



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
José de Alencar Gomes da Silva
Coordenação de Pós-graduação *Strictu sensu*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

MARIANA TAVARES DE SOUZA MONTEIRO BIZARRO

**ESTUDO CITOGENÉTICO-MOLECULAR DO LINFOMA DE BURKITT EM
CRIANÇAS E ADOLESCENTES: MUTAÇÕES DOS GENES *ID3*, *TCF3* E
CCND3 E ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS SECUNDÁRIAS**

Orientador(es): Profa. Dra. Maria Luiza Macedo Silva
Profa. Dra. Rocio Hassan

RIO DE JANEIRO

2019



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
José de Alencar Gomes da Silva
Coordenação de Pós-graduação *Strictu sensu*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

MARIANA TAVARES DE SOUZA MONTEIRO BIZARRO

**ESTUDO CITOGENÉTICO-MOLECULAR DO LINFOMA DE BURKITT EM
CRIANÇAS E ADOLESCENTES: MUTAÇÕES DOS GENES *ID3*, *TCF3* E
CCND3 E ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS SECUNDÁRIAS**

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação
Strictu Senso em Oncologia do Instituto Nacional de
Câncer (INCA) para obtenção do título de Doutor em
Oncologia

Orientador(es): Profa. Dra. Maria Luiza Macedo Silva

Profa. Dra. Rocio Hassan

RIO DE JANEIRO

2019

ii

B625e Bizarro, Mariana Tavares de Souza Monteiro
Estudo citogenético-molecular do linfoma de Burkitt em crianças e adolescentes: mutações dos genes ID3, TCF3 e CCND3 e alterações cromossômicas secundárias /Mariana Tavares de Souza Monteiro Bizarro. – Rio de Janeiro, 2019. 132 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019.

Orientadores: Maria Luiza Macedo Silva; Rocio Hassan.

1. Linfoma de Burkitt. 2. Aberrações Cromossômicas. 3. Criança.
4. Adolescente. I. Macedo, Maria Luiza (Orient.). II. Hassan, Rocio (Orient).
III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616 99446



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

MARIANA TAVARES DE SOUZA MONTEIRO BIZARRO

**ESTUDO CITOGENÉTICO-MOLECULAR DO LINFOMA DE BURKITT EM
CRIANÇAS E ADOLESCENTES: MUTAÇÕES DOS GENES *ID3*, *TCF3* E
CCND3 E ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS SECUNDÁRIAS**

**ORIENTADORES: Profa. Dra. Maria Luiza Macedo Silva
Profa. Dra. Rocio Hassan**

Aprovada em: 25/03/2019

EXAMINADORES

Dra Claudete Klumb
Dra. Eliana Abdelhay
Dr. Hector Seuanez
Dr. Marcelo Land

**RIO DE JANEIRO
2019**

**Ao meu marido, Rafael, meu principal
incentivador e companheiro e ao meu mais lindo
projeto de vida, meu filhote, Arthur, fiel parceiro e
companheiro até o fim desta empreitada e a quem
todos os meus esforços são e serão pautados desde o
dia em que soube da sua existência.**

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Luiza Macedo, pela orientação desde que cheguei ao INCA, pela oportunidade, apoio, incentivo, confiança em mim para o desenvolvimento deste projeto, pelos conhecimentos transmitidos, pelas discussões científicas e pela amizade.

À Dra. Rocio Hassan pela co-orientação, por ter aberto as portas do seu laboratório e da biologia molecular, um grande desafio, por seu incentivo, e por sua ajuda incansável nas discussões dos resultados de biologia molecular para a finalização deste trabalho.

Ao Dr. Thomas Liehr, pela colaboração e oportunidade de realizar os experimentos de citogenética molecular no seu laboratório na *Universitätsklinikum Jena*.

À Dra. Eliana Abdelhay, pelo incentivo incessante e aporte financeiro.

Ao Dr. Raul Ribeiro, pela colaboração e incentivo, por todas as revisões e pelos conhecimentos que por meio das discussões são passados e aprendidos.

À Dra. Luciana Pinto, pela colaboração como patologista do projeto, pela revisão patológica dos casos deste trabalho e pela ajuda e parceria incansável sempre que precisei de lâminas, dados ou confirmar algum diagnóstico referente a este projeto.

À Priscila Valverde e ao Eduardo, por terem me dado todo o aporte na separação de blocos de parafina dos pacientes selecionados e colaborado na preparação de lâminas histológicas e dos cortes de parafina, sempre tão pacientes, eficientes e carismáticos, e ao Dr. Davy Raposo, pela colaboração na construção dos TMAs.

Ao irmão que ganhei durante este percurso, que viveu comigo o meu dia a dia, e a quem devo uma parcela deste título, Roberto Capela.

Aqueles que estiveram comigo diariamente, na vivência do laboratório, pela amizade, cumplicidade, apoio e por terem sido minhas mãos quando precisei, e que mesmo já não mais estando presentes, foram de suma importância durante esta longa caminhada no INCA, me servindo de apoio e alicerce em algum momento: Elaine, Thiago, Luana, Deborah, Kelly e Daniela.

À Gabriela Lozada, Gabi, por sua paciência imensa e pela ajuda ímpar com os experimentos e protocolos de biologia molecular deste trabalho, pela ajuda com as análises estatísticas, por todo o seu cuidado em atender às minhas dúvidas, por sua preocupação sempre e pela amizade querida que ganhei.

À Paula, pela parceria, ajuda com experimentos deste trabalho e momentos divertidos, à Luiza, com quem dividi algumas placas de sequenciamento, e bastantes horas de experimentos. À Marcela e ao Thiago pelas mãos quando elas me faltavam, socorrendo aqui e ali. À Bianca e à Vanessa pelo acolhimento no espaço delas e imensa boa vontade (e paciência) em responder as minhas dúvidas, sempre brilhantemente, e pela convivência agradável no laboratório.

À Priscilla Segges e à Nathália Amaral pela ajuda com a padronização do FISH em parafina. À Telma Padilha e à Lili, sempre solícitas quando precisei de ajuda com o sequenciador.

Àqueles com quem tive o imenso prazer de conviver durante um curto período desta empreitada, durante meu estagio de doutorado sanduiche, que me ensinaram muito e de certa maneira aliviaram, junto com sua alegria e convivência agradável, a saudade de casa, Shayma, Ahmed e Igor. E ao Moneeb, pela supervisão e colaboração durante meu estagio na Universidade de Jena.

Àqueles que me ajudaram de maneiras diversas, sendo solícitos e agradáveis, quando nem lhes cabia tanto: Fernando (arquivo médico do INCA), Camila (Hospital da Lagoa), Dr. Carlos Azeredo (INTO), Izabelle (Universidade Federal de Pernambuco), Dra. Terezinha Marques Salles (Universidade Federal de Pernambuco) e Dra. Soraia Rouxinol (Hospital da Lagoa).

Ao colegas tão queridos do Laboratório de Citogenética e dos Laboratórios do CEMO: Elizete, Moisés, Luise, Viviane, Elaiza e Eliane, pela alegre companhia e convivência diária, e pela ajuda, quando precisei.

Ao corpo docente do PPGO do INCA, pelas lições e ensinamentos passados, seja em disciplinas, palestras e pelos corredores.

Ao pessoal da secretaria do PPGO do INCA: Rodrigo, Daniele e Andréia, por estarem sempre dispostos a ajudar nas solicitações e tirar dúvidas.

Aos órgãos de fomento, principalmente ao Ministério da Saúde, sem os quais, a realização deste projeto não seria possível.

Aos pacientes e seus familiares, sem os quais este estudo não seria possível e nem teria sentido.

Aos meus pais, Teresa e Robson, meus incansáveis incentivadores e torcedores, meus exemplos de vida e de persistência.

Ao meu marido, Rafael, aquele que me incentiva, me segura, me apoia, acredita em mim, sonha comigo e me ajuda em tudo para tornar o dia a dia menos cansativo. E ao meu filho, Arthur, que foi gerado ao longo deste caminho, e tem sido meu fiel escudeiro e o principal motivo do meu esforço e persistência.

A minha tia Valéria, minha madrinha Selma e meus sogros Marise e Ricardo, por todo o apoio e incentivo, e pela crença em mim.

Às minhas amigas Monique e Natália pela torcida, orações e por aceitarem a minha ausência constante e em especial à Patricia, por ter me socorrido muitas vezes no desespero, sempre com uma palavra encorajadora e uma oferta de ajuda, e por ter me servido como inspiração de determinação e garra, à Amanda Vieira, por mesmo trabalhando numa área totalmente distinta a minha, ter tido a paciência de sentar comigo para me explicar um pouco de bioinformática, e ser solícita sempre que surgia com um pedido de socorro, à Amanda Figueiredo, pois desde o início da minha formação sempre esteve ao meu lado ora apoiando, ora ensinando, ora puxando minha orelha e buscando dados pra mim no arquivo e à Amanda Maia por todo o apoio e incentivo desde o início da minha formação.

Agradeço principalmente à Deus, que me trouxe até aqui.

**“Um pouco de ciência afasta de
Deus. Muita aproxima Dele”
(Louis Pasteur)**



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Estudo citogenético-molecular do linfoma de Burkitt em crianças e adolescentes: mutações dos genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3* e alterações cromossômicas secundárias

RESUMO

Mariana Tavares de Souza Monteiro Bizarro

O Linfoma de Burkitt (LB) é um linfoma de alto grau de células-B maduras, sendo a leucemia linfoblástica aguda L3 (LLA-L3), sua contraparte leucêmica (em conjunto L/LB). A marca genética desta doença é o rearranjo entre o oncogene *MYC* com genes da imunoglobulina. Além do LDH alto, doença avançada e idade, as anormalidades cromossômicas adicionais vêm sendo discutidas como potenciais marcadores de prognóstico clínico desfavorável. Estudos mostraram que aproximadamente 70% dos pacientes com L/LB podem apresentar mutações nos genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3*. Logo, estudos incluindo séries de pacientes com outras situações epidemiológicas vem sendo encorajados, já que ainda não está bem definido como estão estas mutações em grupos etários distintos. A partir dessas premissas, nosso objetivo foi avaliar as frequências e tipo de alterações genéticas, a nível cromossômico e gênico em crianças e adolescentes com L/LB associados ou não ao vírus Epstein-Barr (EBV) na nossa população. Para isso, caracterizamos cito-molecularmente anormalidades cromossômicas secundárias encontradas em aspirado de medula óssea de pacientes com LLA-L3 e em tumores fixados e impregnados em parafina (FFPE) no LB, estudamos a frequência do vírus EBV e sua associação com variáveis clínico-biológicas e finalmente estudamos as mutações dos genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3*. Nesse estudo, foi possível caracterizar com precisão as anormalidades cromossômicas secundárias de 4 pacientes, observando-se um padrão cariotípico com anormalidades secundárias no LB, onde parecem prevalecer as trissomias estruturais parciais. A condição de rearranjo do *IGH/MYC* e de anormalidades envolvendo os cromossomos 1 e 13 foi estudada em 32 pacientes, dos quais 80% apresentaram o rearranjo *IGH/MYC*. Em 79% dos pacientes cujos tumores FFPE foram estudados por FISH foram encontradas alterações cromossômicas secundárias envolvendo os cromossomos 1 e 13. O EBV foi detectado em 52% (26/52) dos tumores das crianças e adolescentes, porém não houve nenhuma associação com dados clínicos de apresentação e desfecho da doença. Com relação às mutações, encontramos 67% de mutações patogênicas no gene *ID3*, 18% no gene *TCF3* e 26% no gene *CCND3*. A presença de mutações no gene *ID3* refletiu significativamente nas sobrevividas global e livre de doença ($p < 0,05$) em toda a coorte e essa observação foi uma tendência também no grupo pediátrico. Em suma, neste trabalho foi caracterizado citogenética e molecularmente um grupo de pacientes com L/LB e foi realizada a primeira descrição da frequência e impacto clínico de mutações em genes envolvidos na patogênese da doença em pacientes brasileiros.



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**Molecular-cytogenetic study in children and adolescents with Burkitt lymphoma:
mutations in *ID3*, *TCF3* e *CCND3* genes and secondary chromosome alterations**

ABSTRACT

Mariana Tavares de Souza Monteiro Bizarro

Burkitt Lymphoma (BL) is a high-grade mature B-cell lymphoma, and acute lymphoblastic leukemia subtype L3 (ALL-L3) is considered its leukemic counterpart (BL/L). The rearrangement between the *MYC* oncogene and immunoglobulin genes is the genetic hallmark of this disease. In addition to high LDH levels, advanced disease staging and age, additional chromosomal abnormalities have been discussed as potential markers of unfavorable clinical prognosis. Studies have shown that approximately 70% of patients with BL/L may present mutations in *ID3*, *TCF3*, and *CCND3* genes. Hence, the literature has encouraged studies including patients with other epidemiological status, as it's not yet well defined how these mutations are in different age groups. Based on these premises, our objective was to evaluate the frequency and type of chromosomal and genetic changes in children and adolescents with BL/L in our population, in association or not with the Epstein-Barr virus (EBV). For this purpose, we characterized cyto-molecularly secondary chromosomal abnormalities found in bone marrow aspirate of patients with ALL-L3 and fixed formalin and paraffin embedded (FFPE) BL tumors. We studied the frequency of EBV virus and its association with clinical-biological variables and finally, we studied the mutations of *ID3*, *TCF3*, and *CCND3* genes. In this study, we accurately characterized secondary chromosomal abnormalities of 4 patients, observing a karyotype pattern with secondary abnormalities in BL which seems to prevail as partial trisomies. The condition of *IGH/MYC* rearrangement and abnormalities in relation to chromosomes 1 and 13 were studied in 32 patients, from which 80% presented *IGH/MYC* fusion. Seventy-nine percent of the patients, whose FFPE tumors were studied by FISH, presented with secondary chromosome abnormalities involving chromosomes 1 and 13. EBV was detected in 52% (26/52) of children and adolescents' tumors, but we did not observe any association with clinical presentation and outcome. Regarding the mutations, we found 67% of patients carrying pathogenic mutations in the *ID3* gene, 18% in *TCF3* gene and 26% in *CCND3* gene. *ID3* mutations was significantly associated with overall survival and disease-free survival rates ($p < 0,05$) of this series, and this observation was also a tendency in paediatric patients. Briefly, in this work, we characterized cyto-molecularly a pediatric group of BL/L patients and firstly described the frequency and clinical associations of genes involved in BL/L pathogenesis in Brazilian patients.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
ÍNDICE.....	xii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiv
ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES	xv
ABREVIATURAS E SIGLAS	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Linfoma/Leucemia de Burkitt: História e Conceitos.....	1
1.2 Epidemiologia: Classificação dos subtipos clínicos e apresentação clínica.....	2
1.3 Aspectos histopatológicos e imunológicos	4
1.4 Associação com o vírus Epstein-Barr	4
1.5 Aspectos genéticos e moleculares.....	5
1.5.1 Rearranjo do oncogene <i>MYC</i> : Marcadores citogenéticos.....	5
1.5.2 Desregulação do oncogene <i>MYC</i> e sua relação com a patogênese da doença.....	8
1.5.3 Desregulação do <i>MYC</i> através de pequenos RNAs não codificantes.....	8
1.5.4. A era pós- <i>MYC</i> : mutações em genes reguladores de ciclo celular	9
1.6 Aspectos prognósticos	11
1.6.1 Anormalidades cromossômicas secundárias.....	11
1.7 Estadiamento e Tratamento	12
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo Principal.....	16
3.2 Objetivos Secundários	16
4. METODOLOGIA.....	17
4.1 Desenho do Estudo	17
4.2 Pacientes e amostras	17
4.3 Dados Clínicos e Epidemiológicos.....	19
4.4 Critérios de Inclusão.....	19
4.5 Critérios de Exclusão.....	19
4.6 Manipulação e Processamento de amostras.....	20
4.6.1 Cultura celular para estudo citogenético	20
4.6.2 Estudo cariotípico por Bandeamento G.....	21
4.6.3 Estudo dos rearranjos moleculares por Hibridação <i>in situ</i> por Fluorescência (FISH)	21
4.6.3.1 FISH a partir de amostras frescas (medula óssea e sangue periférico).	21
4.6.3.2 FISH a partir de amostras FFPE para a validação dos achados citogenéticos.....	22
4.6.3.3 Padrão de Hibridização – Critérios para análise.....	25
4.6.4 Estudo das alterações cromossômicas secundárias por Bandeamento cromossômico multicolorido (MCB).....	27
4.6.5 Métodos de extração de ácidos nucleicos.....	28
4.6.5.1 Extração de DNA a partir de amostras FFPE	28
4.6.5.2 Extração de RNA a partir de amostras FFPE	30
4.6.5.3 Avaliação da quantidade dos ácidos nucleicos extraídos.....	30
4.6.6 Métodos de PCR.....	31

4.6.6.1 Considerações Gerais	31
4.6.7 Caracterização de mutações por sequenciamento de Sanger.....	32
4.6.7.1 Purificação dos Produtos de PCR.....	33
4.6.7.2 Reação de sequenciamento.....	33
4.6.7.3 Precipitação com Etanol-EDTA	34
4.6.7.4 Análise das sequências.....	34
4.6.8 Estudos de Expressão Gênica e de miRNAs	35
4.6.8.1 Retrotranscrição e quantificação da expressão gênica por ensaios simples	35
4.6.9 Detecção e tipificação do EBV.....	38
4.6.9.1 Método de hibridização <i>in situ</i> para EBERs (EBER-ISH).....	38
4.6.9.2 Tipificação do EBV por PCR	39
4.7 Informação mínima necessária pra publicação de experimentos em PCR quantitativa (MIQE)	39
4.8 Análise Estatística.....	39
5. RESULTADOS.....	41
5.1 Apresentação Clínica	41
5.2 Detecção do rearranjo do <i>MYC</i> e de anormalidades cromossômicas secundárias	46
5.2.1 Caracterização por citogenética convencional e molecular de alterações secundárias observadas na medula óssea.....	46
5.2.2 Avaliação de anormalidades cromossômicas secundárias nas amostras de MO dos pacientes com LLA-L3	47
5.2.3 Avaliação da frequência da t(8;14) e de anormalidades cromossômicas secundárias envolvendo o 1q e 13q em pacientes com tumores FFPE	58
5.3 Estudo da expressão gênica e de microRNAs	62
5.4 Detecção do EBV e suas variantes moleculares e sua associação com características clínicas e resposta terapêutica.....	65
5.4.1 Detecção e tipagem do EBV.....	65
5.5 Análise de mutações nos genes <i>ID3</i> , <i>TCF3</i> e <i>CCND3</i> e sua associação com características clínicas, presença do EBV e resposta terapêutica.....	66
5.5.1 Frequência de mutações patogênicas nos genes <i>ID3</i> , <i>TCF3</i> e <i>CCND3</i>	66
5.5.2 Polimorfismos de base única (SNP) benignos na coorte de estudo.....	76
5.5.3 Mutações silenciosas e intrônicas na coorte de estudo.....	76
5.5.4 Associação entre as mutações nos genes <i>ID3</i> , <i>TCF3</i> e <i>CCND3</i> e as características clínicas, presença do EBV e resposta terapêutica	77
5.6 Análise de Sobrevida	80
6. DISCUSSÃO	85
7. CONCLUSÃO.....	96
8. REFERÊNCIAS	99
9. ANEXO I.....	115
10. ANEXO II.....	117
11. ANEXO III.....	121
12. ANEXO IV	131
13. ANEXO V.....	132

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1: Sistema de Estadiamento de Murphy para LNH pediátricos	13
Tabela 4.1: Iniciadores utilizados nas reações de PCR para amplificação de regiões de interesse dos genes <i>ID3</i> , <i>TCF3</i> e <i>CCND3</i>	32
Tabela 4.2: Ensaios utilizados para PCR em tempo real quantitativo pela metodologia TaqMan	37
Tabela 4.3: Ensaios utilizados para PCR em tempo real quantitativo pela metodologia SYBRgreen	37
Tabela 4.4: Ensaios utilizados para PCR em tempo real quantitativo para miRNAs.....	37
Tabela 5.1: Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes estudados	42
Tabela 5.2: Características clínicas da coorte (tumor FFPE) estudada	44
Tabela 5.3: Características citogenéticas (bandeamento G) e cito-moleculares do grupo de pacientes com MO analisada	46
Tabela 5.4: Descrição do estado mutacional e das mutações patogênicas encontradas nos genes <i>ID3</i> , <i>TCF3</i> e <i>CCND3</i> em 32 pacientes com Linfoma de Burkitt	68
Tabela 5.5: Caracterização genética das mutações patogênicas encontradas	74
Tabela 5.6: Mutações e polimorfismos de base única com potencial patogênico previamente descritos, que foram encontrados na coorte do estudo	75
Tabela 5.7: Caracterização genética das mutações patogênicas e silenciosas encontradas	77
Tabela 5.8: Características dos pacientes com LB em relação ao status de mutação de <i>ID3</i> , <i>TCF3</i> e <i>CCND3</i>	78

