 1994.

WIEMELS J. L.; LEONARD, B. C.; WANG, Y. *et al.* Site-specific Translocation and Evidence of Postnatal Origin of the t(1;19) *E2A-PBX1* Fusion in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Proc Natl Acad Sci**. v. 23, n.99, p. 15101–15106, 2002.

Anexos

Tabela 1: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LLA T.

Caso	Idade (anos)	SG (dias)	Situação	Blastos Fim Indução (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /l)	Blastos SP (%)	Blastos MO (%)	Índice de DNA	Fase S (%)	BCR/ABL p190	BCR/ABL p210	AF4/MLL	E2A/PBX1	TEL/AML1
1	21	420	1	0	14,6	1	32	1	17,02	0	0	0	0	0
6	14	930	0	0	27,1	32	86	1	1,25	0	0	0	0	0
10	19	31	1		81,5	94	82	1	3,08	0	0	0	0	0
18	13	734	0	0	98,9	65	96	1	0,98	0	0	0	0	0
20	22	731	0	1	5,3	31	97	1	0,18	0	0	0	0	0
26	9	74	1	0	83,8	78	95	1	2,1	0	0	0	0	0
27	8	7	1		485,5	84		1	12,58					
31	20	478	0	0	41,7	24	90	1	1,94	0	0	0	0	0
32	29	40	1		96,7	98	96	1	0,35	0	0	0	0	0
37	16	335	0	0	318	95	79			0	0	0	0	0
45	22	168	0	0	57	43	73	1	3,14	0	0	0	0	0

Tabela 2: Características imunofenotípicas dos pacientes com LLA T.

Caso	Subtipo LLA T	IMF CD45	IMF CD19	IMF CD10	IMF CD34	IMF HLA-DR	IMF CD3s	IMF CD3cit	IMF CD7	IMF CD5	IMF CD1a	IMF CD4	IMF CD8	IMF CD13	IMF CD33
1	2	548,7	0	0	0	150,7	86	48,3	44,5	114,4	0	48,5	1299,7	0	0
6	2	338,8	0	0	0	253,3	71,3		39,5	97,4	193,5	78,8	346,6	0	0
10	1	68,3	0	0	158,8	25,6	130,4	22,7	142,3	97,5	0	0	0	0	0
18	1	142,7	0	0	0	0	164,2	119,6	196,8	29,8	0			0	
20	1	34,9	0	0	21,2	41,3		36,3	39,1	47,3	0	25,8	212,6	0	0
26	1	198,2	0	0	0		0		120,8	45,8	0	38,5	295	0	0
27	2	103,3	0	37,3	0		23,8		50,8	85,6	36,6	0	156,3		0
31	1	220	0	0	128,9	0	32,8		46,4	33,5	28,6	20,6	124	0	
32	1	105,8	0		63,1		0	215,6	134,3	227,8	23,8	19	36,7	111,9	0
37	1	154,6			51,1		23	375,2	80,6	37,1	59,9	216,2	124	0	
45	2	66	0	0	0	0	35,5		123,3						0

Tabela 3: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LLA B.

Caso	Idade (anos)	SG (dias)	Situação	Blastos Fim Indução (%)	Leucócitos ($\times 10^9/l$)	Blastos SP (%)	Blastos MO (%)	Índice de DNA	Fase S (%)	BCR/ABL p190	BCR/ABL p210	AF4/MLL	E2A/PBX1	TEL/AML1
2	59	40	1		5,2	43		1	2,74	0	0	0	0	0
3	13	939	0	5	68,1	74	76	1	1,29	1	0	0	0	0
4	12	107	1	0	25,2	2	68	1	5,13	0	0	0	0	0
5	27	17	1		49,5	96		1	1,82	0	0	0	1	0
7	31	450	1	0	3,9	29	99	1	0,77	0	0	0	0	0
8	2	900	0	1	4,3	22	96	1,22	1,43	0	0	0	0	0
9	34	898	0	74	7,2	31	96,4	1	0,72	0	0	0	0	0
11	60	39	1		85,2	97	100	1	2,93	0	0	0	0	0
12	29	308	1	1	11	74	95	1	15,09	0	0	0	1	0
13	18	836	0	0	88,4	94	94	1	10,8	0	0	0	0	0
14	35	34	1		5,6	40	100	1	0,68	0	0	0	0	0
15	19	387	1	0	45,8	82	89	1	3,05	0	0	0	0	0
16	49	736	0	0	3,3	14	56	1	0,5					
17	29	770	0	1	70,6	87	93	1	1,29					
19	62	40	1		59,6	67	95	1	4,33	1	0	0	0	0
21	50	95	1		212	96	89	1	0,64	0	1	0	0	0
22	74	18	1		35	89	94	1,16	0,23	1	0	0	0	0
23	16	166	1	0	124,4	91	70	1	0,4	0	0	1	0	0
24	7	658	0	0	1,8	3	94	1,25	5,92	0	0	0	0	0
25	14	20	1		62	74	88	1	7,23	0	0	0	0	0
28	17	216	1	75	300,4	0	87	1	0,58	0	0	0	0	0
29	11	31	1		2	0	94	1	3,47					
30	62	23	1		262	91	85	1	4,63	0	0	1	0	0
33	13	93	1	0	188,5	94	93	1	1,28	0	0	0	0	0
34	51	223	1	0	2,1	44	74	1	0,1	0	0	0	0	0
35	30	427	0	0	72,9	95	100	1	3,99	0	0	0	0	0
36	36	70	1		7,7	3	94			0	0	0	0	0
38	44	142	1	0	39,6	0	48	1	1,31	0	0	0	0	0
39	24	219	1	0	30,4	84	100	1	0,53	0	0	0	0	0

Tabela 3: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LLA B.

