

CAPÍTULO I:

Introdução

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma neoplasia maligna resultante da proliferação clonal e acúmulo de células que exibem marcadores celulares associados aos estágios precoces de maturação linfóide. Os blastos se acumulam na medula óssea (MO) e substituem a população normal da mesma.

É a neoplasia mais freqüente na infância, correspondendo a 30-35% dos casos de câncer neste segmento (1). Seu pico de incidência ocorre entre 2 e 5 anos de idade, sendo quatro vezes mais freqüente que a leucemia mielóide aguda (LMA) (2).

Sua etiologia permanece desconhecida, porém alguns fatores de risco têm sido associados a esta patologia. A radiação ionizante é um dos fatores ambientais relacionados ao excesso de leucemia em algumas regiões geográficas estudadas (3-5) principalmente quando a exposição ocorre durante a vida intra-uterina ou durante a primeira infância. Produtos químicos diversos e imunodeficiências também são fatores leucemogênicos (5). Além dos fatores de riscos ambientais, algumas anomalias cromossômicas constitucionais (fatores genéticos) estão associadas a uma maior susceptibilidade à LLA e LMA, como síndrome de Down, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi e ataxia-telangiectasia (6;7). Polimorfismos genéticos também estão envolvidos na susceptibilidade às leucemias (8).

Baseado no curto tempo de latência, na presença de translocações associadas à LLA no sangue de recém-nascidos com leucemia, nos estudos em gêmeos com leucemia foi postulado que o evento inicial na patogênese da LLA ocorreria durante a vida intra-uterina. Em alguns subtipos de LLA é necessário um novo evento mutagênico para que a LLA se desenvolvesse (9-11). Este segundo evento na patogênese da LLA de células precursoras B (LLA cpB) possivelmente está relacionado à resposta imunológica a um ou vários patógenos. Evidências em estudos populacionais demonstram que o influxo de novas pessoas em comunidades isoladas causa um aumento no número de casos de LLA (12). De maneira similar, uma resposta imunológica anormal a infecções virais ou bacterianas também seria uma possível causa de LLA (10;13;14) .

Diferentes agentes infecciosos, principalmente vírus, foram e estão sendo estudados como possíveis fatores associados ao desenvolvimento da LLA em crianças, porém nenhum foi comprovado até o momento. A maioria dos autores (14-16), no entanto, concorda que o agente infeccioso implicado deveria ser um patógeno relativamente comum e pouco patogênico. Por outro lado, houve o surgimento recente da hipótese adrenal, que sugere que crianças em países em desenvolvimento estariam sujeitas a infecções de

repetição que causariam a liberação de cortisol endógeno em doses equivalentes às utilizadas para tratamento da LLA. Estes picos de cortisol seriam capazes de eliminar o clone leucêmico (17).

Tendo em vista que atualmente as taxas de sobrevida em cinco anos (18;19) das crianças com LLA é de aproximadamente 80%, mas que o número absoluto de crianças que morrem representa uma grande parcela do total de óbitos infantis por câncer (1) e a morbidade decorrente do tratamento da LLA pode deixar seqüelas em pessoas que têm uma grande expectativa de vida, torna-se importante o entendimento da patogênese desta doença, de modo a possibilitar sua prevenção ou desenvolvimento de novos tratamentos.

CAPÍTULO II:

Fundamentos teóricos

I. LEUCEMIAS AGUDAS PEDIÁTRICAS

1. Classificações

O diagnóstico das leucemias agudas baseia-se nos resultados das análises morfológicas da medula óssea, em conjunto com as reações citoquímicas, perfil imunofenotípico e citogenético das células leucêmicas. Sua classificação tem importância na decisão terapêutica, no prognóstico e na padronização dos estudos científicos sobre etiopatogênese. A classificação morfológica utilizada atualmente é a da Organização Mundial de Saúde (OMS), que adaptou os critérios do grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) (20;21). Neste período esta classificação foi a melhor solução para reprodutibilidade e concordância inter-observador e aplicação de protocolos terapêuticos. Os critérios FAB foram baseados na coloração das células do sangue periférico, no aspirado ou biópsia de medula óssea pelo método de Wrigth-Giemsa e das reações citoquímicas (20;21). A partir do tamanho celular e pleomorfismo nuclear, as LLAs foram classificadas como L1, L2 e L3. Foi então observado que a frequência de cada subtipo varia com a faixa etária idade. Atualmente esta classificação ainda é muito aplicada em regiões com poucos recursos diagnósticos.

A principal crítica a esta classificação é que ela exclui informações importantes para o prognóstico do paciente e diagnóstico diferencial, que atualmente são evidenciados através das análises de imunofenotipagem e da genética molecular.

A classificação de OMS utiliza para diagnóstico uma quantidade de blastos maior ou igual a 20%. Ela divide a LLA em dois grandes grupos: leucemia linfoblástica aguda de precursor B, que corresponde a 80% dos casos, e leucemia linfoblástica aguda de precursor T, utilizando dados de imunofenotipagem (20).

No entanto, a classificação mais comumente utilizada é a desenvolvida pelo *European Group for Immunophenotyping Leukemias* (EGIL) (21), que se baseia no perfil imunofenotípico das células em concordância com os aspectos morfológicos dos casos.

2. Aspectos clínicos

Os principais sinais e sintomas da LLA são atribuídos à substituição das células hematopoiéticas normais pelas células leucêmicas, assim como, pelo crescimento descontrolado destas células no tecido linfóide e em sítios extramedulares.

Aproximadamente dois terços das crianças apresentam sintomas inespecíficos, como letargia, fadiga, dor óssea e inapetência por cerca de 4 semanas antes do diagnóstico. Alguns casos já foram relatados com sintomas se arrastando por alguns meses (1).

Os sintomas mais freqüentes são aqueles relacionados à anemia, como astenia, mal-estar, redução da tolerância ao exercício e palidez cutâneo-mucosa. Em seguida estão os sinais e sintomas correlacionados à presença de trombocitopenia, sendo petéquias, equimoses, epistaxe e sangramento nas fezes ou na urina alguns dos achados relacionados a esta alteração.

Outros sinais e sintomas estão relacionados à presença de neutropenia, como febre, otite média, faringite, pneumonia e sepsis. Hepatoesplenomegalia ocorre em cerca de dois terços dos pacientes. Adenomegalia também é um achado comum e geralmente é generalizada e indolor.

Dor óssea é um achado comum (25% a 40% dos casos) (2), principalmente em crianças na primeira infância, podendo ser o primeiro sintoma. Pode ser uma dor difusa nos membros superiores ou inferiores, dor lombar, artralgia ou uma recusa para deambular. Decorre da infiltração do periósteo ou da cortical do osso pelos linfoblastos, causando expansão da cavidade medular e hemorragia óssea (22). Também pode haver infiltração das articulações com conseqüente artralgia, edema e calor local (2). A artrite pode ser crônica ou recorrente, ocorrendo em poucas articulações e de forma assimétrica, podendo ser migratória (2). Ocorre com maior freqüência em crianças com LLA de células precursoras B (1) e leucometria baixa. Cerca de 2% das crianças com LLA têm achados radiológicos característicos, incluindo linhas transversas radiolúcidas nas metáfases, neoformação óssea subperiosteal ou lesões osteolíticas mimetizando tumores ósseos, osteopenia ou colapso vertebral, mimetizando histiocitose de Langherhans. Podem surgir fraturas patológicas e colapso vertebral secundários a osteopenia. Em estudo realizado em São José do Rio Preto, São Paulo (22), a freqüência de dor óssea em crianças com LLA foi

de 36% e este grupo concluiu que a presença de dor óssea pode contribuir para atraso no diagnóstico da LLA. De fato, há relato de demora entre 2 semanas a 13 meses na realização do diagnóstico da LLA (2). Este sintoma pode ser confundido com o desconforto ósseo comumente atribuído à fase de crescimento da criança.

Em um estudo realizado por pesquisadores da UNIFESP, os sinais e sintomas ortopédicos mais prevalentes foram: dor nos membros ou articular (62%), dificuldade para deambular (39,3%) e artrite (22,9%) (2). As articulações mais acometidas foram a do joelho, seguida pelos tornozelos, punhos, cotovelos e quadris (2). Um problema especialmente observado neste estudo foi a utilização de corticóide para tratamento dos sintomas de dor óssea e articular, o que dificulta ainda mais o diagnóstico, visto que alivia os sintomas e altera as características das células blásticas (2).

Estes sinais e sintomas podem estar presentes a poucos dias ou a muitos meses antes do diagnóstico. Esta dificuldade ocorre devido a inespecificidade dos sintomas e a confusões diagnósticas, visto que os sintomas ortopédicos simulam outras doenças, como artrite reumatóide juvenil ou osteomielite.

Algumas vezes a LLA pode se manifestar de maneira incomum, com quadro típico de anemia aplásica, hipereosinofilia, insuficiência renal isolada, nódulos pulmonares, necrose de medula óssea, derrame pericárdico, hipoglicemia, nódulos cutâneos ou neutropenia cíclica (5).

Infiltração leucêmica no sistema nervoso central (SNC) ocorre por via hematogênica, por semeadura das meninges por blastos circulantes, ou por extensão direta a partir da MO do crânio. É mais comum nos subtipos de LLA-T e de células B maduras, bem como em crianças com leucometria alta (1). Os sinais e sintomas são decorrentes do aumento da pressão intracraniana (PIC), como cefaléia, náusea e vômito, letargia, irritabilidade, papiledema, geralmente sem rigidez de nuca. Os nervos cranianos podem ser envolvidos, sendo os mais frequentes o sétimo, o terceiro, o quarto e o sexto. A síndrome de obesidade hipotalâmica é um achado incomum devido à infiltração do hipotálamo por células leucêmicas, causando hiperfagia e aumento de peso patológico. O envolvimento da medula espinhal pode causar compressão da mesma, com dor lombar, paresia de membros inferiores, paraplegia e incontinência urinária e/ou fecal (1).

O envolvimento testicular apresenta-se como aumento indolor do testículo, usualmente unilateral, sendo rara no momento do diagnóstico da LLA, porém até 25% dos meninos podem ter doença oculta nesta localização. Os rins geralmente estão aumentados no diagnóstico da LLA, porém sem perda de sua função, exceto se houver nefropatia por ácido úrico. Priapismo é raro, mas pode ser encontrado em meninos com LLA T e leucostase.

Massa mediastinal está presente quase exclusivamente nos casos de LLA T, podendo ser acompanhado de derrame pleural. Estes pacientes também podem evoluir com síndrome de veia cava superior e insuficiência respiratória (1).

Com relação ao sistema gastrointestinal, a monilíase da cavidade oral é comum no diagnóstico, assim como manifestações hemorrágicas, como petéquias e hemorragia digestiva. Ulcerações na mucosa são freqüentes, assim como infecções bacterianas, fúngicas e virais. Massas intra-abdominais ocorrem com maior freqüência na LLA de células B maduras.

Alterações oculares são encontradas em mais de um terço das crianças com LLA recém-diagnosticada (1). Todas as estruturas oculares podem ser acometidas, podendo haver hemorragia retiniana, paralisia oculomotora e papiledema.

O envolvimento pulmonar e cardíaco é raro, mas é potencialmente grave. Derrame pericárdico ocorre em um terço dos casos de LLA T. Síndrome de hiperleucocitose pode causar insuficiência respiratória. Cardiomiopatia pode ocorrer em decorrência de septicemia ou distúrbios metabólicos (1). A LLA com hipereosinofilia pode causar trombos murais no miocárdio ou fibrose endocárdica de Löffler.

A pele raramente é acometida na LLA, porém pode haver proliferação de linfoblastos nos locais de sangramento intradérmico e na leucemia congênita, pode haver infiltração cutânea em cerca de 50% dos neonatos (1).

A LLA com freqüência acomete órgãos extramedulares, sendo comum a recaída da doença após o tratamento nestes sítios, como SNC, testículos, linfonodos, fígado, baço e rins. No entanto, a disfunção do órgão devido ao envolvimento do órgão pela leucemia é rara e ocorre apenas no estágio terminal da doença.

O diagnóstico diferencial da LLA inclui condições clínicas benignas, que estão sumarizadas no quadro 1. Entre estas estão as linfocitoses de origem infecciosa como a coqueluche, a mononucleose infecciosa (MI), osteomielite e parasitoses como leishmaniose visceral (LV) ou calazar e outras condições como a púrpura trombocitopênica idiopática (PTI), anemia aplásica e doenças reumáticas. Algumas neoplasias malignas também fazem parte da constelação do diagnóstico diferencial da LLA, principalmente os linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, metástase de neuroblastoma para a MO.

Quadro 1: Principais patologias não-malignas no diagnóstico diferencial da LLA em crianças.

Doenças não malignas
Anemia aplásica e outras síndromes de falência medular (anemia de Fanconi).
Infecções virais (mononucleose infecciosa, citomegalovirose).
Outras infecções (leishmaniose).
Artrite reumatóide juvenil, febre reumática.
Reação leucemóide (coqueluche, sepsis).
Púrpura trombocitopênica idiopática.
Eritroblastemia transitória da infância.

3. Achados laboratoriais

Cerca de 90% dos pacientes com LLA apresentam alterações laboratoriais hematológicas no diagnóstico e estas representam o grau de envolvimento da MO pelos blastos. Anemia normocítica e normocrômica, com contagem de reticulócitos baixa ocorre em aproximadamente 80% dos pacientes. A leucometria está aumentada na grande maioria dos casos, porém pode haver neutropenia. A contagem de plaquetas inferior a $100.000/\text{mm}^3$ é comum. Em cerca de 5% dos casos a contagem de leucócitos pode ser menor que $2.000/\text{mm}^3$, sem linfoblastos detectáveis no sangue periférico (1).

O exame do sangue periférico demonstra a presença de linfoblastos na maioria dos pacientes. O diagnóstico definitivo baseia-se no exame da MO, que é hiperclular e

encontra-se infiltrada por linfoblastos, sendo necessário que pelo menos 25% das células nucleadas sejam blastos. A importância do exame de MO deve-se ao fato que algumas patologias, como infiltração da MO no linfoma não-Hodgkin (LNH), infecções granulomatosas, osteopetrose e tumores metastáticos também podem causar um quadro de leucocitose com a presença de blastos no sangue periférico (1).

Outros achados laboratoriais são: aumento do nível sérico de ácido úrico, que reflete a carga tumoral; aumento nos níveis séricos de cálcio, fósforo e potássio; acidose láctica; redução do nível sérico de imunoglobulinas e aumento de desidrogenase láctica (LDH), que também reflete a carga tumoral.

II. MARCADORES BIOLÓGICOS ESPECÍFICOS

1. Imunofenótipo

O padrão de expressão dos antígenos de diferenciação das células investigadas permite a definição da linhagem celular e o estágio de maturação na classificação das leucemias agudas (LAs). Além disso, a distinção de marcadores celulares anormais permite o seguimento do paciente para avaliação da resposta terapêutica. Neste trabalho consideramos apenas os antígenos associados à diferenciação dos linfócitos B.

2. Seqüência de maturação da célula B e antígenos de células B.

A maturação dos linfócitos B se inicia com uma célula-tronco multipotente que se caracteriza pela expressão do antígeno de superfície CD34 e do MHC classe II DR (HLADr). Esta célula multipotente é CD34+/HLADr- e seus genes de cadeias pesada (IgH) e leve (IgL) da imunoglobulina ainda não estão rearranjados.

A expressão de antígenos celulares é determinada pela etapa da diferenciação celular. Com relação às células B, a molécula mais específica é o receptor de células B (BCR), que é composta por uma imunoglobulina (Ig) de superfície, com uma cauda citoplasmática curta, associada a dois heterodímeros de CD79a e CD79b (23).

A primeira indicação de comprometimento da célula progenitora da linhagem B está

na expressão de CD79a intracitoplasmática, que sinaliza um estágio pró-B. Mesmo antes de qualquer sinal de rearranjo detectável a célula prepara-se para que as moléculas acessórias necessárias para expressão do BCR na membrana possam ser transcritas adequadamente. Há também o CD22 intracitoplasmático (não na superfície celular), concomitante com o CD19 na membrana celular.

Seguindo o amadurecimento celular, ocorre o rearranjo dos genes de cadeia pesada de (IgH), o que ocorre primeiro em um dos cromossomos 22 e, se for improdutivo, ocorre no outro cromossomo. Este estágio é caracterizado pela presença da expressão do CD10 na superfície celular, assim como de mCD22.

Na fase seguinte, quando a célula é denominada por pré-B, há presença de cadeia μ intracitoplasmática e a célula já apresenta rearranjo completo do gene da cadeia pesada de Ig. A seguir ocorre o rearranjo do gene da cadeia leve de Ig. Esta célula B virgem expressa CD79, CD19, CD22, CD20, e Ig de superfície. Estas células escapam da exclusão isotípica e co-expressam IgM e IgD com a mesma especificidade.

A célula B virgem sofre um processo seletivo na MO para evitar auto-reatividade para células produtoras de anticorpos e desloca-se para os órgãos linfóides secundários, onde permanece no centro germinativo na zona do manto.

3. Classificação imunofenotípica da LLA de células precursoras B.

A classificação se baseia na expressão das moléculas de superfície celular de acordo com as etapas de maturação da célula normal descritas anteriormente. Os marcadores que permitem esta definição são identificados através de citometria de fluxo e os critérios definidos recomendam a identificação de pelo menos dois antígenos específicos de cada linhagem (24). Os rearranjos das imunoglobulinas são identificados através da biologia molecular.

O grupo EGIL (21) simplificou a caracterização das LLA, padronizando as diferentes nomenclaturas utilizadas por diferentes pesquisadores na área de imunofenotipagem celular. Esta classificação pode ser observada no quadro 2. As LLA são subdivididas em 4 estágios: B-I, B-II, B-III e B-IV, do fenótipo mais imaturo para o mais maduro. O subtipo mais comum é o B-II ou LLA-comum e os subtipos mais raros são o mais imaturo e o mais maduro, B-I ou LLA pró-B e B-IV ou LLA-B, respectivamente (23).

Em todas as LLAs de células precursoras B as células geralmente são positivas para

TdT, CD79, HLA-DR, CD19 e CD22. Este grupo é subdividido em LLA pró-B (CD10⁻/cIgμ⁻), LLA comum (CD10⁺/cIgμ⁻) e LLA pré-B (CD10⁺/cIgμ⁺/sIgμ^{+/-}) (25).

No subtipo pré-B as células apresentam positividade para CD19, CD24, HLA-DR, cCD22 e CD10. Os antígenos TdT e CD20 têm expressão variável. Sua característica é a presença de cadeia pesada μ citoplasmática (25;26).

A LLA de células B maduras representa 2 a 5% das LLA. As células apresentam os antígenos CD19, CD20, CD22, CD24 e sIgμ. Muitos casos são CD10⁺ (25;26).

A citometria de fluxo também pode ser utilizada para classificar as LLA de acordo com o seu conteúdo de DNA (26). Neste caso as LLA são classificadas como hiperdiploides, que implicam em bom prognóstico, e hipodiploides, com prognóstico desfavorável.

Quadro 1: Sumário da expressão de antígenos celulares que caracterizam as leucemias de células B precursoras.

Classificação EGIL	
B-I (pró-B)	CD19+, CD10-, cIgμ-, sIgM-
B-II (comum)	CD19+, CD10+, CD20 ^{+/-}
B-III (pré-B)	CD19+, CD10+, CD20+, cIgμ+, sIgM-
B-IV (células B maduras)	K ou λ Cy ou Ms

TdT= nucleotidiltransferase terminal; Cy=citoplasmático; Ms= membrana de superfície; Ig= imunoglobulina. Fonte: Bene (21)

3. Genética-molecular

A análise citogenética das células leucêmicas, através do bandejamento cromossômico, é importante no diagnóstico e no prognóstico da LLA. No entanto, ainda apresenta uma série de restrições na prática clínica. Estas são decorrentes da dificuldade de obtenção de metáfases de alta qualidade na citogenética convencional e porque algumas alterações crípticas não são identificadas nesta metodologia. Com isto, a citogenética molecular tem sido utilizada com frequência crescente, principalmente as técnicas de reação por transcriptase reversa (RT-PCR) e de hibridização por fluorescência in situ (FISH), nos casos mais comuns de LLA. As translocações cromossômicas que ativam

genes específicos são características da LLA (8) e identificam subtipos da doença, sendo encontradas em 75% dos casos (27). Geralmente as translocações ativam genes de fatores de transcrição, que podem controlar a diferenciação celular e com frequência codificam proteínas de cascatas transcripcionais (8).

As alterações genéticas podem ser numéricas ou estruturais. O quadro 2 sumariza as principais alterações genéticas na LLA-cpB.

Hiperdiploidia com 51-65 cromossomos ocorre em 30% dos casos de LLA-cpB da infância, e está associada com bom prognóstico. Quase haploidia ocorre em cerca de 1% dos casos.

Translocações envolvendo o cromossomo 11 ocorrem em cerca de 80% das LLA de células imaturas CD10- (LLA pro-B) em lactentes e têm vários possíveis parceiros. As fusões do *MLL* têm papel fundamental na leucemogênese e conferem mau prognóstico (28)

Aproximadamente 25% dos casos de LLA de precursor B apresentam o gene de fusão *TEL-AML1* criado pela t(12; 21) e confere excelente prognóstico ao paciente, com sobrevida livre de eventos de cerca de 90% (28). O gene *TEL* é um importante regulador do desenvolvimento hematopoiético e o gene *AML1* é essencial para a hematopoiese embrionária. A presença da proteína de fusão *TEL-AML1* nos progenitores de células B parece causar um desenvolvimento desordenado destas células (8).

Na t(1; 19) ocorre o rearranjo *E2A-PBX1*, que está presente em 3-5% das LLA cpB e em 25% das LLA pré-B. Antigamente os pacientes com esta translocação apresentavam mau prognóstico quando tratados com quimioterapia a base de antimetabólitos, porém atualmente têm melhor prognóstico, quando tratados com quimioterapia mais intensa (29), pois foram incluídos no grupo de risco intermediário.

Na LLA-B há a translocação de um alelo do gene *MYC* no cromossomo 8 no gene da cadeia pesada ou leve da imunoglobulina. A translocação predominante é a t(8; 14), que envolve o gene da cadeia pesada de Ig no cromossomo 14.

A t(9; 22), o cromossomo Filadélfia, é encontrada em cerca de 4% das LLA da infância, independente do imunofenótipo, e está associada a um mau prognóstico apesar do tratamento intenso (28). Esta translocação causa a fusão da proteína de sinalização *BCR* com a tirosino-quinase *ABL*, resultando numa atividade tirosino-quinase constitutiva, com interações complexas com elementos transformadores como a via de sinalização para o gene *RAS* (8).

A definição da lesão genética associada à LLA tem importância na definição do tratamento, pois pacientes com translocações que conferem mau prognóstico devem ser tratados com regimes terapêuticos mais intensos.

Quadro 2: Principais alterações genético-moleculares na LLA infantil.

Subtipo	Frequência	Alteração genética-molecular	Achados associados	SLE 5 anos
Hiperdiploidia >50 cromos	27-29%	Desconhecida	Fenótipo B precursor, idade 1-10 anos, baixa leucometria, bom prognóstico	80-90%
t (12;21) (p12-13;q22)	20-25%	<i>TEL-AML-1</i>	Fenótipo B precursor, pseudodiploidia, idade 1-10 anos, bom prognóstico	85-90%
t (1;19) (q23;p13)	5-6%	<i>E2A-PBX1</i>	Fenótipo pré-B, pseudodiploidia, leucometria alta, negros SNC+, bom prognóstico c/ tto intenso	70-80%
t (4;11) (q21;q23) e outras t 11q23	4-8%	<i>MLL-AF4</i>	Fenótipo precursor B CD10-/CD15+, lactentes, hiperleucocitose, SNC+, prognóstico ruim	10-30%
t (9;22) (q34;q11)	3-4%	<i>BCR-ABL</i>	Fenótipo precursor B, idade mais avançada, leucocitose, prognóstico desfavorável	20-35%
t (8;14) (q24;q32.3), t (2;8) (p12;q24) ou t (8;22) (q24;q11)	2%	Superexpressão do <i>MYC</i> com rearranjos <i>IGH</i> , <i>IGL</i> ou <i>IGK</i>	Fenótipo B, sexo masculino, doença “bulky”, bom prognóstico com tratamento curto intensivo com CFX	70-85%
Dic (9;21) (p11-12)	1%	Desconhecido	Fenótipo B precursor, sexo masculino, bom prognóstico	80-90%

Adaptado de Pui e cols (27). CFX= ciclofosfamida.

II. EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO

1. Distribuição geográfica e incidência das leucemias linfoblásticas agudas

As taxas de incidência de LA na infância variam entre os países de acordo com o nível de desenvolvimento humano. No quadro 3 há um resumo das diferentes variações nas taxas de incidência de LLA, ajustadas por idade e sexo, em diversos países de acordo com a localização geográfica (20).

A LLA da infância (LLA CD10+) apresenta uma incidência maior em crianças entre 2 e 5 anos de idade e predomina no sexo masculino, com exceção da LLA de lactentes (LLA pro-B), que ocorre com maior frequência no sexo feminino. Nos Estados Unidos e na África do Sul demonstrou-se que há uma maior frequência desta doença em crianças brancas, quando comparado com os afrodescendentes negros (20).

Há uma tendência de que os países mais industrializados, com população com mais recursos financeiros, apresentem taxas mais altas de LLA. Variações intermediárias são encontradas em alguns países do leste da Europa e baixa incidência ocorre em Israel, China e Índia. No Brasil, atualmente podemos estimar as diferenças entre as taxas de incidência a partir dos registros de câncer de base populacional (RCBP) estabelecidos em algumas cidades da federação conforme a tabela 1. As diferenças de incidência de leucemias agudas em geral nas diferentes regiões do Brasil com registro de câncer pediátrico foram alvo de nossas análises (www.inca.gov.br).

Alguns autores (29;30) demonstraram um aumento da taxa de incidência de leucemias agudas ao longo do tempo. No Reino Unido, Kroll e cols (31) encontraram um aumento do número de casos de LLA-comum ao longo do tempo, mas não de outros subtipos de LA. Nos países nórdicos a incidência de LLA permaneceu estável nos últimos 20 anos, sem diferença nos subtipo (32). Estes dados são difíceis de serem interpretados, porque podem indicar não um aumento real do número de casos de LA, mas uma melhora no diagnóstico ou na notificação dos casos.

Tabela 1: Taxas de incidência de leucemia aguda de acordo com a área geográfica.

Registro	Ambos os sexos	Sexo masculino	Sexo feminino
Costa Rica	4,63	5,17	4,07
Finlândia	4,19	4,18	4,20
Canadá	4,10	4,48	3,69
Hong Kong	4,06	5,06	2,99
Suécia	4,01	4,09	3,93
Austrália (New South Wales)	3,99	5,62	4,32
Alemanha	3,90	4,36	3,41
Noruega	3,83	3,93	3,73
EUA (brancos)	3,80	4,13	3,45
Itália	3,79	3,89	3,68
Hungria	3,35	3,70	2,99
Reino Unido	3,28	3,57	2,97
Eslováquia	2,84	3,18	2,48
Cuba	2,54	2,76	2,31
Kuwait	2,43	2,71	2,14
Japão	2,26	2,56	1,95
Brasil (Goiânia)	2,19	2,18	2,21
Nova Zelândia (Maori)	2,19	3,03	1,31
EUA (negros)	2,08	2,20	1,96
Brasil (Belém)	1,88	2,05	1,74
Israel (Judeus)	1,86	1,87	1,84
China (Tianjin)	1,74	1,90	1,57
Índia (Bombay)	1,60	1,98	1,20

Taxas de LA por 100.000 habitantes em ordem decrescente de magnitude, ajustadas por idade (0-14 anos).

Fonte: Parkin e cols (33).

Tabela 1: Taxas de incidência (por 100.000 habitantes) de leucemia infantil no Brasil.

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

Fonte: Ministério da Saúde (34)

2. Relação com fatores de risco genéticos e ambientais

Diversos fatores têm sido implicados como possíveis causadores de LLA em crianças. A susceptibilidade genética, assim como fatores ambientais, tem sido estudada (16). As hipóteses atuais indicam que são necessários dois eventos para o desenvolvimento da leucemia (9;35;36). O segundo evento ocorre em decorrência de fatores ambientais.

Algumas doenças genéticas estão associadas a um maior risco de leucemia na criança, como a síndrome de Down, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi, neurofibromatose tipo I, síndrome de Schwachman, síndrome de ataxia-telangiectasia e imunodeficiência hereditária (6;7;37;38), porém correspondem a apenas 5% dos casos. Estudos têm sugerido que a maneira como a pessoa reconhece antígenos, responde a eles, reconhece e repara danos ao DNA e a metabólitos químicos, pode aumentar o risco de desenvolver leucemia, por isso o polimorfismo genético pode ser um fator de risco tão importante quanto os fatores ambientais.

