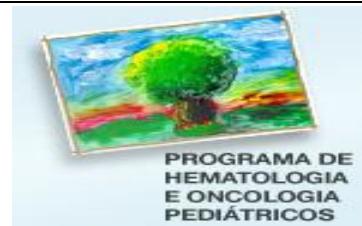




INCA
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
MINISTÉRIO DA SAÚDE



Avaliação epidemiológica das leucemias linfoblásticas em crianças brasileiras e implicação de infecções na sua patogênese.

Fernanda Azevedo Silva

Orientadora: Dra Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira.

Rio de Janeiro
Novembro de 2009

Ministério da Saúde.
Instituto Nacional de Câncer.
Pós-graduação *strictu-sensu*.

Avaliação epidemiológica das leucemias linfoblásticas em crianças brasileiras e implicação de infecções na sua patogênese.

Fernanda Azevedo Silva

Orientadora: Dra Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira.

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer.

Aprovada em 04 de novembro de 2009.

Banca Examinadora:

Dr. Ângelo Maiolino - UFRJ

Dra. Gulnar Azevedo e Silva Mendonça - UERJ

Dr. Luiz Claudio Santos Thuler - INCA

Dr. Ronir Raggio Luiz - UFRJ

Rio de Janeiro
Novembro de 2009.

S586a Silva, Fernanda Azevedo

Avaliação epidemiológica das leucemias linfoblásticas em crianças brasileiras e implicações das infecções em sua patogênese / Fernanda Azevedo Silva. - Rio de Janeiro: INCA, 2009.

123 f. il.

Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Câncer. Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA-RJ), 2009. Orientador: Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira.

1. Leucemia-linfoma linfoblástico de células precursoras - etiologia. 2. Criança. 3. Infecção. 4. Epidemiologia. 5. Oncologia. I. Pombo-de-Oliveira, Maria do Socorro. II. Título.

CDD 616.99419071

À Juju, Bibi e Cláudio.

Agradecimentos:

Agradeço a todos aqueles que tornaram este trabalho possível, em especial à minha orientadora, Dra Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório e me fez vislumbrar o campo instigante do estudo das leucemias das crianças. A Dra Socorro está sempre cheia de novas idéias e recebe calorosamente todos aqueles que procuram por sua ajuda.

Ao professor Ronir Raggio Luiz, que me recebeu de maneira muito amável e partilhou seus conhecimentos estatísticos comigo. Eu sempre fico extasiada com seus conhecimentos e idéias formidáveis. Obrigada!

Às Dras Kátia Calabrese e Celeste Souza, do laboratório de imunomodulação da Fiocruz, que realizaram as sorologias para leishmaniose.

A Rejane Reis e Marcell, da CONPREV, que fizeram o cruzamento dos dados do nosso banco como os do RCBP.

Aos pais das crianças que permitiram a inclusão dos seus filhos neste estudo. Só quem tem filhos sabe o sofrimento deles e como foi altruísta este gesto. Também agradeço aos médicos assistentes, que mesmo estando assoberbados de trabalho, enviaram os casos e perderam um pouco do seu precioso tempo para responder a nossas perguntas.

Agradeço a todos os colegas do Serviço de Hematologia e Oncologia Pediátricos, que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho. Gostaria de citar em particular a Mariana Sant'Ana que é responsável pela imunofenotipagem dos casos que chegam ao laboratório. Sem ela não haveria nenhuma tese!

Aos amigos que passaram pelo Serviço e que foram desbravar novas fronteiras: (i) Synara No Cordeiro, que realizou as sorologias de PVB19, HHV-6, dosagem de proteína C

reativa, separou amostras, organizou o banco... Não sei como o laboratório ainda funciona sem você. (ii) Fausto Ferraris, que é a pessoa mais tranqüila que eu conheci em todos estes anos. Fausto compartilhou comigo seus conhecimentos de citometria de fluxo, de HTLV (seu trabalho de mestrado), ajudou-me com o trabalho de bancada e, principalmente, incentivou-me com suas palavras, contribuindo significativamente para minha formação. (iii) Juliane Menezes, minha amiga, que foi companheira de engarrafamento na travessia da ponte e está sempre pronta a ajudar nas dificuldades. (iv) Márcia Amorim, que foi a pessoa que me ensinou a trabalhar na bancada, a padronizar uma reação de PCR e compartilhou seus conhecimentos de biologia molecular e genética comigo, foi também uma amiga e importante na troca de experiências sobre bebês.