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1: Esquema ilustrativo da $t(8;14)(q24;q32)$	6
Figura 1.2: Esquema ilustrativo da $t(2;8)(p12;q24)$	6
Figura 1.3: Esquema ilustrativo da $t(8;22)(q24;q11.2)$	7
Figura 1.4: Via de sinalização ID3-TCF3-CCND3	10
Figura 4.1: Padrão de hibridização da sonda IGH/MYC/CEP	26
Figura 4.2: Padrão de hibridização das sondas 1p36/1q25 e D13S319/13q34	26
Figura 5.1: Cariótipos parciais mostrando as principais alterações encontradas na MO dos pacientes	47
Figura 5.2: Caracterização cromossômica do paciente P98 através de bandeamento G e FISH	48
Figura 5.3: Caracterização da anormalidade envolvendo o cromossomo 11	49
Figura 5.4: Refinamento dos pontos de quebra do cariótipo do paciente P98	50
Figura 5.5: Cariótipo parcial do paciente P101	51
Figura 5.6: Confirmação do rearranjo do MYC no paciente P101 através de FISH	51
Figura 5.7: Investigação da origem da anormalidade secundária envolvendo o cromossomo 13 no paciente P101	52
Figura 5.8: Refinamento dos pontos de quebra do cromossomo 13 envolvido na anormalidade cromossômica secundária no paciente P101	53
Figura 5.9: Refinamento dos pontos de quebra do cromossomo 7 envolvido na anormalidade cromossômica secundária no paciente P101	54
Figura 5.10: Cariótipo parcial do paciente P103 por bandeamento G	55
Figura 5.11: Refinamento das anormalidades cromossômicas do paciente P103	55
Figura 5.12: Caracterização inicial do paciente P22 por bandeamento G e FISH	56
Figura 5.13: Investigação da origem do terceiro sinal do MYC no paciente P22 através de bandeamento multicolorido	57
Figura 5.14: Confirmação dos achados do bandemaneto multicolorido utilizando pinturas cromossômicas	57
Figura 5.15: Avaliação e caracterização por FISH de pacientes com amostras de tumor FFPE, utilizando a sonda IGH/MYC/CEP8	59
Figura 5.16: Avaliação e caracterização do paciente P60 por FISH com a sonda IGH/MYC/CEP8	60

Figura 5.17: FISH com a sonda LSI p58/TelVysion1p/1q25 (Abbott Molecular)	61
Figura 5.18: FISH com a sonda LSI D13s319/13q34.....	62
Figura 5.19: Distribuição da expressão gênica representada pela Fold change (2- $\Delta\Delta Cq$) obtida para <i>MYC</i> , <i>BCL2</i> e <i>CD10</i> para o paciente P22	63
Figura 5.20: Quantificação da expressão de miRNAs representada pela Fold change (2- $\Delta\Delta Cq$) obtida para miR155, miRLet7a, miRLet7b, miRLet7e para o paciente P22	64
Figura 5.21: Quantificação da expressão de miRNAs representada pela Fold change (2- $\Delta\Delta Cq$) obtida para miR9*, miR21 e miR150	64
Figura 5.22: ISH para EBERs	65
Figura 5.23: Tipagem do vírus Epstein-Barr por PCR para o gene EBNA3-C em amostras de linfoma de Burkitt	66
Figura 5.24: Distribuição dos padrões de mutação agrupados dos três genes no grupo estudado	69
Figura 5.25: Esquema do gene <i>ID3</i> com as mutações encontradas na coorte do estudo.....	71
Figura 5.26: Esquema do gene <i>TCF3</i> com as mutações encontradas na coorte do estudo.....	72
Figura 5.27: Esquema do gene <i>CCND3</i> com as mutações encontradas na coorte do estudo	73
Figura 5.28: Distribuição das frequências de mutações patogênicas em cada gene	74
Figura 5.29: Comparação das frequências de mutações patogênicas nos genes <i>ID3</i> , <i>TCF3</i> e <i>CCND3</i> nos grupos pediátrico vs. Adultos	79
Figura 5.30: Distribuição das idades de acordo à presença ou não de mutações patogênicas nos pacientes pediátricos	80
Figura 5.31: Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) na coorte total de pacientes com tumor FFPE e entre os pacientes com LB pediátrico	81
Figura 5.32: Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global (SG) na coorte total de pacientes com tumor FFPE em relação ao estadiamento da doença, aos níveis de LDH e a infiltração da MO	82
Figura 5.33: Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global (SG) na coorte total de pacientes com tumor FFPE em relação à presença ou não de mutações nos genes <i>ID3</i> , <i>TCF3</i> e <i>CCND3</i>	83

Figura 5.34: Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida global (SG) na coorte total de pacientes com tumor FFPE em relação ao estado mutacional dos pacientes	84
Figura 5.35: Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de doença (SLD) na coorte total de pacientes com tumor FFPE em relação à ausência ou presença de mutação em ID3	84

ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ACTB	<i>Actin beta</i> / Actina beta
AID	<i>Activation-induced cytidine deaminase</i> / Citosina deaminase induzida por ativação
<i>bHLH</i>	<i>basic-Helix-Loop-Helix</i> / Domínio proteico base-hélice-volta-hélice
BAX	<i>BCL2 associated X, apoptosis regulator</i>
BCL2	<i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i> / Leucemia/Linfoma de células B 2
BCL2L1	<i>BCL2 Like 1</i>
BCL6	<i>B-cell leukemia/lymphoma 6</i> / Leucemia/Linfoma de células B 6
BCR	Receptor de células B
B2M	<i>Beta-2 Microglobulin</i>
c.	Posição da mutação no RNAm
C	Citosina
CCD	<i>Charge Coupled Device</i> / Dispositivo de carga acoplada
CCND3	<i>Cyclin D3</i> / Ciclina D3
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementar
CD	<i>Cluster differentiation</i> / Antígeno de diferenciação
CD10	Antígeno comum das leucemias linfoblásticas agudas
CD20	Antígeno dos linfócitos B
CD79a	Antígeno intracelular de célula B
CDK6	<i>Cyclin dependent kinase 6</i> / Quinase dependente de ciclina 6
CEMO	Centro de Transplante de Medula Óssea
CEP	<i>Centromeric Probe</i> / Sonda centromérica
CO ₂	Gás Carbônico
Cq	Ciclo de quantificação
Cy	Ciclo de quantificação
Cy0	Ciclo de quantificação Cy0
DAPI	4,6-Diamino-2-Fenilindol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIPAT	Departamento Integrado de Patologia
DNA	<i>Desoxorribonucleic acid</i> / Ácido Desoxorribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> / Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DO	Densidade Óptica

DP	Desvio Padrão
<i>E2F1</i>	<i>E2F transcription factor 1</i> / Fator de transcrição 1 E2F
EBV	<i>Epstein-Barr Virus</i> / Vírus Epstein Barr
EC	Estágio clínico
EBERs	<i>Epstein-Barr Virus encoded small RNAs</i> / Pequenos RNAs codificados pelo vírus Epstein Barr
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> / Ácido etilenodiamino tetraacético
EUA	Estados Unidos da América
F	Sexo feminino
FAB	<i>French-American-British Classification</i> / Classificação Franco-americano-britânica
FAS	<i>Fas cell surface death receptor</i> / Receptor de morte de superfície celular Fas
FC	<i>Fold Change</i>
FFPE	<i>Formalin Fixed-Paraffin Embedded</i> / Fixado em formalina e incluído em parafina
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridization</i> / Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>
g	Força G
G1	Fase <i>Gap</i> 1 da divisão celular
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> / Fator estimulante de colônia granulocítica
GDI	Gene de interesse
GDR	Gene de referência
<i>GUSB</i>	<i>Glucuronidase beta</i> / Glucoronidase beta
g/mL	Gramas/Mililitro
HCL	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina-eosina (coloração)
HFL	Hospital Federal da Lagoa
HFR	Hiperplasia folicular reativa
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> / Vírus da imunodeficiência humana
HLH	<i>Helix-loop-Helix</i> / Domínio proteico hélice-volta-hélice
<i>HMBS</i>	<i>Hydroxymethylbilane synthase</i> / Hidroximetilbilano
HSE	Hospital dos Servidores do Estado
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
<i>ID3</i>	<i>Inhibitor of DNA binding 3</i> / Inibidor de ligação de DNA 3
IHC	Imunohistoquímica

IFF	Instituto Federal Fernandes Figueira
IG	Imunoglobulina
<i>IGH</i>	<i>Immunoglobulin Heavy Chain</i>
Igκ	<i>Immunoglobulin Light Chain kappa</i>
Igλ	<i>Immunoglobulin Light Chain lambda</i>
<i>IGH/MYC</i>	Fusão entre os genes <i>IGH/MYC</i>
IGH/MYC/CEP8	Sonda de dupla fusão IGH/MYC/CEP8
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPPMG	Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira
ISCN	<i>International System for Chromosome Nomenclature</i> / Sistema Internacional de Nomenclatura Cromossômica
ISH	<i>in situ Hybridization</i> / Hibridização <i>in situ</i>
kb	Kilobase
KCl	Cloreto de Potássio
Ki-67	Anticorpo Monoclonal codificado pelo gene <i>MKI67</i> , marcador de proliferação celular
L	Litros
L3	Subtipo L3 da Leucemia Linfoblástica Aguda
LB	Linfoma de Burkitt
L/LB	Linfoma / Leucemia de Burkitt
LBe	Linfoma de Burkitt da variante endêmica
LBs	Linfoma de Burkitt da variante esporádica
LDH	<i>Lactate Dehydrogenase</i> / Desidrogenase Láctica
LDGCB	Linfoma Difuso de Grandes Células B
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LNH	Linfoma Não-Hodgkin
LSI	<i>Locus specific probe</i> / Sonda lócus específica
M	Molar ou Masculino
<i>MAX</i>	<i>MYC associated factor X</i> / Fator X associado ao <i>MYC</i>
MCB	<i>Multicolor Chromosome Banding</i> / Bandeamento cromossômico Multicolorido
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
miRNA	Micro RNA
miR9	Micro RNA 9
miR21	Micro RNA 21
miR150	Micro RNA 150
miR155	Micro RNA 155
miRLet7a	Micro RNA Let-7 ^a
miRLet7b	Micro RNA Let-7 ^b

miRLet7e	Micro RNA Let-7e
MO	Medula Óssea
mRNA	RNA mensageiro
<i>MYC</i>	<i>MYC proto-oncogene</i> / Proto oncogene <i>MYC</i>
N	Número de pacientes ou Normal
Na ₄ HPO ₂	
(NH ₄)SO ₄	Sulfato de amônio
NaSCN	Tiocianato de Sódio
Ng	Nanograma
NTC	<i>Non template control</i> / Controle sem amostra
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.	Posição do aminoácido na proteína
P	Paciente
PA	<i>Pro-analyse</i> / Para análise
<i>PAX5</i>	<i>Paired box 5</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> / Tampão salino de fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reação em cadeia da polimerase
PCP	<i>Partial chromosome painting</i> / Pintura cromossômica parcial
pH	Potencial Hidrogeniônico
<i>PI3K</i>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i> / Quinase – fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato
PK	Proteinase K
pmol/μL	Picomol/microlitro
<i>P53</i>	Gene da proteína tumoral p53
qPCR	PCR quantitativo
RC	Remissão Completa
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> – Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _{se}	Ribonuclease
rpm	Rotações por minute
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> / Meio de cultura do Instituto do Parque Memorial Roswell
RT-qPCR	<i>Real time quantitative PCR</i> – PCR quantitativo em tempo real
S	Fase de síntese da divisão celular
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SLE	Sobrevida Livre de Eventos
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> / Polimorfismo de base única
SSC	Solução salina de citrato

SUS	Serviço Único de Saúde
T	Timina
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBS	Tampão salino tris
<i>TCF3</i>	<i>Transcription factor 3</i> / Fator de transcrição 3
TdT	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase</i> / Transferase desoxinucleotidil terminal
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TS	Transições
TV	Transversões
U	Unidade
U/l	Unidade Internacional/Litro
x g	Força G
WCP	<i>Whole chromosome painting</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> / Organização Mundial da Saúde
VDJ	<i>Variable Diversity Jointing</i>
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
°C	Graus centígrados
%	Por cento
-	À
5'	Porção 5 primo do DNA
<	Menor
>	Maior
≥	Maior ou igual
±	Mais ou menos
ΔΔCq	Delta delta Cq
κ	Cadeia <i>kappa</i> da imunoglobulina
λ	Comprimento de onda ou Cadeia <i>lambda</i> da imunoglobulina

Termos citogenéticos/Símbolos utilizados na nomenclatura:

add	Adição
dup	Duplicação
i	Isocromossomo
inv	Inversão cromossômica

mar	Cromossomo marcador
p	Braço curto do cromossomo
q	Braço longo
t	Translocação
(-) sinal negativo	Perda de material genético
(+) sinal positivo	Ganho de material genético
() parênteses	Delimita os cromossomos alterados e os pontos de quebra
(,) vírgula	Separa n° de cromossomos, cromossomos sexuais e anormalidades cromossômicas
(;) ponto e vírgula	Separa cromossomos e as regiões cromossômicas quando os rearranjos estruturais envolvem mais de um cromossomo
(?) interrogação	Identificação questionável de cromossomo ou estrutura cromossômica
(::) 2 dois pontos	Quebra e ligação
(->) seta	Indica de onde vai um ponto de quebra ao outro ponto de quebra
X e Y	Cromossomos sexuais

1. INTRODUÇÃO

1.1 Linfoma/Leucemia de Burkitt: História e Conceitos

Descrito pela primeira vez em 1958 por Denis Burkitt como um tumor envolvendo as mandíbulas de crianças africanas (BURKITT 1958; DIMITRAKOPOULOS *et al.* 2007), o linfoma de Burkitt (LB) é uma neoplasia agressiva bastante estudada e que representou um importantíssimo papel no entendimento da tumorigênese ao longo de sua história, uma vez que foi o primeiro tumor humano associado a um vírus, o vírus Epstein-Barr (EBV) e um dos primeiros tumores que apresentou uma translocação cromossômica ativando um oncogene (EPSTEIN *et al.* 1964, MAGRATH 1990; AQUINO *et al.* 2013). Além disso, foi o primeiro linfoma a ser associado ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) (MAGRATH 1990, 2012; MOLYNEUX 2012).

O LB é um linfoma Não-Hodgkin (LNH) de células B maduras, altamente agressivo e é considerado o tumor com a mais alta taxa de crescimento celular, podendo duplicar de tamanho em até 48 horas (GOD & HAQUE 2010; MOLYNEUX 2012; DIMITRAKOPOULOS *et al.* 2007). Especula-se que o tumor tem origem numa célula do centro germinativo que perde a regulação da proliferação por meio da ativação e consequente superexpressão do *MYC*, um oncogene super expresso em mais da metade dos cânceres humanos (SLACK & GASCOYNE, 2011; DANG, 2012). No entanto, algumas evidências apontam para uma origem mais variável, dentre elas sugere-se que o LB com infecção do EBV pode surgir por meio de células B de memória ou células B pós centro germinativo (SAID *et al.* 2014; DOZZO *et al.* 2016).

A marca molecular do LB é a presença de uma translocação do oncogene *MYC*, com um dos genes de imunoglobulina (*IG*), o que leva à expressão desregulada e ectópica dessa proteína (MAGRATH 2012; SLACK & GASCOYNE 2011; GREENOUGH & DAVE 2014). A translocação com a cadeia pesada (*IGH*), no cromossomo 14q32, $t(8;14)(q24;q32)$, é a mais frequente, ocorrendo em aproximadamente 80% dos pacientes. As translocações variantes, $t(2;8)(p12;q24)$ e $t(8;22)(q24;q11)$, ocorrem em 10-15% dos pacientes.

Durante muito tempo o LB era considerado como duas desordens linfoproliferativas distintas: linfoma de células pequenas não clivadas em pacientes com

tumor sólido extranodal ou massa nodal e Leucemia Linfoblástica Aguda do subtipo L3 da Classificação Franco-Americano-Britânica (FAB) em pacientes com mais de 25% de envolvimento da medula óssea (MO). Atualmente, baseando-se nos fatores morfológicos, moleculares e genéticos compartilhados, a Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO) reconhece as duas desordens como uma entidade única: neoplasia de células B maduras, subtipo Linfoma/Leucemia de Burkitt (L/LB) (SWERDLOW *et al.* 2008).

Dois fatores ambientais têm se mostrado relevantes para a patogenia dessa doença, principalmente no LB endêmico: a infecção por EBV e a exposição a enfermidades infecciosas endêmicas como a malária e a febre amarela. O fator importante na associação com o EBV parece ser a idade de soroconversão. Postula-se que uma infecção precoce com o vírus predisponha ao desenvolvimento do L/LB (DE-THÉ *et al.* 1976). Também já se sabe que o risco para L/LB é significativamente aumentado após o transplante de órgãos (SAID *et al.* 2014) e nas imunodeficiências associadas ao HIV (SWERDLOW *et al.*, 2008).

1.2 Epidemiologia: Classificação dos subtipos clínicos e apresentação clínica

Na perspectiva clínica, a OMS considera três variantes clínicas do L/LB: endêmica, esporádica e associada à imunodeficiência. Essas variantes têm similaridade morfológica, imunofenotípica e genética, no entanto elas diferem com relação às áreas geográficas de aparecimento no Globo e à associação com o vírus EBV. Outras variáveis importantes entre elas incluem os principais sítios de acometimento da doença e os pontos de quebra do oncogene *MYC* nos casos onde ele está translocado com um dos genes das cadeias da imunoglobulina (HUANG *et al.* 2015; MILES *et al.* 2016).

Originalmente descrito em crianças na África Equatorial e Papua Nova Guiné, o LB endêmico (LBe) é associado à endemicidade de malária e o EBV é encontrado em quase 100% dos casos, relacionando fortemente a infecção pelo vírus à patogenia da doença. A incidência anual é estimada em 40 a 50 por milhão de crianças abaixo dos 18 anos. Nessas áreas endêmicas de alto risco, o LB compreende aproximadamente metade de todas as neoplasias da infância e mais que 90% dos diagnósticos de linfoma. O pico de incidência é aos 6 anos de idade e a doença acomete duas vezes mais meninos do que meninas. Os sítios acometidos podem envolver os ossos da mandíbula, assim como

outros ossos da face, os rins, o trato gastrointestinal, os ovários, a mama, além de outros sítios extranodais. A infiltração da MO nesse subtipo é rara. (FERRY 2006; SWERDLOW *et al.* 2008; THOMAS *et al.* 2011; GREENOUGH & DAVE 2014; WANG *et al.* 2015).

Os casos de L/LB diagnosticados no restante do mundo (principalmente América do Norte e Europa), sem associação climática e geográfica e associação rara com o EBV (<20% dos casos) (GIULINO-ROTH & GOLDMAN 2015), são considerados LB esporádicos (LBs). Essa variante clínica tem sido descrita em mais de 40% dos linfomas da infância nos Estados Unidos da América (EUA) e no Oeste da Europa. Ela geralmente ocorre em crianças entre 3 e 12 anos de idade (média 6 a 8 anos) e também acomete mais meninos do que meninas, numa ordem de grandeza de 3 a 5 vezes maior no sexo masculino (FERRY 2006; THOMAS *et al.* 2011; MOLYNEUX 2012; GIULINO-ROTH & GOLDMAN 2015). A incidência anual é de 2 por milhão de crianças abaixo dos 18 anos de idade. O abdômen é o sítio mais comumente acometido pela doença, especialmente a área ileocecal. Os ovários, rins, anel de Waldeyer e outros sítios também podem estar envolvidos. O envolvimento bilateral das mamas pode ocorrer em associação com o início da puberdade ou lactação (FERRY 2006).