Para analisar a resposta à infecção, alguns autores têm estudado o polimorfismo do sistema HLA. Taylor e cols (39) relataram que os portadores do alelo *DPB1*0201* do HLA classe II teriam maior risco de desenvolver LLA de precursor B e LLA T. Outro alelo, *DPB1*0101*, parece proporcionar proteção.

Estudos de caso-controle avaliaram se infecção materna durante a gestação estaria associada à maior risco de leucemia nas crianças. Dois estudos (40;41) mostraram que infecção pelo EBV e infecção do trato urinário baixo ocasionaria um aumento do risco. Roman e cols (42) relataram um aumento do risco de leucemia associado a infecções virais inespecíficas durante a gestação, principalmente na LLA cpB (43).

Infecções durante a infância também foram objeto de vários estudos, porém alguns poucos demonstraram um risco aumentado, enquanto outros demonstraram um efeito protetor (16;44), inclusive associado à infecção pelo herpesvírus 6 (HHV-6), EBV e vírus da rubéola, coqueluche, sarampo e diarreia.

A vacinação também foi estudada como fator de risco para leucemia da criança. As vacinas BCG, sarampo e para *Haemophilus influenzae* tipo b apresentaram efeito protetor, enquanto outros estudos mostraram um discreto aumento do risco (16). Estudos anteriores foram inconclusivos, portanto, não há consenso com relação à questão de se a vacinação teria efeito protetor ou de aumento do risco de LLA.

Amamentação já foi implicada tanto como fator protetor como facilitador da leucemia, pois pode proporcionar exposição da criança a agentes infecciosos, mas também pode conferir proteção pela passagem passiva de anticorpos maternos. A evidência atual sugere que amamentação prolongada reduz o risco de leucemia da criança, porém isto pode ser decorrente de fatores sócio-econômicos associados à amamentação (16).

As crianças que freqüentam creches estão expostas a um maior número de agentes infecciosos. Os estudos mostram um efeito protetor contra leucemias, principalmente LLA, nestas crianças, contudo há a possibilidade de viés devido a outros fatores, como nível sócio-econômico (16). Um fator correlato é a socialização da criança, que também implica em maior exposição a antígenos. Isto tem sido estudado avaliando-se a ordem de nascimento, com trabalhos demonstrando que os irmãos mais velhos teriam um risco aumentado de leucemia (16).

Os estudos realizados para avaliar a infecção viral como possível fator causal da leucemia da criança têm demonstrado os seguintes resultados: Smith e cols (45) pesquisaram seqüência genômica dos poliomavírus JC, BK e Simian 40 em 25 crianças com LLA de precursor B e concluíram que eles não estão associados com LLA. Há relatos da presença de seqüência genômica do HHV-6 em pacientes com leucemia (16). O vírus TT também foi estudado em amostras de pacientes com leucemia e não foi encontrada associação (46). MacKenzie e cols (47;48) estudaram a presença de vírus linfotrópicos (EBV, HHV-6, 7 e 8) nas células de pacientes com leucemia por técnicas moleculares (SB, RT-PCR) e não encontraram o genoma destes vírus.

Ablashi e cols (49) relataram titulação alta de anticorpos anti-HHV-6 em pacientes com LLA, porém outros estudos (50) não reproduziram estes resultados. Petridou e cols (51) encontraram, na Grécia, uma associação inversa entre leucemia e soropositividade para EBV, HHV-6, *Mycoplasma pneumoniae* e Parvovírus B19 em crianças com LLA maiores de 5 anos de idade. Além disso, Kerr e cols (52) relataram a presença de infecção por Parvovírus B19 no líquido de crianças com LLA e LMA. A infecção pelo Parvovírus está associada a uma significativa cascata de citocinas que causam distúrbios na hematopoiese e supressão da função normal da MO, o que pode propiciar a liberação de um clone leucêmico ou induzir sua proliferação.

3. Hipótese de Kinlen para etiologia das leucemias pediátricas

Kinlen (15) descreveu os resultados da mortalidade de uma comunidade rural na Escócia, onde houve um influxo populacional de crianças durante a evacuação de Londres na II Guerra Mundial, encontrando um aumento transitório de leucemia aguda na infância. Com isto ele sugeriu que a leucemia aguda da infância seria o resultado de um desfecho raro de uma infecção comum e relativamente não patogênica em pessoas que não estavam imunizadas, após contato com carreadores do vírus. Este autor relatou que leucemias agudas podem ocorrer em agrupamentos (clusters) de indivíduos com determinadas características referentes a áreas geográficas e temporalidade. Estes agrupamentos já foram descritos em Chicago (EUA), Nevada (EUA), Sellafield (UK) e Dounreay (UK) (53).

Estes dados são questionados no trabalho de Wolff e cols (54). Eles referem que, embora crianças tenham sido retiradas das cidades de risco num período de quatro dias em 1939, não houve um aumento do número de casos de leucemia aguda nos anos subsequentes (1940-1949). No entanto, ele estudou apenas crianças até 4 anos de idade e Kinlen encontrou resultados significativos no grupo de 5 a 14 anos.

Outros trabalhos encontraram resultados similares. Um estudo com crianças na Grécia e na Itália (55) demonstrou um aumento na mortalidade por leucemia aguda nos anos 50 e 60 devido a um grande movimento populacional. Langford (56) também encontrou um aumento estatisticamente significativo ($RR=1,41$, $IC95\%=1,13-1,76$) da mortalidade por LLA em crianças entre 0 e 14 anos de idade entre 1969 e 1973. Alguns autores (57;58) encontraram associação entre aumento do tamanho da população e o desenvolvimento de LA em crianças entre 1 e 4 anos.

No entanto, outros estudos contestam estes achados. Roman e cols (42) associaram o aumento de casos de LA em crianças em determinadas áreas no Reino Unido à presença de radiação. Um estudo em Hong-Kong (59) não encontrou associação entre influxo de pessoas em uma região com o aumento da incidência de LA em crianças.

Parslow e cols (60) encontraram, também no Reino Unido, uma incidência menor de LA em crianças em áreas com grande mistura populacional ($RR=0,72$, $IC95\%=0,54-0,97$) e uma maior incidência em áreas com baixa mistura populacional ($RR=1,56$, $IC95\%=0,73-3,34$). Um estudo de investigadores do Reino Unido também não encontrou associação, concluindo que uma baixa diversidade de migração em determinadas regiões,

pode estar associada com LA (61), porém eles não estudaram, como Kinlen, o impacto do influxo populacional numa comunidade, mas sim a presença de mistura populacional em grandes centros urbanos.

Em geral, os estudos demonstram um aumento de LA em crianças após um influxo populacional em áreas isoladas, principalmente um maior número de casos de LLA-comum. No entanto, quando se estudam grandes centros urbanos, com grande mistura populacional, parece haver uma redução do número de casos de LA na infância.

4. Hipótese de Mel Greaves para etiologia das leucemias linfoblásticas de células B precursoras

As evidências epidemiológicas sugerem que a LA pediátrica, especialmente a LLA comum, é mais prevalente nas sociedades com melhor nível sócio-econômico e padrão de higienização (35). Fatores ambientais como exposição a pesticidas, agentes químicos como o benzeno, campos eletromagnéticos, radiação ionizante, vírus como o HTLV-1 e EBV e bactérias como *Helicobacter pylori*, podem contribuir para o desenvolvimento da LA. Embora alguns destes agentes sejam apontados como fator causal, ainda não existe comprovação bem estabelecida de que a leucemia seja decorrente do efeito de um único fator de risco.

Com base nas análises epidemiológicas descritivas de diversos epidemiologistas ingleses, e principalmente com os resultados de Kinlen, Mel Greaves (36) sugeriu uma hipótese com plausibilidade biológica referente aos mecanismos da resposta imune dos indivíduos.

Estudos realizados em gêmeos univitelinos com LLA demonstraram que as células leucêmicas compartilham o mesmo ponto de quebra do gene de fusão, tendo origem em uma única célula, em um dos fetos (62). Esta célula seria disseminada ao outro gêmeo através das anastomoses vasculares da placenta única, monocoriônica (35).

Estes achados motivaram a pesquisa das alterações moleculares causadoras da leucemia no sangue de crianças que fora armazenado nos cartões utilizados para realização do teste do pezinho (Guthrie cards). Desta maneira, foram encontrados os genes de fusão no sangue de crianças que desenvolveram leucemia anos depois do nascimento (35).

No entanto, como as taxas de concordância de LA em gêmeos idênticos não são iguais, elas refletem a necessidade de eventos adicionais para o início da leucemogênese

(35). Com relação ao gene de fusão *MLL*, associado a LLA do lactente, a taxa de concordância é muito alta, em torno de 25-50% para gêmeos dicoriônicos e cerca de 100% para gêmeos monocoriônicos. Estes dados associados ao breve período de latência sugerem que somente a presença deste gene de fusão é suficiente para o desencadeamento da LA (35).

Para a LLA-comum a taxa de concordância é de cerca de 5%, com um tempo médio de latência de 3 anos, implicando que a presença do gene de fusão *TEL-AML1* não é suficiente para o desenvolvimento da LLA. Outra evidência desta hipótese é que nem todas as crianças que apresentaram este gene de fusão ao nascimento desenvolveram LLA. Para cada criança com diagnóstico de LLA, há pelo menos 20 outras crianças saudáveis que tiveram a translocação cromossômica, com o gene de fusão *TEL-AML1* e um clone pré-leucêmico gerado no útero. Este fato sugere que algum outro fator no período pós-natal é necessário para o desenvolvimento da doença. Devido à grande diversidade biológica das LLA, é improvável que haja apenas um agente causal do segundo evento. Os fatores que têm sido implicados são os ambientais (35), susceptibilidade genética e o acaso (62).

Greaves postulou que uma resposta imunológica exacerbada a um agente infeccioso seria o evento necessário para o desenvolvimento da LLA-comum (35). Isto poderia ocorrer após uma hipoplasia transitória da MO devido a ação do interferon gama ($IFN-\gamma$) produzido pelos linfócitos T, seguido por uma recuperação exacerbada de células (35). Outra possibilidade é que a resposta imunológica esteja não-balanceada pela ausência de uma modulação imunológica apropriada durante a infância devido à exposição a antígenos, principalmente nos países desenvolvidos, além de um possível papel do HLA ou outros genes associados com a resposta imunológica (35). Em ambas as questões, a natureza da infecção permanece indefinida, podendo ser causada por vírus e/ou bactérias.

Com relação à LLA-comum com hiperdiploidia ou com fusão do *TEL-AML1*, as evidências sugerem uma causa infecciosa (35). Uma resposta anormal à infecção poderia causar a perda do segundo alelo do gene *TEL*, possibilitando o desenvolvimento da LLA-comum.

Desta maneira, a hipótese de Greaves (13;62) sugere que há um primeiro evento, a nível molecular, que ocorreria durante a vida intra-uterina, seguido de um segundo evento, possivelmente uma resposta imunológica anormal, pós-natal, necessário para o desenvolvimento da LLA. Novamente, crianças com poucos contatos sociais na infância,

que não desenvolveram infecções comuns da infância, primogênitos são mais propensos ao desenvolvimento da LLA.

Esta hipótese de dois eventos é a mais aceita nos caso da LLA-comum com marcadores moleculares associados ao processo da leucemogênese, como na LLA *TEL-AML1+*, ou seja, há um primeiro evento intra-uterino que causa o surgimento do gene de fusão, e um segundo evento, após o nascimento que permite a evolução para LLA (62). A figura 1 compara as hipóteses de Kinlen e Greaves.

Variabilidade genética também é importante na susceptibilidade à LLA. O risco de LLA no lactente tem sido associado a variantes polimórficas do gene *NQO1*, assim como do *MTHFR*. Do mesmo modo, alelos do HLA classe II influenciam no risco de LLA da infância (62).

Figura 1: Comparação das hipóteses de Greaves e Kinlen.

	Proliferação celular rápida		Baixa exposição a patógenos causando redução do estresse proliferativo	Exposição a patógenos durante o período de proliferação linfóide aumentada.
Desenvolvimento fetal		Nascimento	Lactação	Infância inicial
→				
Hipótese de Greaves	Mutações aleatórias		Residência num ambiente com baixa exposição a patógenos comuns.	Exposição tardia a patógenos comuns.
Hipótese de Kinlen			Baixa ou não-exposição a patógenos não endêmicos.	Exposição a novos patógenos como resultado do aumento da mistura populacional.

Modificado de Pui e cols (8)

5. Hipótese de Smith

Em 1997, Smith (63) propôs que uma infecção durante a gravidez e não durante a infância causaria LLA comum. O agente etiológico causaria infecção materna que seria transmitida ao feto. Como resposta a esta infecção, a criança teria maior risco de desenvolver LLA antes dos cinco anos de idade (63;64). Este agente etiológico deveria ter

capacidade de induzir instabilidade genômica, exercer efeitos especificamente nos linfócitos B, apresentar taxas altas de infecção em regiões com baixo nível sócio-econômico, ter potencial oncogênico limitado, ter capacidade de atravessar a barreira placentária e causar infecção fetal e que as infecções sejam oligossintomáticas (63;64). Ele sugeriu que o vírus JC poderia estar relacionado ao desenvolvimento de LLA com hiperdiploidia (45).

6. Hipótese Adrenal

Em 2008, Schmiegelow e cols (17) sugeriram a hipótese adrenal para a patogênese da LLA infantil. Segundo estes autores, crianças residentes em áreas com baixo nível sócio-econômico estariam sujeitas a infecções de repetição, que causariam a liberação de cortisol endógeno em níveis semelhantes aos utilizados para tratamento da LLA, o que permitiria a eliminação do clone pré-leucêmico. Esta hipótese baseia-se nas seguintes premissas:

1. No pico de incidência de LLA antes dos 5 anos de idade, que é mais proeminente nos países desenvolvidos;
2. Que nos países industrializados 80% dos casos de LLA de linhagem B apresentam ou hiperdiploidia ou a translocação $t(12; 21)(p13; q22)$, que se iniciam no período pré-natal;
3. Que neonatos saudáveis podem nascer com a translocação $t(12; 21)(p13; q22)$ e conseguem eliminá-lo sem desenvolver leucemia posteriormente;
4. Os glicocorticóides são agentes antileucêmicos eficazes e a maioria das LLAs são sensíveis a estes agentes;
5. O hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) libera cortisol, que causa remissão morfológica da LLA;
6. Durante o estresse infeccioso, a resposta do ACTH pode aumentar a liberação do cortisol a níveis equivalentes aos obtidos com o tratamento antileucêmico;
7. Infecções graves podem induzir remissão morfológica da LLA;
8. Crianças que freqüentam creches têm maior risco de infecção e menor risco de LLA;

9. Nos países em desenvolvimento, a grande carga de infecções graves e a desnutrição contribuem para redução da ocorrência de LLA devido ao aumento da secreção de cortisol e a resposta celular a este durante infecções.

7. Aspectos epidemiológicos das leucemias no Brasil

Pouco tem sido descrito sobre a epidemiologia dos fatores de riscos das leucemias agudas no Brasil. A maioria dos trabalhos epidemiológicos realizados cita estatísticas americanas ou européias, ou trata apenas de aspectos clínicos referentes às respostas aos tratamentos. Um estudo epidemiológico da década de 1990 relatou uma estimativa de casos de LLA no Brasil inferior aos já estimados para incidência nos EUA e na Europa (33). Os dados do registro utilizado para realização deste estudo foi ineficiente devido à inexatidão e limitações do diagnóstico na época da realização do mesmo. Recentemente, com o estabelecimento de registros de câncer em diversas regiões do Brasil, estas análises têm apresentado resultados mais consistentes.

Dados do Ministério da Saúde (33;65) sobre mortalidade por leucemias nos diferentes estados brasileiros podem ser avaliados no quadro 5. Na faixa etária de 0 a 4 anos, a taxa de mortalidade varia de 0,29 para 100.000 em Tocantins a 3,50 para 100.000 no Amapá, entre o sexo masculino, e entre 0,27 no Piauí e 4,34 para 100.000 no Amapá, para o sexo feminino. Dentre os pacientes de 5 a 9 anos, as taxas variaram entre 0 em Roraima e 2,88 no RS para meninos, e 0,37 em Alagoas e 3,08 por 100.000 no Amapá, para meninas.

Tabela 3: Taxas de mortalidade por leucemias, por idade, em 100.000 homens e mulheres (1995-1999).

Estados	Sexo masculino				Sexo feminino			
	0 -4	5-9	10-14	15-19	0 -4	5-9	10-14	15-19
	anos	anos	anos	anos	anos	anos	anos	anos
Acre	2,34	1,79	2,37	1,95	0,59	1,23	0,00	0,65
Alagoas	0,96	1,10	1,65	1,16	1,34	0,37	1,06	1,39
Amapá	3,50	1,49	1,50	0,85	4,34	3,08	0,00	3,23
Amazonas	1,05	1,99	0,86	1,34	1,54	1,14	1,00	1,07
Bahia	0,70	1,06	0,70	0,88	0,66	0,56	0,71	0,50
Ceará	2,25	1,38	1,28	1,27	1,43	1,17	0,77	0,78
Distrito Federal	1,69	1,08	2,42	3,12	1,95	0,88	0,60	2,45
Espírito Santo	1,57	1,32	1,60	2,94	0,74	0,96	1,26	1,68
Goiás	1,09	1,81	1,42	1,36	1,22	0,68	1,29	1,43
Maranhão	0,78	0,67	0,80	0,99	0,49	0,40	0,54	0,50
Mato Grosso	1,37	1,35	1,17	1,40	1,90	0,78	0,61	1,91
Mato Grosso do Sul	3,20	2,20	1,96	2,11	2,14	2,10	0,92	1,55
Minas Gerais	1,22	1,59	1,33	1,74	1,23	1,01	0,88	1,23
Pará	1,21	1,62	0,96	1,55	1,31	0,89	0,55	0,60
Paraíba	1,10	1,04	1,07	1,26	1,12	0,53	1,19	1,04
Paraná	1,59	1,73	1,68	2,05	2,01	1,18	0,89	1,43
Pernambuco	1,39	1,20	1,22	1,52	1,05	0,73	1,37	1,23
Piauí	0,53	0,83	0,55	0,72	0,27	0,49	0,45	0,24
Rio de Janeiro	2,39	2,04	2,21	2,21	2,04	1,93	1,57	1,53
Rio Grande do Norte	2,65	1,06	1,54	2,81	2,58	1,63	1,17	1,39
Rio Grande do Sul	1,78	2,88	2,33	2,19	1,94	1,95	1,19	1,522
Rondônia	2,05	1,01	1,00	1,36	0,80	1,58	0,52	0,84
Roraima	1,08	0,00	0,00	0,00	1,11	2,47	1,24	0,00
Santa Catarina	1,88	2,23	1,57	2,17	1,78	1,76	1,79	1,56
São Paulo	1,81	1,93	1,66	2,25	1,70	1,12	1,37	1,40
Sergipe	1,86	2,02	0,97	1,05	1,91	1,04	0,59	1,04
Tocantins	0,29	0,29	1,12	0,31	2,13	0,91	0,29	0,00

Fonte: Ministério da Saúde, 2008 (65)

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) (66) recebe pacientes de todo o país para tratamento. Nos anos de 1994 e 1995 as neoplasias do sistema hematopoiético e reticuloendotelial foram os tumores pediátricos (<15 anos) mais frequentes. A LLA foi o tipo mais comum, correspondendo a 28,9% dos tumores pediátricos.

Um trabalho (67) realizado na população brasileira avaliou faixa etária, tipo de leucemia, situação temporal das leucemias infantis e comparou o efeito das diferenças imunofenotípicas com fatores ambientais em diferentes regiões do Brasil encontrou incidência de LLA de 2,2, 2,6 e 3,3/10⁶, respectivamente, nos estados da Bahia, Rio de Janeiro e Brasília. Este estudo também demonstrou que a curva de incidência de acordo com a faixa etária de distribuição da LLA-comum foi um pouco mais ampla do que o relatado na Europa e América, porém bastante similar a de países como Chile e Nicarágua (Malta). Outro dado interessante é que na Bahia houve menor prevalência da LLA-comum (1,6 X 10⁶). Este Estado caracteriza-se por uma população com menor nível sócio-econômico, famílias numerosas, tempo de amamentação prolongado e presença de certas doenças endêmicas, características de áreas tropicais, como leishmaniose.

O estudo de Boing e cols (68) avaliou a mortalidade e a morbidade hospitalar das neoplasias no Brasil entre 2002 e 2004 e encontrou mortalidade de 2,50 para 100.000 mulheres e 3,10 para 100.000 homens em todas as faixas etárias. Ele também relatou que as internações por leucemia foram responsáveis pelo maior gasto de recursos financeiros do SUS, pois tiveram o maior valor médio por internação, superando R\$ 500.000,00 no ano, sem contar os gastos indiretos.

Leal e Wünsch Filho (69) estudaram a associação entre industrialização e leucemia no estado de São Paulo a partir dos registros de mortalidade. Eles não encontraram um maior número de óbitos por leucemia nas regiões mais industrializadas. No entanto, evidenciaram um padrão constante de altos coeficientes de mortalidade por leucemia na região de Jales, uma região precariamente industrializada no noroeste de São Paulo. Este aumento do número de óbitos nesta região foi decorrente de todos os subtipos de leucemia, mas principalmente de LLA. Embora os autores ponderem que numa região com poucos habitantes um ligeiro aumento no número de casos possa resultar no achado de um cluster, não podemos excluir a possibilidade de aumento do número de casos por influxo populacional.

Recentemente, o INCA divulgou novos dados de incidência de LLA em crianças baseado em registros de base populacional de diferentes cidades do Brasil (34).

8. Aspectos das doenças infecciosas prevalentes na infância no Brasil

Durante a infância as doenças infecto-parasitárias (DIP) são uma importante causa de morbidade (65). A distribuição das causas de internações no Brasil no ano de 2006 pode ser observada no **quadro 6**. Em crianças abaixo de um ano de idade, DIP correspondem a 18,4% das internações, entre 1 e 4 anos são 27,1%, entre 5 e 9 anos, 18,7% e entre 10 e 14 anos, 14%. Além disso, uma parte significativa das doenças respiratórias na infância e das patologias perinatais também são decorrentes de infecções, aumentando a importância destas patologias nesta faixa etária. Nestes mesmos grupos etários, as internações por neoplasias correspondem a 0,5%, 19%, 3,7% e 4,9%, respectivamente (70).

Tabela 4: Distribuição das internações por grupo de patologias e faixa etária, 2006.

Capítulo CID	< 1 ano	1 a 4 anos	5 a 9 anos	10 a 14 anos	15 a 19 anos
I. Doenças infecciosas e parasitárias	18,4	27,1	18,7	14,0	4,5
II. Neoplasias	0,5	1,9	3,7	4,9	2,1
III. Doenças hematológicas e imunológicas	0,5	0,8	1,1	1,2	0,5
IV. Doenças endócrinas e metabólicas	2,4	3,2	2,6	2,3	0,6
V. Transtornos mentais e comportamentais	0,0	0,0	0,1	0,5	1,3
VI. Doenças do sistema nervoso	1,4	1,8	2,2	2,4	0,8
VII. Doenças do olho e anexos	0,2	0,3	0,6	0,6	0,2
VIII. Doenças do ouvido e apófise mastóide	0,2	0,4	0,8	0,8	0,1
IX. Doenças do aparelho circulatório	0,3	0,3	0,6	1,4	1,0
X. Doenças do aparelho respiratório	34,6	42,2	29,2	16,8	4,6
XI. Doenças do aparelho digestivo	3,8	6,5	10,3	10,0	4,1
XII. Doenças da pele e subcutâneo	0,7	1,7	2,3	2,3	1,0
XIII. Doenças osteomusculares	0,2	0,6	2,2	3,7	1,4
XIV. Doenças do aparelho geniturinário	1,5	3,2	6,2	6,8	5,1
XV. Gravidez, parto e puerpério	0,0	0,0	0,0	9,2	63,7
XVI. Afecções originadas no período perinatal	30,0	1,8	0,5	0,3	0,0
XVII. Malformações congênitas	2,7	2,3	2,8	2,5	0,5
XVIII. Achados clínicos e laboratoriais	0,9	1,1	1,5	1,7	0,8
XIX. Envenenamento	1,0	4,1	12,5	16,5	7,0
XX. Causas externas de morbidade e mortalidade	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
XXI. Contatos com serviços de saúde	0,5	0,7	1,7	2,1	0,7
CID 10ª Revisão não disponível ou não preenchido	0,0	0,1	0,3	0,2	0,1
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Fonte: SIH/SUS

Dentre as diversas causas de infecção na infância, ressaltamos a leishmaniose visceral (LV) que é doença de notificação compulsória, endêmicas em diferentes regiões do Brasil e que tem importância por acometer principalmente crianças de regiões com baixo nível sócio-econômico.

9. Leishmaniose visceral (LV), calazar.

No Brasil, nos últimos anos, a LV tem se expandido para áreas urbanas. Embora ocorra em todas as regiões, até a década de 90 a maioria dos casos (90%) ocorria no Nordeste (71). Com a expansão da doença, no ano 2002, o Nordeste passou a responder por 77% dos casos. Foram relatados surtos no Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina, Natal, São Luís, Fortaleza, Camaçari (BA), Três Lagoas (MS), Campo Grande e Palmas. O ambiente propício à ocorrência da LV é aquele de baixo nível socioeconômico e pobreza, no entanto, estas características vêm se modificando, principalmente, nos estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste, onde a LV se encontra urbanizada (71). Na figura 2, observamos a distribuição dos casos de LV no Brasil.

A doença é mais freqüente em crianças menores de 10 anos (54,4%) e 41% dos casos registrados ocorrem em menores de 5 anos, sendo o sexo masculino o mais afetado (60%), conforme demonstrado no quadro 7. A maior susceptibilidade das crianças é explicada por relativa imaturidade imunológica celular, desnutrição e maior exposição ao vetor no peridomicílio (71).

Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral são protozoários do gênero *Leishmania*, que são parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema mononuclear (72-74). No Brasil, a *Leishmania chagasi* é a espécie comumente isolada em pacientes com LV e é transmitida pelo mosquito *Lutzomia sp.* O período de incubação é de 10 dias a 24 meses, com média de 2 a 4 meses. Existe uma resposta humoral detectada através de anticorpos circulantes, que tem pouca importância como defesa. A *Leishmania* determina uma supressão reversível e específica da imunidade celular, permitindo a disseminação e multiplicação do parasito. Só uma pequena parcela de indivíduos infectados desenvolve sinais e sintomas da doença. Após a infecção, caso o hospedeiro não desenvolva a doença, observa-se que os exames que pesquisam imunidade celular ou humoral permanecem reativos por longo período, podendo-se concluir que a *Leishmania* está presente no organismo infectado durante longo tempo, depois da infecção inicial (71).

A doença tem cinco diferentes apresentações. A forma inaparente ou assintomática caracteriza-se por sorologia positiva ou detecção dos parasitos nos tecidos sem manifestações clínicas (71). O diagnóstico é feito por exames sorológicos (RIFI e ELISA) ou pela intradermoreação de Montenegro. Os títulos de anticorpos em geral são baixos e

podem permanecer positivos por um longo período. Os pacientes que apresentam cura clínica ou aqueles com leishmaniose tegumentar podem apresentar reatividade nos exames sorológicos e na intradermoreação de Montenegro.

Em áreas endêmicas, as crianças podem apresentar uma forma oligossintomática, com febre baixa, diarreia e tosse seca, hepatomegalia, esplenomegalia discreta e adinamia, com duração de cerca de 15 dias e que evolui para cura espontânea.

Na leishmaniose clássica há alopecia, edema de membros inferiores, febre, astenia, adinamia, anorexia, emagrecimento, desnutrição e caquexia (72). Hepatoesplenomegalia acentuada, micropoliadenomegalia generalizada, palidez, manifestações hemorrágicas, como gengivorragia, epistaxe, equimose e petéquias também são encontrados (74). Amenorréia, atraso no crescimento e puberdade tardia podem estar presente. Assim como anemia, trombocitopenia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia.

O período de estado caracteriza-se por febre irregular, emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia. Apresenta um quadro clínico arrastado, com mais de dois meses de evolução, associado a comprometimento do estado geral. Caso não sejam feitos o diagnóstico e tratamento, a doença evolui progressivamente para uma fase terminal, com febre contínua e comprometimento mais intenso do estado geral. Instala-se a desnutrição, edema dos membros inferiores que pode evoluir para anasarca. Também pode haver hemorragias, icterícia e ascite. O óbito geralmente é determinado por infecções bacterianas e/ou sangramentos.

A quinta apresentação possível da leishmaniose visceral é a refratária, que é evolutiva, sem resposta ao tratamento ou com resposta parcial. O paciente evolui para óbito devido à infecção ou hemorragia.

As complicações mais frequentes do calazar são de natureza infecciosa bacteriana. Dentre elas destacam-se: otite média aguda, piodermites, infecções do trato urinário e respiratório. Caso essas infecções não sejam tratadas, o paciente poderá desenvolver um quadro séptico com evolução fatal.