À minha família. Meu pai que, com sua inteligência, sempre foi um ideal a ser perseguido. Minha mãe, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões e sempre está presente me ajudando, principalmente cuidando de minhas filhas para que eu pudesse escrever esta tese. Meus irmãos, Flávia e Eraldo, que sempre estão dispostos a ajudar. Meu marido, Cláudio, que é a pessoa que mais me incentiva e a quem eu sempre tive como modelo para minha vida acadêmica. Minhas filhas, Gabriela e Júlia, se não fosse por elas, esta tese não seria a mesma. E a Silvana, que já faz parte da família, porque cuida com carinho das minhas filhas enquanto estou trabalhando ou escrevendo a tese.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e Swiss Bridge que tornaram possível a realização deste trabalho.

“Fácil é ver o que queremos enxergar...
Difícil é saber que nos iludimos com o que achávamos ter visto”.

(Carlos Drummond de Andrade)

Sumário

CAPÍTULO I: Introdução.....	1
CAPÍTULO II: Fundamentos teóricos.....	4
I. Leucemias agudas pediátricas.....	5
1. Classificações.....	5
2. Aspectos clínicos.....	6
3. Achados laboratoriais.....	9
II. Marcadores biológicos específicos.....	10
1. Imunofenótipo.....	10
2. Seqüência de maturação da célula B e antígenos de célula B.....	10
3. Classificação imunofenotípica da LLA de células precursoras B.....	11
4. Genética-molecular.....	12
III. Epidemiologia e fatores de risco.....	16
1. Distribuição geográfica e incidência das leucemias linfoblásticas agudas.....	16
2. Relação com fatores de risco genéticos e ambientais.....	19
3. Hipótese de Kinlen para etiologia das leucemias pediátricas.....	21
4. Hipótese de Mel Greaves para etiologia das leucemias linfoblásticas de células B precursoras.....	22
5. Hipótese de Smith.....	24
6. Hipótese adrenal.....	25
7. Aspectos epidemiológicos das leucemias no Brasil.....	26
8. Aspectos das doenças infecciosas prevalentes na infância no Brasil.....	29
9. Leishmaniose visceral (LV), calazar.....	31
10. Viroses da infância implicadas na patogênese da LLA	36
10.1. Parvovírus B19.....	37
10.2. Herpesvírus-6.....	40
CAPÍTULO III: Justificativa do estudo.....	43
CAPÍTULO IV: Objetivos.....	46
1. Objetivo principal.....	47
2. Objetivos secundários.....	48
CAPÍTULO V: Métodos.....	49
I. Representação esquemática do estudo.....	50
II. Critérios de inclusão e exclusão.....	51
III. Análise estatística.....	52
IV. Metodologia dos testes sorológicos e bioquímicos utilizados.....	53
V. Comitê de ética em pesquisa (CEP).....	53
CAPÍTULO VI: Casuística.....	54
CAPÍTULO VII: Resultados.....	60
1. Incidência de LLA em 16 registros brasileiros.....	61
2. Avaliação da incidência de leucemia aguda na infância e de subnotificação no Brasil pelo método de captura-recaptura.....	75
3. Leishmaniose visceral e leucemia aguda.....	78
4. Avaliação de sorologia para Parvovírus B19 e Herpesvírus-6 em crianças com leucemia aguda.....	85
CAPÍTULO VIII: Discussão.....	90

CAPÍTULO IX:	
Conclusões.....	103
1. Geral.....	104
2. Específicas.....	104
CAPÍTULO X: Referências bibliográficas.....	105
CAPÍTULO XI: Anexo.....	116

Lista de Abreviaturas:

AREBT= mielodisplasia com excesso de blastos em transformação.
BK, vírus= Poliomavírus, nomeado com as iniciais do primeiro paciente onde foi isolado.
CD= cluster of differentiation.
CEP= Comitê de Ética em Pesquisa.
COV= valor de referência calculado.
Cy= citoplasmático.
DIP= doenças infecto-parasitárias.
EBV= vírus Epstein-Bar.
EDTA= anticoagulante etilenodiaminotetra cético
EGIL= European Group for Immunophenotyping Leukemias.
ELISA= imunoenensaio enzimático.
ES= exantema súbito.
FAB= grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico.
FISH= hibridização por fluorescência *in situ*.
GM-CSF= fator de crescimento de colônias granulocíticas e monocíticas.
HHV-6= Herpesvírus-6.
HLA= Antígenos Leucocitários Humanos.
HTLV-1= vírus T-linfotrópico humano.
IC= intervalo de confiança.
ICC= insuficiência cardíaca congestiva.
IFN- γ = interferon gama.
Ig= imunoglobulina.
JC, vírus= virus John Cunningham, poliomavírus.
LAs= leucemias agudas.
LDH= desidrogenase láctica.
LLA= leucemia linfóide aguda.
LLA-B= leucemia linfóide aguda de células B maduras.
LLA-pB= leucemia linfóide aguda de células B precursoras.
LLA-T= leucemia linfóide aguda de células T.
LMA= leucemia mielóide aguda.
LMC= leucemia mielóide crônica.
LNH= linfoma não-Hodgkin.
LV=leishmaniose visceral.
MHC= complexo principal de histocompatibilidade.
MI= mononucleose infecciosa.
MLL= gene “mixed-lineage leukemia”.

MO= medula óssea.
Ms= membrana de superfície.
MTHFR= gene metilenotetrahydrofolato redutase.
MYC= oncogene *MYC*.
NK= célula natural killer.
NQO1= gene quinona oxidoreductase
OMS= Organização Mundial de Saúde.
OR= razão de risco (odds ratio)
PCR= Reação em Cadeia da Polimerase
PIC= pressão intracraniana.
PTI= púrpura trombocitopênica trombótica.
PVB19= Parvovírus B19.
RAS= oncogene *RAS*.
RIFI= reação de imunofluorescência indireta.
RR= risco relativo.
RT-PCR= reação por transcriptase reversa.
SB= Southern Blot.
SIDA= síndrome de imunodeficiência adquirida.
SNC= sistema nervoso central.
TCLE= termo de consentimento livre e esclarecido.
TdT= nucleotidiltransferase terminal.
TT, vírus= vírus TT, denominado com as iniciais do paciente em que foi isolado.

Lista de quadros.

Quadro 1: Principais patologias não-malignas no diagnóstico diferencial da LLA em crianças.	9
Quadro 2: Sumário da expressão de antígenos celulares que caracterizam as leucemias de células B precursoras.	12
Quadro 3: Principais alterações genético-moleculares na LLA infantil.	15
Quadro 4: Principais estudos avaliando RCBP pelo método de captura-recaptura.	95
Quadro 10: Estudos sobre a associação de leucemia aguda e HHV-6.....	98
Quadro 11: Estudos sobre associação de Parvovírus B19 e leucemia aguda.	99
Quadro 12: Estudos associando Leishmaniose visceral e leucemia aguda.	102

Lista de tabelas.

Tabela 1: Taxas de incidência de leucemia aguda de acordo com a área geográfica.	17
Tabela 2: Taxas de incidência (por 100 000 habitantes) de leucemia infantil no Brasil.	18
Tabela 3: Taxas de mortalidade por leucemias, por idade, em 100 000 homens e mulheres (1995-1999).....	27
Tabela 4: Distribuição das internações por grupos de patologias e faixa etária, 2006.....	30
Tabela 5: Taxas de incidência de leishmaniose visceral, por 100 000 habitantes, por faixa etária e região geográfica, 2005.....	35
Tabela 6: Distribuição dos casos de LLA de acordo com a região geográfica de origem....	57
Tabela 7: Características demográficas dos casos selecionados para análise.....	58

Lista de figuras.

Figura 1: Comparação das hipóteses de Greaves e Kinlen.....	24
Figura 2: Distribuição dos casos autóctones de Leishmaniose visceral por município, Brasil, 2002.....	35
Figura 3: Formas promastigotas do <i>L.chagasi</i>	36
Figura 4: Formas amastigotas teciduais do <i>L.chagasi</i>	36
Figura 5: Infecção pelo Parvovírus B19.	39
Figura 6: Aspecto típico do rash da sexta doença.	42
Figura 7: Distribuição dos casos analisados.	56
Figura 8: Distribuição do número de casos de LLA de acordo com subtipo e faixa etária.	59

Resumo

A LLA é a neoplasia mais comum na infância, ocorrendo principalmente entre 2-5 anos. As hipóteses atuais sugerem a necessidade de dois eventos moleculares agindo na patogênese da LLA de células B precursoras. O primeiro evento seria uma lesão genética que ocorreria durante a vida intra-uterina e o segundo evento seria conseqüente à ação de uma infecção viral neste clone aquiescente. Pouco tem sido descrito sobre a epidemiologia das leucemias agudas no Brasil. Atualmente, com o estabelecimento de registros de câncer pediátrico, é possível analisar estes dados.