O L/LB associado com a imunodeficiência corresponde ao grupo de pacientes infectados pelo vírus HIV e geralmente está relacionado com infecção de EBV, e a pacientes que foram previamente submetidos a transplante de órgãos. O risco para desenvolver LB também aumenta 4 a 5 anos após o transplante de órgãos, mas esse risco é muito menor do que o associado à infecção por HIV (MOLYNEUX 2012; GREENOUGH & DAVE 2014). Sua incidência está estimada em 22 por 100.000 pessoas por ano nos EUA (THOMAS *et al.* 2011; MOLYNEUX 2012). O envolvimento da MO é menos comum neste subtipo (FERRY 2006).

Um tipo epidemiológico intermediário entre os LBe e LBs tem sido sugerido para descrever a situação epidemiológica do L/LB em países em desenvolvimento, como o Brasil, que inclui crianças de pouca idade e uma associação com o EBV entre 50% a 70%. O primeiro relato no Brasil das taxas de incidência de linfomas em crianças e adolescentes, baseado em registros de câncer de base populacional, mostrou uma incidência muito maior de LB na faixa etária entre 1 e 4 anos de idade (4,7 por milhão) em contrapartida a taxa de 3,6 por milhão entre 5 e 9 anos de idade (KLUMB *et al.* 2004; HASSAN *et al.* 2008; FERREIRA *et al.* 2012).

1.3 Aspectos histopatológicos e imunológicos

A morfologia do L/LB é caracterizada por células monomórficas de tamanho médio, com uma alta taxa de proliferação. As células têm tamanho intermediário e contém cromatina densa e nucléolos basofílicos proeminentes. Algumas variantes plasmocitoides e atípicas mostram mais pleiomorfismo nuclear. Em secções de tecido, as células parecem estar tipicamente amassadas e o citoplasma é altamente basofílico, com margens citoplasmáticas. A cromatina nuclear é granular e contém pequenos nucléolos com mitoses frequentes. O índice de proliferação, determinado pela marcação de Ki-67, é geralmente $\geq 95\%$, com uma alta taxa de renovação, mostrada por elevada taxa de apoptose, caracterizando um aspecto marcante da morfologia dessa neoplasia, que é a aparência de "céu estrelado" que se dá devido a macrófagos espalhados com células tumorais apoptóticas (SLACK & GASCOYNE 2011; MOLYNEUX 2012; DUNLEAVY *et al.* 2016).

As células malignas expressam um imunofenótipo de centro germinativo de linhagem B, sendo positivas para os antígenos CD20, CD79a, PAX5, CD10 e BCL6. As células geralmente são negativas para BCL2. A maioria dos casos expressa a proteína nuclear MYC. (HECHT & ÁSTER 2000; PERKINS & FRIEDBERG 2008; SWERDLOW *et al.* 2008; SLACK & GASCOYNE 2011; MOLYNEUX 2012).

1.4 Associação com o vírus Epstein-Barr

O EBV é um membro da família *gamma-Herpesviridae*, que foi isolado inicialmente de uma cultura celular de LB por Epstein e colaboradores em 1964 (EPSTEIN *et al.* 1964), e foi a primeira descrição de um vírus envolvido na patogênese de um tumor humano (ROCHFORD & MOORMANN 2015). Desde então, ele foi relacionado a muitas neoplasias humanas, incluindo tumores de origem hematopoiética, epitelial e mesenquimal (YOUNG *et al.* 2016). O EBV contém um genoma episomal de DNA dupla-fita com 172 kb (GANDHI 2006). Esse vírus estabelece uma infecção latente em linfócitos B de memória e pode induzir à proliferação das células infectadas que estão em latência (RICKINSON & KLEFF 2001).

A infecção pelo vírus EBV normalmente é assintomática durante a infância, mas na adolescência pode resultar em mononucleose infecciosa, que é uma imunopatologia

benigna e auto-contida, caracterizada pela intensa produção de células T ativadas no sangue periférico. Nas áreas de endemia de L/LB, todas as crianças acima de 2 anos de idade são, virtualmente, expostas ao EBV. Na população mundial, até 95% dos indivíduos são infectados assintomaticamente pelo EBV (CRAWFORD 2001; GANDHI 2006).

A associação entre L/LB e EBV ocorre em frequências variadas, dependendo de variáveis sociogeográficas. O genoma do EBV é detectado em quase todos os casos de LBe, por outro lado, está associado a menos de 20% dos casos de LBs e de 30% a 40% dos casos de LB-HIV+ (CRAWFORD 2001). No Brasil existe uma associação de 50% a 70% de presença do genoma do EBV (HASSAN *et al.* 2008). Excluindo-se os casos de LBs, há uma prevalência de LB-EBV+ em áreas de baixo poder socioeconômico e de infecção precoce pelo EBV (QUEIROGA *et al.* 2008; HECHT & ÁSTER 2000; PERKINS & FRIEDBERG 2008). Nos tumores, o genoma do EBV deve ser detectado através de Hibridização *in situ* (ISH) de RNAs codificados pelo EBV (EBERs), uma vez que a expressão do EBV nas células tumorais do LB é muito restrita (programa de latência I), sendo expressas apenas a proteína EBNA1, e um conjunto de RNAs não codificantes e microRNAs (YOUNG *et al.* 2007, 2016). Enquanto o EBV parece ter um papel chave na estimulação das células B durante os estágios que precedem o LB, o seu papel após o desenvolvimento da neoplasia ainda não é claro, e tem se buscado associações clínicas de significado associado à sua presença (ROCHFORD & MOORMAN 2015; PERKINS & FRIEDBERG 2008).

1.5 Aspectos genéticos e moleculares

1.5.1 Rearranjo do oncogene MYC: Marcadores citogenéticos

Apesar das diferenças geográficas que caracterizam os diferentes subtipos clínicos de L/LB, quase todos os casos compartilham a translocação do oncogene *MYC*, no cromossomo 8q24, com um dos genes de imunoglobulina (SLACK & GASCOYNE 2011; GREENOUGH & DAVE 2014). Como descrito acima, a t(8;14)(q24;q32), envolvendo o *IGH* no cromossomo 14q32, é a mais frequente, ocorrendo em aproximadamente 80% dos pacientes (Fig. 1.1). As translocações variantes, t(2;8)(p12;q24) e t(8;22)(q24;q11), que envolvem as cadeias leves κ e λ , ocorrem

respectivamente em 10-15% dos pacientes (Fig. 1.2 e 1.3). A consequência molecular dessas translocações é a expressão desregulada do oncogene *MYC*, que exerce um papel primordial no controle do ciclo celular (GREENOUGH & DAVE 2014).

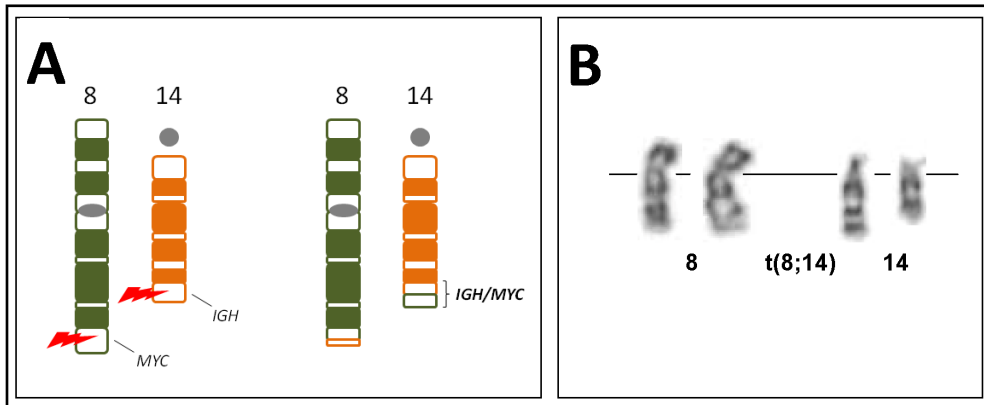


Figura 1.1: Esquema ilustrativo da $t(8;14)(q24;q32)$: A) Idiograma da $t(8;14)(q24;q32)$, mostrando os genes envolvidos na anormalidade; B) Cariótipo parcial da $t(8;14)(q24;q32)$, mostrando os cromossomos 8, 14 normais e os cromossomos translocados. Fonte: A autora.

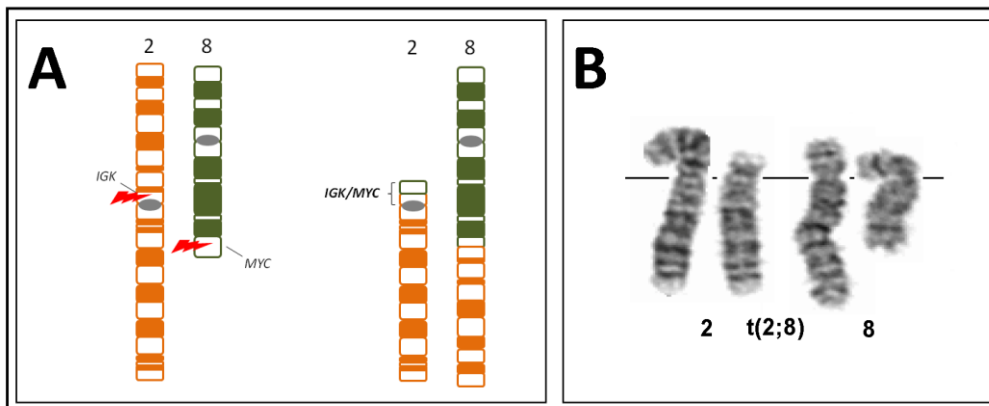


Figura 1.2: Esquema ilustrativo da $t(2;8)(p12;q24)$: A) Idiograma da $t(2;8)(p12;q24)$, mostrando os genes envolvidos na anormalidade; B) Cariótipo parcial da $t(2;8)(p12;q24)$, mostrando os cromossomos 2, 8 normais e os cromossomos translocados. Fonte: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t0814ID1050.html>

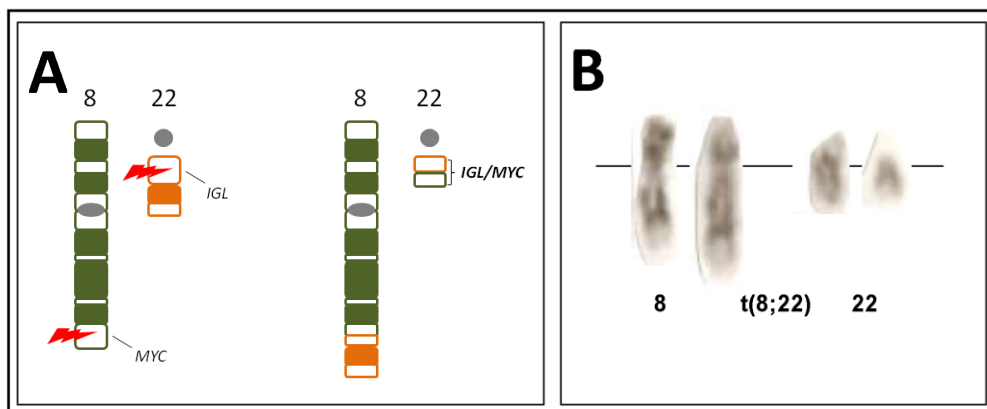


Figura 1.3: Esquema ilustrativo da $t(8;22)(q24;q11.2)$: A) Idiograma da $t(8;22)(q24;q11.2)$, mostrando os genes envolvidos na anormalidade; B) Cariótipo parcial da $t(8;14)(q24;q11.2)$, mostrando os cromossomos 8, 22 normais e os cromossomos translocados. *Fonte: A autora.*

Uma vez que a translocação do oncogene *MYC* é reportada nos três subtipos clínicos, ela é considerada o evento genético primário desta neoplasia (SLACK & GASCOYNE 2011). Apesar disso, os pontos de quebra do *MYC* podem diferir dependendo da variante clínica a que se refere (MOLYNEUX 2012). Geralmente, no LBe, o ponto de quebra usualmente ocorre à montante da região 5' do *MYC*, e esta distância pode ser bem grande. Nesses casos, o gene *MYC* fica intacto. No LBs, o ponto de quebra se encontra geralmente no primeiro éxon ou no primeiro intron, no entanto, a região codificadora do gene *MYC* que consiste no segundo e terceiro éxons sempre fica intacta (SHIRAMIZU *et al.* 1991; GUTIÉRREZ *et al.* 1992). Segundo Boxer & Dang (2011), isto evidencia uma diferença na patogênese dessas duas variantes, e o estágio de diferenciação das células alvo a sofrerem transformação provavelmente difere nestes dois subtipos clínicos de L/LB.

A diversidade da localização dos pontos de quebra no cromossomo 8 sugere que a translocação ocorre em diferentes estágios do desenvolvimento da célula B. Neste contexto, tem se discutido que os LBe apresentam um ponto de quebra na translocação que possivelmente ocorre durante o rearranjo VDJ, na diferenciação precoce da célula B, enquanto que nos LBs e nos relacionados à imunodeficiência a recombinação é mais provável de ocorrer durante os eventos de mudança de classes da imunoglobulina (HARTMANN *et al.*, 2008; BOXER & DANG 2011). Além disso, tanto na $t(8;14)(q24;q32)$, como em suas variantes, o locus *MYC* no cromossomo 8 normal fica

silenciado, enquanto que no cromossomo translocado o gene *MYC* é expresso em altos níveis (DIMITRAKOPOULOS *et al.*, 2007).

1.5.2 Desregulação do oncogene *MYC* e sua relação com a patogênese da doença

O oncogene *MYC* está localizado na região cromossômica 8q24, e sua tradução gera uma fosfoproteína nuclear que atua na progressão do ciclo celular, na apoptose e também na transformação celular (NGUYEN *et al.* 2017). A proteína *MYC* forma um heterodímero com o fator de transcrição *MAX*, e esse complexo se liga a sequências promotoras *E Box*, de modo a regular a transcrição de genes alvo específicos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4609>). Nos linfomas, a taxa de complexos *MYC/MAX* pode levar a super autoregulação (SAID *et al.* 2014).

A perda de regulação da proteína *MYC* resulta na ativação e repressão de vários genes regulados por ela, dentre os quais ciclina D1, *P27*, o gene da enzima lactato desidrogenase A, *P19ARF*, *P53*, *BAX*, *FAS* e *FAS* ligante (MAGLUTA & KLUMB 2008).

1.5.3 Desregulação do *MYC* através de pequenos RNAs não codificantes

Considerado a marca genética da doença, o rearranjo do *MYC* com uma das imunoglobulinas, era até pouco tempo considerado um critério diagnóstico obrigatório para a definição do L/LB, no entanto, atualmente, a classificação WHO considera 10% de casos sem um rearranjo identificável do oncogene *MYC* (SLACK & GASCOYNE 2011). É interessante ressaltar que mesmo sem a identificação do rearranjo, estudos têm apontado que não há diferença na expressão do oncogene quando esses casos são comparados a casos que possuem o rearranjo do mesmo (LEUCCI *et al.* 2008; ONNIS *et al.* 2010). Deste modo, a literatura tem sugerido que mecanismos alternativos, além de translocações cromossômicas, podem estar levando a desregulação do *MYC*. Um desses mecanismos parece acontecer epigeneticamente, em nível pós transcricional por meio da atividade microRNAs (miRNAs) (ONNIS *et al.* 2010).

Os miRNAs são pequenos RNAs, não codificantes, de cadeia simples, que podem se ligar a sequências complementares em regiões 3' não traduzidas dos seus RNAs mensageiros (mRNAs) alvo. Isto leva à inibição da tradução ou à degradação do

mRNA alvo e, conseqüentemente, a um nível reduzido da proteína correspondente. Assim, os miRNAs podem influenciar em processos celulares importantes, tais como a diferenciação, proliferação e apoptose (LENZE *et al.*, 2011).

Onnis e colaboradores (2010) mostraram o hsa-miR-9* significativamente *down-regulado* nos casos sem a translocação do *MYC*. No seu estudo, há evidências de que o hsa-miR-9* seria capaz de modular a expressão de *MYC* e *E2F1*, um fator de transcrição envolvido nos mecanismos de regulação do *MYC*, sugerindo que este miRNA estaria possivelmente relacionado à superexpressão de *MYC* em casos de L/LB sem o rearranjo do *MYC*.

O próprio *MYC* é capaz de ativar a expressão de miRNAs específicos, de modo que a literatura sugere que exista um *feedback* entre ele e miRNAs específicos, capazes de controlar suas expressões reciprocamente (ONNIS *et al.* 2010) Várias publicações mostraram que o oncogene *MYC* regula mais de 60 miRNAs. Por exemplo, já foi mostrada a repressão dos miRNAs miR-Let7a, miR-Let7e, miR150 e miR155 por *MYC* no L/LB (ROBERTUS *et al.* 2010; LENZE *et al.* 2011).

1.5.4. A era pós-*MYC*: mutações em genes reguladores de ciclo celular

Apesar da desregulação do oncogene *MYC* ter um papel central na patogênese da doença, atualmente se sabe, através de estudos de sequenciamento de próxima geração, que ela é necessária mas não suficiente para desencadear o L/LB (GREENOUGH & DAVE 2014). Estudos recentes mostraram que, além do *MYC*, outros genes estão frequentemente mutados nos casos com L/LB, dentre eles o *TCF3*, entre ~10% e 25% dos casos, ou seu regulador negativo, o *ID3*, entre ~30% e ~70% dos casos. Além disso, mais de 30% de casos de LBs mostraram ter mutações no gene que codifica a Ciclina D3, *CCND3*, que por sua vez é ativado pelo *TCF3*, promovendo a progressão do ciclo celular (LOVE *et al.* 2012; SCHMITZ *et al.* 2012; RITCHER *et al.* 2012; ROHDE *et al.* 2017). É importante citar que mutações em *TCF3* e/ou *ID3* foram associadas em 67% e 40%, respectivamente, dos casos de LBe e associados com HIV (SCHMITZ *et al.* 2012).

Um estudo do programa transcricional regulado por *TCF3* nas células de Burkitt permitiu observar que ele modula genes essenciais para a função do centro germinativo, além de atuar no aumento da expressão do *ID3*, criando um loop inibitório que, em

células normais, poderia diminuir a ação do *TCF3* (CAMPO 2012). Interessante notar que o gene *ID3* é um alvo direto do *MYC*, e também pode contribuir para a regulação negativa da via do *TCF3* em células normais (SCHMITZ *et al.* 2012). Sendo assim, acredita-se que as mutações inativadoras de *ID3* no LB liberem o *TCF3* de sua função inibitória. Neste estudo também se observou que o *TCF3* promoveu a sobrevivência das células de LB ao intensificar a sinalização do receptor de células B (BCR), através da via da *PI3K*, e promoveu a sua proliferação através da modulação de genes relacionados com o ciclo celular, como o *CCND3*. Além disso, a natureza altamente proliferativa característica do LB pode ser influenciada também por mutações no *CCND3*, visto que a ciclina D3 regula a transição de G1 para S no ciclo celular (LOVE *et al.* 2012; SCHMITZ *et al.* 2012; CAMPO 2012).

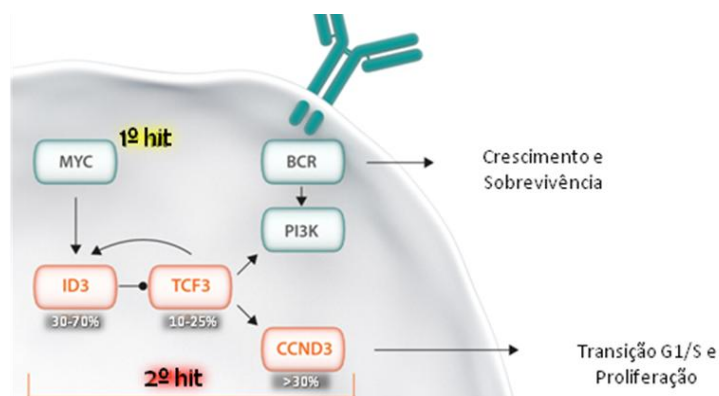


Figura 1.4: Via de sinalização ID3-TCF3-CCND3: Mutações em genes da via podem promover a sobrevivência de células do LB, e parecem representar um evento importante na patogênese da doença. *Adaptado de Rohde et al. 2017.*

A alteração na função da proteína ID3 foi também proposta como um mecanismo chave na patogênese do LB em casos esporádicos e endêmicos, independente do rearranjo do *MYC*. O defeito regulatório dessa proteína parece ter relação com uma predominância de mutações sem sentido em resíduos conservados da proteína ID3 no motivo *helix-loop-helix* (HLH) (GEBAUER *et al.* 2013). No entanto, ainda estão faltando estudos mais abrangentes incluindo séries de pacientes com outras situações epidemiológicas. A associação entre a presença do EBV e um perfil específico dessas mutações foi levantada na literatura (CAMPO 2012), mas ainda faltam dados para elucidar esta associação. Gebauer e colaboradores (2013) chamam atenção para a possibilidade de mutações recorrentes, afetando a alça regulatória ID3-TCF3, com sinalização consecutiva de células B, poderem representar alvos para novas abordagens

terapêuticas para pacientes mais velhos ou pacientes de países em desenvolvimento, onde os protocolos de tratamento não podem ser efetivamente aplicados. Junto com essas mutações afetando o *ID3* e o *TCF3*, as mutações no *CCND3*, que é ativado por *TCF3* e interage com *CDK6*, também pode representar um alvo para se estudar novas estratégias terapêuticas, incluindo inibidores de PI3K e de CDK6 (DUNLEAVY *et al.* 2016).