As hemorragias são geralmente secundárias a plaquetopenia, sendo a epistaxe e a gengivorragia as mais comumente encontradas. A hemorragia digestiva e a icterícia quando presentes indicam gravidade do caso.

Os achados laboratoriais são anemia, pancitopenia, proteinúria leve, hipoalbuminemia, hiperbilirrubinemia leve, elevação de transaminases e fosfatase alcalina, alterações no metabolismo lipoprotéico (72).

O diagnóstico é por sorologia ou demonstração da presença de parasitas nos tecidos, geralmente baço ou medula óssea. O exame imunológico mais utilizado no Brasil é a imunofluorescência indireta (RIFI) (71). O resultado da imunofluorescência indireta é normalmente expresso em diluições. Aceitam-se como positivas diluições a partir de 1:80. Nos títulos iguais a 1:40, recomenda-se a solicitação de uma nova amostra em 30 dias. Valores inferiores a 1:40 são negativos. O teste ELISA tem o seu resultado expresso em unidades de absorvância a um raio de luz, em uma reação com diluições fixas ou mais comumente, apenas como reagente ou não. Na presença de dados clínicos e laboratoriais, um teste sorológico reagente, reforça o diagnóstico de leishmaniose visceral. Entretanto, um teste reagente, na ausência de manifestações clínicas sugestivas de leishmaniose visceral, não autoriza o início do tratamento.

A intradermoreação de Montenegro é sempre negativa durante o período de estado da doença, não sendo utilizado para o diagnóstico. Ele torna-se positivo após a cura clínica na maioria dos pacientes em um período de seis meses a três anos após o término do tratamento.

Diagnóstico Parasitológico: a punção aspirativa esplênica é o método para demonstração direta do parasita com maior sensibilidade, seguida pelo aspirado de medula óssea, biópsia hepática e a aspiração de linfonodos. Por ser um procedimento mais seguro, recomenda-se a punção aspirativa da MO. A visualização dos amastigotas pode ser feita com as colorações de Giemsa ou Wright, Leishman ou Panóptico (figura 4). O encontro de parasitas no material examinado depende do número de campos observados (mínimo de 200 campos para considerar uma lâmina como negativa).

Isolamento em meio de Cultura (in vitro): as formas amastigotas do parasita, inoculadas em meios de cultura especiais, contendo agar e sangue de coelho, transformam-se em formas promastigotas. O meio de cultura mais utilizado é o NNN (Novy-MacNeal-Nicolle), associado ou não a meios líquidos, como LIT ou Schneider, que aumentam a positividade da cultura. As culturas devem ser mantidas entre 24-26°C e observadas em microscopia óptica comum ou invertida, semanalmente, até quatro semanas. Os tubos positivos devem ser encaminhados para laboratórios de referência para identificação da espécie (figura 3).

Métodos moleculares: o método do PCR apresenta sensibilidade de 94%, porém sofre influência de diversas variáveis, como área endêmica, o tipo de amostra, o alvo do DNA utilizado para amplificação e o método de extração do DNA.

O tratamento é com antimoniais pentavalentes ou anfotericina B (75). Quando não tratada, a LV é fatal em 75-85% das crianças e, quando tratada adequadamente, a taxa de cura é de 95% (71).

A LV tem apresentado nova importância mundial com o advento da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), que possibilitou um aumento do número de casos desta doença, com apresentações clínicas diferentes das usuais e dificuldade no diagnóstico (76). As crianças podem não apresentar esplenomegalia e os amastigotas podem ser encontrados em qualquer órgão e podem apresentar características de anemia aplásica (71).

Alguns relatos de caso têm sido publicados descrevendo a associação de leishmaniose e leucemia (77), geralmente durante o curso do tratamento da neoplasia, em decorrência de imunossupressão. Kopterides e cols (78) revisaram os casos de leishmaniose e câncer publicados e demonstraram de a leishmaniose pode mimetizar neoplasias malignas, pode complicar o tratamento de um câncer ou pode ocorrer concomitante ao diagnóstico da neoplasia. Estes estudos foram realizados em adultos, sendo poucos os casos de leucemia aguda em crianças. Todos os estudos em crianças foram sobre o desenvolvimento de LV durante o tratamento imunossupressor. Faltam estudos avaliando a presença de LV antes ou durante o diagnóstico do câncer.

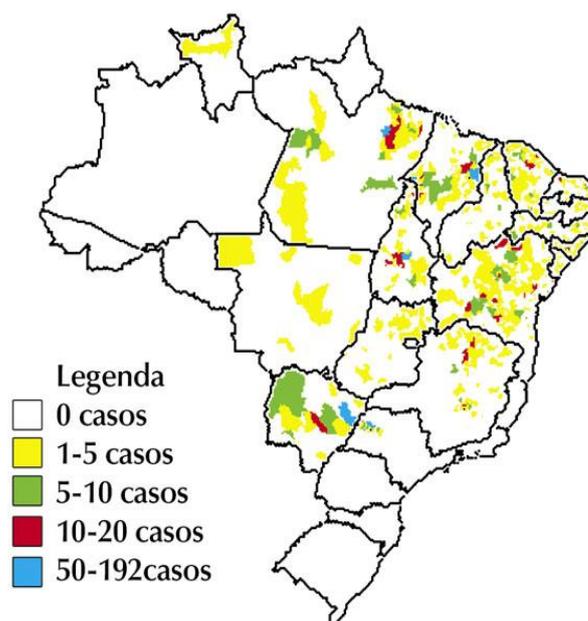
O princípio fundamental da imunoregulação pela leishmaniose é que o parasita, que replica quiescente nos macrófagos, é morto pelos macrófagos ativados. Em modelos murinos de doença por *L. major*, exemplifica o paradigma Th1/Th2, no qual o desfecho da doença é determinado pela natureza e magnitude da resposta de células T e citocinas no início da infecção. No rato infectado, a produção de interferon gama por Th1 e células NK media resistência, enquanto a expansão de células Th2 confere suscetibilidade. Interleucina 12 tem papel chave no desenvolvimento da imunidade celular, induzindo células T naive a diferenciarem-se em células Th1 e por induzir células T e NK a produzirem interferon gama. Em homens, o modelo é mais complexo e varia com as diferentes apresentações da doença e espécies do parasita (74).

Tabela 5: Taxa de incidência de leishmaniose visceral, por 100.000 habitantes, por faixa etária e região geográfica, 2005.

Região	Menor 1 ano	1 a 4 anos	5 a 9 anos	10 a 19 anos	20 a 39 anos	40 a 59 anos	60 anos e mais	Total
Norte	23,71	17,31	5,18	2,09	1,90	1,41	0,93	4,21
Nordeste	24,68	18,62	4,52	1,86	2,15	1,91	1,00	3,84
Sudeste	4,21	3,30	1,24	0,51	0,57	0,55	0,52	0,84
Sul	-	-	0,04					
TOTAL	12,28	9,10	2,52	1,03	1,07	0,93	0,68	1,89

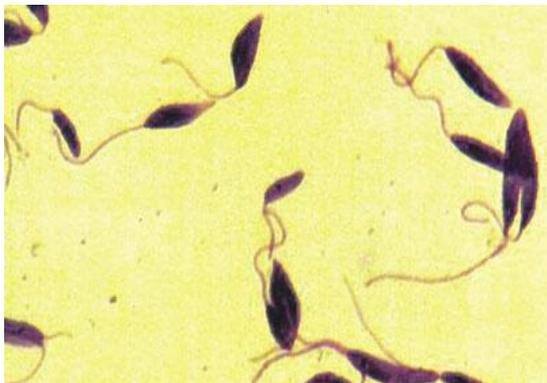
Fonte: MS/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN

Figura 2: Distribuição dos casos autóctones de Leishmaniose visceral por município, Brasil, 2002.



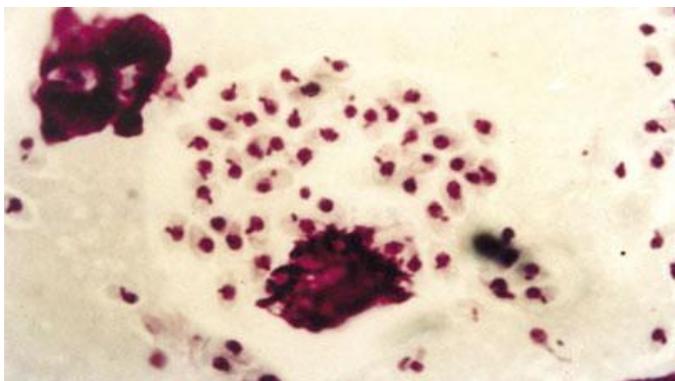
Fonte: SINAN (79)

Figura 3: Formas promastigotas do *L.chagasi*.



Fonte: MS (80)

Figura 4: Formas amastigotas teciduais do *L.chagasi*.



Fonte: MS (80)

10. Viroses da infância implicadas na patogênese da LLA

As crianças são susceptíveis a uma série de infecções virais. Dentre estas, destacamos as infecções pelo Parvovírus B19 e Herpesvírus-6, que têm sido estudadas como possível associação na patogênese da LLA da infância.

10.1. Parvovírus B19

O Parvovírus B19 (PVB19) pertence à família *Parvoviridae* e é dependente das células do hospedeiro para replicação. A infecção pelo PVB19 é universal, sendo uma infecção comum na infância. Cerca de 50% dos adolescentes de 15 anos têm sorologia reativa para este vírus. Em países de clima temperado, a infecção acontece na primavera, em pequenas epidemias com intervalos de poucos anos. O vírus propaga-se por perdigotos e também por transfusão de hemoderivados, especialmente os concentrados de fator VIII e IX, pois o vírus é resistente a inativação por calor e detergentes solventes devido a ausência de envelope lipídico (81).

O PVB19 foi implicado em diferentes doenças:

- **Quinta doença:** a maioria dos casos de infecção pelo PVB19 é assintomática. A forma de apresentação mais comum é o eritema infeccioso (EI) ou quinta doença, um exantema infantil caracterizado pelo rash tipo “em bofetada” (figura 5). Febre e sintomas inespecíficos *influenza-like* ocorrem inicialmente, na fase de viremia. Rash cutâneo e sintomas reumáticos surgem cerca de duas semanas após a infecção, concomitante ao surgimento de anticorpos antivirais, possivelmente devido à formação e deposição de imunocomplexos. A sorologia realizada nesta fase confirma a soroconversão dos anticorpos IgM ou a presença de IgG que antes era inexistente. O rash pode ser evanescente, mas pode recorrer com a exposição solar, calor, emoção e exercício.
- **Artropatia:** em adultos, a infecção pode causar artropatia significativa, com artralgia e artrite em 50% dos pacientes. O acometimento articular é simétrico, ocorrendo principalmente nas mãos, mas também em tornozelos, joelhos e punhos, podendo apresentar fator reumatóide positivo. Geralmente resolve em poucas semanas sem destruição articular.
- **Crise aplásica transitória:** em pacientes com aumento da destruição de glóbulos vermelhos e alta demanda para produção de eritrócitos a infecção pelo PVB19 pode causar uma interrupção abrupta da produção de hemácias, que causa ou piora anemia. Este quadro é particularmente importante em pacientes com doença falciforme e esferocitose hereditária. Há viremia na crise aplásica transitória e a produção de hemácias retorna ao normal após o

surgimento de anticorpos que controlam a infecção. Embora transitório este quadro pode precipitar insuficiência cardíaca congestiva (ICC), acidentes cerebrovasculares e seqüestro esplênico agudo. Já foram relatados casos de agranulocitose, trombocitopenia, pancitopenia e síndrome hemofagocítica associados à infecção pelo PVB19.

- **Infecção persistente pelo PVB19:** ocorre na ausência de anticorpos protetores. Na ausência da imunidade antiviral, não ocorre a quinta doença, mas pode haver aplasia de células vermelhas persistentes. Anticorpos contra o PVB19 geralmente estão ausentes, porém o genoma viral pode ser prontamente detectado na circulação por PCR. Ocorre em pacientes com imunodeficiências diversas.
- **Hidropsia fetal:** a infecção pelo PVB19 em gestantes, seguida de transmissão transplacentária ao feto pode causar abortamento ou hidropsia fetal. O PVB19 infecta o fígado fetal, que é o sítio de produção de glóbulos vermelhos, causando anemia grave e ICC. O maior risco ocorre nas infecções adquiridas no segundo trimestre da gestação.

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo PVB19 baseia-se na sorologia e em testes moleculares. Os anticorpos vírus-específicos são detectados por imunoenaios enzimáticos. IgM é detectado em quase todos os casos de infecção por PVB19 na apresentação e surgem em poucos dias após o início da crise aplásica, persistindo por dois ou três meses. A pesquisa de IgG é menos importante devido a presença em grande parte da população. Pesquisa do DNA viral é necessária para o diagnóstico de infecção persistente. Os métodos de hibridização diretos são confiáveis e sensíveis. PCR é mais sensível, porém pode apresentar resultados falso-positivos devido à contaminação ou resultados não interpretáveis porque baixos níveis de vírus podem persistir por meses a anos após a infecção aguda em pessoas saudáveis (81).

A presença de DNA do PVB19 no LCR de crianças com LLA e LMA detectado por PCR na época do diagnóstico da leucemia levou a especulações sobre o papel deste vírus na patogênese da leucemia aguda (52). A resposta do hospedeiro à infecção pelo PVB19 poderia estar relacionada ao desenvolvimento de leucemia aguda. A infecção pelo PVB19 está associada com supressão do setor eritróide na MO, proliferação celular imunológica e regulação para cima de mediadores importantes como o fator de crescimento de colônias granulocíticas e monocíticas (GM-CSF). Tais mecanismos

poderiam estar implicados na conversão de um clone pré-leucêmico em leucemia franca (82).

Figura 5: Infecção pelo Parvovirus B19.



À esquerda: criança com o rash “em bofetada” típico do exantema súbito. No centro: Aspirado de medula óssea demonstrando ausência de precursores eritróides maduros e os pronormoblastos gigantes característicos. À direita: hidropsia fetal. Fonte: NEJM, 2004 .

10.2. Herpesvírus 6 (HHV-6):

Os HHV-6 são dois vírus distintos (variantes A e B). Os testes sorológicos atuais não diferenciam entre infecção aguda e passada. Cerca de 95% das pessoas com mais de 2 anos de idade têm sorologia reativa para um ou ambas variantes (83). O HHV-6B é o agente etiológico da sexta doença, roséola infantil ou exantema súbito (84), sendo freqüentemente ativo em pacientes imunocomprometidos, porém a maioria dos estudos não diferencia as duas variantes do HHV-6 e aqui usaremos esta terminologia sem diferenciação dos dois tipos.

A infecção pelo HHV-6 acontece em idade bem precoce. Há relatos de seroprevalência de 64 a 83% aos 13 meses de idade em países como EUA, Reino Unido, Japão e Taiwan (83). Nos EUA, um estudo com sorologia e PCR encontrou que 10% dos lactentes com menos de um mês de idade eram PCR positivos. Positividade ao PCR parece refletir infecção passada pelo vírus, devido a persistência do DNA viral nas células mononucleares do hospedeiro. O título de anticorpos declina acentuadamente com cerca de um mês de idade e torna a aumentar em torno dos 16 aos 18 meses, acompanhado de um aumento da positividade do PCR, sendo consistente com perda dos anticorpos maternos e uma alta taxa de infecção nos meses subsequentes (85).

O estudo de Zerr e cols (86) documentou a ocorrência de infecção primária pelo HHV-6 em 130 crianças, com percentagens cumulativas de 40% aos 12 meses de idade e 77% aos 24 meses de idade. O pico de infecção ocorreu entre 9 e 21 meses, com maior risco de ocorrer em crianças do sexo feminino (RR=1,7; 95% CI=1,2-2,4) e nas com irmãos mais velhos (RR=2,1, 95% CI=1,4-2,9). 93% das crianças tiveram sintomas e 38% procuraram atendimento médico. Após a infecção primária, o vírus replica na glândula salivar e permanece latente em linfócitos e monócitos.

A apresentação clássica (83) do ES começa com febre, que pode exceder 40°C e dura 3 a 5 dias. Quando a temperatura normaliza, surge um rash macular ou maculopapular iniciado no tronco e disseminando-se para as extremidades, face e pescoço (figura 6). Adenomegalia cervical, pós-auricular e occipital são comuns. Também pode haver diarreia, manchas de Nagayama na úvula e palato mole, tosse, edema de pálpebras, abaulamento de fontanela e convulsão febril. Linfocitose e neutropenia ocorrem durante o rash. Geralmente não precisa de tratamento específico e se resolve sem seqüelas a longo-

prazo. Há febre baixa seguida de rash maculopapular ou pode ser assintomático. Também pode haver otite, alterações gastrointestinais ou respiratórias e convulsões. Possíveis complicações são infecção do SNC com convulsões, hiperexia, vômito diarreia, tosse, síndrome hematófagocítica, hepatite fulminante, infecção disseminada e hepatoesplenomegalia podem ocorrer. Em imunodeprimidos a infecção pelo HHV-6 pode causar supressão da MO, pneumonite, encefalite, hepatite, febre e rash.

O diagnóstico (83) pode ser baseado nos seguintes métodos:

- Cultura viral: o HHV-6 pode ser cultivado de linfócitos. O eritema súbito é a única entidade que pode ser diagnosticada baseada nos achados clínicos e cultura positiva. É mais difícil interpretar a cultura positiva em pacientes com imunodeficiência, pois a atividade viral pode não estar relacionada com eventos clínicos.
- Métodos moleculares: os ácidos nucleicos do HHV-6 podem ser detectados por hibridização e PCR. Southern Blot (SB) é menos sensível que o PCR, mas pode ser utilizado para diagnóstico em um grande número de amostras.
- Sorodiagnóstico: podem ser utilizados a imunofluorescência indireta, radioensaio e ensaios enzimáticos. IgM reativa indica infecção primária ou reativação. Na infecção primária, anticorpos IgM anti-HHV-6 podem ser detectados dentro de 5 a 7 dias, porém cerca de 5% dos adultos saudáveis têm IgM reativo.

Em 1996, Fujita e cols (87) descreveram o primeiro caso de infecção pelo HHV-6 em paciente com LLA. A relação entre infecção pelo HHV-6 e doenças linfoproliferativas tem sido amplamente estudada devido HHV-6 ao fato do vírus ter capacidade de manter-se integrado ao genoma do hospedeiro (88). Casos de HHV-6 integrado ao DNA das células mononucleares foram descritos em pacientes com doenças linfoproliferativas, embora seja incerto se há relação com a patogênese destas doenças (89). O DNA do HHV-6 também foi encontrado nos blastos de 88% dos pacientes com LLA-T em uma série de casos. Outro estudo com 14 pacientes, sendo 7 com LLA-pB e 5 com LLA-T detectou o DNA viral em 28% dos casos, sendo todos com LLA-pB comparados com 26% de doadores de sangue saudáveis. Após PCR nested, 64% dos casos de LLA foram positivos comparados com 50% dos doadores saudáveis (83).

Trinta e três crianças com LLA e 7 com LMA foram testadas para a presença de anticorpos IgM e IgG contra HHV-6 no diagnóstico por Salonem (90). 97,5% das crianças

leucêmicas apresentavam anticorpo anti-IgG reativo e 40% tinham anti-IgM reativos comparados com 92,3% e 7,7%, respectivamente para os controles ($p=0,005$), indicando que reativação ou resposta primária inapropriada à infecção pelo HHV-6 poderia estar implicada na patogênese da leucemia.

Gentile (91) estudou a relação entre LMA, LLA, leucemia mielóide crônica (LMC) e mielodisplasia com excesso de blastos em transformação (AREBT) com o nível de anticorpos anti-HHV-6 e encontrou uma associação entre aumento da seropositividade em pacientes com LMA (OR=1,20; 95%CI=1,07-1,33). Wittekindth (92) demonstrou a ausência de DNA do HHV-6 no LCR de crianças com leucemia, exceto na presença de encefalite viral. Recentemente, Seror (93) descreveu o caso de uma criança que apresentou infecção aguda pelo HHV-6 e que desenvolveu LLA dois meses depois.

Os resultados destes estudos são conflitantes, mas não se pode descartar um papel para a infecção pelo HHV-6 na patogênese da LLA visto que os estudos foram realizados em pacientes com diferentes faixas etárias e utilizando diferentes metodologias.

Figura 6: Aspecto típico do rash da sexta doença.



Fonte: NEJM, 2005 (94).

CAPÍTULO III:

Justificativa do estudo

Os vários estudos epidemiológicos descritos, que buscam identificar fatores de riscos na etiopatogênese das LLA, foram realizados em países europeus ou na América do Norte, onde o padrão de exposição para doenças infecciosas não é semelhante ao dos países tropicais. Eles sugerem que a maior prevalência de LLA nestes países é decorrente de uma menor exposição às infecções comuns (virais) da infância e a um menor contato social entre as crianças, o que ocasionaria uma resposta imunológica ineficaz ou alterada na vigência de uma infecção comum tardia. Esta hipótese é particularmente associada com a LLA comum (CD10+), que é a leucemia de maior prevalência nas crianças na faixa etária entre 2 e 5 anos. Embora não seja o um fator causal *per si* isto seria o segundo passo determinante da leucemogênese, descrito anteriormente. Em países desenvolvidos com altos padrões de higiene, já existe uma discussão sobre o perfil imunológico atuando no aumento de incidência de determinadas doenças graves e emergentes na infância como diabetes, asma e LLA (95).

O Brasil é um país de dimensões continentais, com uma população heterogênea e com diferentes exposições a agentes infecciosos e níveis de higienização. Seus habitantes estão sujeitos a diversas condições de saneamento básico, agregações familiares numerosas e exposições a diversas infecções endêmicas. As crianças, além de estarem expostas a doenças infecciosas comuns nesta faixa etária, estão propensas ao desenvolvimento de doenças regionais que não ocorrem nos países desenvolvidos (parasitoses), principalmente em decorrência às diferenças climáticas e de saneamento básico.

Embora já esteja bem consolidado o reconhecimento das leucemias entre as doenças infantis no Brasil, bem como a atuação de grupos de tratamento desta doença, muito pouco se sabe sobre o verdadeiro perfil biológico das leucemias infantis, de acordo com as diferentes regiões geográficas e etnias.

O desenvolvimento recente de um registro nacional de leucemias na infância permite avanços nesta área. Em 1997 foi desenvolvido pelo Ministério da Saúde, em parceria com o Banco do Brasil, o Programa Criança e Vida, que equipou 8 laboratórios em diferentes regiões do Brasil, no sentido de melhorar o diagnóstico das LAs na infância. Também foi o responsável pela criação de uma rede de atendimento clínico de crianças com câncer pediátrico.

Recentemente foi criado no INCA um sistema eletrônico que facilitou a interação entre profissionais de saúde e clínicos com o diagnóstico imuno-molecular das leucemias

infantis (www.imunomolecular.redecancer.org.br). Este sistema permite que médicos assistentes cadastrem seus pacientes, enviem amostras biológicas para estudo e acompanhem seus resultados (96). Desta forma obtivemos uma coleção de dados que nos permite analisar as possíveis diferenças geográficas das LLA no Brasil.

Nossa questão é, portanto, avaliar se o possível segundo evento necessário para a patogênese das LLAs (62), poderia ser decorrente de outros agentes patogênicos mais comuns nos países tropicais. Dado que procedemos sistematicamente o diagnóstico de leucemias agudas, entre outras doenças cujas características clínicas fazem parte da constelação do diagnóstico diferencial, nós esperamos, por meio deste estudo, determinar o perfil epidemiológico e biológico das crianças com LLA no Brasil.

Ao avaliar o perfil demográfico e clínico destas crianças pretendemos identificar possíveis associações a agentes infecciosos que possibilitariam direcionar estudos adicionais na patogênese da LLA, especulando se infecções endêmicas brasileiras, como a leishmaniose visceral, contribuiriam para a patogênese da LLA-comum.

CAPÍTULO IV:

OBJETIVOS

Principal

Testar as hipóteses sobre as influências das exposições às infecções na infância como fator de risco na patogênese das leucemias linfoblásticas de células precursoras B no Brasil.

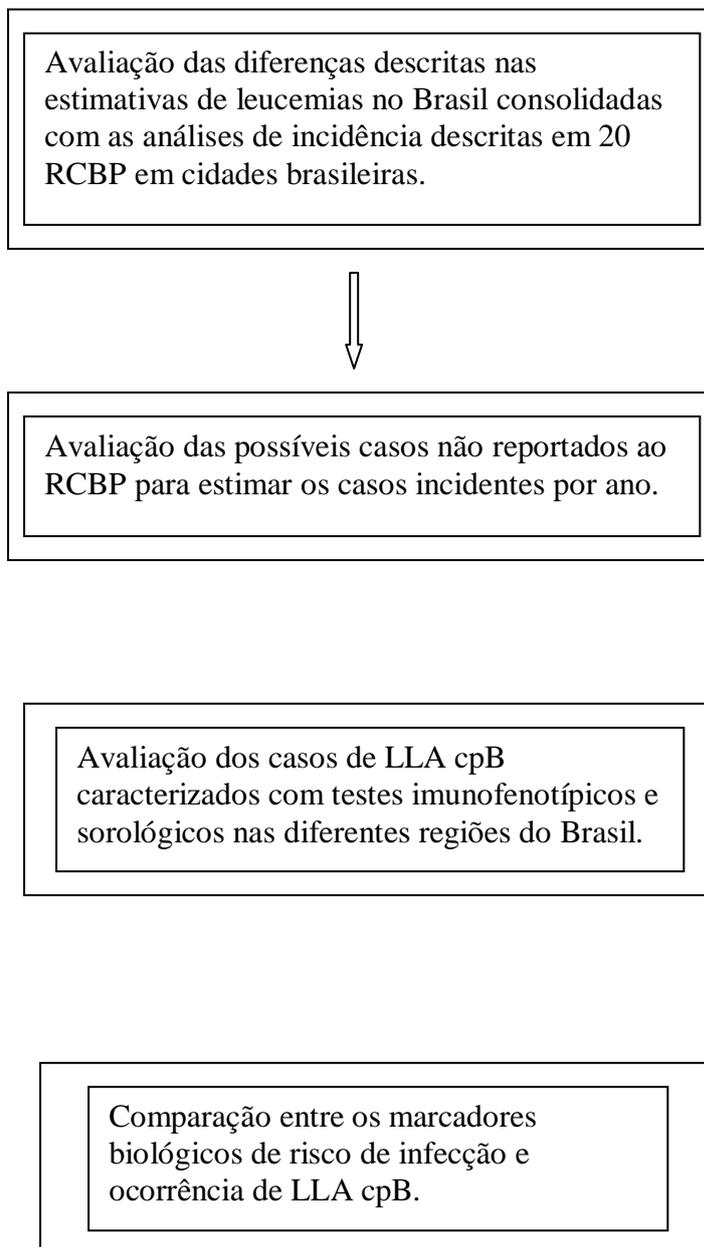
Secundários

1. Estimar a incidência de LLA em crianças em diferentes cidades brasileiras;
2. Estimar a o número de casos de LLA não reportados aos registros de base populacional de algumas cidades brasileiras;
3. Determinar a prevalência de anticorpos contra Parvovírus B19 e Herpesvírus-6 nas crianças com leucemia aguda;
4. Determinar a distribuição dos valores da proteína C reativa em uma amostra de pacientes com leucemia aguda, para avaliar exposições infecciosas;
5. Verificar a associação entre leishmaniose visceral e leucemia aguda no diagnóstico diferencial entre estas duas doenças em regiões endêmicas do Brasil.

CAPÍTULO V:

Métodos

I. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ESTUDO



O esquema acima sumariza o estudo. Os detalhes são descritos nos artigos no capítulo de resultados deste manuscrito. A seguir encontra-se uma descrição generalizada da análise realizada.

Estudamos crianças cujo material biológico foi enviado entre 1999 e 2007, de vários estados brasileiros, para diagnóstico e caracterização biológica de leucemia antes de qualquer tratamento anti-neoplásico. Esta coorte foi estabelecida a partir da formação de uma rede de laboratórios que operacionaliza o diagnóstico de neoplasias pediátricas no Brasil. As amostras de aspirado de medula óssea e/ou de sangue periférico foram encaminhadas juntamente com uma ficha contendo informações demográficas, clínicas e laboratoriais, necessárias para caracterização dos casos. Foram realizadas as análises imunofenotípicas para caracterizar as diferenças dos subtipos de leucemias agudas de acordo com os critérios EGIL nas regiões do Brasil. Para avaliação dos casos de LLA quanto à presença ou não de alterações moleculares e subtipos imunofenotípicos, foram realizadas as análises das frequências observadas por período do ano e faixas etárias dos casos de LLA cpB.

Comparados as variáveis comuns da ficha de encaminhamento e os resultados laboratoriais (marcadores de infecção) entre os pacientes com diagnóstico confirmado de LLA e aqueles cujos resultados laboratoriais descartaram o diagnóstico de leucemia aguda ou outra doença maligna. Estes pacientes foram considerados como grupo controle devido à exclusão diagnóstica de leucemia. Casos e controles foram analisados de acordo com região geográfica e faixa etária para avaliação de riscos nas análises de marcadores de infecção viral e parasitária.

II. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Crítérios de inclusão:

- Crianças com idade inferior a 19 anos no momento do diagnóstico;
- Diagnóstico confirmado de LLA por critérios morfológicos e imunofenotípicos, segundo os critérios da OMS;

Critérios de exclusão:

- Recusa em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido no hospital de origem.
- Presença de síndromes genéticas.
- Diagnóstico confirmado de outras neoplasias malignas (neuroblastoma, histiocitose, metástases, etc).
- Diagnóstico de outros tipos de leucemia ou mielodisplasia.
- Indefinição quanto à classificação do subtipo de LLA.
- Leucemias bifenotípicas e bilineais.
- Imunodeficiência congênita ou adquirida.

III. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realização da análise estatística foi utilizado um banco de dados realizado com o programa Excel com os dados demográficos de todos os pacientes, variáveis clínicas, resultados da imunofenotipagem, biologia molecular e análises sorológicas.

Os cálculos estatísticos foram feitos com o auxílio dos programas SPSS 11.0 e Epi Info (Epi Info Version 5.01a - March 1991. J Dean, A Dean, A Burton, R Dicker, Centers for Disease Control, Atlanta, GA 30333).

Os valores de "p" foram calculados pelos métodos de chi-quadrado (97), quando as variáveis eram categóricas e pelos testes t de Student ou ANOVA quando as variáveis eram contínuas. O cálculo bilateral (ou bicaudal) foi utilizado por não se conhecer da literatura o efeito esperado. Os valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significantes estatisticamente.

Para estimativa do número de casos de leucemia e avaliação da magnitude da subnotificação dos registros utilizamos a técnica de captura-recaptura. Foram utilizados como fontes o registro de base populacional referente às cidades de Belo Horizonte, Recife e Salvador e o registro de casos novos encaminhados para diagnóstico no laboratório do INCA, referente a estas mesmas cidades no ano de 2001.

Os casos foram comparados por nome, data de nascimento, nome da mãe e cidade de origem. A comparação foi manual devido ao reduzido número de casos. O número de casos estimado foi calculado utilizando a fórmula de Chapman (98;99). Com o número de casos estimado foi calculada a incidência estimada para cada cidade.

IV. METODOLOGIA DOS TESTES SOROLÓGICOS E BIOQUÍMICOS UTILIZADOS

Para realização da sorologia para Parvovírus B19 foi realizado o imunoensaio enzimático (ELISA), utilizando o kit Biotrin Parvovirus B19 IgM and IgG Enzyme Immunoassay, de acordo com as instruções do fabricante.

Este kit é um teste de microcaptura para detecção de anticorpos IgM e IgG direcionados ao Parvovírus B19, podendo ser utilizado com amostras de plasma ou soro. Foram utilizados controles positivo e negativo. Os testes foram utilizados com amostra de plasma dos pacientes e de controles, congeladas a -80°C conforme as orientações do fabricante. A positividade do exame foi determinada em relação a um valor de referência calculado (COV), que determina o padrão de positividade do teste. Leituras acima do valor de $\text{COV} \times 1,1$ foram consideradas reativas e as amostras com resultado abaixo do valor do $\text{COV} \times 0,9$ foram não-reativas.

Para realização da sorologia para herpesvírus humano 6 (HHV-6) foi utilizado o kit PANBIO ELISA IgG, que detecta qualitativamente os anticorpos IgG para HHV-6 no soro ou plasma dos pacientes. A técnica utilizada foi a indicada pelo fabricante.

A dosagem da proteína C reativa foi realizada pelo método de imunoturbidimetria com o kit Cobas CRPLX, utilizando o soro ou plasma dos pacientes, de acordo com as instruções do fabricante.

Para o estudo de leishmaniose foram realizados os testes: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) utilizando o kit. IFI - LEISHMANIOSE HUMANA Bio-Manguinhos (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos) IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE HUMANA, conforme instruções do fabricante. Valores de titulação maiores ou iguais a 1:80 foram considerados positivos e valores inferiores a 1:40 foram considerados negativos. Os valores intermediários foram considerados indeterminados.

V. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

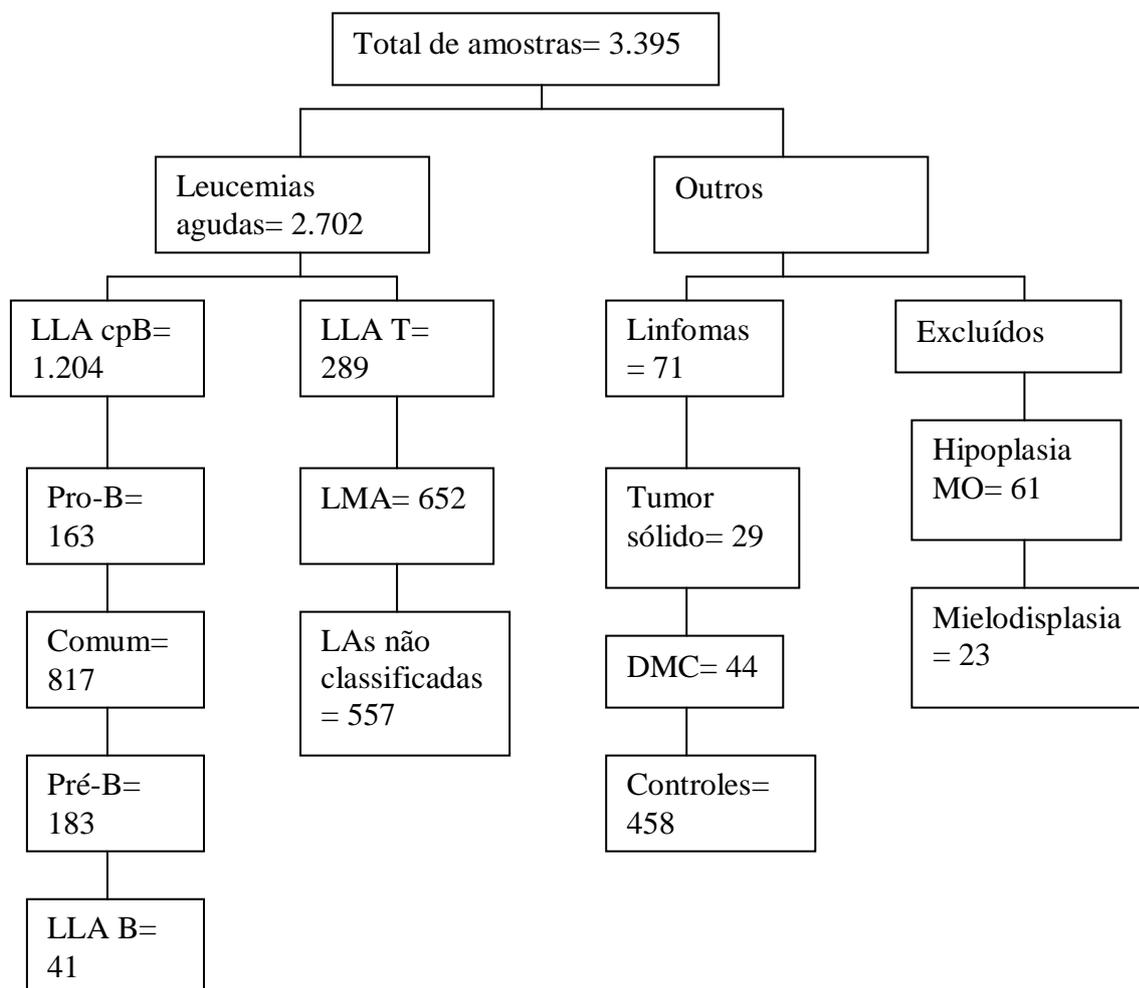
Este estudo foi aprovado pelo CEP do INCA sob o número 070/07.

CAPÍTULO VI:

Casuística

No período de 1999 a 2007 o laboratório recebeu 3.395 amostras para avaliação diagnóstica de crianças e adolescentes com idade inferior a 18 anos. Destes, 1.493 foram confirmados como LLA com a classificação EGIL bem estabelecida. Portanto, foram excluídos das análises os casos que ainda não foram classificados adequadamente. Alguns destes casos provavelmente tiveram as análises prejudicadas devido ao uso prévio de corticosteróides que tem efeito modulador na expressão dos antígenos de superfície, como o CD 10 ou devido a viabilidade celular para análises devido ao tempo de viagem da amostra ou condições de preservação no transporte. A figura 7 mostra a distribuição dos casos avaliados.

Figura 7: Distribuição dos casos analisados.



Abreviações: DMC= doença mieloproliferativa; LAs= leucemias agudas; MO= medula óssea; LLA cpB= leucemia linfóide aguda de células precursoras B; LLA T= leucemia linfóide aguda de células T; LMA= leucemia mielóide aguda; pro-B= leucemia linfóide aguda pro-B; comum= leucemia linfóide aguda de células B comum; Pré-B= leucemia linfóide aguda pré-B; LLA B= leucemia linfóide aguda de células B maduras.

Nas tabelas 6 e 7 podemos observar a distribuição dos casos de LLA de acordo com a região geográfica de origem, por faixa etária, gênero e cor da pele. A seguir, na figura 8, verificamos o número de casos de leucemia por faixa etária e subtipo de leucemia.

Tabela 6: Distribuição dos casos de LLA de acordo com a região geográfica de origem.

	Sudeste N=493	Centro-oeste N= 258	Nordeste N=677	Outras Regiões* N= 65	Total N=1493
LLA comum	232 (28,4%)	156 (19,1%)	389 (47,6%)	40 (4,9%)	817
LLA pró-B	67 (40,8%)	30 (18,3%)	58 (35,4%)	8 (5,5%)	163
LLA pré-B	75 (41,0%)	12 (6,7%)	91 (49,7%)	5 (2,6%)	183
LLA B	10 (24,4%)	26 (63,4%)	2 (4,9%)	3 (7,3%)	41
LLA T	109 (37,7%)	34 (11,8%)	137 (47,4%)	9 (3,1%)	289

Abreviações: LLA T= leucemia linfóide aguda de células T; LLA pro-B= leucemia linfóide aguda pro-B; LLA comum= leucemia linfóide aguda de células B comum; LLA pré-B= leucemia linfóide aguda pré-B; LLA B= leucemia linfóide aguda de células B maduras.

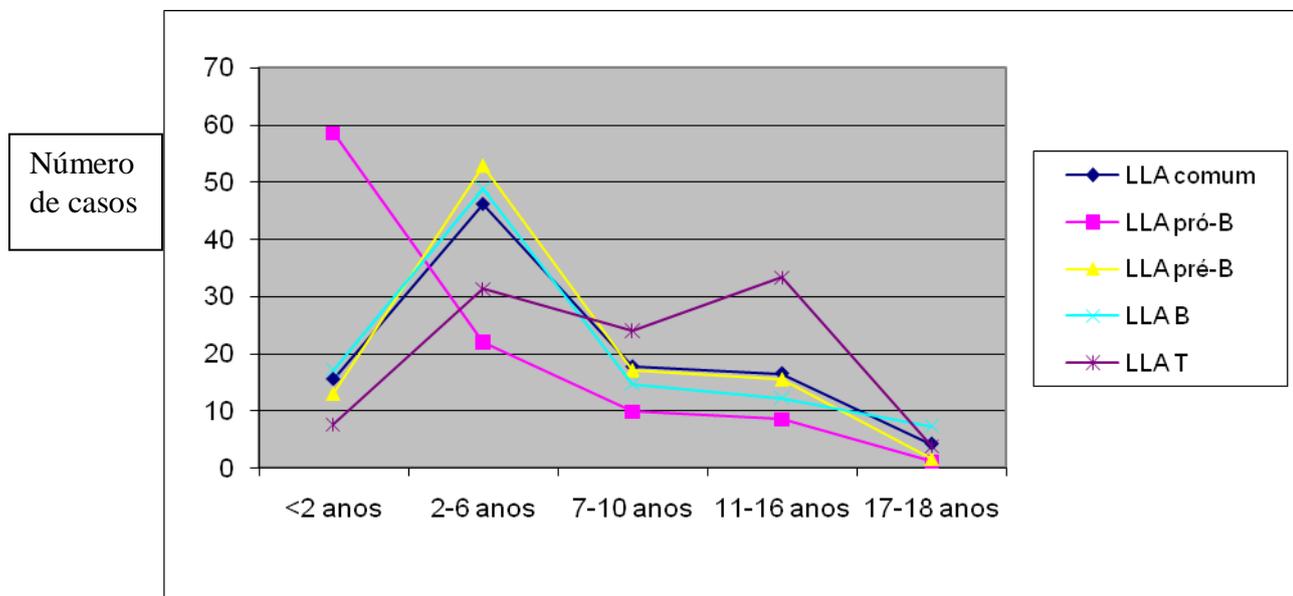
* Outras regiões= casos esporádicos encaminhados das Regiões Norte e Sul para revisão diagnóstica

Tabela 7: Características demográficas dos casos selecionados para análise.

	LLA pró-B N=163	LLA- comum N=817	LLA pré-B N=183	LLA-B N=41	LLA-T N=289
Sexo feminino	77 (47%)	373 (45,6%)	70 (38,3%)	15 (36,6%)	79 (27,4%)
Sexo masculino	86 (53%)	444 (54,4%)	113 (61,7%)	26 (63,4%)	210 (72,6%)
Branco	370 (45,3%)	83 (50,8%)	82 (45%)	18 (44,1%)	105 (36,5%)
Não-branco	447 (54,7%)	80 (49,2%)	101 (55%)	23 (55,9%)	184 (63,5%)

Abreviações: LLA T= leucemia linfóide aguda de células T; LLA pro-B= leucemia linfóide aguda pro-B; LLA comum= leucemia linfóide aguda de células B comum; LLA pré-B= leucemia linfóide aguda pré-B; LLA B= leucemia linfóide aguda de células B maduras.

Figura 8: Distribuição do número de casos de LLA de acordo com subtipo e faixa etária.



CAPÍTULO VII:

Resultados

1. Incidência de LLA em 16 registros brasileiros.

A seguir estão os resultados deste estudo, no artigo intitulado “*Childhood Leukaemia Incidence in 16 Brazilian Population-Based Cancer Registries*”.

Sumarizando: Neste estudo descrevemos a incidência de leucemia aguda da infância baseada em dados de 16 Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP), no período de 1997 a 2004. A mediana da taxa de incidência ajustada para idade (0-14 anos) foi 4,7 para 100.000 habitantes. Houve um pico de incidência na idade de 3 anos para os casos de LLA.

Submetido ao Br J Cancer, em setembro 2009.

Childhood Leukaemia Incidence in 16 Brazilian Population-Based Cancer Registries

Reis RS*, de Camargo B*, **Azevedo-Silva F**, Ferreira JMO, Oliveira JFP, Santos MO, Pombo-de-Oliveira MS.

ABSTRACT

BACKGROUND: There is a tendency showing higher incidence rates of childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL) in more resource-rich countries; whereas lower rates are seen in more income-deprived countries.

METHODS: We describe the incidence of childhood acute leukaemia in Brazil based on data from 16 PBCRs, located in cities throughout 5 geographical regions, for the period between 1997 and 2004 (not equally distributed).

RESULTS: The median age-adjusted incidence rate (AAIR) of leukaemia in children aged 0-14 was 47.0 per million, and a similar pattern was observed in Mexico. Different AAIR was found regarding ALL and acute non-lymphoblastic leukaemia (ANLL), ranged from 24.8 to 76.84 per 1,000,000 children; Manaus, despite the fact that being located in a poor area of the country has the highest AAIR (56.6 per million) of ALL. Goiania, by far, has the highest AAIR (24.5 per million) of ANLL. The median age-specific incidence rates in all Brazilian PBCRs demonstrated a marked peak in incidence of ALL at age 3, in both genders.

CONCLUSION: This is the first population-based study of childhood leukaemia that describes substantial regional differences in the incidence of acute leukaemia in Brazil. Our findings are useful to monitoring further time trends in the incidence of childhood leukaemia in different geographical settings worldwide.

Keywords: acute lymphoblastic leukaemia; childhood; acute non-lymphoblastic leukaemia; incidence; population-based cancer registries.

Introduction

Leukaemia is the most common type of cancer in children under 15 years old, in developed societies, where it corresponds to 25-35% of all malignancies in this age (Parkin *et al*, 1988). Data showing variations in the incidence of childhood leukaemia according to geographical cancer registries have been described, with considerable interest in analyzes that are related to measures of population-mixing, indicator of socio-economic status (SES), time trends, ethnicity among other variables associated with environmental factors (Stiller *et al*, 2008). Acute leukaemia is recognized as a disease with heterogeneous characteristics and different biological aspects, and the great progress in cure rates for paediatric leukaemia has been achieved, along with an increment of information about the pathogenesis of the disease. Current efforts are primarily focusing on further tailor-made treatment and the identification of potential causes that trigger the mechanisms that lead to childhood leukaemia. Five-year survivals of children with leukaemia have remarkable improvements in subgroups defined by biological characteristics, age sex and geographical categories (Coebergh *et al*, 2006). Albeit not significant, there is a suggestion of an overall increase in leukaemia, especially ALL in children ages 5 through 9, in whom an increase was initially observed (1992–1999: APC, 3.6%; 95% CI, 0.5%–6.8%) in United States (Linabery and Ross, 2008). In European countries, significant increases in all leukaemia were recently demonstrated by the average annual percentage change of 0.7% ($p > 0.001$) (Steliarova-Foucher *et al*, 2004). Positive associations between high SES and ALL in children have been reported in different studies (Alexander *et al*, 1999; Borugian *et al*, 2005). The results of these studies were heterogeneous and varied according to location, time, study design, and measure of SES. Such analyses generally cover comparatively long periods of time, with quality of diagnosis of cancer and the denominator from census estimates (Poole *et al*, 2006; Li *et al*, 2008). In countries such as Brazil, with continental dimensions and socioeconomic disparities across geographical regions, publications based on population-based cancer registries were still scarce and pool analyses were compromised by the effects of unstable data and inadequate data ascertainment, random variations jeopardized by economic factors. Therefore, the majority of childhood leukaemia incidence rates are still vastly unknown although data have been reported from regional settings (Ribeiro *et al*, 2008; Curado *et al*, 2009). In the present study we describe, for the first time, the incidence of childhood leukaemia in different cities of Brazil, analysing the period of 1997–2004, which could be relevant for monitoring further time trends in the incidence of childhood leukaemia in Brazil.

Methods

For this study, we selected data from 16 out of 20 PBCR located in different cities throughout Brazil that met the standard criteria recognized by the International Agency for Research in Cancer (IARC) parameters regarding quality data. Data from 4 PBCR were excluded due to the following factors: 1) Palmas, due to scattered case ascertainment and poor data quality; 2) Campo Grande and Vitória, because their data collections covered a period of less than 3 years; and 3) Campinas PBCR because of the limitations of the period covered in the study (1991-95).

Briefly, variables for each case included demographic information such as patient name, patient's mother's name, date of birth, gender, complete residential address, information on diagnosis (data and basis of diagnosis by morphology and/or histopathology of peripheral blood and bone marrow). Diagnoses were grouped according to the International Classification

of Diseases for Oncology (ICD-02). Leukaemia was subdivided into 5 subgroups: acute lymphoid leukaemia (ALL), acute non-lymphocytic leukaemia (ANLL), chronic myeloid leukaemia (CML), other specified leukaemia (OSL) and unspecified leukaemia (UL). To test the geographical differences in incidence we grouped PBCR into five Brazilian regions (North, Northeast, South, Southeast and Midwest) as described elsewhere (de Camargo *et al*, 2009).

The Brazilian ethnicity/race stratification is very difficult to characterize with the same criteria usually applied in the United States, Europe, Asia and/or Africa. Skin colour denotes the Brazilian equivalent of the English term “race” and is based on a complex phenotypic evaluation that takes into account, besides skin complexion, hair type and shape of nose and lips (Parra *et al*, 2003). In this report, race variables were considered according to the definition provided by the *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística* (IBGE) census (www.ibge.gov.br/home). The distribution was mainly categorized into 5 groups: i) Whites, mainly Brazilians from European descent; ii) Blacks, Brazilians from African descent; iii) Intermediates, Brazilians with a mixture of European and African descent; iv) Native Amerindians; and v) Asians, Brazilians with Japanese or Chinese origins.

The underlying population-at-risk for each region covered for children was obtained from the IBGE and all the standard and recommended variables collected by each PBCR included are described in more details elsewhere (de Camargo *et al*, 2009).

Statistical methods

Age-adjusted incidence rates (AAIR) were calculated by the direct method using the world population proposed by age groups less than 14 years old (Doll *et al*, 1966). The incidence rate per 1,000,000 inhabitants refers to the risk of new leukaemia cases. For all PBCRs included, analyses included the number of new cases, the absolute and relative values, age-adjusted incidence rates (AAIRs) according to acute leukaemia subtype, and sex. The median of age-specific incidence rates (ASIR) by leukaemia subtype in each PBCR and were calculated using resume measurement from 14 PBCR, excluding Goiania and São Paulo PBCRs. Per time period, reported incidence rates are average values (Percy *et al* 1990).

Results

Although the time-point of the data collection for all PBCRs was not equally distributed, the period analysed was from 1997 to 2004 (Table 1) and collected date were obtained consecutively for at least 4 years. The AAIR in both genders of all paediatric leukaemia in 16 PBCRs varied from 24.8 to 76.8 per million; the lowest being in Aracajú (24.8) and Salvador (25.6) and the highest in Goiania (71.0), Cuiabá (71.1) and Manaus (76.8); the AAIR was slightly higher in males, except in 3 cities (Jaú, Curitiba and Belém), in which the M/F ratios of 0.75, 0.82, 0.88 were respectively found as shown in Table 1.

For children younger than age 1 the highest AAIR was seen in Cuiabá for both genders: female 12 and male 6.7 per million, respectively, and the lowest was found in Brasilia, for both genders, 0.9 per million; children ages 1-4 had the highest AAIR in all registries with a median average of 17.3 for females and 18.7 for males per million; children in 5-9 years of age had median average of 11.0 for females and 13.2 for males per million; children in 10-14 years of age had median average of 6.0 for females and 9.3 for males per million.

The distribution of leukaemia in different race groups was analysed and demonstrated a higher percentage of unknown category in the majority of the registries, reaching more than 80% in

Recife, João Pessoa and Brasília. In only 4 PBCR [Curitiba, Porto Alegre, Jaú and Natal] the percentage of unknown category was less than 12% of unknown race was observed. Among these 4 PBCR, White children with leukaemia correspond to 76%, 90%, 75% and 40% in Curitiba, Porto Alegre, Jaú and Natal, respectively (Table 2). Two PBCRs from São Paulo and Goiania were excluded due to the lack of this particular information.

Overall, the most common leukaemia subtype was ALL, corresponding to 61-87.5% of all cases in all PBCR registries. In three registries, Fortaleza, Goiania and João Pessoa, ANLL correspond to more than 25% frequency of all leukaemias [26 %, 33% and 30%, respectively]. The median AAIR observed for ALL was 34.8 per million, the highest being AAIR presented in Manaus (56.6 per million), whereas the lowest AAIR was found in Salvador (17.8 per million). The median AAIR observed for ANLL was 9.8 per million. Aracajú has the lowest AAIR for ANLL (3.1 per million), whereas the highest AAIR for ANLL was seen in Goiania with 24.5 childhood cases per million.

The median ASIR in all Brazilian PBCRs is shown in Figure 1, demonstrated a marked peak in incidence at age 3, in both genders in all leukaemia, pronounced by ALLs with ASIR 73.0 per million. Data from São Paulo and Goiania were not included.

The median ASIR according to leukaemia subtype and gender is shown in Figure 2 (a,b). There was a sharp peak in incidence at age 2 and 3 in ALL for females and males, respectively. However, another marked peak in incidence of leukaemia at age 4 was observed in females, whereas there was a peak at age 6 for males. The peak in males at age 6 was 40.0, whereas in females it was 27.2 per million.

Discussion

The aetiology of childhood leukaemia remains elusive and population-based incidence data can provide insights among different demographic groups. The PBCR remains one of the major sources of information for etiological studies and cancer control activities. Recently we analyzed the incidence of childhood cancers according to the data contained in 14 PBCRs, using quality criteria that allow us to report descriptive epidemiological data for Brazil (de Camargo *et al*, 2009). This is the first report of the incidence rate of childhood leukaemia provided by 16 PBCRs located in different cities from all Brazilian geographical regions. Unlike previous reports (de Camargo *et al*, 2009), three PBCRs were included herein (Belém, Cuiabá and Belo Horizonte) and more information is added to represent registries across most regions of the country.

Regarding childhood leukaemia, there are several reports in medical literature pointing out geographical differences in incidence patterns (Coebergh *et al*. 2006; Clavel *et al*, 2004). The majority of these data have also been documented in North American and European populations (Steliarova-Foucher, *et al*. 2004; Li *et al* 2008). The PBCRs in low and middle income countries cover only a small proportion of childhood cancer in the developing world even though it is considered of great value to guide cancer diagnosis and care (Valsecchi and Steliarova-Foucher, 2008; Curado *et al*, 2009).

Some Brazilian data had been recorded in the past regarding incidence rates of childhood leukaemia based on 5 PBCRs (Parkin *et al* 1988; Stiller and Parkin, 1996; Parkin *et al*, 1998). The pitfall of these data concerns the representativeness of Brazil and the quality of the registries at that time point. Before 1996, the data might have been jeopardized by income disparities, lack of access to healthcare, high life expectancy and illiteracy rates in some regions in the country (Messias, 2003). More recently, income inequality and health indicators

have been analyzed and both neonatal and post-neonatal mortality rates decreased in poorer areas (Goldani *et al*, 2002). However, public data sets from the Brazilian Ministry of Health demonstrated that the highest mortality rate among malignancy occurring in children is due to acute leukaemia (www.datasus.gov.br/catalogo/sim.htm).

Because Brazil has a large population and huge geographical variations regarding socioeconomic status and environmental factors, it is important to assess the impact of childhood leukaemia incidence rate distribution. The median incidence rate observed in the analysis of 16 PBCRs was 49.8 per million, with a similar pattern to that observed in Mexico (Fajardo-Gutiérrez *et al*, 2007). It is clear that differences in leukaemia incidence rates varied according to PBCRs demonstrating that even in the same region there are major differences. For instance, in the North and Northeast although 6 out of 8 PBCRs present lower AAIR, the highest rate in ALL was observed in Manuas; in contrast the Midwest, Southeast and South PBCRs present the more homogeneous rate between 42.4 and 53.1, with the exception of Belo Horizonte, São Paulo and Brasília, which display lower rates. The incidence in São Paulo remains stable when comparing the present data with previous publications (Parkin *et al* 1988; Parkin *et al*, 1998).

Regarding ANLL, in seven PBCRs a high incidence of ANLL was also observed (11.3 to 24.5 per million) corroborating with similar result found in 4 out of 10 jurisdictions of the Mexican republic (Fajardo-Gutiérrez *et al*, 2007). The incidence rate for ANLL in children in the United States was 10.3, 5.0 and 6.2 per million in age groups 0.1 to 4, 5 to 9, and 10 to 14, respectively, and the highest rate was found among Hispanics in California (Glazer *et al*, 1999; (Douer, 2000). Similar rates were observed in European countries. This excess of ANLL is being reported for the first time in South American children, as far as we know based on PBCR data. The explanation for these differences needs further investigation of whether the differences could be related with environmental factors or genetic susceptibility.

A striking difference in the incidence of ALL has been reported between White and African-American children in the United States in most age groups. As previously reported, the Brazilian population has special features according to its ethnic background. The population was framed by extensive miscegenation between Amerindians, Europeans and Africans, is one of the most variable in the world. Using a panel of ten ancestry-informative genetic markers, the authors concluded that at the individual level, skin colour as determined by physical evaluation was a poor predictor of European-derived (Whites) or African-derived (Blacks) populations (Pimenta *et al*, 2006). In this sense it is very difficult to analyze the incidence rate adjusted by race due to different interpretations in race criteria. Another confounding factor is how closed are the socio-economic status and race in Brazil. Therefore, the results observed in this study regarding incidence of childhood leukaemia must be analyzed prudently for the aforementioned reasons. We believe that maternal education and income distribution reflect the social environment experienced by all participants more so than the ethnic profile (www.tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2006/matriz.htm; Ribeiro *et al*, 2008).

The population at risk in the geographical regions where the PBCR are located are social and economically distinct. Those in the South, Southeast and Midwest regions are richer, whereas those in North and Northeast are poorer. Because childhood leukaemia must be treated in a specialized care unit, we cannot rule out that leukaemia occurring in population of low income status could be underreported or misdiagnosed. In this sense, we are facing a straying

difference in the geographical regions; for instance, Manaus has the highest AAIR, which is the opposite of what is expected. It is a city located in a poor area of the country, with the highest child mortality rate in the first year of life (2.49/100.000/year), a high rate of female illiteracy and the lowest number of specialist healthcare professionals. This finding underscores the necessity of developing analytical studies with the aim of understanding the risk factors that these paediatric population settings have in developing leukaemia.