Para avaliar estas hipóteses na população brasileira, que difere da população estudada nos países desenvolvidos pela exposição à patógenos, assim como no acesso a saneamento básico, realizamos um estudo epidemiológico, numa coorte de pacientes com LLA cujas amostras biológicas foram enviadas ao laboratório no contexto de rede de referência nacional. Estimamos a incidência de LLA em três cidades diferentes, utilizando o método de captura-recaptura e analisamos a exatidão do registro de câncer de base populacional destas três cidades. A incidência estimada de LLA foi 5,76/100 000 em Salvador, 6,32/100 000 em Recife e 3,20/100 000 em Belo Horizonte. A taxa de subnotificação foi de 84,5%, 64,6% e 50% para cada cidade, respectivamente. Também realizamos sorologia para Parvovírus B19 e Herpesvírus-6, assim como a dosagem de proteína C reativa (um marcador de inflamação), não tendo havido diferença entre os 110 pacientes com LLA e os 67 controles para nenhum destes testes. 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.

Finalmente, 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%. A concordância entre os testes RIFI e ELISA foi de 83%. 13 pacientes apresentavam leishmaniose visceral no momento do diagnóstico da leucemia aguda.

Nosso estudo demonstra que a incidência de LLA em crianças no Brasil pode ser maior do que o registrado até o momento devido à deficiência dos registros de câncer de base populacional, o que tem implicações no estudo da patogênese da LLA, visto que as hipóteses levam em consideração a menor incidência da doença em países em desenvolvimento. Encontramos que a prevalência de anticorpos contra Parvovírus B19 e Herpesvírus-6 é similar à da população em geral, não havendo uma associação entre estas doenças e a LLA nesta amostra. Demonstramos que existe uma associação entre leishmaniose visceral e LLA, pois esta parasitose pode dificultar o diagnóstico da leucemia, estar associada à mesma no diagnóstico, mas não foi possível demonstrar um papel desta doença na patogênese da leucemia.

Abstract:

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer in childhood, occurring mainly between ages 2-5. There are different hypothesis on ALL pathogenesis that states that two different hits are necessary to ALL development. The first one would be a molecular lesion occurring during intra-uterine life. The second one would be a common childhood viral infection. Few have been described about acute leukemia's epidemiology in Brazil.

To evaluate Brazilian population on regard ALL's pathogenesis, we studies children whose blood was sent for diagnosis proposal. We estimated ALL's incidence in three different cities and the completeness of population-based cancer registry (BPCR) using capture-recapture method. The estimated incidence was 5, 76/100 000 in Salvador, 6, 32/100 000 in Recife and 3, 20/100 000 in Belo Horizonte. The completeness of the BPCR was 15.5%, 35.4% and 50% for Salvador, Recife and Belo Horizonte, respectively. We also evaluated the seroprevalence of antibodies against Parvovirus B19 and Herpesvirus-6, as well as measurements of C-reactive protein. The seroprevalence of IgG antibodies against, HHV-6 and PVB19 in B-cell precursor ALL's patients was 76% and 42, 4%.

Finally, we described the seroprevalence of antibodies against visceral leishmaniasis in 243 ALL's children, 73 with AML and 55 controls: 3,7%, 5,5% and 14,5%, respectively. Concordance between IFI and ELISA was 83% and 13 patients presented acute visceral leishmaniasis at the time of acute leukemia diagnosis.

We found out that ALL's incidence could be higher than described in Brazil because of PBCR underreporting. The prevalence of antibodies against Parvovirus B19 and

Herpesvirus-6 was similar to that in general population, not confirming a role for those infections in ALL's pathogenesis. Visceral leishmaniasis seems to be associated with ALL as it can mimic this disease and also be concomitant to it.