1.6 Aspectos prognósticos

A análise citogenética é importante no diagnóstico para identificar a $t(8;14)(q24;q32)$, que culmina na desregulação do *MYC* por meio da fusão gênica *IGH/MYC* (BURMEISTER 2005, MAGRATH 2012). Fatores prognósticos desfavoráveis em crianças incluem idade mais avançada (acima de 15 anos), estágio avançado da doença, doença invasiva, níveis altos de Lactato desidrogenase (LDH) e envolvimento do sistema nervoso central (SNC) e da MO. Uma resposta desfavorável na indução de remissão completa (RC) é considerada também um sinal clínico de mau prognóstico (SANDLUND 1996, PATTE 2001, FERRY 2006). Atualmente, a presença de anormalidades cromossômicas secundárias à fusão *IGH/MYC* também tem sido relacionada ao prognóstico adverso dos pacientes com L/LB (LONES *et al.* 2004, ONCIU *et al.* 2006).

1.6.1 Anormalidades cromossômicas secundárias

Aproximadamente 60% dos pacientes com L/LB apresentam cariótipos contendo anormalidades cromossômicas secundárias à $t(8;14)(q24;q32)$ e suas variantes, entre as quais 30% a 50% dos tumores apresentam cariótipos complexos (NELSON *et al.* 2010).

Os cromossomos 1, 6, 7, 12, 13 e 17 são os mais frequentemente envolvidos nas alterações cromossômicas secundárias descritas no L/LB, na literatura, e tipicamente resultam em ganhos de material cromossômico nos braços longos dos cromossomos 1 (1q), 7 (7q) e 12 (12q) e perdas de material cromossômico nos braços longos dos cromossomos 6 (6q) e 13 (13q) e no braço curto do cromossomo 17 (17p) (POIREL *et al.* 2009; NELSON *et al.* 2010).

Apesar de existir uma associação já descrita com vários cromossomos, nos últimos anos as pesquisas têm mostrado que dentro do grupo de pacientes com L/LB, as anormalidades citogenéticas que se destacam são aquelas que afetam o 1q, encontradas nas séries estudadas em uma frequência de entre ~30% e 40% (GARCIA *et al.* 2003; LONES *et al.* 2004; ONCIU *et al.* 2006; POIREL *et al.* 2009). Apesar de alguns destes estudos terem encontrado uma associação entre esta anormalidade e um prognóstico pior nos pacientes de L/LB, outros trabalhos não observaram essa associação (LONES *et al.* 2004; ONCIU *et al.* 2006; POIREL *et al.* 2009) Desta forma, o significado do envolvimento do 1q em anormalidades cromossômicas secundárias no L/LB permanece incerto. Anormalidades envolvendo o 13q foram o segundo grupo de anormalidades secundárias mais frequentes no LB. Especialmente duas destas séries (NELSON *et al.* 2010, ONCIU *et al.* 2006) associaram as alterações citogenéticas do 13q a um prognóstico pior.

Acredita-se que as anormalidades cromossômicas secundárias possam afetar a regulação de outros oncogenes ou genes supressores de tumor além do *MYC*, podendo alterar seus comportamentos biológicos no L/LB (LONES *et al.*, 2004). Onciu *et al.* (2006), num dos estudos descrito acima, mostrou que a complexidade do cariótipo e as anormalidades cromossômicas específicas estão relacionadas com o prognóstico dos pacientes de L/LB tratados com a quimioterapia intensiva.

1.7 Estadiamento e Tratamento

A terapia do LB é guiada por estadiamento clínico e histopatológico, que em conjunto com outros fatores auxiliam na escolha das estratégias terapêuticas. Clinicamente, o prognóstico é determinado por estadiamento, que inclui a extensão da doença. A classificação do *Saint Jude Children`s Research Hospital*, Classificação de Murphy, para o L/LB, é o sistema mais comum de estadiamento (Tabela 1.1). Segundo ela, o L/LB é dividido em quatro estágios clínicos (EC) de acordo com o envolvimento de sítios extranodais (MURPHY 1980). A apresentação da doença em estágios mais avançados é mais comum, com aproximadamente 30% dos pacientes sendo diagnosticados com uma doença de estágio mais limitado (I ou II), enquanto os outros 70% apresentam uma doença generalizada (III ou IV) (FERRY 2006).

Tabela 1.1: Sistema de Estadiamento de Murphy (St. Jude Children's Research Hospital) para LNH pediátricos

Estágio I	- Um único tumor (extranodal) ou área anatômica única (nodal), excluindo-se o mediastino e o abdômen
Estágio II	- Um único tumor (extranodal) com envolvimento de nódulo regional - Dois ou mais nódulos no mesmo lado do diafragma; - Dois únicos tumores (extranodais) com ou sem envolvimento de nódulo regional no mesmo lado do diafragma; - Um tumor primário do trato gastrointestinal, normalmente na área ileocecal, com ou sem envolvimento de nódulos mesentéricos associados, possíveis de ser removidos completamente.
Estágio III	- Dois únicos tumores (extranodais) de lados opostos no diafragma; - Duas ou mais áreas nodais abaixo e acima do diafragma; - Todos os tumores intratorácicos primários (mediastino, pleural, tímico); - Todas as doenças intra-abdominais primárias extensas sem possibilidade de remoção; - Todos os tumores paraespinhais e pelidurais, independentemente de outros tumores.
Estágio IV	- Qualquer parâmetro acima com envolvimento inicial de SNC e MO.

Fonte: Adaptado de Rosolen et al, 2007.

Uma vez que o L/LB é caracterizado por uma alta taxa de proliferação, de modo que pode haver entrada de células malignas no ciclo celular durante a quimioterapia, o desenho dos protocolos de tratamento do L/LB tem se baseado em quimioterápicos intensivos e com intervalos de curta duração, para assegurar a manutenção da concentração sérica das drogas no organismo dos pacientes (PATTÉ 2002; SAID *et al.* 2014; WANG *et al.* 2015; DUNLEAVY *et al.* 2016). A terapia padrão utilizada para o L/LB da infância, atualmente consiste de protocolos quimioterápicos com vários agentes, de curta duração e dose-intensiva, acompanhado da profilaxia do SNC. Na série estudada por Bowman (1996), foi observado que a utilização desse tipo de protocolo resulta em uma excelente sobrevida nas crianças: pacientes com doença localizada têm uma taxa de sobrevida de 5 anos maior que 90%, e crianças com doença disseminada (incluindo a fase leucêmica) podem alcançar uma taxa de mais de 90% de RC, com uma taxa de sobrevida livre de eventos (SLE) em 4 anos de 65% em pacientes com envolvimento da MO, e 79% daqueles de EC IV da doença. Entretanto, a terapia de resgate para recaída ou doença refratária normalmente não é bem sucedida e pacientes em estádios mais avançados da doença que recebem tratamento intensivo ou que falham na primeira indução, raramente podem ser resgatados (BURKHARDT *et al.* 2011; DUNLEAVY *et al.*, 2016).

O papel do monitoramento de doença residual mínima no L/LB ainda não está bem estabelecido. Alguns clínicos monitoram rotineiramente, embora os achados não sejam usados para guiar o tratamento. A presença de doença residual na MO é melhor aplicada para predição de risco de falha no tratamento (MOLYNEUX 2012; MINARD-COLIN *et al.* 2015; DOZZO *et al.* 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de ser considerado um tumor agressivo, a melhora no diagnóstico, juntamente com a introdução de terapias de maior intensidade e curta duração em pacientes com L/LB levou a taxas de cura a patamares entre 80% e 90% (PATTE 2012, SAID *et al.* 2014). Entretanto, para a maioria dos pacientes que recaem ou cuja doença progride, não existem alternativas terapêuticas eficazes até o momento. Apesar do seu importante papel na história do estudo do câncer, até hoje, não foram identificados marcadores de uso amplo que possam ser usados para melhorar a estratificação do risco ao diagnóstico (SCHIFFMAN *et al.* 2011). As alterações cromossômicas secundárias vêm sendo discutidas na literatura, como potenciais marcadores de mau prognóstico (LONES *et al.* 2004; ONCIU *et al.* 2006). Dentre elas, os rearranjos envolvendo o braço longo do cromossomo 1 (1q) ainda são controversos. Alguns estudos mostraram uma associação com uma resposta clínica pior (LONES *et al.*, 2004) e outros não encontraram uma associação (ONCIU *et al.* 2006; POIREL *et al.* 2009). Já para as anormalidades envolvendo o braço longo do cromossomo 13 (13q), a associação com um prognóstico pior é mais firme, considerando-se a deleção de uma porção cromossômica nessa região (LONES *et al.* 2004; TOUJANI *et al.* 2009). Ainda assim, existe uma variabilidade em relação à presença de duplicações desta região cromossômica, cujo significado clínico ainda não foi elucidado. Desta maneira, a variabilidade cromossômica encontrada nos cariótipos do L/LB ao diagnóstico ainda necessita de mais pesquisas para identificar as diferentes regiões cromossômicas mínimas associadas a prognóstico e os mecanismos genéticos ou epigenéticos possivelmente envolvidos.

Estudos preliminares de nossa equipe observaram anormalidades cromossômicas secundárias em pacientes com LB/LLA-L3 em 71% dos casos, dentre as quais, as regiões cromossômicas envolvidas com maior frequência nessas anormalidades foram a 1q e a 13q. Além disso, observamos uma heterogeneidade molecular do rearranjo do oncogene *MYC* em 21% dos pacientes estudados (DE SOUZA *et al.* 2014).

Apesar das translocações envolvendo o oncogene *MYC* terem sido por muitos anos consideradas essenciais para a patogênese desta neoplasia, novos achados têm permitido a discussão acerca da afirmativa de que elas seriam por si só suficientes para

o aparecimento do L/LB. Nesse sentido, os genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3* tem sido apontados como potenciais *drivers* da linfomogênese no LB, de modo que já foi sugerido que a via ID3-TCF3-CCND3 pode representar um segundo *hit* da patogênese do LB, onde estudos apontam uma frequência de mutações de até 80% nestes genes (ROHDE *et al.* 2017).

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo estudar marcadores genéticos e marcadores cromossômicos de prognóstico, estabelecendo o seu impacto no L/LB na nossa população de crianças e adolescentes, assim como contribuir para a descrição mais precisa de alterações secundárias a t(8;14) que podem ter algum papel na linfomogênese.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

Descrever frequências e tipo de alterações genéticas, a nível cromossômico e gênico, da leucemia B madura (LLA-L3) e linfoma de Burkitt, associados ou não ao vírus Epstein-Barr (EBV), em crianças brasileiras.

3.2 Objetivos Secundários

- a) Detectar a translocação t(8;14)(q24;q32), caracterizando sua potencial heterogeneidade nos casos estudados prospectivamente;
- b) Investigar a presença de anormalidades citogenéticas secundárias à t(8;14) ou suas variantes em amostras biológicas de crianças com L/LB;
- c) Descrever a associação com o EBV e suas variantes moleculares;
- d) Estudar a frequência, associação com o EBV e prognóstico clínico das anormalidades secundárias envolvendo as regiões cromossômicas 1q e 13q, em amostras de tumor fixadas em formalina e impregnadas em parafina (FFPE);
- e) Estudar mutações de genes envolvidos na via de ID3-TCF3-CCND3 e sua associação com características de apresentação clínica, presença do EBV e resposta clínico-terapêutica;

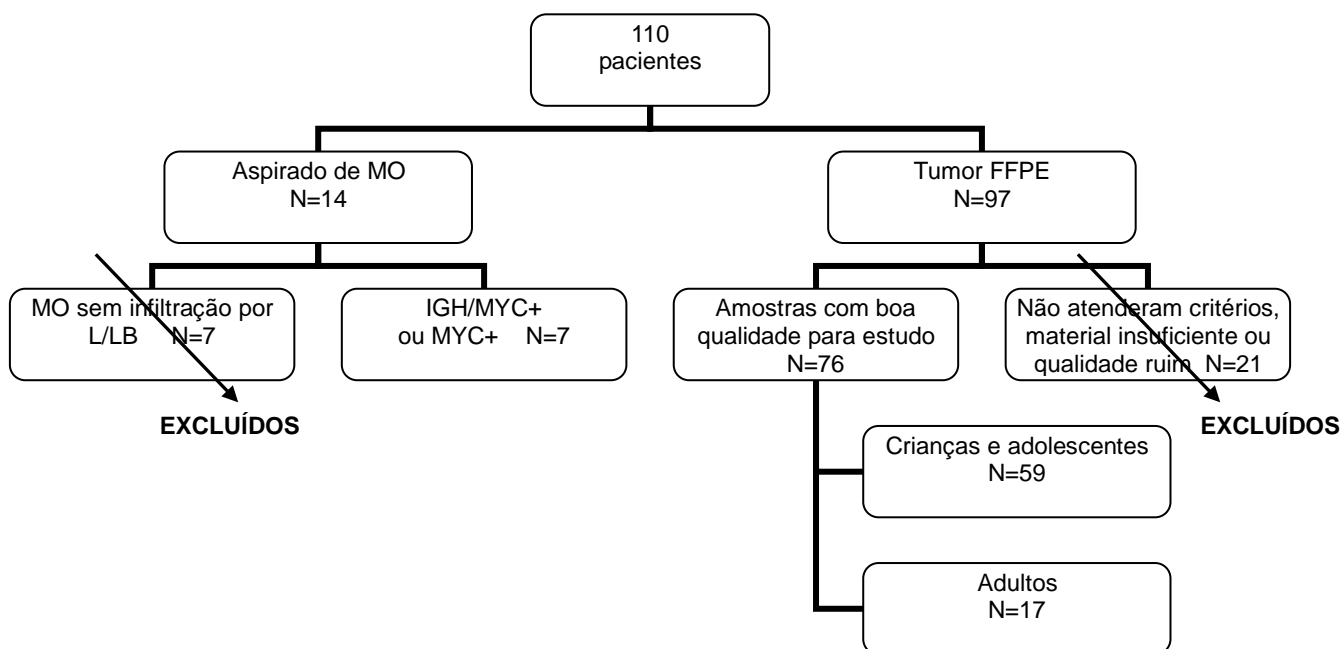
4. METODOLOGIA

4.1 Desenho do Estudo

Estudo prospectivo e retrospectivo descritivo transversal.

4.2 Pacientes e amostras

Este estudo incluiu pacientes com diagnóstico histopatológico de Linfoma de Burkitt ou LLA-L3, cujas amostras tenham sido analisadas no Instituto Nacional do Câncer – INCA entre 2005 e 2016. Dentre 110 pacientes inicialmente selecionados, 76 (59 crianças e adolescentes entre 0 e 21 anos de idade e 17 adultos >21 anos) tiveram amostras tumorais FFPE analisadas. Foram excluídos 21 pacientes de tumor FFPE por não possuírem parafina suficiente para o estudo. Quatorze pacientes tiveram seus aspirados de medula óssea analisados. Sete dos 14 tiveram o diagnóstico de L/LB confirmado. Seis desses casos foram classificados como LLA-L3, e um paciente com tumor inicial na hemiface que teve infiltração da MO. Os outros sete pacientes foram excluídos, pois apesar da presença de tumor primário em outro sítio, não foi comprovado envolvimento medular e não havia disponibilidade de material tumoral. Um paciente (P22) teve amostras FFPE e aspirado de MO analisadas em paralelo. O fluxograma dos pacientes incluídos no estudo segue detalhado abaixo.



O grupo de pacientes adultos foi incluído visando a comparação da frequência de mutações nas duas faixas etárias, uma vez que a maioria dos estudos internacionais foi feito em coortes heterogêneas e somente um estudo comparou os achados nos dois grupos distintos (HAVELANGE *et al.* 2016). Estes pacientes foram selecionados de acordo com a disponibilidade de material biológico na Divisão Integrada de Patologia (DIPAT) do INCA, e destes, 6 tinham diagnóstico de L/LB associado ao vírus HIV.

Quatro amostras de linfonodo reativo FFPE foram utilizadas para padronização da hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) em parafina, além de 3 linhagens celulares de LB (Namalwa, Raji e Ramos), 2 de Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB), 3 hiperplasias foliculares reativas (HFR) e 2 amostras normais de aspirado de MO, que foram utilizadas como controle para os experimentos de expressão dos genes celulares e microRNAs.

Todas as amostras tumorais foram revisadas por uma patologista da DIPAT, Dra. Luciana Pinto, e caracterizadas do ponto de vista histológico de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) (SWERDLOW *et al.*, 2008).

Foram estudados dois tipos de amostras: (i) alíquotas de medula óssea que foram enviadas para diagnóstico cromossômico ao laboratório de citogenética do CEMO – INCA; (ii) Tecido fixado e incluído em parafina (FFPE) do tumor ao diagnóstico, arquivado na DIPAT. Estas amostras foram provenientes de diferentes centros, onde os pacientes foram tratados, a constar: Serviço de Hematologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro; Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira (IPPMG), Rio de Janeiro; Hospital Federal da Lagoa (HFL), Rio de Janeiro; Instituto Fernandes Figueira (IFF), Rio de Janeiro; Hospital dos Servidores do Estado (HSE), Rio de Janeiro; Sistema Único de Saúde (SUS) do Acre; SUS Santa Catarina e Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), Recife.

Os estudos citogenéticos foram realizados no Laboratório de Citogenética do Centro de Estudos de Medula Óssea (CEMO) e no Laboratório de Citogenética Molecular da Universidade de Jena (Alemanha) e os estudos moleculares realizados no Laboratório de Oncovirologia do CEMO.

Este estudo obedeceu às diretrizes de pesquisa envolvendo seres humanos do Conselho Nacional de Saúde, em sua resolução nº 466/2012 publicada no dia 13 de junho de 2013, que visam assegurar os direitos e deveres que dizem respeito à comunidade científica, aos sujeitos da pesquisa e ao Estado. Medidas que proporcionam

confidencialidade e privacidade dos pacientes, foram adotadas, assim como sigilo e a segurança dos dados obtidos. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA (Protocolo 20/11) (Anexo I).

4.3 Dados Clínicos e Epidemiológicos

Os dados demográficos (sexo, idade, procedência), clínicos (data de diagnóstico, sítio da doença, estadiamento clínico, níveis de LDH, dados hematológicos, envolvimento de MO e do SNC), morfológicos (citoquímica, imunofenotipagem e imunohistoquímica, IHC), e de tratamento e desfecho clínico (protocolo clínico, recaída, óbito, data da recaída, data do óbito, data do último seguimento) foram obtidos a partir dos prontuários médicos físicos e eletrônicos. Todos os casos tiveram período de seguimento pós-término do tratamento de pelo menos 3 anos.

Os pacientes foram classificados segundo critérios morfológicos, imunofenotípicos e imunohistoquímicos, de acordo com a classificação WHO.

4.4 Critérios de Inclusão

- a) Idade de 0 a 21 anos (crianças e adolescentes);
Idade > 21 anos (adulto);
- b) Diagnóstico clínico e histopatológico de Leucemia / linfoma de Burkitt;
- c) Disponibilidade de material biológico armazenado no Laboratório de Citogenética (CEMO) e ou do bloco de parafina com material tumoral armazenado no DIPAT, suficiente para os estudos.

4.5 Critérios de Exclusão

- a) Indisponibilidade de dados clínicos, por perda de prontuário físico;
- b) Impossibilidade de realizar os estudos citogenéticos e moleculares por inadequação do material biológico.