For decades infectious exposure has been proposed to B cell precursor ALL (Bpc-ALL) aetiology, nevertheless no specific agent has been so far documented for paediatric leukaemia (Smith *et al*, 1999; Priftakis *et al*, 2003), while some Hodgkin's lymphoma and Burkitt lymphoma are consistently associated with the Epstein-Barr virus (Armstrong *et al*, 1993; McKenzie *et al*, 1999). An unusual pattern of population mixing that had occurred in some UK regions, with a high level of inward and outward migration that would have increased the incidence of ALL (Kinlen, 1995). In Bpc-ALL, viral infection may be the proxy for the „secondary“ mutations, through the immunological response stress, required to guarantee the persistence of abnormal clone started during foetal life (Greaves, 2007).

In the previous decades epidemiological surveys have revealed a 10-fold variation in the incidence of childhood ALL worldwide, indicating a geographic correlation with environmental sets (Greaves *et al*, 1993; Parkin *et al*, 1988). Albeit a speculation we suggest that Brazil can be considered in epidemiological transition linked as presents a “*new environmental set*”, with mixture of modern hygiene settings, without the complete replacement of pre-industrialized conditions. In this sense, poor housing conditions are still a reality for many population sectors in most big cities, including deficient sanitation and overcrowded environment. In the North and Northeast cities unsatisfactory results obtained by vectors control programs contributed to allow the persistence of an “ancient” pattern of epidemiological risk factors.

The lower incidence rate of childhood ALL observed in places like Aracaju and Salvador might also be explained by “protective” mechanisms common to less developed areas, such as breastfeeding rate, family aggregation and infections.

In 1997, the Brazilian Ministry of Health, acting in partnership with the *Banco do Brasil Foundation*, developed the *Programa Criança e Vida*, whose aim was to equip eight laboratories in cities located in the Northeast (2), Southeast (4), Midwest (1) and South (1) of Brazil, in order to provide the diagnosis of paediatric cancer in impoverished areas. Since then, there was a clear improvement in terms of recognition and classification of leukaemia in Brazil, as well as childhood cancer treatments (Pombo-de-Oliveira *et al*, 2008). Since the beginning of the year 2000 the coverage of cases reached completeness due to registry-based search for cancer patients in different hospitals with tertiary healthcare. Therefore, one should be cautious when evaluating incidences in different regions of such a large country and blame the possibility of under-notification cases. Further analysis is required to analyze these differences according to immunophenotyping profile applying the new International Classification of Disease ICD-O-3 (Fritz, 2000) to test whether age incidence of childhood Bcp-ALL in different Brazilian settings reflects the differences found in this report.

Finally, the incidence rates found in some Brazilian cities were similar to those reported in developed countries, although it also shows that incidences vary according to each city within the country.

Acknowledgments

We are grateful to all of the coordinators of the PBCRs in Brazil that contributed to this work: Carlos Anselmo Lima (PBCR-Aracajú); Lucrécia A. Cabral Formigosa (PBCR-Belém); Berenice N. Antoniazzi (PBCR-Belo Horizonte); Maria Ilma Castilho (PBCR-Cuiabá); Cyntia Asturian Laporte (PBCR-Curitiba); Maria Cristina Scanduzzi (PBCR-Distrito Federal); Miren Maite Uribe Arregi (PBCR-Fortaleza); José Carlos de Oliveira (PBCR-Goiânia); José Getúlio Martins Segalla (PBCR-Jaú); Josefa A. P. de Aquino (PBCR-João Pessoa); Anasselis Veiga de Lima (PBCR-Manaus); Maria Suely Lopes Correa (PBCR-Natal); Viviane Lilia Araújo Ribeiro (PBCR-TO); Paulo Recena Grassi (PBCR-Porto Alegre); Cláudia C. Lima de Castro (PBCR-Recife); Elmando Sampaio Silva (PBCR-Salvador); Fernanda Alessandra Silva (PBCR-São Paulo).

References

- Alexander FE, Ricketts TJ, McKinney PA, Cartwright RA (1990) Community lifestyle characteristics and risk of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet*, **336**, 1461-1465.
- Armstrong AA, Alexander FE, Paes RP, Morad NA, Gallagher A, Krajewski AS, Jones DB, Angus B, Adams J, Cartwright RA (1993) Association of Epstein-Barr virus with pediatric Hodgkin's disease. *Am.J.Pathol.*, **142**, 1683-1688.
- Borugian MJ, Spinelli JJ, Mezei G, Wilkins R, Abanto Z, McBride ML (2005) Childhood leukemia and socioeconomic status in Canada. *Epidemiology*, **16**, 526-531.
- Clavel J, Goubin A, Auclerc MF, Auvrignon A, Waterkeyn C, Patte C, Baruchel A, Leverger G, Nelken B, Philippe N, Sommelet D, Vilmer E, Bellec S, Perrillat-Menegaux F, Hemon D (2004) Incidence of childhood leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in France: National Registry of Childhood Leukaemia and Lymphoma, 1990-1999. *Eur.J.Cancer Prev.*, **13**, 97-103.
- Coerbergh JW, Reedijk AM, de Vries E, Martos C, Jakab Z, Steliarova-Foucher E, Kamps WA (2006) Leukaemia incidence and survival in children and adolescents in Europe during 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur.J.Cancer*, **42**, 2019-2036.
- Curado MP, Voti L, Sortino-Rachou AM (2009) Cancer registration data and quality indicators in low and middle income countries: their interpretation and potential use for the improvement of cancer care. *Cancer Causes Control*, **20**, 751-756.
- de Camargo B, de Oliveira SM, Rebelo MS, de Souza RR, Ferman S, Noronha CP, Pombo-de-Oliveira MS (2009) Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: First report of 14 population-based cancer registries. *Int.J.Cancer*. DOI 10.1002/ijc.24799
- Doll R, Payne P, Watherhouse JAH (1966) *Cancer Incidence in Five Continents*, Springer, Berlin.
- Douer D. (2000) Acute promyelocytic leukemia. *Curr.Treat.Options.Oncol.*, **1**, 31-40.
- Fajardo-Gutierrez A, Juarez-Ocana S, Gonzalez-Miranda G, Palma-Padilla V, Carreon-Cruz R, Ortega-Alvarez MC, Mejia-Arangure JM (2007) Incidence of cancer in children residing in ten jurisdictions of the Mexican Republic: importance of the Cancer registry (a population-based study). *BMC.Cancer*, **7**, 68.
- Fritz AG. (2000) World Health Organization. International Classification of Disease for Oncology.3rd ed. WHO, Geneva (Switzerland).
- Glazer E R, Perkins CI, Young JL, Jr, Schlag RD, Campleman SL, Wright WE (1999) Cancer among Hispanic children in California, 1988-1994: comparison with non-Hispanic white children. *Cancer*, **86**, 1070-1079.
- Goldani MZ, Benatti R, Da Silva AA, Bettiol H, Correa JC, Tietzmann M, Barbieri MA (2002) Narrowing inequalities in infant mortality in Southern Brazil. *Rev.Saude Publica*, **36**, 478-483.
- Greaves MF, Colman SM, Beard ME, Bradstock K, Cabrera ME, Chen PM, Jacobs P, Lam-Po-Tang PR, MacDougall LG, Williams CK, (1993) Geographical distribution of acute lymphoblastic leukaemia subtypes: second report of the collaborative group study. *Leukemia*, **7**, 27-34.
- Greaves M (2006). Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*, **6**, 193-203.
- Kinlen LJ (1995) Epidemiological evidence for an infective basis in childhood leukaemia *Br J. Cancer*, **71**, 1-5
- Li J, Thompson TD, Miller JW, Pollack LA, Stewart SL (2008) Cancer incidence among children and adolescents in the United States, 2001-2003. *Pediatrics*, **121**, e1470-e1477.
- Linabery AM, Ross JA (2008) Childhood and adolescent cancer survival in the US by race and ethnicity for the diagnostic period 1975-1999. *Cancer*, **113**, 2575-2596.

- MacKenzie J, Gray D, Pinto-Paes R, Barrezueta LF, Armstrong AA, Alexander FA, McGeoch DJ, Jarrett RF (1999) Analysis of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 subtypes in EBV-associated lymphomas from Brazil and the United Kingdom. *J.Gen.Virol.*, **80** (Pt 10), 2741-2745.
- Messias E. (2003) Income inequality, illiteracy rate, and life expectancy in Brazil. *Am.J.Public Health*, **93**, 1294-1296.
- Parkin DM, Kramarova E, Draper GJ, Masueyr E, Michaelis J, Neglia J, Qureshi S, Stiller C. (1998) *International Incidence of Childhood Cancer*, p. 391. International Agency for Research on Cancer, Lyon (France).
- Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, Bieber CA. (1988) The international incidence of childhood cancer. *Int.J.Cancer*, **42**, 511-520.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **100**, 177-182.
- Percy C, van Holten V, Muir C (1990) *International Classification of Diseases for Oncology*, 2nd ed, p. 144. Geneva (Switzerland).
- Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, Rocha J, Bydlowski SP, Pena SD (2006) Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum.Hered.*, **62**, 190-195.
- Pombo de Oliveira MS, Koifman S, Vasconcelos GM, Emerenciano M, de Oliveira NC. (2009) Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. *Blood Cells Mol.Dis.*, **42**, 121-125.
- Poole C, Greenland S, Luetters C, Kelsey JL, Mezei G. (2006) Socioeconomic status and childhood leukaemia: a review. *Int.J.Epidemiol.*, **35**, 370-384.
- Priftakis P, Dalianis T, Carstensen J, Samuelsson U, Lewensohn-Fuchs I, Bogdanovic G, Winiarski J, Gustafsson B. (2003) Human polyomavirus DNA is not detected in Guthrie cards (dried blood spots) from children who developed acute lymphoblastic leukemia. *Med.Pediatr.Oncol.*, **40**, 219-223.
- Ribeiro KB, Buffler PA, Metayer C. (2008) Socioeconomic status and childhood acute lymphocytic leukemia incidence in Sao Paulo, Brazil. *Int.J.Cancer*, **123**, 1907-1912.
- Roman E, Simpson J, Ansell P, Kinsey S, Mitchell CD, McKinney PA, Birch JM, Greaves M, Eden T. (2007) Childhood acute lymphoblastic leukemia and infections in the first year of life: a report from the United Kingdom Childhood Cancer Study. *Am.J.Epidemiol.*, **165**, 496-504.
- Smith MA, Strickler HD, Granovsky M, Reaman G, Linet M, Daniel R, Shah KV (1999) Investigation of leukemia cells from children with common acute lymphoblastic leukemia for genomic sequences of the primate polyomaviruses JC virus, BK virus, and simian virus 40. *Med.Pediatr.Oncol.*, **33**, 441-443.
- Steliarova-Foucher E, Stiller C, Kaatsch P, Berrino F, Coebergh JW, Lacour B, Parkin M. (2004) Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe since the 1970s (the ACCISproject): an epidemiological study. *Lancet*, **364**, 2097-2105.
- Stiller CA, Kroll ME, Boyle PJ, Feng Z. (2008) Population mixing, socioeconomic status and incidence of childhood acute lymphoblastic leukaemia in England and Wales: analysis by census ward. *Br.J.Cancer*, **98**, 1006-1011.
- Stiller CA, Parkin DM (1996) Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. *Br.Med.Bull.*, **52**, 682-703.
- Valsecchi, MG, Steliarova-Foucher E. (2008) Cancer registration in developing countries: luxury or necessity? *Lancet Oncol.*, **9**, 159-167.

Table 1. Age-adjusted incidence rates for leukaemia in Brazilian PBCR according to gender

Regions	PBCR (Period)	Number of cases	Male AAIR	Female AAIR	Ratio M/F	Total
North	Belem (1997-2001)	77	31.16	36.49	0.88	33.79
	Manaus (1999-2002)	141	42.57	34.27	1.24	76.84
Northeast	Aracajú (1998-2002)	16	34.47	14.95	2.20	24.82
	Fortaleza (1998-2002)	140	46.28	41.98	1.15	44.10
	Recife (1997-2001)	105	57.56	57.99	1.14	55.78
	JoãoPessoa (2000-2004)	27	36.28	30.70	1.25	33.51
	Natal (1998-2001)	44	34.87	20.53	1.75	55.60
	Salvador (1998-2002)	81	31.82	19.29	1.70	25.63
Midwest	Cuiabá (2000-2004)	72	91.17	50.73	1.88	71.10
	Brasilia (1999-2002)	96	43.86	38.25	1.18	41.07
	Goiania (1999-2003)	99	79.97	61.83	1.16	71.03
Southeast	Belo Horizonte(2000-2003)	92	49.24	36.89	1.42	43.11
	São Paulo (1998-2002)	644	58.06	43.75	1.20	51.00
	Jaú (2000-2004)	7	49.52	69.03	0.75	59.11
South	Curitiba (1999-2003)	124	56.32	71.90	0.82	63.97
	PortoAlegre(1999-2003)	96	76.50	45.27	1.74	61.18

Abbreviations: M, male; F, female; AAIR, age-adjusted incidence rates;

Sources: Population-Based Cancer Registries; MP/ Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE); MS/ INCA/ CONPREV/ Information Division, 2008 (www.inca.gov.br).

Table 2. The frequency of acute leukaemia according to race distributions, Brazil

Regions	PBCR	Number of cases	Whites (%)	Blacks (%)	Intermed (%)	Unknown (%)
North	Belem	77	8.5	0.0	54.3	37.2
	Manaus *	141	27.1	2.9	32.9	34.3
Northeast	Aracajú	16	25.0	0.0	43.7	31.3
	Fortaleza**	140	15.0	0.0	36.4	45.0
	Recife	105	5.7	0.0	7.6	86.7
	João Pessoa	27	14.8	0.0	0.0	85.2
	Natal	44	40.0	6.7	48.9	4.4
Midwest	Salvador	81	13.5	6.7	47.2	32.6
	Cuiabá	72	30.5	5.6	36.1	27.8
	Brasilia **	96	7.3	2.1	6.2	81.2
Southeast	Belo Horizonte	92	27.2	5.4	23.9	43.5
	Jaú	7	75.0	0.0	12.5	12.5
South	Curitiba	124	78.8	2.4	12.1	9.6
	Port Alegre**	96	90.6	1.04	0.0	7.2

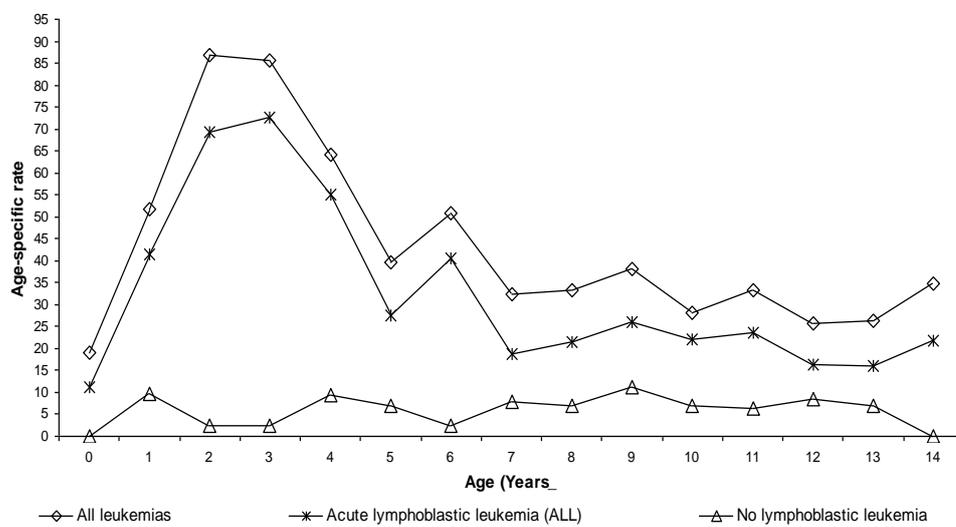
Abbreviations: PBCR, Population-based Cancer Registry; Intermed,intermediate; (*) Native Indian , 2.9%; (**) Asian descendent, 3.5% in Fortaleza, 3.0% in Brasilia and 1.0% in Porto Alegre.

Table 3. Age-adjusted incidence rates for leukaemia in Brazilian PBCR according to leukaemia subtype, 1997-2004.

Regions	PBCR (Period)	ALL	ANLL
North	Belem (1997-2001)	22.4	4.6
	Manaus (1999-2002)	56.6	10.9
Northeast	Aracajú (1998-2002)	22.0	3.1
	Fortaleza (1998-2002)	27.0	10.3
	Recife (1997-2001)	46.0	9.0
	João Pessoa (2000-2004)	22.0	9.8
	Natal (1998-2001)	36.0	14.1
Midwest	Salvador (1998-2002)	17.8	4.8
	Cuiabá (2000-2004)	50.0	9.7
	Brasília (1999-2002)	30.5	8.5
Southeast	Goiania (1999-2003)	53.1	24.5
	Belo Horizonte (2000-2003)	34.0	6.6
	São Paulo (1998-2002)	34.6	11.5
South	Jaú (2000-2004)	51.9	14.3
	Curitiba (1999-2003)	50.7	12.4
	Porto Alegre (1999-2003)	42.4	14.5

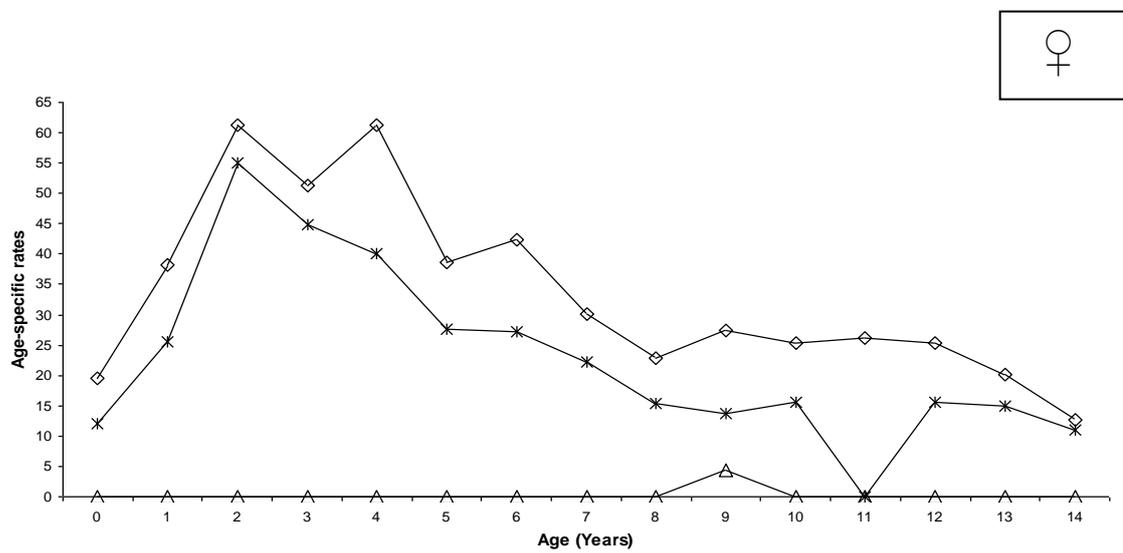
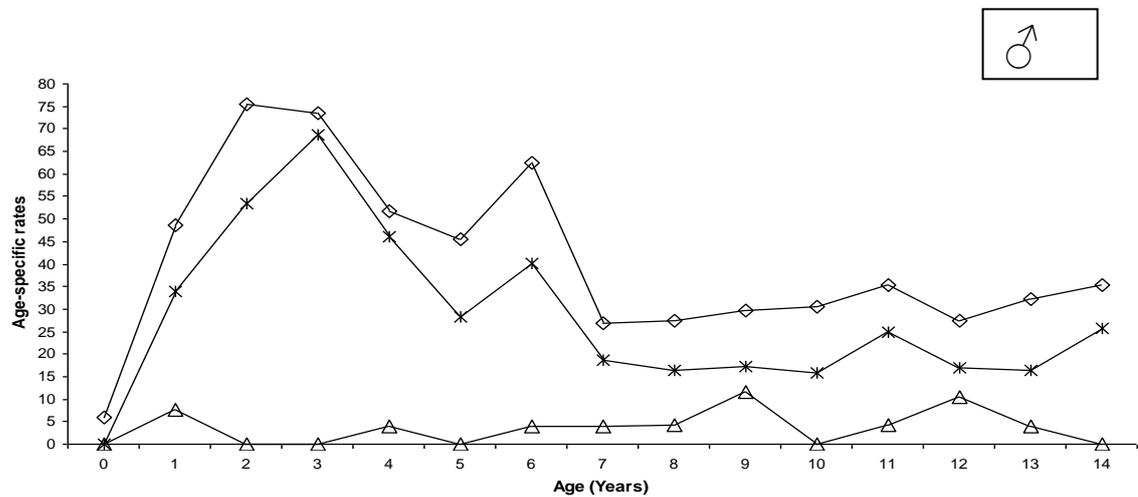
Abbreviations:
PBCR, Population-based Cancer Registry; ALL, acute lymphoblastic leukaemia; ANLL, acute non-lymphoblastic leukaemia.

Figure 1: Median age-specific incidence rates per million of leukaemia in Brazilian PBCR



Sources: Population-Based Cancer Registries; MP/IBGE; MS/INCA/CONPREV/ Information Division.
Data from São Paulo and Goiania PBCR were not available.

Figure 2. Median age-specific incidence rates per million of leukaemia in Brazilian PBCR by gender



2. Avaliação da incidência de leucemia aguda na infância e de subnotificação no Brasil pelo método de captura e recaptura.

O artigo "*Evaluation of childhood acute leukemia incidence and underreporting in Brazil by capture-recapture methodology*" demonstra a totalidade dos resultados deste estudo e encontra-se a seguir.

Neste estudo calculamos a incidência de LLA em três cidades brasileiras: 5,76/100 000 em Salvador, 6,32/100 000 em Recife e 5,48/100 000 em Belo Horizonte. A taxa de subnotificação foi de 84,5%, 64,6% e 70,8% para cada cidade, respectivamente.

3. Leishmaniose visceral e Leucemia aguda.

A seguir, encontra-se a descrição completa do estudo.

“Prevalence of antibodies against Leishmania in children with acute leukemia before treatment”

Neste estudo descrevemos a prevalência de anticorpos anti-leishmania em 243 crianças com LLA, 73 com LMA e 55 crianças sem neoplasia, que foi, respectivamente, 3,7%, 5,5% e 14,5%. Treze pacientes apresentavam leishmaniose visceral no momento do diagnóstico da leucemia aguda.

Prevalence of antibodies against *Leishmania* in children with acute leukemia before treatment

Fernanda Azevedo Silva¹, MD, Synara No Cordeiro¹, BSc, Gisele Moledo Vasconcelos¹, PhD., Celeste da Silva Freitas de Souza², PhD., Kátia da Silva Calabrese², PhD, and Maria S. Pombo-de-Oliveira¹, MD, PhD.

Abstract

Background. To describe the seroprevalence rate of leishmaniasis as an infection associated with acute leukemia.

Study design. This was a cross-sectional study that investigated sera and bone marrow aspirations from children seen in tertiary-care cancer center from different regions of Brazil. Antibodies against leishmaniasis were screened by reaction of indirect immunofluorescence (IF).

Results. The study group was composed of 243 acute lymphoblastic leukemia (ALL), 73 acute myeloid leukemia (AML), and 55 children without acute leukemia. The prevalence of antileishmaniasis antibodies was 4.1% in acute leukemia cases, (3.7% for ALL, and 5.5% for AML patients) whereas an increased seroprevalence (14.5%) was observed in children without acute leukemia. We confirmed the co-existence of leishmaniasis and acute leukemia in 13 cases.

Conclusion. Visceral leishmaniasis should be considered in differential diagnosis of childhood leukemia in tropical and subtropical countries, as it might be associated with childhood leukemia as a concurrent disease.

Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is endemic in Asian, Africa, the Middle East, Mediterranean countries, and South America. VL is caused by obligate intracellular protozoan parasites of *Leishmania* species. It is estimated that 600,000 new cases of VL occur each year in Brazil, making VL an important medical problem in different areas of this country (Passos *et al*, 2005; Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006). Affected children present splenomegaly, anemia, pancytopenia, and increased abnormal lymphocyte counts (Wittner & Tanowitz, 2000). Diagnosis is made by examining bone marrow (BM) aspirates for the presence of amastigotes within histiocytes and/or neutrophils (Pearson & Queiroz, 1996).

Leishmaniasis has been associated with cancer in three different ways: (i) it may mimic malignant disorders, (ii) it may develop in patients with cancer, and (iii) it may co-exist with malignancy (Kopterides *et al*, 2007d). Anecdotal cases of VL during ALL treatment have been reported (Aguado *et al*, 1983b; Fakhar *et al*, 2008a; Kapila *et al*, 1994c). In this regard, we performed a cross-sectional study of childhood leukemia to determine if serological testing for leishmaniasis would establish an association between childhood acute leukemia and previous or current infection by the parasite.

Methods.

A dataset recorded from 371 children from whom bone marrow (BM) aspirations and peripheral blood (PB) samples were obtained for diagnostic purposes from 2002 to 2006 was reviewed. Demographic characteristics, signs and symptoms at the time of sample collection, diagnostic procedures and clinical follow-up were recorded. The Instituto Nacional de Cancer's ethics committee approved this study. Written informed consent was obtained from the parents of the children.

Biological samples (BM and PB) were evaluated by morphology and immunophenotype for the diagnosis of acute leukemia prior to initiating any chemotherapy. Acute myeloid and lymphoid leukemias were characterized by immunophenotypic assays and morphological analysis into different cellular subtypes. The diagnostic criteria have been reviewed by Bain (Bain, 2003). Patients whose diagnoses excluded acute leukemia and other malignant disease were used as controls. Their diagnoses were viral, bacterial or parasitic diseases and benign hematological diseases. Samples from children presenting malignancies other than acute leukemia were excluded from this study.

The PB samples were screened by reaction of indirect immunofluorescence (IF) using kits from BioManguinhos /Oswaldo Cruz Foundation, according to manufacturer's instructions. The IF method is the gold standard for the diagnosis of leishmaniasis as indicated by the Health Ministry in Brazil. Control and test sera were diluted from 1:40 to 1:1280, adding the anti-IgG fluorescein conjugate at 1:100. A specimen was considered positive when titers were equal or greater to 1:80 and were considered negative when titers were less than 1:40; results falling between these levels were considered indeterminate.

Finally, confirmation of clinical stage of leishmaniasis was obtained from morphological analysis of BM smears by optic microscopy. The presence of amastigotes within histiocytes or neutrophils was considered positive for active infection disease.

Statistical analyses were performed using SPSS 11.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Comparison between the groups was made with ANOVA and the Chi square test when appropriate. All p-values were two-sided. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results and Discussion

The main demographic features and acute leukemia classifications are shown in Table 1. The study comprised 371 children less than 16 years of age representing all regions of Brazil. There were no statistically significant differences between groups regarding gender, age or ethnicity. The prevalence of anti-leishmania antibodies by IF was 4.1% among total acute leukemia cases, 3.7% among ALL patients, and 5.5% among AML patients; the seroprevalence rate among the nonleukemic children was 14.5% ($p=0.035$). Results from IF analysis is showed in Table 2. All cases with seropositive results were evaluated for the presence of amastigote forms in BM aspiration smears. Amastigotes were found in 2 AML patients and in 3 non-leukemic children. Summaries of demographic and laboratory findings among children with leishmaniasis are shown in Table 3. All children presented symptoms characterized by persistent daily fevers, anorexia and weight loss. Physical examinations demonstrated pallor, splenomegaly and hepatomegaly (data not shown). Laboratory analysis demonstrated anemia and thrombocytopenia in all cases. Leukopenia was found in 6 cases, normal leukocyte levels were found in 7 cases, and elevated WBC counts were found in 8 cases (the latter were all cases of acute leukemia). Persistent myelodysplastic features were found in one child whose clinical presentation was difficult (persistent low fever and diarrhea) who was finally diagnosed and treated as VL. BM hypoplasia was found in 6 VL cases and in 1 AML case. The co-existence of amastigote forms and blast cells were found in 2 cases of AML.

VL is considered an opportunistic infection and was described as a potential complication of acute leukemia's treatment. It is also a differential diagnosis with this disease because of similarity between their clinical aspects. Here we present our experience with cases of childhood leukemia and VL and report the largest series of such associations. A few reports have suggested an association between leishmaniasis and chronic leukemia in adulthood (Kopterides *et al*, 2003; Kopterides *et al*, 2007b).