Caso	Idade (anos)	SG (dias)	Situação	Blastos Fim Indução (%)	Leucócitos ($\times 10^9/l$)	Blastos SP (%)	Blastos MO (%)	Índice de DNA	Fase S (%)	BCR/ABL p190	BCR/ABL p210	AF4/MLL	E2A/PBX1	TEL/AML1
40	66	99	1		78	89	93	1	4,28	1	0	0	0	0
41	16	295	0	0	17	67	87	1	0,51	0	0	0	0	0
42	52	12	1		1,9	51	93	1	7,74	0	0	0	0	0
43	16	284	1	27	140,6	0	87	1	2,11	0	0	0	0	0
44	22	118	0	0	1,1	7	82	1	1,26	0	0	0	0	0
46	22	239	1	0	2,6	16	84	1,36	9,03	0	0	0	0	0
47	59	61	1		19,4	79	86	1	0,79	0	0	0	0	0
48	59	6	1		2,3	50	64	1,26	3,74	0	0	0	0	0
49	12	238	0	0	124,1	90	100	1	3,87	0	0	0	0	0

Tabela 4: Características imunofenotípicas dos pacientes com LLA B.

Caso	Subtipo LLAB	IMF CD45	IMF CD19	IMF CD10	IMF CD34	IMF HLA-DR	IMF CD22	IMF IgMs	IMF Kappa s	IMF Lambda s	IMF CD79a c	IMF IgMc	IMF Kappa c	IMF Lambda c	IMF CD13	IMF CD33
2	3	111,4	54,9	176,2	211,4	82,9	46,9				693,7	205,4			0	0
3	3	42,6	41,2	45,3	149,9		37,7	116,4	0	0	83,3	121			0	
4	2	86	138,3	26	209,3		28,6	0	0	0					0	
5	3	263,8	296,8	46,8	0	342	38,4				303,7	57,8			0	0
7	1	91	189,6	0	597,6	84,5	39,3				81,7	0			23,5	151,8
8	3	47,3	259	102,4	588,1	284,6	142,5				137	65,5			0	0
9	3	335,2	260,8	0	0	183,1	58,1				62,5	276,4			0	0
11	1	65,3	133,8	0	1556,	182,4	34,2				136,1	45,4			27,6	
12	3	171,8	180,8	0	0	195,6	34				77,9	98,8			0	
13	3	51,7	345,2	0	0	266	22,7				49,6	269,6			0	
14	2	23,5	99,4	24,8	57,4	51	35,2				31,2	76,9			0	
15	1	139,7	55,6	0	157,9	47,2	128,9	0	0	0	22,1	0	0	0	0	0
16	1	90,5	264,5	20,2	337,2	197,3	39,4	0	0	0	27,8	0	0	0	0	135,1
17		102,9	164,8	20,1	0	173,5	24,5	0	0	0	25,1	0	0	0	0	26,3
19	2	131,4	311,4	27,4	78,9	335,6	59	0	0	0	22,6	0	0	0	0	35,1
21	3	370,3	107,4	0	0	22,6	49,5	0	0	0	123	385,5	0	0	0	
22	3	43,7	153,5	96,4	101,1						84,1	169,5			0	0
23		96,3	122,3	0	0		25,3	0	0	0	48,4	0	0	0		0
24	3	23,1	167	153,7	37,2		43	26,2	0	0	75,1	148,8	0	0		0
25	2	34,6	44,3	321,7	122,8		41,9	0	0	0	39,6	0	0	0	0	88,1
28	2	132	187,3	186,6	77,8		89	0	0	0	83	144,9	0	0		
29	2	40,9		117,5	35,3		50				110,9	241,6			0	
30	1	182,9	187,7	0	67,1		0		0	0	46,8	0	0	0	0	
33		41,2	167,7	0	0	57,9	0	0	0	0	153,2	0	0	0	0	
34	2	30,7	147,7	32,3	148,5		30,4	0	0	0	52,7	0			0	0
35	2	84,1	357,8	139,3	190,1	64,9	47,7				87,3	0			0	
36	3	134,6	171,6	0	0	460,6	28,5	28,2	38,1	0		26,6			0	
38	2	45,4	105,9	425,6	32,6	103,2	36,6									31,3
39	1	117,3	234,4	24,3	1091,	211,8	387,9		0	0	29,6	0	0	0	0	
40	2	38,1	196,1	38	213,9	143,6		0	0	0	32,6	0	0	0	0	0

Tabela 4: Características imunofenotípicas dos pacientes com LLA B.

Caso	Subtipo LLAB	IMF CD45	IMF CD19	IMF CD10	IMF CD34	IMF HLA-DR	IMF CD22	IMF IgMs	IMF Kappa s	IMF Lambda s	IMF CD79a c	IMF IgMc	IMF Kappa c	IMF Lambda c	IMF CD13	IMF CD33
41	2	0	401,4	26,5	55,7	122,5	344,4	0	0	0	30,9	0	0	0	16,4	0
42	3	175	167,3	0	0	589,1	277,8	19,9	0	0	147,2	16,2	20,3	0	0	0
43	2	103,5	188,5	168	754,9	285,5	272,2	0	0	0	64,9	0	0	0	0	21,3
44	2	83,1	303,8	322,4	356,2	196,8	206,2	0	0	0	42,1	0	0	0	0	0
46	3	15,6	641	67,1	0	411,7	0	0	0	0	103,1	31,4	0	0	0	256,8
47	2	214,2	253,9	711,1	200,3	469,1	0	0	0	0	156,4	0	0	0	25,3	0
48	1	33,7	71,9	24,7	224	0	65,9	0	0	0	52,6	0	0	0	0	47,8
49	2	125,3	624,4	47,9	0	142,7	154,6	0	0	0	98,8	0	0	0		0