4.6 Manipulação e Processamento de amostras

Os estudos cariotípicos foram realizados utilizando preparação cromossômica obtida a partir de cultura celular de MO, pelos métodos de bandeamento G. A caracterização de rearranjos moleculares envolvendo os genes *IGH*, *MYC* e as regiões cromossômicas 1q e 13q foi feita através de FISH. Estudos citogenéticos moleculares utilizando o bandeamento multicolorido foram aplicados a amostras selecionadas para caracterização de rearranjos complexos. O diagnóstico da infecção pelo vírus EBV foi realizado no material tumoral, pelo método de ISH e a tipificação do vírus por PCR a partir de DNA. A avaliação da expressão de genes celulares foi realizada por RT-PCR. A presença e caracterização de mutações gênicas envolvendo os genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3* foram determinadas através de sequenciamento de Sanger.

4.6.1 Cultura celular para estudo citogenético

O estudo cromossômico foi realizado em preparação cromossômica obtida a partir de MO ou tecido tumoral, utilizando técnicas de obtenção e identificação cromossômica.

Para obtenção de mitoses foi utilizada a técnica descrita por Testa et al. (1985) modificada. Resumidamente, 5×10^6 células foram cultivadas em 5 mL de meio de cultura composto de RPMI 1640 (Sigma) (80%) e soro bovino fetal (20%) em garrafas de cultura de 40 mL. As células foram incubadas durante 24 horas em estufa a 37 °C. Após 22 a 23 horas adicionou-se uma solução de colchicina (Sigma) em uma concentração de 0,05 g/mL. Ao término do período de incubação, seguiu-se a retirada da cultura e o preparo das lâminas. Para esse procedimento foi utilizado o método descrito por Hungerford (1965) modificado. Após o período de 24 horas de incubação, as células foram centrifugadas por 6 minutos a 420 g, e o sedimento obtido foi submetido a hipotonia, utilizando uma solução de KCl a 0,07M em banho-maria a 37 °C. Após 20 minutos, as células foram fixadas três vezes em solução de Carnoy (3 metanol:1 ácido acético glacial). Na primeira fixação, o material foi deixado à temperatura ambiente por 20 minutos. Na última fixação, o material foi ressuspensão em um pequeno volume de fixador para o preparo das lâminas, pingando-se uma gota da suspensão em lâmina

limpa e umedecida. A lâmina foi observada em microscópio óptico para verificação dos resultados e então o material foi estocado a 4°C para posterior análise cromossômica.

4.6.2 Estudo cariotípico por Bandeamento G

Para a análise cromossômica, a técnica utilizada foi a descrita por Seabright (1971). Resumidamente, as lâminas com 2 a 10 dias de preparo foram incubadas em uma solução de tripsina (Sigma) 0,1% aquecida a 37 °C em tempos que variaram de um segundo a um minuto. Em seguida as lâminas foram lavadas com soro fisiológico e coradas em solução de Giemsa (Merck) a 2% em tampão fosfato (pH 6,8), por 10 minutos.

O padrão cariotípico dos pacientes foi determinado pela análise média de 20 células metafásicas em microscopia óptica. Um caso foi considerado anormal quando mais de três células apresentavam a mesma anomalia cromossômica. A presença de células normais concomitantes com as anormais foi usada como parâmetro para eliminar a possibilidade de uma anomalia cromossômica constitucional. Os cromossomos foram identificados e classificados de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética de 2016 (McGOWAN-JORDAN *et al.* 2016).

A documentação dos cariótipos foi realizada no computador por um programa analisador de imagem (Ikaros, da Metasystems), utilizando-se para isso uma câmera CCD acoplada ao microscópio Olympus BX41.

4.6.3 Estudo dos rearranjos moleculares por Hibridação in situ por Fluorescência (FISH)

4.6.3.1 FISH a partir de amostras frescas (medula óssea e sangue periférico)

Para a aplicação das sondas gênicas e realização da técnica de FISH, as lâminas das amostras prospectivas foram confeccionadas pingando-se o material cromossômico de cada amostra em lâmina fosca lapidada (Precision®) identificada, e deixando a lâmina em temperatura ambiente por 24 horas antes de iniciar o processo de pré-tratamento e hibridização.

Para investigação de rearranjos moleculares, foram utilizadas sondas comerciais de sequência homóloga de DNA para *loci* específicos (LSI) IGH/MYC/CEP8 *dual fusion* (Abbot Molecular) e MYC *break apart* (Cytocell).

Resumidamente, as lâminas contendo a preparação cromossômica foram incubadas em 2XSSC a 37 °C por 20 minutos e em uma solução de pepsina 0,5% a 37 °C por 10 minutos. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS1X por 3 minutos em temperatura ambiente, incubadas em uma solução de Formaldeído por 10 minutos também em temperatura ambiente, e lavadas novamente em PBS1X por 3 minutos em temperatura ambiente. O processo de desidratação foi feito incubando-se as lâminas em banhos sucessivos de etanol (Merck) 70%, 85% e 100% respectivamente, 2 minutos cada.

Após desidratação, as sondas gênicas foram aplicadas nas amostras, e ambas foram co-desnaturadas em banho seco a 75 °C por 7 minutos. As lâminas foram então incubadas em câmara escura, na estufa de CO₂ a 37 °C por um período de 12-18 horas.

Após a incubação *overnight*, foi feita a lavagem em 0,4XSSC/0,1% Tween 20 a 72 °C por 2 minutos seguida de lavagem em 2XSSC/0,1% Tween 20 por 1 minuto em temperatura ambiente.

Para análise, foi usada a contra coloração com DAPI II. A análise foi feita em microscópio de fluorescência Olympus BX51 munido de lâmpada HBO 100W e filtros apropriados. A documentação foi realizada através de uma câmera CCD e software de análise Isis (Metasystems).

4.6.3.2 FISH a partir de amostras FFPE para a validação dos achados citogenéticos

a) Confecção de lâminas histológicas e do *Tissue Microarray* (TMA)

Para a realização da técnica de FISH em amostras FFPE, foram confeccionadas lâminas histológicas de 27 pacientes e amostras de 41 pacientes foram utilizadas para confecção de TMA (JAWHAR 2009).

Para confecção das lâminas histológicas, cada bloco de parafina foi submetido a cortes histológicos sucessivos de 3 µm, utilizando como ferramenta um micrótomo (Leica RM2255) e em seguida, os cortes foram aplicados sobre lâminas polarizadas (Inopat). As lâminas foram identificadas, secas verticalmente à temperatura ambiente, incubadas em estufa a 56 °C por 12 horas e posteriormente armazenadas a -20 °C.

Para confecção do TMA, inicialmente, a partir de lâminas coradas em hematoxilina-eosina (HE) foi feita a identificação de áreas representativas do tumor, e essas áreas foram identificadas nos blocos de parafina correspondentes a cada lâmina. O TMA foi construído usando um *tissue microarrayer* (Beecher Instruments Inc) para seccionar o bloco receptor e as áreas de interesse dos blocos de parafina de cada amostra. Para cada amostra, foram retirados dois cilindros de 2 mm (*cores*) das áreas representativas do tumor e transferidos para o bloco receptor. A distância entre cada *core* foi de 2,5 mm. O bloco receptor pronto foi incubado a 37 °C por 20 minutos para facilitar a impregnação do tecido na parafina. Depois de pronto o bloco receptor, foram cortadas seções de 3 µm em um micrótomo (Leica RM2255) para confecção de lâminas, que foram identificadas e armazenadas a - 20°C. Durante este estudo, foi necessária a construção de 2 TMAs para incluir as 41 amostras selecionadas. Em cada um deles, foi incluída amostra histológica de fígado, para auxiliar na orientação da localização das amostras no bloco de TMA. Os TMAs foram construídos em colaboração com o Dr. Davy Rapozo, na DIPAT.

b) Padronização do FISH a partir de amostras em FFPE

Inicialmente, foram realizados experimentos para padronização do FISH em 4 amostras de linfonodos reativos FFPE, onde foi utilizado o kit *Tissue Pretreatment* (Aquarius®), e soluções caseiras em contraparte, testando-se etapas e tempos. Resultados melhores foram obtidos para as amostras tratadas com o kit *Tissue Pretreatment* (Aquarius®).

b.1) Desparafinização

As lâminas histológicas e de TMA foram desparafinizadas deixando-as em banho seco (Labnet International, Inc) a 56 °C por 30 minutos. Posteriormente, foram colocadas em 3 banhos sucessivos de Xileno P.A. (Vetec), 10 minutos cada, e desidratadas em 2 banhos sucessivos de etanol P.A. (Merck), 5 minutos cada. Após desparafinização e desidratação, as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente para secar.

b.2) Pré-tratamento e hibridização

A confirmação do rearranjo do *MYC* e a pesquisa de anormalidades secundárias envolvendo as regiões cromossômicas 1q e 13q foi feita em amostras de tumor FFPE, através da técnica de FISH interfásico.

As lâminas foram incubadas por 30 minutos em HCl 0,2N em temperatura ambiente e, por conseguinte, por 1 hora em solução na solução de pré-tratamento *Tissue Pretreatment* (Aquarius®) em banho-maria aquecido a 87 °C. Para cessar a atividade da solução de pré-tratamento, as lâminas foram lavadas em 2 banhos de 3 minutos cada em água destilada. Após o processo de pré-tratamento, foi realizada uma digestão proteolítica com a enzima proteolítica do kit *Tissue Pretreatment* (Aquarius®) sobre toda a área da lâmina contendo material. O tempo de ação da pepsina foi testado incubando-se a lâmina com a solução, inicialmente por 15 minutos na estufa de CO₂ a 37 °C e, ao fim deste tempo, a lâmina foi lavada em 2 banhos de água destilada por 3 minutos cada, e desidratada em banho sucessivos de etanol 70%, 85% e 100% por 2 minutos cada. A lâmina foi observada ao microscópio óptico (Olympus) a fim de observar a qualidade de digestão dos tecidos. Quando o tempo de digestão não foi suficiente, as lâminas foram rehidratadas por 2 minutos em 2 banhos de água destilada, cada e o processo de digestão proteolítica foi repetido, considerando o grau de digestão dos tecidos para decisão do tempo a ser acrescido na incubação com a enzima. O processo de lavagem e desidratação foi repetido após cada incubação com a enzima, bem como o processo de rehidratação. Após obter uma digestão proteolítica desejável, a sonda foi aplicada sobre a lâmina, que por sua vez foi protegida com lamínula 24x32 mm, selada com a cola Fixo Gum (Marabu) e tanto a sonda quanto a amostra foram co-desnaturados em banho seco a 75 °C por 7 minutos.

Por fim, as lâminas foram incubadas por um período de 12-18 horas juntamente com a sonda de DNA, dentro de uma câmara escura, em estufa de CO₂, para hibridização. Foram utilizadas as sondas comerciais LSI IGH/MYC/CEP(8) *dual color dual fusion* (Vysis, Abbott Molecular), LSI 1p36/1q25 (Vysis, Abbott Molecular) e LSI 13q34 (Vysis, Abbott Molecular). Após o período de incubação, a lamínula foi retirada e foi feita a lavagem da lâmina em solução de 0,4XSSC em banho-maria a 72 °C por 2 minutos seguida de incubação por 1 minuto na solução de 2XSSC/0,1% Tween 20 em temperatura ambiente. A lâmina foi deixada em temperatura ambiente para secar um pouco e foi aplicado DAPI II (Vysis, Abbott Molecular) sobre toda a área de

hibridização, seguida de proteção com lamínula 24x32 mm. A análise dos resultados foi feita em microscópio de fluorescência acoplado com câmera CCD e software Isis (Metasystems). Pontos de corte para cada sonda foram previamente validados, utilizando linfonodos de hiperplasia reativa, após contagem de mínimo de 600 núcleos.

4.6.3.3 Padrão de Hibridização – Critérios para análise

A sonda IGH/MYC/CEP8 *tricolor dual fusion* (Abbott Molecular) compreende um conjunto de três sondas marcadas diferencialmente que se ligam aos pontos de quebra esperados em cada locus, que são o *IGH* (marcação verde) e o *MYC* (marcação vermelha), e ao centrômero do cromossomo 8 (marcação azul).

Desta forma, a aplicação desta sonda em uma célula normal, sem o rearranjo, resulta no aparecimento de dois sinais de cada cor (dois sinais verdes, dois sinais vermelhos). Uma translocação cromossômica envolvendo os pontos de quebra esperados divide os dois sinais e gera um sinal de fusão em cada um dos cromossomos envolvidos na translocação cromossômica, de forma que o que é visualizado neste caso são dois sinais de fusão (co-localização das sondas) nos cromossomos envolvidos na translocação e um sinal de cada cor (um verde e um vermelho), nos dois cromossomos que não sofreram a translocação. Esta sonda ainda é composta por um terceiro fluorocromo (azul), uma sonda centromérica do cromossomo 8, que é usada como controle, que tanto em uma célula normal, como em uma anormal (com o rearranjo recorrente) é observada em número de dois (Fig 4.1) (MAY *et al.*, 2010).

A sonda 1p36/1q25 (Abbott Molecular) compreende três sondas marcadas com fluorocromo vermelho, que marca a região 1p36, verde, que marca a região telomérica do braço curto do cromossomo 1 e azul, que marca o ponto de quebra 1q25. A aplicação em uma célula normal resulta no aparecimento de dois sinais de cada cor, representando as duas cópias de cada região. (Fig. 4.2A e B). Já a sonda D13S319/13q34 (Abbott Molecular) compreende duas sondas marcadas com fluorocromo verde, que marca o ponto de quebra 13q34 e vermelho, que marca a região 13q14.3. A aplicação das sondas em uma célula normal resulta no aparecimento de dois sinais de cada cor, representando as duas cópias de cada região. A alteração no número de cópias de algum sinal de uma das duas sondas citadas anteriormente, então, representa uma alteração no número de cópias da região correspondente, numa célula alterada. (Fig. 4.2C e D).

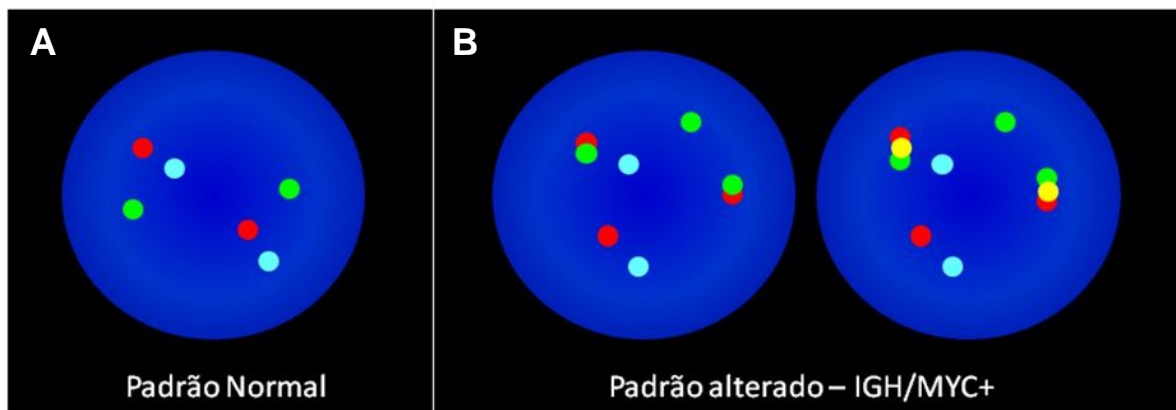


Figura 4.1: Padrão de hibridização da sonda IGH/MYC/CEP8: A) Em células normais, o padrão obtido inclui dois sinais de cada cor (verde: *IGH*, vermelho: *MYC*, azul: centrômero do cromossomo 8) referentes aos alelos e centrômeros normais; B) Em células alteradas, observam-se dois sinais de fusão (das sondas verde e vermelha), podendo gerar, ou não, um sinal amarelo, e esses sinais de fusão são referentes aos cromossomos derivados da fusão *IGH/MYC*.

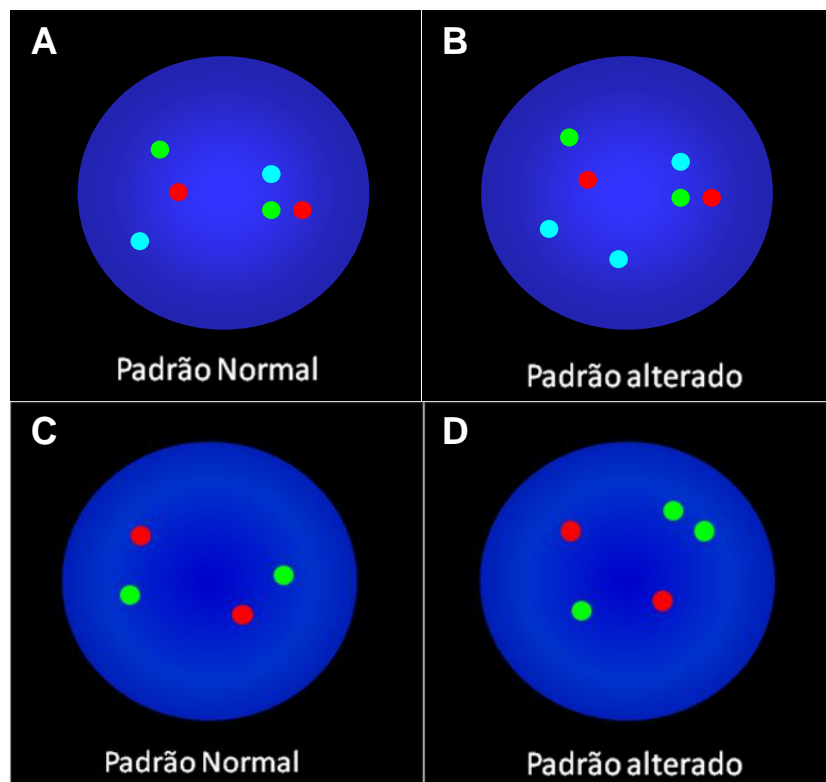


Figura 4.2: Padrão de hibridização das sondas 1p36/1q25 e D13S319/13q34: A) Em células normais, o padrão de hibridização da sonda 1p36/1q25 inclui dois sinais de cada cor (verde: 1p36, vermelho: região telomérica do cromossomo 1, azul: 1p25), correspondente ao número de alelos normal; B) Em células com a duplicação da região 1q25, espera-se encontrar 3 sinais azuis, referentes a 3 cópias dessa região; C) Em células normais, o padrão de hibridização da sonda D13S319/13q34 inclui dois sinais de cada cor (verde: 13q34 e vermelho: 13q14.3); D) Em células com duplicação da região 13q34 espera-se encontrar 3 sinais verdes, referentes a 3 cópias dessa região.

4.6.4 Estudo das alterações cromossômicas secundárias por Bandeamento cromossômico multicolorido (MCB)

Para refinar e caracterizar 4 amostras de MO que através do cariótipo por bandeamento G apresentaram alterações cromossômicas secundárias, os cariótipos, a técnica de MCB foi aplicada com a utilização de sondas caseiras, confeccionadas no Laboratório de Citogenética Molecular coordenado pelo Dr. Thomas Liehr (Universitätsklinikum Jena, Alemanha). Estas sondas são geradas pelo processo de microdissecção de regiões específicas dos cromossomos. Cada uma das sondas é baseada em um número de fragmentos cromossômicos que varia de 15 a 20, que são retirados de cada cromossomo, de forma imprecisa intencionalmente, para que ao serem sobrepostas se tenha a certeza de que cada um dos cromossomos será coberto. Com isso, são geradas 169 sondas de regiões específicas que cobrem todo o genoma humano (LIEHR & CLAUSSEN 2002; LIEHR *et al.* 2002; WEISE *et al.* 2008). Quando sobrepostas, essas sondas criam um padrão de pseudo-cores para cada um dos 24 cromossomos humanos. A técnica de MCB é baseada na mudança da taxa de intensidade de fluorescência ao longo dos cromossomos.

O processo de hibridização, a pós-lavagem e a detecção do sinal foram feitos de acordo com os experimentos realizados para a técnica de FISH. As sondas caseiras utilizadas para caracterização refinada dessas amostras incluíram sondas de pintura cromossômica total (WCP) e parcial (PCP), a saber, WCP 1, WCP 2, WCP3, WCP7, WCP 8, WCP9, WCP11, WCP13, WCP14, PCP8p e PCP8q, mix de sondas Submix1 (PCP1p, PCP1q, RP11-130 B18 - 1q12, RP11-35 B4 – 1q21.1), sondas de bandeamento cromossômico multicolorido (MCB), dentre as quais MCB1, MCB2, MCB7, MCB8, MCB11 e MCB13, além de sondas de cromossomo artificial de bactéria (BAC), que seguem: RP11-301 M17, RP11-57 I17, RP11-100 024, RP11-95 C14, RP11-90 N9, RP11-313 n23, RP11-380 G21, RP11-538 C21, RP11-520 F9, RP11-98 F3, RP11-448 A3, RP11-356 E17 e RP11-567 M21.