We have found a higher prevalence of VL in non-leukemic patients because that is a selected population with clinical finds that could be present in both acute leukemia and visceral leishmaniasis and all children belong to endemic areas. Incidence rate of VL is 5/100,000 in Brazil, ranging from 0 to 96 (www.datasus.gov.br). LV's is confirmed in nearly 33% of symptomatic patients in endemic regions. (Silva et al)

Several aspects of the co-existence of these two entities that might have clinical consequences should be discussed. Among these are: i) VL mimicking an acute leukemia or ii) VL developing in children with acute leukemia (co-existence) perhaps due to the immunocompromised status of the patient.

With regard to the first point, clinical manifestations of VL such as fever, anemia, splenomegaly, lymphadenopathy, thrombocytopenia and myelodysplastic features in confirmed endemic areas can delay the diagnosis of acute leukemia. The misdiagnosis of acute leukemia due to these overlapping clinical aspects when the child is affected with VL, can lead to fatal consequences (Wittner & Tanowitz, 2000). However, a serological test for leishmaniasis applied as a complementary approach in the differential diagnosis of childhood malignancies solves this issue.

With respect to the second point, the development of VL in children with acute leukemia would be a consequence of exposure to the infection and would be facilitated by the immunocompromised status of the patient, as is often found in the pathogenesis of acute leukemia, resulting in increased susceptibility to an opportunist disease (Kopterides *et al*, 2007e). In this scenario the diagnosis would likely be difficult because of non-specific symptoms, unusual presentations, and a more severe clinical course. In the current study, 13 children with acute leukemia and concomitant VL were diagnosed by serologic analysis and examination of BM slides. This group represented 4.3% of all acute leukemia patients and 8.5% of cases with indeterminate serological diagnosis. This could indicate that a significant fraction of children with acute leukemia in Brazil have concomitant VL. The question remains whether VL infection occurs before the onset of leukemia or is acquired opportunistically by the immunocompromised patient. However, we strongly recommend that in VL endemic areas, the suspicion of an acute leukemia should be evaluated not only according to diagnostic tests for leukemia, but also by serological tests for leishmaniasis. To sum up, our findings suggests that VL is an important differential diagnosis from acute leukemia in children from endemic areas and it could occurs as a concomitant illness even before acute leukemia's treatment. Previously works only described the occurrence of VL after acute leukemia's treatment, this is the first time this evaluation is done at the diagnosis.

Conclusions.

Visceral leishmaniasis is an important differential diagnosis with childhood acute leukemia. It also can be a concurrent disease before the acute leukemia's treatment.

Reference List

- (1) Kinlen L. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain. *Lancet* 1988; 2(8624):1323-1327.
- (2) Greaves MF. Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1988; 2(2):120-125.
- (3) Greaves M. Pre-natal origins of childhood leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2003; 7(3):233-245.
- (4) Hrusak O, Trka J, Zuna J, Polouckova A, Kalina T, Stary J. Acute lymphoblastic leukemia incidence during socioeconomic transition: selective increase in children from 1 to 4 years. *Leukemia* 2002; 16(4):720-725.
- (5) McNally RJ, Eden TO. An infectious aetiology for childhood acute leukaemia: a review of the evidence. *Br J Haematol* 2004; 127(3):243-263.
- (6) Stiller CA, Parkin DM. Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. *Br Med Bull* 1996; 52(4):682-703.

- (7) Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 2002; 296(5567):490-494.
- (8) Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(3):193-203.
- (9) Passos S, Carvalho LP, Orge G, Jeronimo SM, Bezerra G, Soto M et al. Recombinant *Leishmania* antigens for serodiagnosis fo visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12:1164-1167.
- (10) Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; 48(3):151-156.
- (11) Wittner M, Tanowitz HB. Leishmaniasis in Infants and Children. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 2000; 11(3):196-201.
- (12) Pearson RD, Queiroz SA. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 1996; 22:1-13.
- (13) Kopterides P, Mourtzoukou EG, Skopelitis E, Tsavaris N, Falagas ME. Aspects of the association between leishmaniasis and malignant disorders. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101(12):1181-1189.
- (14) Aguado JM, Gomez BJ, Figuera A, de Villalobos E, Fernandez-Guerrero ML, Sanchez FJ. Visceral leishmaniasis (kala-azar) complicating acute leukaemia. *J Infect* 1983; 7(3):272-274.
- (15) Fakhar M, Asgari Q, Motazedian MH, Monabati A. Mediterranean visceral leishmaniasis associated with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Parasitol Res* 2008; 103(2):473-475.
- (16) Kapila K, Prakash MB, Mehrota R, Verma K. Testicular leishmaniasis in a boy with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Cytol* 1994; 38(5):878-879.
- (17) Bain BJ. Acute Leukaemia. *Diagnosis in Leukaemia*. Blackwell Science Ltd, 2003: 47-96.
- (18) Rajasekariah GH, Ryan JR, Hillier SR, Yi LP, Stiteler JM, Cui L et al. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *J Immunol Methods* 2001; 252(1-2):105-119.
- (19) Tavora MP, Pereira MA, Silva VL, Vita GF. [Comparative validation study between the ELISA and RIFI techniques for diagnosing *Leishmania* sp in stray dogs caught in the municipality of Campos de Goytacazes, State of Rio de Janeiro]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40(4):482-483.
- (20) Kopterides P, Halikias S, Tsavaris N. Visceral leishmaniasis masquerading as myelodysplasia. *Am J Hematol* 2003; 74(3):198-199.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of cases and controls

	ALL (n=243)	AML (n=73)	Controls (n=55)	OR	95% CI
Age (years)					
Mean	8.35	9.41	8.44		
SD	5.37	5.16	5.26		
Gender				1.06	0.56-1.99
Male	156 (64.2%)	49 (67.1%)	35 (63.6%)		
Female	87 (35.8%)	24 (32.9%)	20 (36.4%)		
Ethnicity				1.33	0.63-2.89
White	67 (27.6%)	12 (16.4%)	11 (20.0%)		
Non-white	176 (72.4%)	61 (83.6%)	44 (80.0%)		

Abbreviations: n= number of cases; NS= not statistically significant

Table 2: Seroprevalence of anti-leishmania antibodies in acute leukemia and controls

	ALL N (%)	AML N (%)	Controls N (%)	OR	95% CI
IF (+)	9 (3.7)	4 (5.5)	8 (14.5)		
IF (-)	215 (88.5)	62 (84.9)	42 (76.4)	0.25	0.09-0.70
IF (indet*)	19 (7.8)	7 (9.6)	5 (9.1)		

Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloblastic leukemia; (*) indet= indeterminate, when the titer values were between 1:80 and 1:40

Table 3. Demographic and clinical laboratory features of children with IF seropositivity

Demography	WBC	Blasts (%)	IF	Morphology and BM ANALYSIS	Final Diagnosis
#1. 10 years ;Male; BA	3,800	0	1/320	Myelodysplastic features	VL
#2. 12 years; Male ; BA	5,800	0	1/1280	Hypoplasia and amastigote forms	VL
#3. 9 months; Male; BA	1,300	0	1/640	Bone marrow hypoplasia	VL
#4. 10 years; Male; BA	3,600	0	1/320	Bone marrow hypoplasia	VL
#5. 17 months; Female; BA	100,000	95	1/160	Typical ALL morphology	pro-B ALL + VL
#6. 6 years; Male; BA	34,900	87	1/160	Typical ALL morphology	T-ALL + VL
#7. 13 months; Female; BA	4,870	0	1/320	Bone marrow hypoplasia and amastigote forms	VL
#8. 11 months; Male; BA	5,500	0	1/320	Bone marrow hypoplasia	VL
#9. 12 years; Male; BA	76,500	100	1/160	Typical AML morphology and amastigote forms	AML + VL
#10. 16 years; Male; BA	40,000	91	1/160	Typical AML morphology	AML + VL
#11. 5 years; Male; BA	3,000	60	1/80	Typical ALL morphology	Common-ALL + VL
#12. 2 years; Female; RJ	41,100	65	1/320	Bone marrow hypoplasia and AML morphology	AML + VL
#13. 4 years; Male; BA	7,800	65	1/80	Typical AML morphology and amastigote forms	AML + VL
#14. 3 years; Male; BA	8,000	35	1/80	Typical ALL morphology	Pre-B ALL + VL
#15. 4 years; Male; RJ	47,200	74	1/160	Typical ALL morphology	Pre-B ALL + VL
#16. 2 years; Male; BA	1,380	0	1/80	Bone marrow hypoplasia with eosinophilia	VL
#17. 2 years; Male; PB	44,600	0	1/80	Eosinophilia and amastigote forms	VL
#18. 5 years; Female; PB	2,100	35	1/80	Typical ALL morphology	Common-ALL + VL
#19. 4 years; Male; BA	4,400	7	1/80	Typical ALL morphology	ALL (not specified) + VL
#20. 5 years; Female; MS	8,500	5	1/320	Typical ALL morphology	Common-ALL + VL
#21. 13 years; Male; SP	28,000	95	1/80	Typical ALL morphology	Pro-B ALL + VL

Abbreviations: BA=Bahia, RJ=Rio de Janeiro, PB=Paraíba, MS=Mato Grosso do Sul, SP=São Paulo, ALL= acute lymphoblastic leukemia; AML=acute myeloid Leukemia, VL= visceral leishmaniasis

4. Avaliação de sorologia para Parvovírus B19 e Herpesvírus-6 em crianças com leucemia aguda.

A seguir estão os resultados deste estudo, no artigo intitulado “*Seroprevalence rate of anti-Parvovirus B19 and anti-Herpesvirus-6 antibodies in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia*”.

Sumarizando: Foram realizadas sorologias para Parvovirus B19 e Herpesvirus-6 em 110 casos de LLA e 67 controles no momento do diagnóstico. Também foi dosada a proteína C reativa, que é uma proteína de fase aguda de infecção. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na prevalência de anticorpos IgM e IgG contra o Parvovírus B19 e de anticorpos IgG contra o Herpesvírus-6 entre crianças com leucemia e os controles. Também não houve diferença nos níveis de proteína C reativa.

Seroprevalence rate of anti-Parvovirus B19 and anti-Herpesvirus-6 antibodies in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia.

Fernanda Azevedo-Silva¹
 Synara No Cordeiro¹
 Maria S. Pombo-de-Oliveira¹

Abstract:

Introduction: The etiology of childhood leukemia remains uncertain. Infection seems to play an important role in the development of this disease. To investigate the role that Parvovirus B19 and Herpesvirus-6 infection plays in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL), we conduct this study.

Methods: We studied children with ALL and children without malignant diseases at the time of the diagnosis for IgG and IgM antibodies against Parvovirus-B19 and for IgG antibodies against Herpesvirus-6 and did measurements of C-reactive protein.

Results: Positivity for IgM anti-Parvovirus B19 was 10%, 3.3% and 3%, respectively for T-ALL, Bcp-ALL and controls. For IgM anti-Parvovirus B19, the positive results were 40%, 41.1% and 36.4%, for T-ALL, Bcp-ALL and controls, respectively. In respect of HHV-6 IgG antibodies, we found its presence in 75%, 76.1% and 77.3% of T-ALL, Bcp-ALL cases and controls.

Discussion: The results of this study are similar to the seropositivity expected for the population, in general and do not confirm a relationship between ALL and the presence of antibodies against Parvovirus B19 and Herpesvirus-6.

Introduction:

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy in children. The etiology remains uncertain, but genetic susceptibility and environmental exposures are possibly involved (McNally). An infectious etiology has been suspected for the environmental agent (McNally,Salonen). The ALL's peak incidence rate occurs between the ages of 2 and 5 years (MacKenzie, Edgar) and is similar to the age distribution of common childhood infectious diseases. There are hypothesis that suggest that an abnormal response to common infections plays important role in the development of childhood ALL (Greaves, Kinlen).

HHV-6 is the etiologic agent of exanthema subitum and 80% of infants at 13 months have antibodies against HHV-6. Current knowledge of HHV-6 epidemiology indicates that primary infection occurs usually before 2 years of age (Salonen, Yamanashi, Freitas). By 2 years of age the seroprevalence has reached its maximum of about 90% (Parker). A major issue concerning HHV-6 is the possibility of long-term infection and salivary gland tissue is the site of virus replication and persistence (Fox). HHV-6 has been implicated as one possible association with leukemia (Ablashi, Levine and Schlehofer) while other study found a protective effect (Petridou).

Another virus related to acute leukemia is Parvovirus B19, the etiological agent of erythema infectiosum. Different reports described an association between ALL and previously B19 infection (Heegaard; Savasan; Petrella; Kerr). It is also a common infection during childhood with 50% of adolescents having specific anti-parvovirus antibodies (Young).

Infections are also associated with and acute phase response, during which the concentrations of many serum proteins are altered (Walker). C-reactive protein (CRP) is

one of the most sensitive of the acute phase proteins (Walker). It is present in normal serum in trace amounts and rises with inflammatory stimulus. With recovery from tissue injury or infection the serum CRP concentration falls rapidly. CRP serum level has also been postulated to be a potential marker of increased cancer risk (Trichopoulos). Here, we studied the seroprevalence of HHV-6 and Parvovirus B19, as well as CRP measurements, in Brazilian children with acute leukemia at the time of diagnosis, before treatment.

Material and methods:

This is a cross-sectional study realized in a diagnosis center in Rio de Janeiro, Brazil, during years 2002 to 2006. Since 1997, the national public health system in Brazil was reorganized to facilitate diagnosis and treatment of childhood leukemia. Several reference laboratories in different regions of the country were equipped to perform immunophenotyping, cytogenetics and molecular tests. After that, a computerized system was created to facilitate the interaction between epidemiology, clinical and molecular groups, facilitating even further the diagnosis of these patients.

Children with acute leukemia were considered cases and children whose leukemia diagnosis was excluded were considered controls.

Patients: 178 children with leukemia, 110 with ALL diagnosed at INCa were studied serologically for viral infections at the time of their diagnosis. The age of the children ranged from newborn to 18 years. For a reference group, 67 children with diseases other than cancer were included.

Methods: all sera were stored at -80°C and subsequently tested.

Anti-IgG antibodies against HHV-6 were measured from patients with acute leukemia and reference sera from patients with non-malignancies using a commercial enzyme immunoassay (EIA) (PanBio) following manufacturer's instructions.

Anti-IgM and anti-IgG antibodies against Parvovirus B19 were evaluated in children with acute leukemia and controls using EIA tests (Biotrin International Ltda, Dublin, Ireland) as described by manufacturer.

Reactive C protein (RCP) was measured by immunoturbidimetry (IT) using Cobas CRPLX kit as described by manufacturer in patients with acute leukemia and controls.

Statistical methods

Analyses were conducted using SPSS for Windows 11.0. Chi-square or Fisher's exact test were used, as appropriated. All p values were two sided; $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

178 children with leukemia, 110 ALL were studied serologically for Parvovirus B19 and HHV-6 infection at the time of their diagnosis. The age of the children ranged from newborn to 18 years, with 66 being boys and 44 girls. Demographic features are shown in table 1. For the reference group, 67 children with disorders other than cancer were selected. Control group was younger than cases and had more girls than boys, the opposite occurring in leukemia's group. We also had more patients and controls from Northeast and Southeast regions than Center-west region. Forty-five of 110 (40.9%) children with acute leukemia had IgG antibodies against PVB19, compared to 24 of 67 (36%) reference subjects. Specific IgM antibodies were present in 5 (4.5%) patients with leukemia, compared to 2 (3.0%) in the reference group. The anti-HHV-6 IgG antibody was positive in 82 out 110 (74.5%) children with acute leukemia and in 51 (76%) controls. Table 2 shows the results of PVB19 and HHV-6 according to leukemia's

subgroups and controls. We observed no significant differences in antibody pattern between patients with ALL and controls.

The results of CRP measurements are shown in table 3. There was not an important difference between cases and controls.

Discussion

There is a lot of supportive data to suggest that the later postnatal events are related to infections or the body's response to them (McNally).

HHV-6 has oncogenic potential and is found in association with several immunosuppressive conditions (Salonen). It has been detected in patients with lymphoma. Seroepidemiological studies have suggested it to be either an etiological or an ALL-associated agent. This is not consistent in all reports. Salonen et al concentrated their study in the serological status to HHV-6 at the onset of the malignant process, prior to any therapy, and found a high prevalence of virus-specific IgM antibodies. In this study, 97.5% of ALL children had IgG against 92.3% of controls. For IgM, 40% (16) of cases and 7.7% (3) of controls were positive (age 12-13). In our study, we found that only 76% of children with acute leukemia and 77% of controls were positive for IgG anti-HHV-6 antibodies. This is similar to the study of Zerr et al that demonstrated that 77% of healthy children in US had HHV-6 primary infection by the age of 2. In Brazil, the seroprevalence of HHV-6 ranges from 75 to 100% (de Freitas), corroborating our findings. Acute parvovirus infection is associated with a significant cytokine cascade, which is associated with a degree of disturbed hematopoiesis and suppression of normal marrow function, which may allow release of low level malignant clones or induce proliferation (McNally). Parvovirus B19 infection is common in childhood; half of 15-year-old adolescents have specific anti-parvovirus B19 antibodies. (Young).

Kerr et al demonstrated a significant association between the presence of parvovirus B19 DNA in the CSF of four of 16 patients with acute leukemia at presentation compared with controls. We found nearly 41% of IgG antibodies anti-PVB19 for children with ALL and 36% for controls. Regarding IgM antibodies, few patients, mostly with T-ALL presented positive tests, the same occurring in controls.

When evaluating CRP, we found that control group had values slightly higher than ALL group, but it was not a significant statistically.

This study has indicated that ALL is not accompanied by significant increases in serum concentrations of the acute phase reactant CPR. We also did not find a difference regarding the presence of antibodies against PVB19 and HHV-6 at the diagnosis of children with ALL and controls.

References

- Ablashi, D.V., Josephs, S.F., Buchbinder, A., Hellman, K., Nakamura, S., Llana, T., Lusso, P., Kaplan, M., Dahlberg, J., Memon, S., & . (1988) Human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J. Virol. Methods*, **21**, 29-48.
- Fox, J.D., Briggs, M., Ward, P.A., & Tedder, R.S. (1990) Human herpesvirus 6 in salivary glands. *Lancet*, **336**, 590-593.
- Freitas, R.B., Freitas, M.R., & Linhares, A.C. (2002) Prevalence of human herpesvirus 8 antibodies in the population of Belem, Para, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **44**, 309-313.
- Greaves, M.F. (1988) Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **2**, 120-125.
- Heegaard, E.D., Jensen, L., Hornsleth, A., & Schmiegelow, K. (1999) The role of parvovirus B19 infection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Hematol. Oncol.*, **16**, 329-334.
- Kerr, J.R., Barah, F., Cunniffe, V.S., Smith, J., Vally, P.J., Will, A.M., Wynn, R.F., Stevens, R.F., Taylor, G.M., Cleator, G.M., & Eden, O.B. (2003) Association of acute parvovirus B19 infection with new onset of acute lymphoblastic and myeloblastic leukaemia. *J. Clin. Pathol.*, **56**, 873-875.

- Kinlen,L.J. (1989) Infective cause of childhood leukaemia. *Lancet*, **1**, 378-379.
- Levine,P.H., Ablashi,D.V., Saxinger,W.C., & Connelly,R.R. (1992) Antibodies to human herpes virus-6 in patients with acute lymphocytic leukemia. *Leukemia*, **6**, 1229-1231.
- MacKenzie,J., Greaves,M.F., Eden,T.O., Clayton,R.A., Perry,J., Wilson,K.S., & Jarrett,R.F. (2006) The putative role of transforming viruses in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, **91**, 240-243.
- McNally,R.J. & Eden,T.O. (2004) An infectious aetiology for childhood acute leukaemia: a review of the evidence. *Br.J.Haematol.*, **127**, 243-263.
- Petrella,T., Bailly,F., Mugneret,F., Caillot,D., Chavanet,P., Guy,H., Solary,E., Waldner,A., Devilliers,E., Carli,P.M., & . (1992) Bone marrow necrosis and human parvovirus associated infection preceding an Ph1+ acute lymphoblastic leukemia. *Leuk.Lymphoma*, **8**, 415-419.
- Petridou,E., Revinthi,K., Alexander,F.E., Haidas,S., Kolioukas,D., Kosmidis,H., Piperopoulou,F., Tzortzatos,F., & Trichopoulos,D. (1996) Space-time clustering of childhood leukaemia in Greece: evidence supporting a viral aetiology. *Br.J.Cancer*, **73**, 1278-1283.
- Salonen,M.J., Siimes,M.A., Salonen,E.M., Vaheeri,A., & Koskiniemi,M. (2002) Antibody status to HHV-6 in children with leukaemia. *Leukemia*, **16**, 716-719.
- Savasan,S. & Ozdemir,O. (2003) Parvovirus B19 infection and acute lymphoblastic leukaemia. *Br.J.Haematol.*, **120**, 168-169.
- Schlehofer,B., Blettner,M., Geletneky,K., Haaf,H.G., Kaatsch,P., Michaelis,J., Mueller-Lantsch,N., Niehoff,D., Winkelspecht,B., Wahrendorf,J., & Schlehofer,J.R. (1996) Sero-epidemiological analysis of the risk of virus infections for childhood leukaemia. *Int.J.Cancer*, **65**, 584-590.
- Trichopoulos,D., Psaltopoulou,T., Orfanos,P., Trichopoulou,A., & Boffetta,P. (2006) Plasma C-reactive protein and risk of cancer: a prospective study from Greece. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, **15**, 381-384.
- Walker,S.A., Riches,P.G., Rogers,T.R., White,S., & Hobbs,J.R. (1984a) Value of serum C-reactive protein measurement in the management of bone marrow transplant recipients. Part II: Late post-transplant period. *J.Clin.Pathol.*, **37**, 1022-1026.
- Walker,S.A., Rogers,T.R., Riches,P.G., White,S., & Hobbs,J.R. (1984b) Value of serum C-reactive protein measurement in the management of bone marrow transplant recipients. Part I: Early transplant period. *J.Clin.Pathol.*, **37**, 1018-1021.
- Young,N.S. & Brown,K.E. (2004) Parvovirus B19. *N.Engl.J.Med.*, **350**, 586-597.
- Zerr,D.M., Meier,A.S., Selke,S.S., Frenkel,L.M., Huang,M.L., Wald,A., Rhoads,M.P., Nguy,L., Bornemann,R., Morrow,R.A., & Corey,L. (2005) A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. *N.Engl.J.Med.*, **352**, 768-776.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of cases and controls

	Bcp-ALL (N=90)	T-ALL (N=20)	AML (N=68)	Cases without leukemia (N=67)	P-value
Age (years)					
Mean	6.9	9.7	8.49	4.48	<0.001
SD	5.48	5.66	6.29	4.47	
Gender					
Male	55 (61.1%)	12 (60%)	43(62.7%)	40 (59.7%)	0.037
Female	35 (38.9%)	8 (40%)	25(37.3%)	27 (40.3%)	
Geographic region					0.029
Northeast	49 (54.4%)	10 (50%)	20(29.4%)	20 (29.9%)	
Southeast	33 (36.7%)	9 (45%)	38(55.9%)	41 (61.2%)	
Center-west	8 (8.9%)	1 (5%)	10(14.7%)	6 (9%)	

Abbreviations: N= number of cases; Bcp-ALL, B precursor acute lymphoblastic leukemia; T ALL, T cells acute lymphoblastic leukemia.

Table 2: Seroprevalence of anti-PVB19 and HHV-6 antibodies in acute leukemia and controls

	Bcp-ALL N (%)	T-ALL N (%)	AML N (%)	Cases without leukemia N (%)	OR	95% CI
PVB19 IgM(+)	3 (3.3)	2 (10)	0	2 (3)		
PVB19 IgM(-)	87 (96.7)	18 (90)	66 (100)	64 (97)	0.94	0.16-7.16
PVB19 IgG(+)	37 (41.1)	8 (40)	28 (42.4)	24 (36.4)		
PVB19 IgG(-)	53 (58.9)	12 (60)	38 (57.6)	42 (63.6)	1.24	0.66-2.32
HHV-6 IgG(+)	67 (76.1)	15 (75)	52 (78.8)	51 (77.3)		
HHV-6 IgG(-)	21 (23.9)	5 (25)	14 (21.2)	15 (22.7)	0.99	0.47-2.03

Abbreviations: Bpc-ALL, B precursor acute lymphoblastic leukemia; T ALL, T cells acute lymphoblastic leukemia; PVB19= Parvovirus B19; HHV-6= Herpesvirus-6; N= number of cases; OR= odds ratio; 95% CI= 95% confidence interval.

Table 3: CRP results

Diagnosis	Bcp-ALL	T-ALL	Cases without leukemia	P-value
CRP mean	2.62	1.38	3.70	
CRP SD	4.40	1.70	6.29	
CRP min	0	0	0	
CRP max	28	7.41	29	

Abbreviations: pB ALL, B precursor acute lymphoblastic leukemia; T ALL, T cells acute lymphoblastic leukemia; CRP, C-reactive protein; SD, standard deviation; min, minimum; max, maximum.

CAPÍTULO VIII:

Discussão

A patogênese da LLA tem sido amplamente estudada. Os estudos epidemiológicos procuram estabelecer um papel para as infecções como segundo “hit” necessário para o desenvolvimento da LLA cpB. Atualmente quatro hipóteses (15;17;36;63) estão sendo testadas neste contexto. Todas elas são complementares e tendo como interseção uma possível resposta imune desregulada a uma infecção como evento desencadeador da leucemia em crianças predispostas.

Todos os estudos visam a caracterizar os aspectos biológicos das LLA cpB em crianças brasileiras, descrevendo seus aspectos clínico-epidemiológicos de forma que possamos avaliar possíveis associações com três doenças infecciosas: i) infecções por Parvovírus B19, ii) Herpesvírus-6 e iii) leishmaniose visceral. As duas infecções virais são infecções comuns, com distribuição universal, cuja primo-infecção ocorre principalmente na primeira infância, sendo pouco patogênicas. Estas infecções virais foram testadas nos países desenvolvidos. A outra infecção estudada foi a leishmaniose visceral, devido ao seu aspecto endêmico em algumas regiões do Brasil, porém num contexto de imunossupressão decorrente da doença *per se* ou do seu tratamento.

A escolha da LV como uma infecção potencialmente associada à LLA deve-se ao fato de ser uma infecção grave que acomete principalmente crianças na mesma faixa etária do pico de LLA e ser um problema de saúde pública no Brasil, tendo ampla distribuição no território nacional e estar passando por um processo de expansão em áreas urbanas nas grandes cidades do Brasil. Para testar nossa hipótese entendemos que seria importante avaliar inicialmente os dados do Registro de Câncer de Base Populacional existente nas maiores brasileiras e comparar as taxas de incidência da LLA para verificar se os dados atuais são consistentes para questionarmos associações com infecções e serem comparados com os dados de países desenvolvidos. Este tipo de estudo é importante porque muito das

postulações das hipóteses sobre a patogênese da LLA baseiam-se na diferença de incidência desta doença entre países desenvolvidos e em desenvolvimento.

No trabalho de incidência de leucemia aguda em crianças, avaliamos os dados de 20 registros de câncer de base populacional (RCBP) e excluimos 4 para análises posteriores devido ao período de cobertura do registro ser incompatível com os demais ou pela má qualidade dos dados. A incidência de leucemia pediátrica variou de 2,5 a 7,7 por 100.000, sendo as taxas mais baixas em Aracajú (2,5) e Salvador (2,6) e as mais elevadas em Goiânia (7,1), Cuiabá (7,1) e Manaus (7,7). Com este trabalho pudemos estabelecer a incidência de LLA e LMA em diversas cidades brasileiras e avaliar as diferenças geográficas, que já foram descritas na Europa e América do Norte (Steliarova-Foucher 2004 e Li 2008). Este estudo serviu de base para especularmos sobre as diferenças de incidência encontradas nas cidades avaliadas.

Devido aos dados discrepantes entre as incidências de Salvador, Manaus e Aracajú, questionamos se não haveria uma taxa subestimada dos casos incidentes. Para responder a esta questão, utilizamos uma técnica relativamente nova, a captura e recaptura (100-102), para estimarmos o número de casos de LLA em três diferentes cidades: Recife, Salvador e Belo Horizonte. Estas cidades foram escolhidas por representarem um RCBP antigo (Recife) com tradição de qualidade, um novo (Belo Horizonte) e um registro onde a taxa de incidência é a mais baixa do Brasil, indicando a necessidade de reavaliação destes dados devido a possibilidade de ser incompleto, devido a subnotificação do diagnóstico na cidade em questão (Salvador).

Utilizamos o RCBP destas cidades e os registros dos casos do laboratório do INCA, que recebe amostras para diagnóstico destas cidades desde a criação da Rede de Atenção em Oncologia seguida do Programa Criança e Vida. Os casos foram comparados por nome, data de nascimento, nome da mãe, cidade de residência e gênero. A comparação foi

realizada pela pessoa responsável pelas informações do RCBP de modo a manter a confidencialidade dos dados dos pacientes. O número estimado de casos foi calculado utilizando a fórmula de Chapman e a partir deste cálculo foi possível calcular a exatidão dos dados do RCBP. Os resultados das cidades estudadas variaram de 15.5% a 50%, o que está muito aquém dos resultados dos registros dos países desenvolvidos, cujos resultados variam de 80 a 98% (103;104), se considerarmos apenas os estudos que não apresentavam dependência entre as fontes. O quadro 8 sumariza os estudos realizados com esta abordagem. Estes artigos estão sumarizados no quadro.

Foi possível estimar com mais precisão a incidência de LLA para estas cidades entre 5,48 e 6,32 para 100.000 crianças ajustadas por idade. Embora diferentes estes valores são semelhantes em parte, aos resultados encontrados nos países desenvolvidos.

Existem poucos relatos sobre a exatidão dos RCBP dos países em desenvolvimento e, no entanto, seus dados são utilizados rotineiramente para o desenvolvimento de políticas de saúde pública, alocação de recursos financeiros e para formulação de hipóteses relacionadas à patogênese e tratamento das doenças.

Quadro 9: Principais estudos avaliando RCBP pelo método de captura-recaptura.

Autor, local	Ano	Fontes	Exatidão do registro
Kim e cols, Seul (105)	1999	Registro de câncer, relatos médicos e registro de óbito.	89,9%
Brenner e cols, Alemanha (106)	1995	RCBP, registro de óbito, relatos dos médicos e da patologia.	80-90%
Dockerty e cols, Nova Zelândia (107)	1997	RCBP, registro nacional de admissão e alta hospitalar e o registro de câncer infantil.	97%
Al Zarahni e cols, Arábia Saudita	2003	Relatos médicos, de patologia e registro de óbito.	Fontes dependentes. Não avaliou a exatidão do RCBP.
Crocetti, Itália (108)	2001	Relatos médicos, de patologia e registro de óbito.	97,4%
McClish, EUA (109)	2004	RCBP, dados do Medicare pacientes internados e externos.	74% próstata a 89% mama. Houve dependência entre as fontes.

A principal limitação deste trabalho é a utilização de apenas duas fontes de origem dos dados, pois quando utilizamos três ou mais fontes é possível a utilização de programas computacionais que evitam a presença de dependência entre as fontes. Ao utilizar duas fontes devemos levar em consideração à possibilidade de dependência entre elas. Esta dependência pode ser positiva, quando um caso registrado em uma fonte tem maior chance de ser capturado na outra fonte, o que pode subestimar a população; ou negativa, quando um caso de uma fonte tem menor possibilidade de estar presente na outra fonte, permitindo uma superestimação da população. Estas notificações são feitas pelos hospitais da cidade onde fica o RCBP e não há relação entre o envio de amostras para diagnóstico no nosso laboratório e a necessidade ou não de notificar o caso ao registro, visto que a leucemia não é doença de notificação compulsória. Embora ao utilizar duas fontes para a aplicação da metodologia de captura-recaptura não seja possível comprovar ou não a existência de

dependência entre as fontes, é possível suspeitar de dependência quando o valor estimado da população seja muito discrepante do esperado (110). Por exemplo, o achado de um número de casos estimado menor que o número de casos diferentes observados nas duas fontes, seria um indicador de dependência positiva entre elas. Isto não ocorreu em nossa amostra.

Outro problema na utilização desta técnica seria o erro no diagnóstico dos casos de leucemia. Este problema não é significativo atualmente devido à melhora no diagnóstico que ocorreu a partir do Programa Criança e Vida, que a partir de 1999 que equipou diferentes laboratórios para fazer o diagnóstico da leucemia, com precisão, por seus diferentes subtipos.

A partir dos resultados encontrados neste estudo podemos ressaltar dois principais aspectos: o primeiro é a necessidade de incentivar a melhoria da captação dos casos pelos RCBP no Brasil e de utilizar sistemas que permitam a monitoração da sua qualidade; o segundo é que provavelmente a incidência de LLA no Brasil pode ser semelhante a dos países desenvolvidos. Demonstrando que será possível testar as diferentes associações de risco já apontadas nos estudos de países desenvolvidos. A técnica de captura-recaptura é considerada por alguns autores o melhor método para calcular incidência e prevalência das doenças. Alguns trabalhos epidemiológicos sobre a patogênese da LLA baseiam-se na diferença de incidência entre países desenvolvidos e em desenvolvimento para elaborar hipóteses sobre o tipo ou a época ou a gravidade da exposição a infecções na patogênese da LLA. Eles referem (17) que não há dados que indiquem que esta diferença seja proveniente de dificuldades para fazer o diagnóstico ou por subnotificação. Nosso estudo demonstra que a subnotificação pode, sim, ser um fator importante nesta diferença de incidências.

A etapa seguinte do nosso trabalho foi avaliar através de testes sorológicos a presença de anticorpos contra os vírus Parvovírus B19 e Herpesvírus-6 no momento do

diagnóstico e se haveria alguma associação de risco com LLA. Não encontramos diferenças na seroprevalência destes anticorpos entre o grupo de crianças com LLA e um grupo de crianças que apesar de apresentarem os mesmos aspectos clínicos não tinham neoplasia (controles). A prevalência encontrada está dentro do esperado para a população brasileira e de acordo com o padrão mundial. Portanto estes dados continuam com os mesmos resultados controversos relatados na literatura sobre a associação de PVB19 e HHV-6 com o processo de leucemogênese (quadros 9 e 10).

Quadro 10: Estudos sobre a associação de leucemia aguda e HHV-6.

Autores, Local	Ano	Desenho do estudo	Número de casos	Resultados
Ablashi e cols, (49)	1988	Caso-controle, sorologia; LLA		Nível elevado de anticorpos nos casos
Levine e cols, EUA (111)	1992	Caso-controle; LLA.	50 casos	Sem associação
Schlehofer e cols, Alemanha (112)	1996	Caso-controle; LA	121 crianças LA e 197 controles	Sem associação
Chan e cols, Hong Kong (50)	2002	Caso-controle; LLA	98 casos e 228 controles	Efeito protetor da roseola no primeiro ano de vida OR=0.33 (0.16-0.68)
Bogdanovic e cols, Suécia (113)	2004	Caso controle	54 casos e 47 controles	Não encontrou DNA do HHV-6 nos Guthrie cards de crianças.
Petridou e cols, Grécia (44)	2001	Caso-controle; LLA	94 casos e controles	Efeito protetor em crianças >5 anos. OR=0.5 (0.3-0.9)
Ma e cols, China (114;115)	2000	Caso-controle; LA	241 pacientes com doença hematológica	Genoma integrado em amostras de MO de chineses adultos e crianças com leucemia
MacKenzie e cols, UK (48)	2001	Caso-controle; LA e tumores sólidos (controles)	27 casos e 28 controles	Não encontrou genoma integrado

Quadro 11: Estudos sobre associação de Parvovírus B19 e leucemia aguda.

Autores, Local	Desenho do estudo	Número de casos	Resultados
Petridou e cols, Grécia, 2001 (18)	Caso-controle; Só LLA	94 casos e controles	Efeito protetor em crianças >5 anos.
MacKenzie e cols, UK, 2001 (116)	Caso-controle; LA e tumores sólidos (controles)	27 casos e 28 controles	Não encontrou genoma integrado
Kerr e cols, UK, 2003 (52)	Caso-controle, LA	16 casos e 10 controles	OR=16,92 (1,03-77,18)
Bogdanovic e cols, Suécia, 2004 (113)	Caso-controle	54 casos e 47 controles	Não encontrou DNA do PVB19 nos Guthrie cards de crianças.

Como “proxi” para avaliação do período de exposição infecciosa nós dosamos o nível plasmático da proteína C reativa, uma proteína de fase aguda de infecção, que é indetectável no sangue quando o indivíduo está normal e se eleva rapidamente em resposta a um processo infeccioso agudo. Essa proteína é produzida no fígado e alcança níveis bem elevados (>10 mg/L) nos casos de infecção bacteriana e se elevam pouco em resposta a infecções virais. Pequenas elevações na concentração da proteína C reativa (3-10 mg/L) foram encontradas em indivíduos saudáveis (117) e estão associadas a um padrão diverso de tipos de dieta e a condições não inflamatórias, aparentemente indicando lesão tissular, podendo indicar que é o estresse celular e não a inflamação que induz a produção desta proteína. Este biomarcador é comumente utilizado para detectar infecção aguda e avaliar sua resposta ao tratamento, além de ser usada para avaliar a resposta inflamatória nas doenças crônicas. Também é um indicador de inflamação leve associada à doença vascular aterosclerótica (118;119). Quando dosamos a proteína C reativa nosso objetivo foi avaliar um marcador de infecção para correlacionar com os resultados de sorologia.

Não encontramos diferenças estatísticas significativas na dosagem da proteína C reativa em casos de LLA cpB e nas amostras controles (crianças sem leucemia), sugerindo a ausência de um processo infeccioso ativo no momento do diagnóstico da leucemia aguda. Não há estudos na literatura sobre o comportamento desta proteína do diagnóstico da leucemia aguda. No entanto, foi estudada em adultos para avaliação de doença enxerto versus hospedeiro em paciente pós-transplante de medula óssea (120;121) e como possível marcador para o desenvolvimento de leucemia e linfoma (122). Os resultados deste estudo demonstraram uma chance de 1,26 (1,05-1,51) para o desenvolvimento de linfoma ou leucemia nos pacientes que apresentavam a proteína C reativa elevada, caracterizando um papel para inflamação na patogênese do câncer. Esta etapa da nossa investigação ainda necessita de revisão nas análises referentes aos fatores de confundimento que poderiam ser introduzidos na seleção das amostras analisadas.

Utilizando a mesma abordagem, anteriormente citada, decidimos avaliar a presença de anticorpos contra a *L. chagasi*, causador da LV devido a relevância desta infecção nas regiões das quais recebemos amostras para diagnóstico de leucemias, pela gravidade desta doença e por fazer parte do diagnóstico diferencial com LLA e, finalmente, por ser uma doença oportunista. Utilizamos o RIFI, que é o teste padrão-ouro do Ministério da Saúde para o diagnóstico da LV. Nós estudamos 243 pacientes com LLA, 73 com LMA e 55 crianças sem neoplasias malignas e encontramos a prevalência de anticorpos anti-Leishmania em 3,7% dos casos de LLA, 5,5% dos casos de LMA e em 14,5% dos controles. Esta prevalência aumentada de anticorpos anti-Leishmania no grupo de crianças sem leucemia (controle) justifica-se por serem crianças de área endêmica de LV e que apresentavam sintomatologia semelhante à de leucemia aguda, que tem a LV como diagnóstico diferencial.

A revisão da literatura (73;77) sobre a associação de LV e leucemia aguda em crianças se restringe a relatos de casos esporádicos de crianças com leucemia aguda que desenvolveram LV após o início do tratamento da leucemia (quadro 11). Estes estudos consideram a LV como uma infecção oportunista provavelmente devido à imunossupressão relacionada à doença ou ao tratamento. Recentemente, Kopterides e cols (78) publicaram uma revisão sobre a associação de LV e leucemia, resumizando as publicações anteriores em adultos e crianças, na maioria dos casos com a LV dificultando o diagnóstico da leucemia aguda ou vice-versa ou da LV ocorrendo no contexto do tratamento da leucemia aguda. Eles concluíram que a leishmaniose pode afetar a apresentação, o diagnóstico e o curso clínico de diversas neoplasias nas regiões endêmicas.

Quadro 12: Estudos associando Leishmaniose visceral e leucemia aguda.

Autor	Ano	Desenho do estudo	População	Resultado
Kapila e cols, Índia (123)	1994	Relato de caso	1 menino com LLA	Desenvolveu LV após o diagnóstico
Mehrotra e cols, Índia (124)	1995	Relato de caso	1 criança com LLA	Desenvolveu LV 10 meses após o diagnóstico da LLA.
Di Cataldo e cols, Itália (125)	1996	Série de casos	2 LLA, 1 LMA	Desenvolveram LV meses após o diagnóstico da leucemia.
Pati, H.P., Índia (126)	1999	Série de casos	1 LLA, 1LMC, 1MDS	Desenvolveram LV após o diagnóstico
Fakhar e cols, Iran (77)	2008	Relato de caso	1 criança com LLA	Desenvolveu LV meses após o diagnóstico da leucemia.
Aguado e cols, Espanha (127)	1983	Relato de caso	1 adolescente com leucemia aguda	Desenvolveu LV após o diagnóstico.
Grech e cols, Malta (73)	2000	Relato de caso	1 criança com LLA	Desenvolveu LV após diagnóstico.

Ao considerarmos em conjunto os dados destes estudos, podemos observar que a incidência da LLA pode estar subestimada em algumas cidades brasileiras devido as possíveis dificuldades de atuação dos RCBP regionais. É importante que seja feito um esforço pelos responsáveis pelos registros de cada cidade para haver uma captação ativa dos casos, visto que o câncer não é doença de notificação compulsória e os médicos, laboratórios, serviços de patologia, que fazem o diagnóstico da doença devem estar cientes da importância da notificação. Sem um RCBP confiável, torna-se difícil a realização de

estudos baseados nas taxas de incidência divulgadas e decisões equivocadas podem ser tomadas com relação à adequação de recursos financeiros para diagnóstico, prevenção e tratamento das doenças. Outra informação gerada é a de que os estudos internacionais devam ser mais cautelosos ao interpretar dados comparativos de taxas de incidência em países desenvolvidos e em países como o Brasil, com regiões muito industrializadas com nível de desenvolvimento humano adequado e regiões menos favorecidas. Nos procuramos testar as hipóteses de Kinlen e Greaves através das análises sorológicas. Embora estas hipóteses levem em consideração as infecções virais, decidimos testá-las também com relação à infecção parasitária prevalente no Brasil (LV). Ainda não foi possível estabelecer uma associação definitiva no sentido das vias da patogênese da LLA, no entanto, nosso estudo contribuiu com pontos importantes nesta área. Acreditamos ser necessário a realização de estudos adicionais para um melhor entendimento da relação entre níveis de incidência entre estas duas doenças em áreas de risco no Brasil. Finalmente, hipotetizamos que as infecções graves, com liberação de cortisol endógeno no início da infância pode desempenhar um papel na patogênese da LLA e este tópico necessita ser mais bem estudado.

CAPÍTULO IX:**Conclusões**

1. Geral:

Não foi possível evidenciar um papel para as infecções avaliadas na patogênese da LLA na amostra estudada.

2. Específicas:

- A incidência estimada de LLA foi de 5,76; 6,32 e 5,48 por 100.000 habitantes em Salvador, Recife e Belo Horizonte, respectivamente.
- A exatidão do RCBP foi de 15,5; 35,4 e 29,2% em Salvador, Recife e Belo Horizonte, respectivamente.
- A prevalência de anticorpos (IgG) anti-HHV-6 e anti-PVB19 em pacientes com LLA de células B precursoras foi de 76% e 42,4% , respectivamente, não sendo diferente do esperado para a população em geral.
- A proteína C reativa não foi um biomarcador importante na avaliação do papel das infecções na patogênese da LLA.
- Leishmaniose visceral deve ser considerada no diagnóstico diferencial da LLA nas áreas endêmicas e também como uma doença que pode ocorrer em associação com a leucemia.

CAPÍTULO X:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Reference List

- (1) Smith OP HIM. Clinical features and treatment of lymphoblastic leukemia. In: Arceci RJ HISO, editor. *Pediatric Hematology*. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2006: 450-481.
- (2) Barbosa CMPL NCTMLMPAHM. Manifestações músculo-esqueléticas como apresentação inicial das leucemias agudas na infância. *J Pediatr (Rio J)* 2002; 78(6):481-484.
- (3) Noshchenko AG, Moysich KB, Bondar A, Zamostyan PV, Drozdova VD, Michalek AM. Patterns of acute leukaemia occurrence among children in the Chernobyl region. *Int J Epidemiol* 2001; 30(1):125-129.
- (4) Noshchenko AG, Zamostyan PV, Bondar OY, Drozdova VD. Radiation-induced leukemia risk among those aged 0-20 at the time of the Chernobyl accident: a case-control study in the Ukraine. *Int J Cancer* 2002; 99(4):609-618.
- (5) Schumacher HR, Alvares CJ, Blough RI, Mazzella F. Acute leukemia. *Clin Lab Med* 2002; 22(1):153-92, vii.
- (6) German J. Bloom's syndrome. *Dermatol Clin* 1995; 13(1):7-18.
- (7) Sacchi N. Leukaemia in Down's syndrome. *Leukemia* 1991; 5(9):822-823.
- (8) Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008; 371(9617):1030-1043.
- (9) Greaves M. Pre-natal origins of childhood leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2003; 7(3):233-245.
- (10) Greaves M. In utero origins of childhood leukaemia. *Early Hum Dev* 2005; 81(1):123-129.
- (11) Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(9):639-649.
- (12) Kinlen LJ, Stiller C. Population mixing and excess of childhood leukemia. *BMJ* 1993; 306(6882):930.
- (13) Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(3):193-203.
- (14) Greaves MF, Alexander FE. An infectious etiology for common acute lymphoblastic leukemia in childhood? *Leukemia* 1993; 7(3):349-360.
- (15) Kinlen LJ. Infective cause of childhood leukaemia. *Lancet* 1989; 1(8634):378-379.

- (16) McNally RJ, Eden TO. An infectious aetiology for childhood acute leukaemia: a review of the evidence. *Br J Haematol* 2004; 127(3):243-263.
- (17) Schmiegelow K, Vestergaard T, Nielsen SM, Hjalgrim H. Etiology of common childhood acute lymphoblastic leukemia: the adrenal hypothesis. *Leukemia* 2008; 22(12):2137-2141.
- (18) Pui CH. Childhood leukemias. *N Engl J Med* 1995; 332(24):1618-1630.
- (19) Schorin MA, Blattner S, Gelber RD, Tarbell NJ, Donnelly M, Dalton V et al. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Cancer Institute/Children's Hospital Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium Protocol 85-01. *J Clin Oncol* 1994; 12(4):740-747.
- (20) Precursor B- and T- neoplasms. In: Jaffe ES, Halsey J, editor. *WHO Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 2001: 109-118.
- (21) Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 9(10):1783-1786.
- (22) Ikeuti PS, Borim LNB, Luporini RL. Dor óssea e sua relação na apresentação inicial da leucemia linfóide aguda. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2006; 28(1):45-48.
- (23) Bene MC. Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunol Lett* 2005; 98(1):9-21.
- (24) Basso G, Buldini B, De Zen L, Orfao A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica* 2001; 86(7):675-692.
- (25) Szczepanski T, van der Vliet A, van Dongen JJ. Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(7):775-796.
- (26) Jennings CD, Foon KA. Flow cytometry: recent advances in diagnosis and monitoring of leukemia. *Cancer Invest* 1997; 15(4):384-399.
- (27) Pui CH, Crist WM, Look AT. Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1990; 76(8):1449-1463.
- (28) Ferrando AA, Look AT. Clinical implications of recurring chromosomal and associated molecular abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2000; 37(4):381-395.
- (29) Pui CH, Crist WM. Cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia correlates with clinical features and treatment outcome. *Leuk Lymphoma* 1992; 7(4):259-274.

- (30) Gurney JG, Davis S, Severson RK, Fang JY, Ross JA, Robison LL. Trends in cancer incidence among children in the U.S. *Cancer* 1996; 78(3):532-541.
- (31) Kroll ME, Draper GJ, Stiller CA, Murphy MF. Childhood leukemia incidence in Britain, 1974-2000: time trends and possible relation to influenza epidemics. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(6):417-420.
- (32) Hjalgrim LL, Rostgaard K, Schmiegelow K, Soderhall S, Kolmannskog S, Vettenranta K et al. Age- and sex-specific incidence of childhood leukemia by immunophenotype in the Nordic countries. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(20):1539-1544.
- (33) Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993; 54(4):594-606.
- (34) Instituto Nacional de Câncer. Instituto Nacional de Cancer. Cancer na criança e no adolescente no Brasil. Dados dos registros de base populacional e mortalidade. Rio de Janeiro: 2008.
- (35) Greaves M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer* 1999; 35(14):1941-1953.
- (36) Greaves MF. Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1988; 2(2):120-125.
- (37) Bader JL, Miller RW. Neurofibromatosis and childhood leukemia. *J Pediatr* 1978; 92(6):925-929.
- (38) Hecht F, Hecht BK. Cancer in ataxia-telangiectasia patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 46(1):9-19.
- (39) Taylor GM, Dearden S, Ravetto P, Ayres M, Watson P, Hussain A et al. Genetic susceptibility to childhood common acute lymphoblastic leukaemia is associated with polymorphic peptide-binding pocket profiles in HLA-DPB1*0201. *Hum Mol Genet* 2002; 11(14):1585-1597.
- (40) Lehtinen M, Koskela P, Ogmundsdottir HM, Bloigu A, Dillner J, Gudnadottir M et al. Maternal herpesvirus infections and risk of acute lymphoblastic leukemia in the offspring. *Am J Epidemiol* 2003; 158(3):207-213.
- (41) Naumburg E, Bellocco R, Cnattingius S, Jonzon A, Ekblom A. Perinatal exposure to infection and risk of childhood leukemia. *Med Pediatr Oncol* 2002; 38(6):391-397.
- (42) Roman E, Simpson J, Ansell P, Kinsey S, Mitchell CD, McKinney PA et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia and infections in the first year of life: a report from the United Kingdom Childhood Cancer Study. *Am J Epidemiol* 2007; 165(5):496-504.
- (43) Buckley JD, Buckley CM, Ruccione K, Sather HN, Waskerwitz MJ, Woods WG et al. Epidemiological characteristics of childhood acute lymphocytic leukemia.

- Analysis by immunophenotype. The Childrens Cancer Group. *Leukemia* 1994; 8(5):856-864.
- (44) Petridou E, Revinthi K, Alexander FE, Haidas S, Kolioukas D, Kosmidis H et al. Space-time clustering of childhood leukaemia in Greece: evidence supporting a viral aetiology. *Br J Cancer* 1996; 73(10):1278-1283.
- (45) Smith MA, Strickler HD, Granovsky M, Reaman G, Linet M, Daniel R et al. Investigation of leukemia cells from children with common acute lymphoblastic leukemia for genomic sequences of the primate polyomaviruses JC virus, BK virus, and simian virus 40. *Med Pediatr Oncol* 1999; 33(5):441-443.
- (46) Shiramizu B, Yu Q, Hu N, Yanagihara R, Nerurkar VR. Investigation of TT virus in the etiology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2002; 19(8):543-551.
- (47) MacKenzie J, Gray D, Pinto-Paes R, Barrezueta LF, Armstrong AA, Alexander FA et al. Analysis of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 subtypes in EBV-associated lymphomas from Brazil and the United Kingdom. *J Gen Virol* 1999; 80 (Pt 10):2741-2745.
- (48) MacKenzie J, Gallagher A, Clayton RA, Perry J, Eden OB, Ford AM et al. Screening for herpesvirus genomes in common acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001; 15(3):415-421.
- (49) Ablashi DV, Josephs SF, Buchbinder A, Hellman K, Nakamura S, Llana T et al. Human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J Virol Methods* 1988; 21(1-4):29-48.
- (50) Chan LC, Lam TH, Li CK, Lau YL, Li CK, Yuen HL et al. Is the timing of exposure to infection a major determinant of acute lymphoblastic leukaemia in Hong Kong? *Paediatr Perinat Epidemiol* 2002; 16(2):154-165.
- (51) Petridou E, Dalamaga M, Mentis A, Skalkidou A, Moustaki M, Karpathios T et al. Evidence on the infectious etiology of childhood leukemia: the role of low herd immunity (Greece). *Cancer Causes Control* 2001; 12(7):645-652.
- (52) Kerr JR, Barah F, Cunniffe VS, Smith J, Vallely PJ, Will AM et al. Association of acute parvovirus B19 infection with new onset of acute lymphoblastic and myeloblastic leukaemia. *J Clin Pathol* 2003; 56(11):873-875.
- (53) Kinlen LJ, Hudson C. Childhood leukaemia and poliomyelitis in relation to military encampments in England and Wales in the period of national military service, 1950-63. *BMJ* 1991; 303(6814):1357-1362.
- (54) Wolff SP. Leukaemia and wartime evacuation. *Nature* 1991; 349(6304):23.
- (55) Kinlen LJ, Petridou E. Childhood leukemia and rural population movements: Greece, Italy, and other countries. *Cancer Causes Control* 1995; 6(5):445-450.

- (56) Langford I. Childhood leukaemia mortality and population change in England and Wales 1969-73. *Soc Sci Med* 1991; 33(4):435-440.
- (57) Stiller CA, Kroll ME, Boyle PJ, Feng Z. Population mixing, socioeconomic status and incidence of childhood acute lymphoblastic leukaemia in England and Wales: analysis by census ward. *Br J Cancer* 2008; 98(5):1006-1011.
- (58) Wartenberg D, Schneider D, Brown S. Childhood leukaemia incidence and the population mixing hypothesis in US SEER data. *Br J Cancer* 2004; 90(9):1771-1776.
- (59) Alexander FE, Chan LC, Lam TH, Yuen P, Leung NK, Ha SY et al. Clustering of childhood leukaemia in Hong Kong: association with the childhood peak and common acute lymphoblastic leukaemia and with population mixing. *Br J Cancer* 1997; 75(3):457-463.
- (60) Parslow RC, Law GR, Feltbower R, Kinsey SE, McKinney PA. Population mixing, childhood leukaemia, CNS tumours and other childhood cancers in Yorkshire. *Eur J Cancer* 2002; 38(15):2033-2040.
- (61) Law GR, Parslow RC, Roman E. Childhood cancer and population mixing. *Am J Epidemiol* 2003; 158(4):328-336.
- (62) Greaves M. Childhood leukaemia. *BMJ* 2002; 324(7332):283-287.
- (63) Smith M. Considerations on a possible viral etiology for B-precursor acute lymphoblastic leukemia of childhood. *J Immunother* 1997; 20(2):89-100.
- (64) Smith MA, Chen T, Simon R. Age-specific incidence of acute lymphoblastic leukemia in U.S. children: in utero initiation model. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(20):1542-1544.
- (65) Brasil.Ministério da Saúde. Sistema de informação sobre mortalidade. www.datasus.gov.br . 30-6-2008.

Ref Type: Electronic Citation

- (66) Brasil, Ministério da Saúde. Registro hospitalar de câncer. Relatório anual 1994/1998. www.inca.gov.br . 1-6-2008.

Ref Type: Electronic Citation

- (67) Pombo-de-Oliveira MS CJADCMCKDJea. . Biological diversity variations of pediatric acute leukemia in Brazil: contribution of immunophenotypic profiles to epidemiological studies. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2005; 27(1):21-26.
- (68) Boing AF, Vargas SA, Boing AC. [The burden of neoplasm in Brazil: mortality and hospital morbidity from 2002 to 2004]. *Rev Assoc Med Bras* 2007; 53(4):317-322.
- (69) Leal CH, Wunsch F, V. [Mortality by industrialization-related leukemias]. *Rev Saude Publica* 2002; 36(4):400-408.

- (70) Brasil.Ministério da Saúde. Sistema de informações sobre mortalidade. Ministério da Saúde . 2008. 30-6-2008.

Ref Type: Electronic Citation

- (71) Brasil.Ministério da Saúde. . Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1a ed. Brasília: 2006.
- (72) Bhattacharya SK, Sur D, Karbwang J. Childhood visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006; 123(3):353-356.
- (73) Grech V, Mizzi J, Mangion M, Vella C. Visceral leishmaniasis in Malta--an 18 year paediatric, population based study. *Arch Dis Child* 2000; 82(5):381-385.
- (74) Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354(9185):1191-1199.
- (75) Sociedade Brasileira de Pediatria. Manual Prático de Atendimento em Consultório e Ambulatório de Pediatria. SBP . 2008. 10-6-2008.

Ref Type: Electronic Citation

- (76) Sinha PK, Pandey K, Bhattacharya SK. Diagnosis & management of leishmania/HIV co-infection. *Indian J Med Res* 2005; 121(4):407-414.
- (77) Fakhar M, Asgari Q, Motazedian MH, Monabati A. Mediterranean visceral leishmaniasis associated with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Parasitol Res* 2008; 103(2):473-475.
- (78) Kopterides P, Mourtzoukou EG, Skopelitis E, Tsavaris N, Falagas ME. Aspects of the association between leishmaniasis and malignant disorders. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101(12):1181-1189.

- (79) Brasil. Ministério da Saúde . 2008.

Ref Type: Electronic Citation

- (80) Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1st ed. Brasília: 2006.
- (81) Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. *N Engl J Med* 2004; 350(6):586-597.
- (82) Kerr JR, Barah F, Cunniffe VS, Smith J, Vallely PJ, Will AM et al. Association of acute parvovirus B19 infection with new onset of acute lymphoblastic and myeloblastic leukaemia. *J Clin Pathol* 2003; 56(11):873-875.
- (83) Braun DK, Dominguez G, Pellett PE. Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(3):521-567.
- (84) Campadelli-Fiume G MPML. Human Herpesvirus 6: An Emerging Pathogen. CDC . 2-7-2008.