Os resultados da hibridização foram documentados em um microscópio de fluorescência da Zeiss Axioplan equipado com o sistema de análise Ikaros e Isis de imagem digital para FISH (MetaSystems), utilizando uma câmera XC77 CCD

4.6.5 Métodos de extração de ácidos nucleicos

Condições livres de DNase ou RNase foram mantidas no local de extração, assim como nos instrumentos utilizados. Na extração do RNA, tanto as pipetas como as ponteiros foram separadas unicamente para estes procedimentos. As soluções de trabalho também foram preparadas e mantidas em condições livres de RNase.

4.6.5.1 Extração de DNA a partir de amostras FFPE

a) Desparafinização

Três seções com 10 micras de cada bloco foram cortadas em micrótomo, e foram posteriormente acondicionados em tubos de 1,5 mL identificados com o número de cada paciente. Para a desparafinização, 500 uL de óleo mineral foram adicionados aos tubos contendo os cortes, seguindo-se de incubação a 80 °C por 1 minuto no termobloco e vortexagem por 15 segundos.

b) Extração de DNA total a partir de amostras FFPE

A extração de DNA foi realizada utilizando o método de purificação de QIAamp DNA FFPE tissue kit (QIAGEN), como sugerido pelo fabricante. Resumidamente, a partir das amostras desparafinizadas, 180 uL de tampão ATL foi adicionado aos tubos, que foram em seguida centrifugados por 15 segundos a 1.000 g, de modo que duas fases foram formadas, uma fase aquosa (inferior) e outra oleosa (superior). À fase aquosa, foram adicionados 20 uL de proteinase K (PK) (Invitrogen) diretamente, homogeneizando-se por pipetagem. Em seguida, os tubos foram incubados a 56 °C no banho maria, *overnight*. No dia seguinte, os tubos foram incubados a 90 °C por 1 hora no termobloco, seguindo-se esta etapa por um spin. Então, 200 uL de tampão AL foram adicionados aos tubos e foram misturados por 15 segundos no vórtex. Ao final deste processo, foram adicionados 200 uL de etanol absoluto (Merck) seguido de nova vortexagem (15 segundos) e centrifugação por 15 segundos a 8.000 rpm. Novamente duas fases foram formadas, uma aquosa na parte inferior e outra oleosa na parte superior do tubo. A fase aquosa (inferior) foi transferida para as colunas nos tubos coletores, com cuidado para não carrear sedimentos. O material foi então centrifugado por 1 minuto a 8.000 rpm, e os tubos coletores descartados, transferindo-se as colunas para novos tubos coletores. Nas colunas, foram adicionados 500 uL de tampão AW1 seguido de

centrifugação por 1 minuto a 8.000 rpm. Os tubos coletores foram mais uma vez descartados e as colunas transferidas para outros tubos. Logo em seguida, 500 uL de tampão AW2 foram pipetados nas colunas, e o processo de centrifugação a 8.000 rpm se repetiu por mais 1 minuto. Repetidamente, os tubos coletores foram descartados e as colunas transferidas para novos tubos, que foram centrifugados por 3 minutos a 14.000 rpm para secar a membrana. Por fim, os tubos coletores foram descartados, e as colunas transferidas para um eppendorf de 1,5 mL, seguindo-se a adição de 50 uL de tampão ATE, no centro da membrana, e incubação por 5 minutos seguido de centrifugação por 1 minutos a 14.000 rpm. Os eppendorfs com DNA foram armazenados a -20 °C.

c) Extração de DNA total a partir de amostras FFPE com pré-tratamento de Tiocianato de Sódio

Tratando-se de amostras FFPE, a fim de se obter um DNA mais puro para as análises deste estudo, foi feita uma modificação no protocolo de extração de DNA total para amostras cuja extração inicial rendeu pouca quantidade e qualidade de DNA (KRIJGSMAN *et al.* 2012). Esta modificação foi testada com a desparafinização de amostras utilizando-se óleo mineral, segundo descrição no tópico 4.6.5.1a e com desparafinização utilizando xilol, onde 1 mL de Xileno foi adicionado aos tubos contendo os cortes, esses tubos vortexados e incubados por 3 minutos a 50 °C. Após centrifugação e retirada do sobrenadante, foi feita a recuperação com 1 mL de Etanol absoluto (Merck) por duas vezes e secagem do sedimento por 10 a 15 minutos em temperatura ambiente. Posterior à desparafinização, seguiu-se o tratamento com 1 mL de NaSCN em cada tubo, que foram vortexados após inclusão da solução e incubados *overnight* em 38 °C. A digestão proteolítica dos tumores foi feita após duas lavagens das amostras com PBS, adição de 60 uL de tampão ATL e 25 uL de PK (Invitrogen). Esta digestão foi feita com incubação *overnight* a 55 °C em banho maria. Após a etapa de pré-tratamento com NaSCN e digestão proteolítica, a extração de DNA foi realizada utilizando o método de purificação de QIAamp DNA FFPE tissue kit (QIAGEN), como sugerido pelo fabricante e descrito em 4.6.5.1b. Foram utilizadas duas amostras pareadas de tumor FFPE para avaliação do melhor método de desparafinização e o método utilizando óleo mineral em lugar do xilol rendeu maior quantidade e qualidade de amostras.

4.6.5.2 Extração de RNA a partir de amostras FFPE

a) Desparafinização

O material incluído nos blocos de parafina foi seccionado com um micrótomo Leica Biosystems, obtendo-se em média 5 seções de 3µm de espessura. Os cortes foram submetidos ao processo de desparafinização com 3 incubações em xilol, seguida por 3 incubações em etanol 100% (Merck).

b) Extração de RNA total a partir de amostras FFPE

A extração de RNA foi realizada utilizando o método de purificação de RNA *Master PureTM* (Epicentre®, Madison, WI) como sugerido pelo fabricante com modificações na etapa de digestão (CHEN & LOSSOS 2007; VERA-LOZADA *et al.* 2014). Resumidamente, após a desparafinização foram adicionados ao sedimento 480 µL de solução de lise celular e tecidual com 60 µL de PK (Invitrogen) a 60 mg/mL e incubado a 65 °C durante 16-20 horas. A precipitação de proteínas foi realizada com os reagentes do *kit* e a precipitação do RNA com isopropanol 100% (Merck). Um tratamento com DNase I foi aplicado. Novamente uma etapa de lise celular, precipitação de proteínas e do RNA foi realizada, finalizando com duas etapas de lavagens com etanol (Merck) 75% diluído em água-DEPC. O RNA foi ressuspendido em 12 µL de água-DEPC e armazenado a -70°C, como descrito previamente (VERA-LOZADA *et al.* 2014)

4.6.5.3 Avaliação da quantidade dos ácidos nucleicos extraídos

As amostras foram quantificadas em um fluorômetro Qubit® 1.0 (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA). As amostras de RNA extraídas foram quantificadas e sua pureza avaliada em um espectrofotômetro Nanodrop® (Wilmington, Delaware USA) nos comprimentos de onda (λ) de 260, 280 e 230 que quantificam ácidos nucleicos, proteínas e contaminação com álcool, fenol e EDTA, respectivamente. A quantificação dos ácidos nucleicos foi realizada considerando as densidades ópticas (DO), em que uma unidade de DO corresponde a aproximadamente 50 µg/mL de DNA de dupla fita e a 40 µg/mL de RNA a 260 nm (SAMBROOK *et al.*, 1989). Características ótimas de pureza para uma amostra foram $\lambda_{260/280}$ entre 1,8-2,0; e $\lambda_{260/230}$ entre 2,0-2,2.

A integridade das amostras foi avaliada pela conservação relativa das frações do RNA ribossômico (28S, 18S e 5S) através de eletroforese em gel de agarose 1,2% preparado com tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,01M) em condições livres de RNases. O gel foi corado com corante Gelred™ (Biotium, Inc; Hayward, CA) e a avaliação das amostras foi realizada sob luz ultravioleta.

4.6.6 Métodos de PCR

4.6.6.1 Considerações Gerais

Todas as reações foram desenhadas para um volume final de 30-50 μL , de acordo com os alvos de interesse, conforme especificado ao longo desta seção.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Veriti™ 96 Well Thermo Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) e incluíram em todos os casos controles positivos, negativos e controles de reação (sem DNA).

Para evitar amplificações adulteradas de DNA e contaminação cruzada entre amostras, a manipulação das amostras e as reações de PCR foram realizadas em ambientes separados: i) extração e manipulação dos ácidos nucleicos; ii) misturas dos reagentes para as reações e; iii) incorporação dos ácidos nucleicos à PCR.

a) PCR para genes constitutivos

Com o objetivo de determinar a amplificabilidade do DNA e testar a presença de inibidores de PCR que pudessem levar ao aparecimento de falsos negativos, realizaram-se reações utilizando iniciadores específicos para o gene constitutivo β -globina (F: TTC TGACACA ACTGTGTTCACTAGC e R: TATTGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG). As reações de PCR foram realizadas em volumes finais de 30 μL , contendo 1X de tampão de PCR [60 mM Tris- SO_4 (pH 8,9) e 18 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], 1,5 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de desorribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 10 pmol/ μL de iniciadores, 1U de *Taq* polymerase Platinum e 100-500 ng de DNA.

As reações foram incubadas em termociclador Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) a 94 °C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto com uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os resultados foram avaliados em géis de agarose 2% preparados com tampão TAE 1X e corados em solução de Gel Red. Foram usados marcadores de peso molecular

de 100 pares de base (pb) (Invitrogen). A eletroforese foi realizada a 110 volts, em cubas de eletroforese tipo horizontal com fonte de corrente contínua Life Tech Model 250 (Gibco). Os resultados das corridas eletroforéticas foram visualizados com a ajuda de um transiluminador UV de onda curta.

b) PCR alvo específicos

As reações de PCR foram realizadas num volume final de 50 µL, combinando os diferentes iniciadores (Tabela 4.1) para os genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3*, de modo a cobrir toda as regiões de interesse, resultando em 8 diferentes produtos de amplificação. As reações foram montadas utilizando 1X de tampão de PCR, 1,85 - 2 mM de MgSO₄, 0,2 mM de dNTPs, 10 pmol/µL de iniciadores (Tabela 4.1), 1U de High Fidelity Platinum™ *Taq* Polymerase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) e 100-500 ng de DNA. As reações foram incubadas a 94 °C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 57°C 30s - 1 min e 68°C por 1 minuto com uma extensão final a 68°C por 5 minutos.

Tabela 4.1: Iniciadores utilizados nas reações de PCR para amplificação de regiões de interesse dos genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3*.

Fragmento Gênico	Sequência (5´- 3´)	Tamanho esperado	Ref.
ID3.1	5´ CGAGAGGCACTCAGCTTAGC 3´ 5´ CTGCCAACTCCAGGACTTGCC 3´	358 pb	Gebauer et al, 2013
ID3.2	5´ TCCAGGCAGGCTCTATAAGTG 3´ 5´ CTGCAGGTCGAGAATGTAGTC 3´	~350 bp	Richter et al.; Gebauer et al, 2013
ID3.3	5´ GTTGCAGGTCAGTGTAGCGG 3´ 5´ AAGAGTTACGCGAGGCAATC 3´	450 bp	Havelange et al, 2016
TCF3.1	5´ AATGTAAGCCATGTACCTGCAC 3´ 5´ CGGAAGGCCTCGTTAATATCC 3´	297 bp	Rohde et al, 2017
TCF3.2	5´ GCACAAACACAAGTAGCTGGATACC 3´ 5´ CGGAAGGCCTCGTTAATATCC 3´	214 bp	Rohde et al, 2017
TCF3.3	5´ GGGATATTAACGAGGCCTTCC 3´ 5´ CACAAAGACAGACATGGACAGAGTC 3´	251 bp	Rohde et al, 2017
TCF3.4	5´ GCACAAACACAAGTAGCTGGATACC 3´ 5´ CACAAAGACAGACATGGACAGAGTC 3´	443 bp	Rohde et al, 2017
CCND3	5´CCATGTGTTGGGAGCTGTC 3´ 5´CTGGAGGCAGGGAGGTG 3´	328 bp	Rohde et al, 2017

4.6.7 Caracterização de mutações por sequenciamento de Sanger

Foram estudados 8 alvos moleculares com o objetivo de pesquisar mutações nos genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3*. Inicialmente, foram feitas reações de PCR para estes alvos, conforme descrito na seção anterior, seguidas de purificação dos produtos de PCR e posterior sequenciamento bidirecional de Sanger.

4.6.7.1 Purificação dos Produtos de PCR

Os produtos de PCR resultantes da amplificação dos oito alvos moleculares de interesse foram purificados utilizando-se o *kit* PureLink® (Invitrogen by Life Technologies). Resumidamente, considerando-se o volume final de produto disponível, foram adicionados 4 volumes de tampão de ligação B2 com isopropanol para cada unidade de volume do produto, homogeneizando-se bem. A amostra, junto com o tampão, foi transferida para a coluna disposta no tubo de lavagem, que foi centrifugada por 1 minuto na rotação de 10.000 g. Após descarte do fluido filtrado no tubo de lavagem e reinserção da coluna no mesmo, foram adicionados 650 µL de tampão de lavagem W1 com etanol e a coluna foi novamente centrifugada por 1 minuto a 10.000 g. O fluido filtrado foi descartado e a coluna reinserida no tubo de lavagem, para centrifugação na rotação máxima por 3 minutos. Por fim, na coluna sobre um tubo de eluição 1,7mL estéril, foram adicionados 50 µL de tampão de eluição E1. A coluna foi incubada por 3 minutos sob agitação e posteriormente centrifugada por 1 minuto na máxima rotação. Após eluído, o produto de PCR purificado foi acondicionado a 4 °C para uso posterior.

As eluições finais contendo o DNA purificado foram avaliadas qualitativa e quantitativamente por eletroforese em géis de agarose a 2%. Como padrão de quantificação, foi utilizado o marcador de massa molecular de 100 pb (Invitrogen), procedendo-se à quantificação por comparação de intensidade das bandas. Após isto, estas amostras foram congeladas a -20°C à espera de procedimentos posteriores.

4.6.7.2 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada em placa de 96 poços, num volume final de 10µL por reação, contendo 5X de tampão de PCR, reagente Bigdye terminator cycle v3.1 (Applied Biosystems), 3,2 pmol/µL de um dos iniciadores e o produto de PCR purificado. Para cada produto foi realizada pelo menos uma reação com iniciadores *sense* e outra com *antisense*. As reações foram incubadas num termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler por 40 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. Após o término da reação, seguiu-se a etapa de precipitação.

4.6.7.3 Precipitação com Etanol-EDTA

Ao término da reação de sequenciamento, foi dado um rápido *spin* na placa, e sua vedação foi removida. Assim, 2,5 µL de EDTA 125 mM, pH 8,0 foram adicionados à parede de cada poço da placa, posteriormente vedada, vortexada cuidadosamente, seguido de um rápido *spin*. Logo, 30 µL de etanol 100% (Merck) também foram adicionados a cada poço, e, vedada, a placa foi vortexada cuidadosamente por no máximo 10 segundos, seguido por incubação a temperatura ambiente por 15 minutos.

Terminando a incubação, a placa foi centrifugada a 3.700 rpm por 45 minutos a 4°C. Após centrifugação, a vedação da placa foi retirada e o sobrenadante foi eliminado. Depois disso, foi adicionado 50 µL de etanol 70% fresco, a placa foi vedada, vortexada cuidadosamente por no máximo 10 segundos e centrifugada a 4 °C por 15 minutos na rotação de 3.700 rpm. O sobrenadante foi novamente eliminado por inversão. Para secar a placa, a mesma foi colocada em um termociclador por 10 minutos a 60 °C com a tampa do aparelho aberta. Após seca, vedada, protegida da luz por papel alumínio, e identificada devidamente, a placa foi armazenada no freezer a -20 °C. O sequenciamento direto foi realizado em um instrumento ABI 3130xl (Applied Biosystems).

4.6.7.4 Análise das sequências

As sequências foram primariamente avaliadas, editadas e alinhadas com o programa BioEdit (HALL, 1999). A análise mutacional foi realizada com o programa Mutation Surveyor v.3.00 (SofGenetics®, LLC, Pennsylvania, USA) e confirmadas por inspeção visual dos esferogramas no programa Bioedit. As sequências de referência foram obtidas a partir do banco de dados do NCBI (GRCh38.p12), a saber: gene *ID3*, NM_002167.4, proteína NP_002158.3; gene *TCF3*, NM_001136139.4 proteína NP_001129611.1; gene *CCND3*, NM_001760.4, proteína NP_001751.1.

As mutações foram descritas de acordo com as recomendações do HGVS (Human Genome Variation Society; <http://varnomen.hgvs.org/>). Uma vez que a mutação foi descrita, estas foram caracterizadas quanto a seu potencial funcional e publicação prévia nos seguintes bancos de dados: Varsome v19.01 (<https://varsome.com/>), COSMIC v.87 (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), Exome Aggregation Consortium (ExAC) (<http://exac.broadinstitute.org/>), dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) e Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF3/index.html>).

4.6.8 Estudos de Expressão Gênica e de miRNAs

4.6.8.1 Retrotranscrição e quantificação da expressão gênica por ensaios simples

Para os ensaios de expressão gênica simples, a reação de retrotranscrição foi realizada utilizando o kit *High-Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) seguindo as indicações do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 0,5 µg de RNA total em um volume final de 20 µL. A reação foi incubada a 25 °C por 10 minutos, seguidos de 120 minutos a 37 °C e 5 minutos a 85 °C em um termociclador Veriti® (Applied Biosystems) e armazenado a -80°C.

Uma etapa de pré-amplificação (pré-Amp) foi realizada para estas amostras, utilizando o reagente SYBR Green (Applied Biosystems, Life Technologies), em reações com um volume final de 10 µL de acordo com as recomendações do fabricante. O perfil térmico consistiu de 10 minutos a 95 °C, seguido de 14 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 2 minutos em um termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Life Technologies). O produto foi diluído na proporção de 1:20 em água livre de nucleases e armazenado a -80 °C. Para o reagente *TaqMan® PreAmp Master Mix* (Applied Biosystems, Life Technologies), a pré-Amp foi realizada em reações com um volume final de 10 µL de acordo com as recomendações do fabricante. O perfil térmico consistiu de 10 minutos a 95 °C, seguido de 14 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos em um termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Life Technologies). O produto foi diluído na proporção de 1:20 em água livre de nucleases e armazenado a -80 °C.

As reações de quantificação por PCR em tempo real após transcrição reversa (RT-qPCR) foram realizadas utilizando a metodologia SYBR Green (Applied Biosystems, Life Technologies) e TaqMan® (Applied Biosystems, Life Technologies). Na metodologia SYBR Green, cada reação apresentava um volume final de 15 µL e estava composta por 1X GoTaq qPCR MM 2X, 60 nM do iniciador *forward*, 60 nM do iniciador reverso, 0,5X do "enhancer" e 3µL de cDNA pré-amplificado. O perfil térmico utilizado foi 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 60 °C por 1 minuto. Na metodologia TaqMan, cada reação apresentava um volume final de 15 µL e estava composta por 1X *TaqMan® PCR*

Master Mix Universal (Applied Biosystems, Life Technologies), 1X do ensaio TaqMan® de expressão gênica específica (Applied Biosystems, Life Technologies) e 3µL de cDNA pré-amplificado. O perfil térmico utilizado foi 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 60 °C por 1 minuto. As reações foram realizadas em um aparelho ViiA™ 7 (Applied Biosystems, Life Technologies) (Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4).

Controles de qualidade foram incluídos nas placas das reações e na quantificação por RT-qPCR, a saber: i) dois controles da reação com ausência de cDNA (NTC) para cada gene avaliado foram colocados em cada placa, o qual não devia mostrar amplificação; ii) todas as reações de qPCR foram realizadas em duplicata, aceitando como valor máximo diferencial de desvio padrão (DP) < +0,15 ciclos; iii) os genes de interesse (GDI) e genes de referência (GDR) foram colocados na mesma corrida; iv) valores fixos tanto para a linha de base como para o limiar de determinação foram estabelecidos no aparelho para todas as corridas (3-15 ciclos e limiar de 0,11; respectivamente).

Cinco linhagens celulares foram utilizadas para fins de comparação da expressão gênica e de miRNAs, Namalwa, Raji, Ramos, Farage e Pfeiffer.

O método de avaliação da expressão gênica a partir de RNA extraído de material FFPE seguiu os parâmetros descritos em Vera-Lozada *et al.* (2014).

Tabela 4.2: Ensaios utilizados para PCR em tempo real quantitativo pela metodologia TaqMan.

Símbolo do Gene	Nome do Gene*	ID do ensaio	Tamanho do amplicon (pb)	Perfil
<i>CD10</i>	<i>membrane metallo-endopeptidase</i>	Hs00153519_m1	115	Endopeptidase
<i>BCL2</i>	<i>apoptosis regulator</i>	Hs00608023_m1	81	Anti-apoptócio
<i>ACTB</i>	<i>actin beta</i>	Hs_01060665_g1	194	GDR
<i>B2M</i>	<i>beta-2 microglobulin</i>	Hs_00984230_m1	81	GDR

* De acordo com HUGO (White *et al*, 2012). GDR, Gene de Referência.

Tabela 4.3: Ensaios utilizados para PCR em tempo real quantitativo pela metodologia SYBRgreen.

Símbolo do Gene	Nome do Gene*	Sequência do ensaio 5'>3'	Tamanho do amplicon (pb)	Perfil
<i>MYC</i>	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>	AGCGACTCTGAGGAGGAAC/ TGTGAGGAGGTTTGTCTGTG	130	Fator de transcrição
<i>ACTB</i>	<i>actin beta</i>	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA/ AGCACTGTGTTGGCGTACAG	194	GDR
<i>GUSB</i>	<i>glucuronidase, beta</i>	CCTGTGACCTTTGTGAGCAA/ AACAGATCACATCCACATACGG	70	GDR

* De acordo com HUGO (White *et al*, 2012). GDR, Gene de Referência.

Tabela 4.4: Ensaios utilizados para PCR em tempo real quantitativo para miRNAs.

Símbolo do miRNA	Nome do Mirna	ID do ensaio
<i>hsa-miR-155</i>	"Micro RNA 155"	002623
<i>hsa-miR-Let7a</i>	"Micro RNA Let-7a"	000377
<i>hsa-miR-Let7b</i>	"Micro RNA Let-7b"	002619
<i>hsa-miR-Let7e</i>	"Micro RNA Let-7e"	002406
<i>hsa-miR-21</i>	"Micro RNA 21"	000397
<i>hsa-miR-150</i>	"Micro RNA 150"	000473
<i>hsa-miR-9*</i>	"Micro RNA 9"	002231
<i>RNU48</i>	"Small nucleolar RNA, C/D Box 48"	001006

RNU48 foi usado como Gene de Referência.

Para cada reação foi obtido o valor de Cq, em que os resultados para cada GDI foram expressos em valores relativos de quantificação ($2^{-\Delta\Delta Cq}$). Nesta parte do estudo, o

valor de C_{qGDR} foi obtido a partir da média de quantificação dos genes *ACTB* e *B2M* para os ensaios TaqMan e a média de quantificação dos genes *ACT* e *GUSB* para os ensaios SYBRgreen, como recomendado.

4.6.9 Detecção e tipificação do EBV

4.6.9.1 Método de hibridização *in situ* para EBERs (EBER-ISH)

A detecção do EBV nas amostras de tumor FFPE foi realizada pela técnica de ISH utilizando sondas biotinizadas para os RNAs virais não traduzidos *EBER1* e *EBER2* (HASSAN *et al.* 2006) conforme descrito a seguir: Os cortes foram desparafinizados por incubação com xilol (Merck) em estufa a 60 °C por 30 minutos, seguido por 2 banhos em xilol de 10 minutos, cada um. Posteriormente, os cortes foram hidratados através de banhos sucessivos em etanol (Merck) de concentração descendente (etanol 100%, etanol 95%, etanol 70%) e água destilada, por 5 minutos em cada banho. Foi então realizada digestão com PK (20µg/ml) a 65 °C por 30 minutos e os cortes foram desidratados através de banhos sucessivos em etanol 70%, etanol 95% e etanol 100% e deixados secar a temperatura ambiente.

A etapa de hibridização foi realizada mediante incubação dos cortes com 10 µl da sonda para EBERs (Novocastra) e incubação em estufa a 37 °C por 2 horas. Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em TBS e acondicionadas em câmara úmida. O bloqueio de hibridização inespecífica foi realizado por incubação com 100 µl de solução bloqueante (TBS 0,1%; Triton X-100; BSA 3%) por 10 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado o anticorpo anti-FITC conjugado com fosfatase alcalina (diluição 1:200) e incubado por 20 minutos. As lâminas foram lavadas duas vezes em PBS, por 3 minutos, seguido de incubação em solução de fosfatase alcalina (pH 9,0) por 5 minutos. Para a detecção da marcação com os anticorpos, aplicou-se 100 µl de solução de detecção preparada no momento [1 ml de solução de fosfatase alcalina, 8 µl de solução do substrato de fosfatase alcalina (BCIP/NBT) e 1 µl de Levamisole] e a incubação procedeu por 16 horas à temperatura ambiente. A contracoloração foi realizada com solução de hematoxilina de Harris por 30 segundos. Após desidratação, realizou-se a montagem utilizando meio Glicergel (Dako). Para cada reação utilizou-se, como controle uma lâmina contendo corte de carcinoma de nasofaringe sabidamente

positivo para a expressão de EBERs. A reação foi considerada positiva quando se observou a marcação nuclear acastanhada.

4.6.9.2 Tipificação do EBV por PCR

A tipificação do EBV foi realizada utilizando DNA extraído do tumor FFPE através do método de PCR e PCR *nested* com iniciadores específicos para o gene EBNA3C, possibilitando a identificação dos tipos EBV-1 e EBV-2 (KHANIM *et al.*, 1996; PALSER *et al.* 2015; CORREIA *et al.* 2017; CHOI *et al.* 2018).

As reações de PCR foram realizadas num volume final de 50 µL, utilizando iniciadores específicos (F: AGAAGGGGAGCGTGTGTTGT; R: GGCTCGTTTTTGACGTCGGC). As reações foram montadas utilizando 1X de tampão de PCR, 1,8 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 10 pmol/µL de iniciadores (Tabela), 1U de Platinum™ Taq Polymerase e 100-500 ng de DNA. As reações foram incubadas a 94 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 57 °C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto com uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os resultados foram avaliados em géis de agarose 2% preparados com tampão TAE 1X e corados em solução de Gel Red. A discriminação dos tipos virais foi realizada por inspeção de tamanho do produto de PCR, sendo esperado um fragmento de 153 pb para EBV1 e um fragmento de 246 pb para EBV2.

4.7 Informação mínima necessária para publicação de experimentos em PCR quantitativa (MIQE)

Como recomendado por Bustin *et al.* (2009), a lista das informações mínimas para publicação de experimentos em qPCR (MIQE) referente as 4 etapas, a saber: qualidade das amostras, condições da reação de retrotranscrição, detalhe sobre os ensaios de PCR e métodos estatísticos utilizados na avaliação dos dados, encontra-se no Anexo II.

4.8 Análise Estatística

O estudo de associação foi realizado por métodos não paramétricos de comparação de frequências (X^2 ou Teste exato de Fisher, de acordo com as frequências

observadas). A comparação de medianas ou médias foi realizada utilizando os métodos de Mann-Whitney ou T de Student, respectivamente. O impacto das alterações citogenéticas na evolução clínica foi avaliado por método de tempo-para-evento, segundo Kaplan-Meier, considerando sobrevida global (tempo entre o diagnóstico e o óbito ou a data do último follow-up) e sobrevida livre de evento (tempo entre o diagnóstico e o evento ou a data do óbito ou último follow-up), considerando como evento, óbito ou recaída. Os dados para imputar evento foram obtidos dos prontuários médicos dos pacientes. A comparação da distribuição de sobrevidas foi realizada com o teste de log-rank. As análises foram realizadas com o programa SPSS v. 20. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significantes.

5. RESULTADOS

5.1 Apresentação Clínica

A tabela 5.1 apresenta as características clínicas e demográficas, de cada um dos pacientes deste estudo, que incluiu 76 pacientes com tumor FFPE (P1-P97) inicialmente selecionadas e com material suficiente disponível na DIPAT e 7 pacientes com aspirado de medula óssea (P22, P98-P103). Todas as amostras de tumor e aspirado tiveram o diagnóstico de L/LB definido segundo critérios morfológicos e imunofenotípicos, de acordo com a classificação WHO (SWERDLOW *et al.*, 2008).

Os dados resumidos das crianças e adultos incluídos neste estudo são apresentados na Tabela 5.2. Entretanto, como o objetivo do presente estudo foi analisar as características clínico-biológicas da população pediátrica em estudo, tendo sido os adultos incluídos apenas para efeitos de comparação da frequência de mutações, as próximas descrições estarão restritas ao grupo das crianças com tumor FFPE com dados clínicos disponíveis para as análises estatísticas.

Tabela 5.1: Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes estudados

Paciente	Sexo/Id	Topografia	Material	WBC	Plaq	Hemog	LDH	EC	MO	SNC	Protocolo	Desfecho	Tempo para desfecho (meses)
P1	M/3	Linfonodos (CFP)	FFPE	8770	364	12,4	2152	III	N	N	LNH-CR98	RCC-V	61
P2	M/5	Abdômen	FFPE	8590	491	9,4	563	II	N	N	BFM-95	RCC-V	152
P4	M/5	Trato gastrointestinal	FFPE	7820	291	12,5	447	III	N	N	ND	RCC-V	126
P5	M/4	Linfonodos intra-abdominais	FFPE	11790	428	11,8	1431	III	N	N	LNH INCA	RCC-V	66
P6	M/8	CFP (Gengiva)	FFPE	12600	566	12,2	443	III	N	N	LNH 2000	RCC-V	121
P9	M/11	Abdômen (íleo)	FFPE	7020	315	13,3	385	IV	+	N	LNH	RCC-V	118
P10	F/13	Abdômen (ovário)	FFPE	4000	142	8,3	586	III	ND	N	LMB 89	RCC-V	90
P11	M/3	Abdômen (íleo)	FFPE	11000	198	13,5	723	II	N	N	ND	RCC-V	65
P13	M/11	Abdômen (íleo)	FFPE	ND	ND	ND	ND	II	N	N	LNH 2000	RCC-V	66
P14	M/11	Linfonodos intra-abdominais	FFPE	6360	603	10,6	1120	II	N	N	LNH-CR98	RCC-V	96
P16	F/10	Linfonodos (CFP)	FFPE	10800	383	10,4	575	III	N	N	LNH-CR98	RCC-V	76
P17	F/4	Abdômen	FFPE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	ND	ND	ND
P18	M/14	Linfonodos intra-abdominais	FFPE	10300	447	11	773	III	N	N	LMB 89	RCC-V	38
P19	M/9	Abdômen (íleo)	FFPE	6350	419	10,2	396	II	N	N	LNH-CR98	RCC-V	75
P20	M/6	CFP (orofaringe)	FFPE	ND	ND	ND	ND	II	N	N	LMB 89	RCC-V	5
P21	M/10	Abdômen (cólon)	FFPE	14600	278	10,8	303	ND	N	N	BFM-95	P-ND	ND
P22	M/8	MO	FFPE/aspirado	6100	ND	ND	2378	IV	+	N	BFM 95	Rec-O	5
P23	F/4	Intestino delgado	FFPE	4100	267	10,7	IND	III	N	N	LMB 89	RCC-V	85
P24	M/18	Trato gastrointestinal	FFPE	9660	463	13,8	2417	ND	N	N	LNH CR	RCC-V	64
P26	F/17	Linfonodos pélvicos	FFPE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	ND	ND	ND
P27	M/8	Linfonodos intra-abdominais	FFPE	5880	282	12,2	2029	ND	N	N	LNH-CR98	RCC-V	68
P28	M/5	Abdômen retroperitônio	FFPE	5950	324	6,5	1110	ND	N	N	LHN-CR98	RCC-O	7
P29	M/21	Linfonodos (pélvicos)	FFPE	9430	198	12,1	583	I	N	N	LNH CR98	RCC-V	63
P30	F/4	Linfonodos (CFP)	FFPE	7180	409	10,8	1635	III	N	N	LNH-CR98	O	3
P31	M/12	Trato gastrointestinal	FFPE	9260	338	10,5	ND	III	N	N	LNH-CR98	RCC-V	38
P32	F/6	Trato gastrointestinal	FFPE	6480	309	8,8	444	II	N	N	LNH-CR98	RCC-V	60
P33	F/5	Abdômen (íleo)	FFPE	5170	494	9,5	372	II	N	N	LNH-CR98	RCC-V	110
P34	M/15	Linfonodos intra-abdominais	FFPE	10500	428	11,4	6136	III	ND	N	ND	Prog-O	0
P35	F/IND	Abdômen (ceco)	FFPE	4760	474	12,1	ND	ND	ND	N	ND	ND	ND
P36	M/15	Linfonodos (pélvicos)	FFPE	6830	322	10,5	1573	III	N	N	LHN-CR98	RCC-V	66
P37	F/7	Linfonodos intra-abdominais	FFPE	ND	ND	ND	ND	IND	N	N	ND	ND	ND
P38	M/5	Linfonodos intra-abdominais	FFPE	11200	715	8,9	2472	ND	N	N	LNH-CR98	RCC-V	60
P40	M/4	Trato gastrointestinal	FFPE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	ND	ND	ND
P43	F/IND	Linfonodos (inguinais)	FFPE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	ND	ND	ND
P45	M/13	Linfonodos intra-abdominais	FFPE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	ND	ND	ND
P50	M/8	Abdômen (jejuno, peritônio)	FFPE	23080	570	11,7	1098	IV	+	N	LNH-CR98	RCC-V	42
P51	F/15	Trato gastrointestinal	FFPE	8340	324	11,2	508	II	N	N	LNH-CR98	RCC-V	61
P52	M/6	Abdômen (ceco)	FFPE	9400	442	11,5	637	II	ND	N	LNH BFM	RCC-V	60
P53	M/8	Linfonodos intra-abdominais	FFPE	10790	252	10,7	462	ND	N	N	LNH-CR98	RCC-V	78
P56	M/12	CFP (seios da face)	FFPE	4300	175	14,4	170	II	N	N	LNH-BFM	RCC-V	34
P57	F/5	Linfonodos intra-abdominais	FFPE	9400	568	11	IND	III	N	N	BFM-94	RCC-V	48

P59	M/8	Trato gastrointestinal	FFPE	12100	450	10,3	1759	IV	+	N	LNH-CR98	RCC-V	68
P60	M/4	Abdômen (jejuno)	FFPE	11200	303	13,4	531	I	ND	N	LNH 95	RCC-V	71
P62	F/9	Abdômen	FFPE	3300	450	10,5	496	III	N	N	LNH 2012	RCC-V	44
P63	M/17	CFP	FFPE	10810	253	11,6	218	III	N	N	LNH 2012	RCC-V	39
P64	M/7	Abdômen	FFPE	6450	336	10,5	730	III	N	N	LNH 2012	RCC-V	93
P65	M/7	Abdômen (íleo)	FFPE	840	593	8,9	184	III	N	N	LNH 2012	RCC-V	95
P66	M/2	Abdômen (retroperitônio)	FFPE	13590	139	11,8	357	III	N	N	LNH 2012	RCC-V	98
P68	M/3	CFP (gengiva)	FFPE	12550	305	12,3	1413	IV	N	+	BFM 2004	RCC-V	63
P69	M/5	CFP (nasofaringe)	FFPE	11980	344	12,5	590	IV	N	+	BFM 2004	Rec-O	10
P70	M/10	BCFP (boca)	FFPE	7000	542	8,2	4555	III	N	N	BFM 2004	RCC-V	47
P71	M/4	Abdômen (ceco)	FFPE	12110	557	11,1	2618	III	N	N	BFM 2004	RCC-V	53
P72	F/4	Abdômen (estômago) e CFP	FFPE	16480	605	9,9	1160	IV	+	N	BFM 2004	RCC-V	40
P73	F/17	Trato gastrointestinal	FFPE	9890	326	10,5	2831	III	N	N	BFM 2004	RCC-V	34
P75	M/5	Abdômen	FFPE	9730	441	7,7	330	II	N	N	BFM 2004	RCC-V	35
P76	M/13	Linfonodos (axila)	FFPE	9000	287	12,5	ND	I	N	N	BFM-95	Rec-Prog-O	20
P77	F/6	CFP (encéfalo)	FFPE	6570	425	8,2	543	IV	N	+	BFM 2004	Rec-Prog-O	6
P79	M/5	Abdômen (fígado e jejuno)	FFPE	11000	473	10,6	ND	ND	N	N	LNH-BFM	RCC-V	30
P80	M/15	Abdômen	FFPE	13200	831	8,8	3496	III	N	N	BFM 2004	Rec-Prog-O	10
P81	F/23	Abdômen (Ovário)	FFPE	4010	281	8,8	1600	III	N	N	LNH	V	56
P82	M/23	Linfonodos (CFP)	FFPE	4970	321	13,9	ND	III	N	N	LNH-CR	ND	ND
P83	M/38	CFP	FFPE	8190	321	15,1	759	I	N	N	LNH-CR	O	1
P84	M/23	Abdômen (Colon)	FFPE	7639	317	13,8	428	ND	N	N	R-CODOX-M	V	61
P85	F/22	Abdômen (Ovário)	FFPE	7670	340	12	ND	ND	N	ND	RCODOX-M	V	61
P86	M/47	Abdômen (Retroperitônio)	FFPE	9770	533	10,6	3327	IV	+	ND	R-CODOX-M	O	0
P87	M/22	ND	FFPE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P88	F/61	Trato gastrointestinal	FFPE	5640	218	13,1	322	ND	N	ND	ND	V	57
P89	F/39	Mama/Estômago, Soe	FFPE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P90	M/52	Linfonodos (axila)	FFPE	11180	325	10,8	5357	IV	+	ND	R-CHOP	V	47
P91	F/43	Tórax	FFPE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P92	M/60	Linfonodos (axila)	FFPE	4530	334	11,2	1878	ND	N	ND	ND	O	8
P93	F/46	CFP	FFPE	7090	170	9,7	681	IV	+	ND	R-CODOX-M	O	4
P94	F/74	Linfonodos (axila)	FFPE	7430	230	11	276	III	N	ND	R-CHOP	V	43
P95	F/69	Abdômen (estômago)	FFPE	9780	318	11,3	837	IV	+	ND	R-CODOX-M	O	1
P96	F/51	Pele (Axila)	FFPE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P97	F/35	Pele	FFPE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P98	M/10	MO	Aspirado	ND	ND	ND	ND	LLAL3	+	ND	ND	O	ND
P99	M/2	MO	Aspirado	4520	446	10,8	343	IV	+	ND	ND	V	ND
P100	M/18	MO	Aspirado	1.000	72	9,4	419	LLAL3	+	ND	ND	O	ND
P101	M/17	MO	Aspirado	17020	39	7,4	402	LLAL3	+	ND	ND	V	ND
P102	F/5	MO	Aspirado	ND	ND	ND	ND	LLAL3	+	ND	ND	O	ND
P103	M/12	MO	Aspirado	5870	ND	8,9	ND	LLAL3	+	ND	ND	V	ND

P: Paciente; S/Id: Sexo e idade (anos); EC, Estadiamento clínico (St. Jude); LDH: lactato-deshidrogenase, valores de referência: 240-480 U/l; N: negativo; +: positivo; ND: não disponível; CFP: cabeça, face e pescoço; MO: infiltração da medula óssea; RCC: Remissão clínica completa; Rec: recaída; Prog: progressão da doença; V: vivo; O: Óbito

Tabela 5.2: Características clínicas da coorte (tumor FFPE) estudada

Características		Crianças (%)# N=59	Adultos (%)# N=17
Sexo	Masculino	42 (71)	7 (41)
	Feminino	17 (29)	10 (59)
Idade	Min- Max	2 – 21	22 - 74
	Mediana	8	43
	Media	9	43
	ND (N)	2	
Contagem leucocitária (uL)	Min - Max	840 - 23.080	4010 – 11.180
	Mediana	9.545	7.535
	Media	9.363	7.326
	ND (N)	8	5
Contagem plaquetária (k/uL)	Min - Max	139 – 831	170 - 533
	Mediana	396	318
	Média	399	305
	ND (N)	9	5
Hemoglobina (g/dL)	Min, Max	6,5 - 14,4	8,8 - 15,1
	Mediana	10,8	11,1
	Média	10,8	11,5
	ND (N)	9	5
LDH (U/l)	Min, Max	170 - 6136	276 - 5357
	Mediana	614	798
	Média	1213	1547
	<500U/L	14 (31)	3 (30)
	500-1000U/L	12 (27)	3 (30)
	>1000 U/L	19 (42)	4 (40)
	ND (N)	14	7
Envolvimento MO	Sim	5 (10)	4 (40)
	Não	44 (90)	6 (60)
	ND	10	7
Envolvimento SNC	Sim	3 (5)	
	Não	56 (95)	17
Estadiamento	I	3 (6)	1 (17)
	II	12 (27)	
	III	22 (49)	3 (50)
	IV	8 (18)	2 (33)
	Não Informado	14	11
HIV	Pos	0 (0,0%)	6 (50%)
	Neg	59 (100%)	6 (50%)
	ND (N)		5
EBV	Pos	26 (50)	12 (71)
	Neg	26 (50)	5 (29)
	ND (N)	7	0
Óbito	Sim	8 (16)	5 (45)
	Não	43 (84)	6 (55)
	ND (N)	8	6

ND, informação não disponível. #As porcentagens foram calculadas de acordo com o número de pacientes com a informação disponível

No grupo de tumores pediátricos FFPE, a mediana das idades foi de 8 anos (faixa, 2 a 21 anos). A razão de sexos (M:F) foi de 2,4:1 (42M:17F). Com relação aos 7 pacientes cujo estudo foi realizado em células da MO, 6 foram diagnosticados com LLA-L3, exceto um paciente (P99), cujo tumor inicial foi LB na hemiface com infiltração na MO (EC IV). A mediana de idade desse grupo foi de 10 anos com idades mínima e máxima de 2 e 18 anos, respectivamente e a razão dos sexos 6:1 (6M:1F).