Ref Type: Electronic Citation

- (85) Prober C. Sixth disease and the ubiquity of human herpesviruses. *N Engl J Med* 2005; 352(8):753-755.

- (86) Zerr DM, Meier AS, Selke SS, Frenkel LM, Huang ML, Wald A et al. A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. *N Engl J Med* 2005; 352(8):768-776.
- (87) Fujita H, Maruta A, Tomita N, Taguchi J, Sakai R, Shimizu A et al. Human herpesvirus-6-associated exanthema in a patient with acute lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1996; 92(4):947-949.
- (88) Ward KN, Thiruchelvam AD, Couto-Parada X. Unexpected occasional persistence of high levels of HHV-6 DNA in sera: detection of variants A and B. *J Med Virol* 2005; 76(4):563-570.
- (89) Ohyashiki JH, Abe K, Ojima T, Wang P, Zhou CF, Suzuki A et al. Quantification of human herpesvirus 6 in healthy volunteers and patients with lymphoproliferative disorders by PCR-ELISA. *Leuk Res* 1999; 23(7):625-630.
- (90) Salonen MJ, Siimes MA, Salonen EM, Vaheri A, Koskiniemi M. Antibody status to HHV-6 in children with leukaemia. *Leukemia* 2002; 16(4):716-719.
- (91) Gentile G, Mele A, Ragona G, Faggioni A, Zompetta C, Tosti ME et al. Human herpes virus-6 seroprevalence and leukaemias: a case-control study. GIMEMA (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell' Adulto). *Br J Cancer* 1999; 80(7):1103-1106.
- (92) Wittekindt B, Berger A, Porto L, Vlaho S, Gruttner HP, Becker M et al. Human herpes virus-6 DNA in cerebrospinal fluid of children undergoing therapy for acute leukaemia. *Br J Haematol* 2009; 145(4):542-545.
- (93) Seror E, DeVillartay P, Leverger G, Lenoir G. [HHV-6 infection and acute lymphoblastic leukemia in a child]. *Arch Pediatr* 2008; 15(1):37-40.
- (94) Prober C. Sixth disease and the ubiquity of human herpesviruses. *N Engl J Med* 2005; 352(8):753-755.
- (95) Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 2002; 296(5567):490-494.
- (96) Pombo de Oliveira MS, Koifman S, Vasconcelos GM, Emerenciano M, de Oliveira NC. Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 2009; 42(2):121-125.
- (97) Armitage P. Theory and practice in medical statistics. *Stat Med* 2001; 20(17-18):2537-2548.
- (98) Coeli CM, Veras RP, Silva Freire CE. [Capture-recapture methodology: an option for surveillance of non-communicable diseases in the elderly]. *Cad Saude Publica* 2000; 16(4):1071-1082.
- (99) Dunn J, Andreoli SB. [Capture and recapture method: a new methodology for epidemiological research]. *Rev Saude Publica* 1994; 28(6):449-453.

- (100) Capture-recapture and multiple-record systems estimation II: Applications in human diseases. International Working Group for Disease Monitoring and Forecasting. *Am J Epidemiol* 1995; 142(10):1059-1068.
- (101) Capture-recapture and multiple-record systems estimation I: History and theoretical development. International Working Group for Disease Monitoring and Forecasting. *Am J Epidemiol* 1995; 142(10):1047-1058.
- (102) Coeli CM, Veras RP, Silva Freire CE. [Capture-recapture methodology: an option for surveillance of non-communicable diseases in the elderly]. *Cad Saude Publica* 2000; 16(4):1071-1082.
- (103) Brenner H. Effects of misdiagnoses on disease monitoring with capture--recapture methods. *J Clin Epidemiol* 1996; 49(11):1303-1307.
- (104) Coeli CM, Veras RP, Silva Freire CE. [Capture-recapture methodology: an option for surveillance of non-communicable diseases in the elderly]. *Cad Saude Publica* 2000; 16(4):1071-1082.
- (105) Kim DS, Lee MS, Kim DH, Bae JM, Shin MH, Lee CM et al. Evaluation of the completeness of cancer case ascertainment in the Seoul male cohort study: application of the capture-recapture method. *J Epidemiol* 1999; 9(3):146-154.
- (106) Brenner H, Stegmaier C, Ziegler H. Estimating completeness of cancer registration: an empirical evaluation of the two source capture-recapture approach in Germany. *J Epidemiol Community Health* 1995; 49(4):426-430.
- (107) Dockerty JD, Becroft DM, Lewis ME, Williams SM. The accuracy and completeness of childhood cancer registration in New Zealand. *Cancer Causes Control* 1997; 8(6):857-864.
- (108) Crocetti E, Miccinesi G, Paci E, Zappa M. An application of the two-source capture-recapture method to estimate the completeness of the Tuscany Cancer Registry, Italy. *Eur J Cancer Prev* 2001; 10(5):417-423.
- (109) McClish D, Penberthy L. Using Medicare data to estimate the number of cases missed by a cancer registry: a 3-source capture-recapture model. *Med Care* 2004; 42(11):1111-1116.
- (110) Coeli CM, Veras RP, Silva Freire CE. [Capture-recapture methodology: an option for surveillance of non-communicable diseases in the elderly]. *Cad Saude Publica* 2000; 16(4):1071-1082.
- (111) Levine PH, Ablashi DV, Saxinger WC, Connelly RR. Antibodies to human herpes virus-6 in patients with acute lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1992; 6(11):1229-1231.
- (112) Schlehofer B, Blettner M, Geletneky K, Haaf HG, Kaatsch P, Michaelis J et al. Sero-epidemiological analysis of the risk of virus infections for childhood leukaemia. *Int J Cancer* 1996; 65(5):584-590.

- (113) Bogdanovic G, Jernberg AG, Priftakis P, Grillner L, Gustafsson B. Human herpes virus 6 or Epstein-Barr virus were not detected in Guthrie cards from children who later developed leukaemia. *Br J Cancer* 2004; 91(5):913-915.
- (114) Ma XT, Song YH, Lu DM, Mu GF, Li G, Ji LX et al. Human herpesvirus 6 in hematologic diseases in China. *Haematologica* 2000; 85(5):458-463.
- (115) Ma XT, Song YH, Lu DM, Mu GF, Li G, Ji LX et al. Human herpesvirus 6 in hematologic diseases in China. *Haematologica* 2000; 85(5):458-463.
- (116) MacKenzie J, Greaves MF, Eden TO, Clayton RA, Perry J, Wilson KS et al. The putative role of transforming viruses in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2006; 91(2):240-243.
- (117) Kushner I, Rzewnicki D, Samols D. What does minor elevation of C-reactive protein signify? *Am J Med* 2006; 119(2):166-28.
- (118) Lloyd-Jones DM, Liu K, Tian L, Greenland P. Narrative review: Assessment of C-reactive protein in risk prediction for cardiovascular disease. *Ann Intern Med* 2006; 145(1):35-42.
- (119) Marnell L, Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clin Immunol* 2005; 117(2):104-111.
- (120) Walker SA, Riches PG, Rogers TR, White S, Hobbs JR. Value of serum C-reactive protein measurement in the management of bone marrow transplant recipients. Part II: Late post-transplant period. *J Clin Pathol* 1984; 37(9):1022-1026.
- (121) Walker SA, Rogers TR, Riches PG, White S, Hobbs JR. Value of serum C-reactive protein measurement in the management of bone marrow transplant recipients. Part I: Early transplant period. *J Clin Pathol* 1984; 37(9):1018-1021.
- (122) Trichopoulos D, Psaltopoulou T, Orfanos P, Trichopoulou A, Boffetta P. Plasma C-reactive protein and risk of cancer: a prospective study from Greece. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(2):381-384.
- (123) Kapila K, Prakash MB, Mehrotra R, Verma K. Testicular leishmaniasis in a boy with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Cytol* 1994; 38(5):878-879.
- (124) Mehrotra R, Choudhry VP, Saxena R, Kapila K, Saraya AK. Asymptomatic visceral leishmaniasis in a child with acute lymphoblastic leukaemia. *J Infect* 1995; 30(2):157-159.
- (125) Di Cataldo A, Lo NL, Marino S, Schiliro G. Visceral leishmaniasis in three children with leukemia. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15(10):916-918.
- (126) Pati HP, Kashyap R, Choudhry VP, Mohapatra M. Visceral leishmaniasis: an opportunistic infection in haematological malignancy. *Haematologia (Budap)* 1999; 29(4):295-300.

- (127) Aguado JM, Gomez BJ, Figuera A, de Villalobos E, Fernandez-Guerrero ML, Sanchez FJ. Visceral leishmaniasis (kala-azar) complicating acute leukaemia. *J Infect* 1983; 7(3):272-274.

CAPÍTULO

Anexo

Implicações das infecções e da hipótese adrenal na patogênese da leucemia linfoblástica aguda.

A seguir estão os resultados deste estudo, no artigo intitulado “*Implications of infectious diseases and the adrenal hypothesis in the etiology of childhood acute lymphoblastic leukemia*”.

Sumarizando: Neste artigo discutimos a Hipótese adrenal na patologia da leukemia linfóide aguda no contexto das características da população brasileira.

Artigo aceito pela Br J Med Mol Dis.

Implications of infectious diseases and the adrenal hypothesis in the etiology of childhood acute lymphoblastic leukemia

Azevedo-Silva, F.1, de Camargo, B. 1, Pombo-de-Oliveira, M.S.1*

Key words: Lymphoblastic leukemia; Acute; Childhood; Epidemiology; Infection; Kala-azar.

Acknowledgment of research grants and fellowships (MSPO is supported in part by a grant-in-aid from the CNPq,#309091/2007-1 and INCA-FAF/Swiss Bridge Foundation (#230150-4)

Abstract:

Acute leukemia is the most frequent cancer in children. Recently a new hypothesis was proposed for the childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) pathogenesis. The so-called “Adrenal Hypothesis” presented an important role of endogenous cortisol for the etiology of B-cell precursor-ALL. The incidence peak of ALL between 3 to 5 years old has been well documented and contributes to this assumption. The adrenal hypothesis proposes that the risk of childhood Bcell precursor ALL is reduced when early childhood infections induce qualitative and quantitative changes in the hypothalamus–pituitary–adrenal axis. The increased plasma cortisol levels would be sufficient to eliminate clonal leukemic cells originated during the foetal life. Because Brazil is a continental and tropical country, the infections exposures are diversified with endemic viral and regionally non-viral infections, with some characteristics that hypothetical supports the recent adrenal hypothesis. Here we discuss this new hypothesis taking into consideration data from epidemiological studies and the possible implications of the diversity of infections occurring in children from Brazil.

In a recent publication Schmiegelow and colleagues (Schmiegelow *et al*, 2008d) proposed an important role of cortisol plasmatic level to the etiology of common-Acute Lymphoblastic Leukemia (c-ALL), nominating as “adrenal hypothesis”. This adrenal hypothetical etiology of c-ALL merged from several evidences disclosed through descriptive epidemiological data around the world (Edgar & Morgan, 2008), and from clinical evidences of mechanistic process of adrenocorticotrophic hormones therapy (Gaynon & Carrel, 1999). The majority of the currently data sustaining the role of infections in the pathogenesis of c-ALL has taken into consideration the presence of an incidence peak of c-ALL in children between 3 to 5 years-old from developed and hygienic countries (Edgar & Morgan, 2008). The combination of ethnic homogeneity, free and easily accessible public health care, and unparalleled registration of all children diagnosed with leukemia, have made the Nordic countries a good setting to test the hypothesis that sustain the protective role of infections in c-ALL pathogenesis (5). Infections can to stimuli in the hypothalamus–pituitary–adrenal axis leading to the increased plasma cortisol levels sufficient to eliminate clonal leukemic cells originated during the foetal life (1).

Only few studies with immunophenotyping tests were subjected to epidemiological analysis in developing countries (Rego *et al*, 1996). Nowadays, different scenarios is merging, mainly in countries as Brazil and Mexico in a manner of allowing international comparisons (Bernaldez-Rios *et al*, 2008;Rego *et al*, 1996). Since the year 2000, there was a remarkable improvement in the recognition of pediatric malignancies in Brazil. The development of a national program which provides access to immunophenotype and molecular tests (Bernaldez-Rios *et al*, 2008) and the development of Population-based Cancer Registries (PBCR), turning the data more reliable for health measures. In a series of 1,690 ALL cases ascertained in a period of 8 years (2000-2007), c-ALL (Figure 1),

presented a curve of age /frequency of B precursors ALL (Bp-ALL) smoother than the observed in developed countries, similar to that described in Mexico (Rego *et al*, 1996). Interesting is that, when we compared the age-specific incidence rates and median of acute leukemia by the reference period from data generated by the Brazilian PBCR, the same shape of broad curve is found (9).

Despite of the fact that, opportunity to access the health care has gradually improved the recognition of pediatric malignancies, the scenario regarding age and incidence of ALL remain unchangeable when we compared the present data with previous publications (Pombo de Oliveira *et al*, 2009). Age-peak profile today seems to be the same as a decade before, corroborating with Schmiegelow and colleagues (Schmiegelow *et al*, 2008c) assumption that the lower registry incidence of childhood ALL is not resultant (only) of underreporting or misdiagnosis notifications. This dataset analysis has also demonstrated that there was an increased diagnosis (3 folds-rates) of acute leukemia from 2000-2007 comparatively to 1990-1999 (Bernaldez-Rios *et al*, 2008). Immunophenotyping and molecular tests were performed in order to evaluate whether the biomarkers would differ according to age, skin color and residence regions. Presently, Bp-ALL accounts for 59% (n= 1,425) of the total ALL cases, in a similar pattern distribution of subtypes, according to geographical regions (Bernaldez-Rios *et al*, 2008).

In this series of Bp-ALL cases, we found in c-ALL (n=812) that 18.7% of cases harboring *ETV6-RUNX1* gene fusion. This frequency is similar to previous reported in a small series of Bp-ALL and, slightly lower than usually reported in developed countries as 25 to 30% of c-ALL cases (Magalhaes *et al*, 2000). Data analysis from PBCRs representatives of the 5 different Brazil's regions demonstrated that the incidence rate of ALL could differs regionally (Table 1). For instance, the mean rate of childhood leukemia incidence adjusted by age demonstrated higher rates for both male and female in Curitiba (Southeast of Brazil) and Goiania (Centre-West), whereas the lower rate was in Salvador and Aracaju (Northeast) (12). The populations at risk in the geographical regions where the PBCR are located are social and economically distinct.

Because childhood leukaemia must be treated in a specialized care unit, we cannot rule out that leukaemia occurring in population of low income status could be underreported or misdiagnosed. Therefore, we have recently demonstrated that underreported cases could also vary between PBCRs (13).

Because Brazil is a continental and tropical country, the infections exposures are diversified with endemic viral and regionally non-viral infections, with some characteristics that hypothetical supports the recent Schmiegelow's hypothesis (Schmiegelow *et al*, 2008b). These differences of incidence rate in Brazil could be explained by early exposure of different kinds of infections, and possible continuous level of cortisol secretions that could eliminate abnormal leukemic clones in children living in area of persistent exposure to infection's agents. It is true that socio-economic levels as confounding factors can difficult the understanding of boundaries among different environmental risk factors associated with ALL. Sanitation and vaccination have being gradually improved in different areas of Brazil, and it might explain the high incidence of childhood ALL in more developed cities. A recent study described by Ribeiro *et al* (Ribeiro *et al*, 2008), disclosed that in São Paulo city (Southern region), poverty district tend to have a smaller number of cases of childhood ALL.

Although infant mortality in Brazil has decreased as a whole, inequalities still exist across the country and the Northeast region have higher rates of poor housing conditions with deficient sanitation. In 2005 the overall leading causes of inpatients morbidity were

respiratory diseases (42.2%) followed by infectious diseases (27.1%) in children aged 1-4 years (Brasil, 2008b).

Regarding vector-borne diseases in 1999, 632,600 new cases of malaria were recorded although malaria mortality was reduced from 0.7 to 0.1 deaths per 100,000 individuals. Dengue fever presented in 2006 with nearly 270,000 reported cases. In 2006 there were nearly 4,000 cases of visceral leishmaniasis and 23,583 cases of cutaneous leishmaniasis reported. These types and severity infections influence the imbalanced equilibrium of Th1/Th2 responses. Studies demonstrated that the *L. chagasi* infection and the human immune response results in an asymptomatic clinical phase with Th1 type immune response with hypersensitivity, and symptomatic period (Kala-azar) with Th2 response characterized by hyposensitivity. Between these two stages of immune modulation affected individuals can present an intermediate sub clinical phase with undefined immunological characteristics (Holaday *et al*, 1993; Jeronimo *et al*, 2000).

What is the correlation between this explanation and the Schmiegelow's hypothesis?

Quoting the work of Dunne and Cooke, about the consequence of the extended infectious disease burden and the adaptative effect of cytokines responses to IL-4, IL-10 and IL-12 (17), the authors argue that an over-reactive inflammatory response is minimized by the anti-inflammatory effect of endogenous cortisol secretion and subsequently this cortisol action could eliminate the possible leukemic clone and the reason for low incidence of c-ALL in malnourished children. In our view-point, the understanding of the implications of such infectious diseases with intense stimulation of immune system, and other environmental exposure of lymphoid cells toward an acute leukemia would help to test Schmiegelow's hypothesis in Brazil. In our experience diagnosing acute leukemia in samples from children living in endemic areas of *L. chagasi* infections, we found children, in which the bone marrow aspiration analysis by flow cytometry, have identified a higher proportion of immature cells with CD19+/CD10+/CD38+ profile compatible with cell proliferation status. Morphology, immuno-molecular and serological tests and, clinical follow-up of these patients excluded the diagnosis of acute leukemia. Thus, in five children a concomitant diagnosis of ALL and the presence of amastigotes forms in histiocytes (*L. chagasi*) were found (Azevedo-Silva, F. *et al*, unpublished results). Whether a possible role of parasitic infection, or even, Kala-azar treatments would be associated with acute leukemia pathogenesis remain to be tested.

To further explore and test this hypothesis we have been analyzing data settings from endemic area of Kala-azar (Salvador, Recife, João Pessoa). First of all, we have reviewed the age-adjusted incidence rate of ALL by the method of capture and re-capture in order to include possible unreported ALL cases to the PBCRs (13); secondly, we are analyzing whether the magnitude of risk of serological positive *L. chagasi* infection, as a *proxi* of previous exposure, would be or not associated with c-ALL in these 3 cities (Azevedo-Silva, F. *et al*, unpublished results); then, we begun to evaluate the percentage of healthy newborns harboring *ETV6/RUNX1*-positive cord blood cells [as risk of developing c-ALL], in order to test if associated factors would be related to disappearance of such „preleukemic“ cells in the infancy, and would influence the subsequent risk of ALL in settings like João Pessoa-PB and São Luis-Maranhão.

To sum up, the existing scientific data suggest that infection plays a critical role in the development of c-ALL, albeit no particular microbial agent is directly implicated. It is plausible that high burden of severe and continuous infections episodes may contribute to reduce childhood ALL due to endogenous cortisol secretion. As these hypotheses remain to be proved, the evaluation of parasitic infection that directly affect bone marrow environment should be test in order to bring another piece of the ALL pathogenesis puzzle.

Reference List

- (1) Schmiegelow K, Vestergaard T, Nielsen SM, Hjalgrim H. Etiology of common childhood acute lymphoblastic leukemia: the adrenal hypothesis. *Leukemia* 2008; 22(12):2137-2141.
- (2) Edgar K, Morgan A. Does infections cause or prevent childhood leukemia? A review of the scientific evidence. London: Children with leukemia 2008;1-43.
- (3) Gaynon PS, Carrel AL. Glucocorticosteroid therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Adv Exp Med Biol* 1999; 457:593-605.
- (4) Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 2006; 6: 193-203.
- (5) Hjalgrim LL, Rostgaard K, Schmiegelow K, Soderhall S, Kolmannskog S, Vettenranta K et al. Age-sex-specific incidence of childhood leukemia by immunophenotype in Nordic countries. *Journal of National Cancer Institute* 2003;95(20):1539-1544.
- (6) Rego E, Garcia A, Viana S, Falcao R. Characterization of acute lymphoblastic leukemia subtypes in Brazilian patients. *Leuk Res* 1996; 20(4):349-355.
- (7) Pombo de Oliveira MS, Koifman S, Vasconcelos GM, Emerenciano M, de Oliveira NC. Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 2009; 42(2):121-125.
- (8) Bernaldez-Rios R, Ortega-Alvarez M, Alatorre-Medina L, Perez-Saldivar M, Campo-Martinez M, Rodriguez-Zepeda M et al. The age incidence of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Mexico city. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008; 30(3):199-203.
- (9) de Camargo B, de Oliveira SM, Rebelo MS, de Souza RR, Ferman S, Noronha CP, Pombo-de-Oliveira MS. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: First report of 14 population-based cancer registries. *Int.J.Cancer*. 2009, *in press* DOI 10.1002/ijc.24799
- (10) Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, Bieber CA. The international incidence of childhood cancer. *Int.J.Cancer* 1988; 42: 511-520
- (11) Magalhaes IQ, Pombo-de-Oliveira MS, Bennett CA, Cordoba JC, Dobbin J, Ford AM, Greaves M. TEL-AML1 fusion gene frequency in paediatric acute lymphoblastic leukaemia in Brazil. *Br J Haematol* 2000; 111(1):204-207.
- (12) Reis RS, de Camargo B, Azevedo-Silva F, Ferreira JMO, Oliveira JFP, Santos MO, Pombo-de-Oliveira MS. Childhood Leukaemia Incidence in 16 Brazilian Population-Based Cancer Registries. *Br J Cancer*, 2009 (*submitted*).
- (13) Azevedo-Silva F, Reis AS, Santos MO, Luiz RR, Pombo-de-Oliveira MS. Evaluation of childhood acute leukemia incidence and underreporting in Brazil by capture-recapture methodology. *Cancer Epidemiology*, *in press* DOI.10.106/j.canep.2009.09.004
- (14) Ribeiro KB, Buffler PA, Metayer C. Socioeconomic status and childhood acute lymphocytic leukemia incidence in Sao Paulo, Brazil. *Int J Cancer* 2008; 123(8):1907-1912.
- (15) Holaday BJ, Pompeu MM, Evans T, Braga DN, Teixeira MJ, Sousa AQ et al. Correlates of Leishmaniaspecific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis* 1993; 167(2):411-417.
- (16) Jeronimo SM, Teixeira MJ, Sousa A, Thielking P, Pearson RD, Evans TG. Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. *Clin Infect Dis* 2000; 30(3):608-609.
- (17) Dunne DW, Cooke A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(5):420-426.

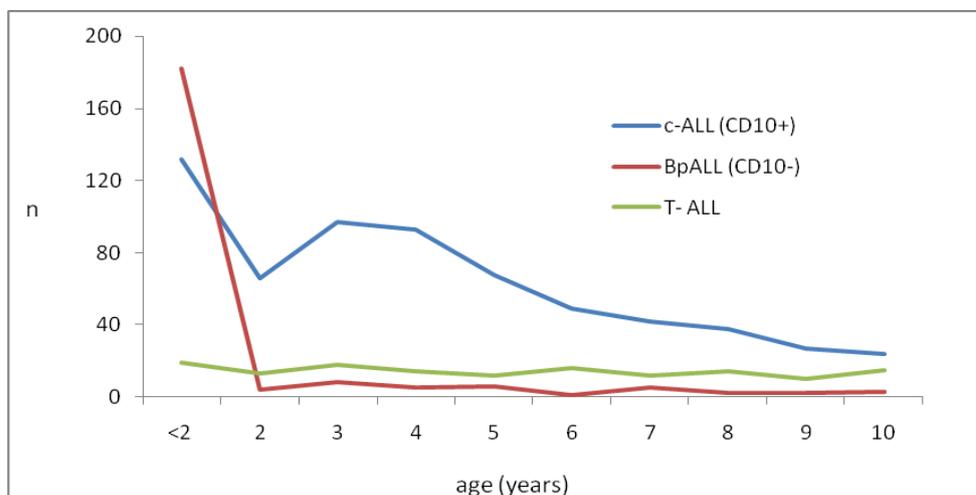
Table 1. Incidence rate of acute lymphoblastic leukemia in 14 PBCR-Brazil, 2008.

PBCR	Period	Incidence rate per million by age in both Male and female					Age- standardized rate (per million)
		0-11 months	1-4 years	5-9 years	10-14 years	15-18 years	Total
Curitiba, PR	1998-2002	15.3	85.2	57.8	26.8	24.0	48.3
Porto Alegre, RS	1998-2002	19.1	59.0	34.8	17.9	12.1	31.5
São Paulo, SP	1998-2002	18.6	50.0	31.2	26.2	18.1	31.5
Belo Horizonte, MG	2000-2003	14.3	55.7	35.1	27.4	17.8	43.1
Jaú, SP	2000-2004	-----	145.0	22.1	-----	22.2	46.4
Recife, PE	1997-2001	17.3	69.8	32.0	44.0	15.5	40.3
Natal, RN	1998-2001	-----	67.7	18.7	30.5	16.1	32.1
João Pessoa, PB	2000-2004	-----	37.1	21.4	13.0	26.0	23.0
Aracaju, SE	1996-2000	25.0	44.6	18.9	12.4	9.5	22.5
Fortaleza, CE	1998-2002	9.6	36.6	24.6	19.6	11.7	23.1
Salvador, BA	1998-2002	-----	24.3	17.3	10.0	8.0	14.5
Manaus, AM	1999-2002	37.0	94.5	50.4	28.3	18.8	49.5
Distrito Federal	1999-2002	4.8	37.5	24.9	17.0	4.4	21.1
Goiania, GO	1999-2003	32.6	64.5	57.4	27.5	33.5	46.1

Source: Instituto Nacional de Câncer, MS, 2008, www.inca.gov.br/tumores_infantis/; Reis R et al.(11); Abbreviations: PBCR= Populational-based Cancer Registry; PR= Paraná; RS=Rio Grande do Sul; SP=São Paulo; MG= Minas Gerais; PE=Pernambuco; RN=Rio Grande do Norte; PB= Paraíba; SE=Sergipe; CE= Ceará; BA=Bahia; AM=Amazonas; GO=Goiás [states of Brazil].

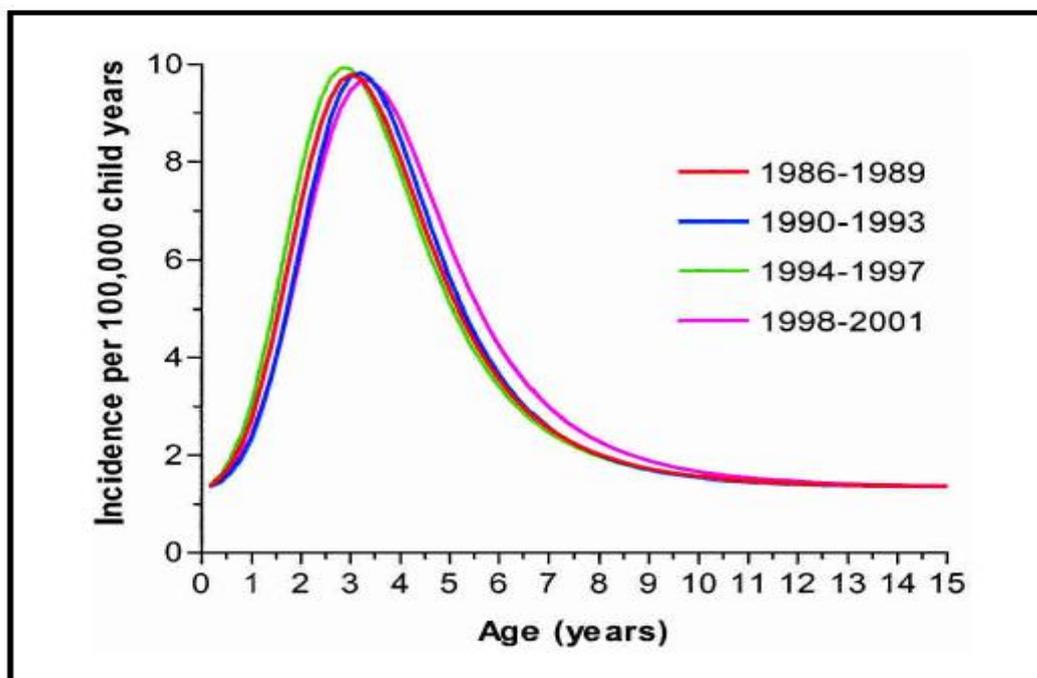
Figure 1:

(a) Distribution of age at diagnosis in a series of ALL cases from Brazil, 2000-2007.



n= number of ALL cases= 1955; BpALL= B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia; c-ALL= common B-cell precursor ALL; T-ALL= T cell acute lymphoblastic leukemia. Data source: Hospital-based ascertained cases as described (6).

Figure 1 (b). Age-specific incidence rates of B-cell precursor ALL.



Model-predicted age-specific incidences rates of B cell precursor ALL in Nordic countries (5), With permission of Oxford University Press, 2003.