O sítio mais frequentemente envolvido foi o abdômen (54%), sendo desses, 53% representados por tumores no trato intestinal e 47% com acometimento não intestinal, envolvendo o retroperitônio, ovário, fígado, estômago e outros. Um paciente apresentou mais de um sítio de acometimento, a saber, estômago e cabeça, face e pescoço. O envolvimento extranodal primário de cabeça, face e pescoço foi observado em 8 pacientes (13,5%). A apresentação nodal da doença foi observada em 29% dos pacientes, incluindo linfonodos intra-abdominais (N= 12), linfonodos de cabeça, face e pescoço (N= 3), linfonodos inguinais (N= 1) e axilares (N= 1). A medula óssea foi o sítio primário de doença em 1 paciente (P22). Em 5 pacientes foi observado envolvimento da MO (10%) e o SNC estava acometido em 3 pacientes (5%).

Grande parte da coorte apresentou doença em estágio avançado, e de acordo com o sistema de estadiamento de Murphy, 67% dos pacientes tinham doença em estágio III/IV e 33% o estadiamento foi I/II, em 45 pacientes crianças e adolescentes para os quais foi possível obter a informação.

Com relação aos níveis séricos de LDH ao diagnóstico, foi possível avaliar 45 casos, cujos níveis variaram de 170 a 6.136 U/l. Em 14 casos (31%), o LDH ocupou a faixa de normalidade, e 31 pacientes (69%) apresentaram níveis elevados de LDH. Aproximadamente metade (48%) da coorte pediátrica teve a infecção pelo vírus EBV detectada e, com relação ao vírus HIV, não houve nenhum paciente com essa condição.

Foi possível obter dados de desfecho clínico para 51 pacientes com LB pediátrico. Em 5 pacientes (P4, P14, P52, P60, P80), a massa tumoral foi ressecada antes de serem admitidos para o início do tratamento nas suas instituições de origem. Na nossa coorte, 43 pacientes (84%) atingiram a remissão clínica completa após o tratamento e 8 pacientes (16%) tiveram um desfecho clínico desfavorável, indo a óbito, dentre os quais 6 recaíram e não responderam a terapia de resgate, com progressão de doença e 1 não respondeu ao tratamento, caracterizando a progressão da doença.

5.2 Detecção do rearranjo do *MYC* e de anormalidades cromossômicas secundárias

5.2.1 Caracterização por citogenética convencional e molecular de alterações secundárias observadas na medula óssea

Os resultados detalhados das análises citogenéticas estão dispostos na tabela 5.3. Através da técnica de bandeamento G e FISH, a translocação t(8;14)(q24;q32) foi encontrada em 4 pacientes (P98-100, P102) (Fig. 5.1A), a translocação variante t(2;8)(p12;q24) em um (P101) (Fig.5.1B), um paciente apresentou uma adição no cromossomo 14 (Fig. 5.1C) e nenhum rearranjo de *MYC* por FISH (P102) e, em um paciente foi observado um cromossomo marcador inicialmente considerado um isocromossomo de 8 com três cópias do gene *MYC* (Fig. 5.1D).

Tabela 5.3: Características citogenéticas (bandeamento G) e cito-moleculares do grupo de pacientes com MO analisada

Paciente	Bandeamento G	FISH	MCB
P22	46,XY,i(8)(q10)	<i>IGH/MYC</i> -/3 sinais <i>MYC</i>	46,XY,t(8;8)(pter->q21::p22->qter)
P98	46,XY,t(8;14)(q24;q32),?add(11q)	<i>IGH/MYC</i> +	46,XY,t(8;14)(q24;q32),der(11)t(1;11)(q21;q23)
P99	46,XY,t(8;14)(q24;q32)	<i>IGH/MYC</i> +	ND
P100	47,XY,t(8;14)(q24;q32),+mar	<i>IGH/MYC</i> +	ND
P101	46,XY,t(2;8)(p12;q24),add(13?q)	<i>MYC</i> +	46,XY,t(2;8)(p12;q24), der(13)(13pter->13q34::13q21->13q32::7q21->7qter)
P102	46,XX,t(8;14)(q24;q32)	<i>IGH/MYC</i> +	ND
P103	46,XY,dup(1?q),add(14)(q32)	<i>IGH/MYC</i> -	46,XY,dup(1)(q21.2q32.1),t(8;14)(q24;q32)

I: isocromossomo; q: braço longo do cromossomo; add: adição; mar: marcador; p: braço curto do cromossomo; +: positivo; -: negativo

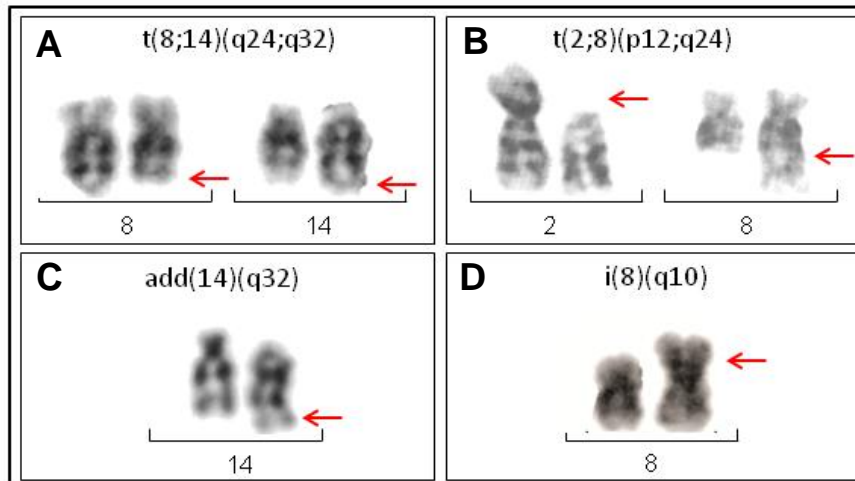


Figura 5.1: Cariótipos parciais mostrando as principais alterações encontradas na MO dos pacientes: A) Translocação $t(8;14)(q24;q32)$, encontrada nos pacientes P98, P99, P100 e P102. As setas vermelhas indicam os pontos de quebra nos cromossomos envolvidos na translocação; B) $t(2;8)(p12;q24)$, observada do P101. As setas vermelhas indicam os pontos de quebra nos cromossomos envolvidos na translocação; C) Adição observada no cromossomo 14, $add(14)(q32)$. A seta vermelha indica o ponto de quebra da adição no cromossomo 14; D) Isocromossomo 8, $i(8)(q10)$ do P22. A seta vermelha indica o braço longo (q) inteiro do cromossomo 8 duplicado a partir do centrômero.

5.2.2 Avaliação de anormalidades cromossômicas secundárias nas amostras de MO dos pacientes com LLA-L3

Em 4/7 (57%) dos pacientes com aspirado de MO (P98, P100, P101 e P103), foram identificadas anormalidades cromossômicas secundárias, que envolveram os cromossomos 1, 11, 13, além de um cromossomo marcador. Além disso, em um paciente (P22), foram observadas 3 cópias do oncogene *MYC*, sem a presença da sua translocação. Estas anormalidades cromossômicas, por necessitarem de ferramentas mais sensíveis para ser precisamente caracterizadas, foram estudadas por FISH multicolorido. O paciente P100 não pôde ser estudado por técnicas moleculares por indisponibilidade de material cromossômico.

No paciente P98, foi identificado um derivado do cromossomo 11, secundário a $t(8;14)(q24;q32)$, como mostrado no cariótipo $46,XY,t(8;14)(q24;q32),?add(11q)$ (Fig. 5.2A). A análise por citogenética molecular utilizando as sondas WCP para os cromossomos 1, 8, 11, 14 indicou que a porção cromossômica “extra” no cromossomo 11 poderia ser proveniente do cromossomo 1 (Fig. 5.2B), de modo que foi aplicada uma sonda de pintura cromossômica para esse cromossomo, confirmando essa suposição

(Fig 5.2C). O bandeamento multicolorido com sonda MCB1 confirmou esse achado e sugeriu o ponto de quebra do cromossomo 1 envolvido na anormalidade cromossômica (Fig 5.3A-F). Estudos subsequentes utilizando sondas de regiões menores, um mix de sondas para o cromossomo 1 (Submix1) e sondas lócus específicas possibilitaram definir precisamente o cariótipo do paciente, indicando seus pontos de quebra (Fig. 5.4A-D), de modo que o cariótipo final do paciente ficou caracterizado como 46,XY, t(8;14)(q24;q32),der(11)t(1;11)(q21;q23). Uma vez que, além do cromossomo 11 derivado, também foi observado uma par de cromossomos 1 normal, ficou caracterizado que esta translocação resultou em uma trissomia parcial do cromossomo 1.

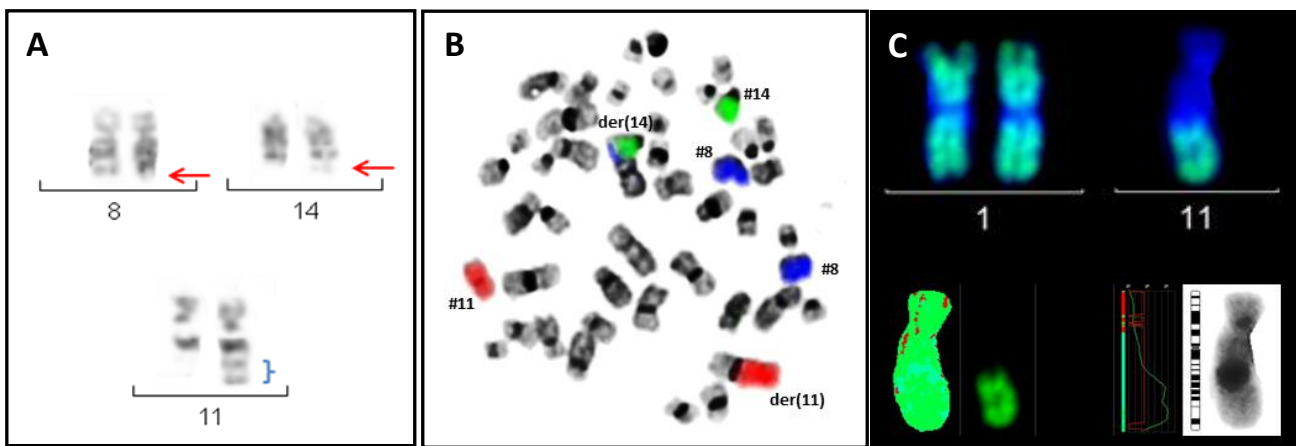


Figura 5.2: Caracterização cromossômica do P98 através de bandeamento G e FISH: A) Cariótipo parcial do paciente P98, ilustrando a adição no cromossomo 11 (chave azul) além da t(8;14)(q24;q32), indicada pelas setas vermelhas; B) FISH utilizando as pinturas cromossômicas WCP8 em azul, WCP11 em vermelho e WCP14 em verde ilustrando a t(8;14) e um derivativo do cromossomo 11 – der(11); C) Sonda WCP1 confirmou o envolvimento do cromossomo 1 na anormalidade cromossômica, através de uma t(1;11).

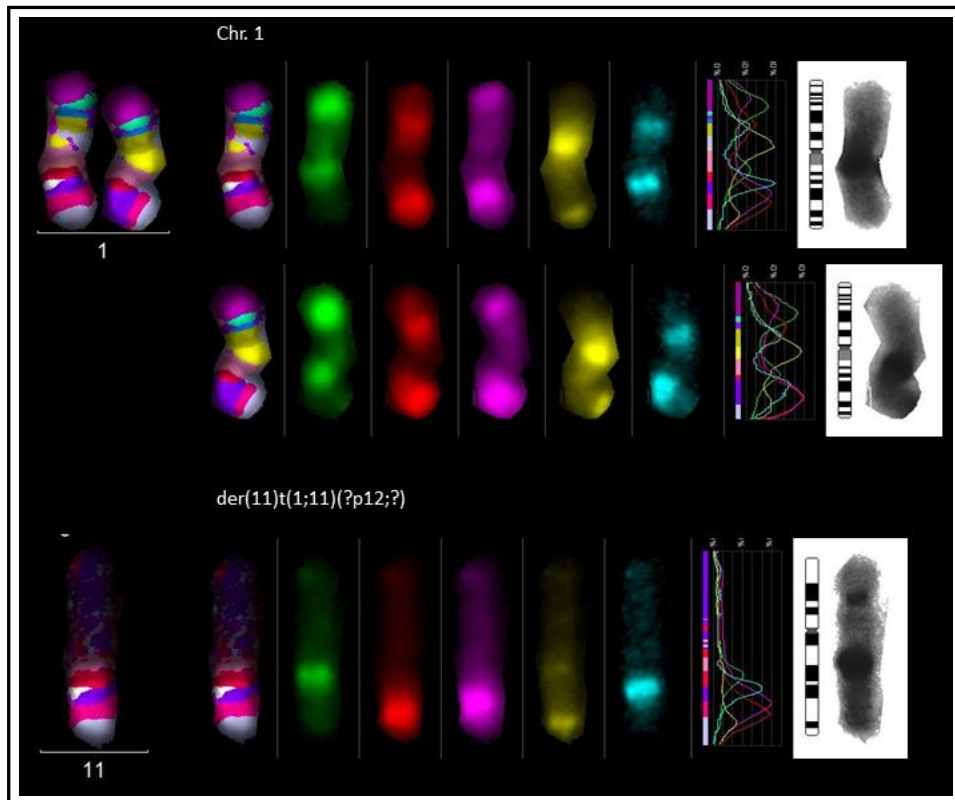


Figura 5.3: Caracterização da anormalidade envolvendo o cromossomo 11: A aplicação da sonda MCB1 confirmou que o cromossomo der(11) tinha uma porção do cromossomo 1 e sugeriu o ponto de quebra da trissomia parcial do cromossomo 1 no derivativo 11 como 1q21.

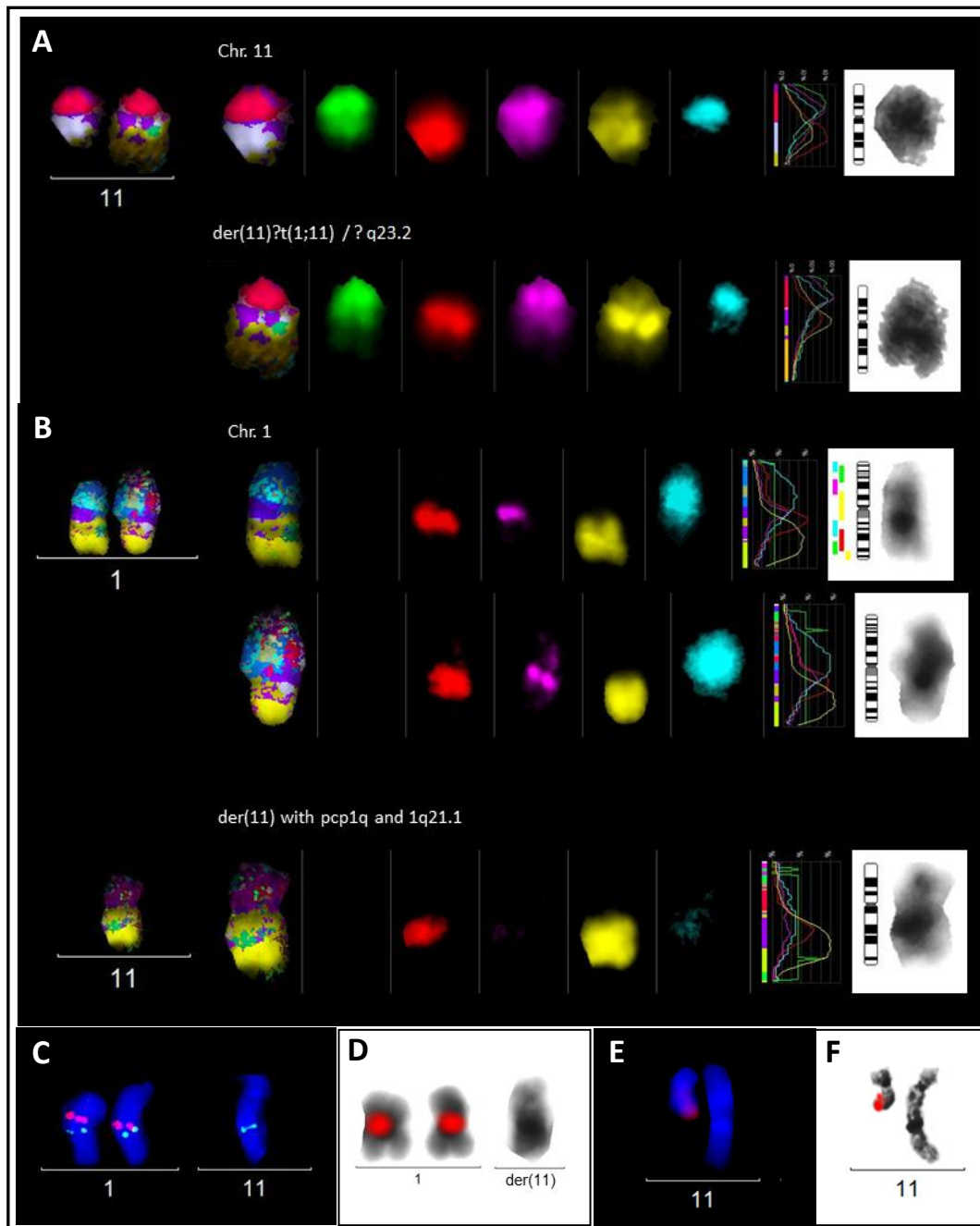


Figura 5.4: Refinamento dos pontos de quebra do cariótipo do P98: A) MCB11 ilustrando um cromossomo 11 normal e o der(11). O MCB sugeriu que o der(11) perdeu sua porção terminal a partir da banda 11q23->qter; B) mFISH submix1 com as sondas PCP1p (azul), PCP1q (amarelo), RP11-130 B18 - 1q12 (rosa), RP11-35 B4 - 1q21.1 (vermelho) mostrando que o der(11) possui várias porções do cromossomo 1; C) Sonda *locus* específica LSI MCL1/1p12 mostrando a presença deste gene (*MCL1*) no der(11); D) Sonda centromérica do 1 (vermelho) mostrando que o der(11) não carrega o centrômero do 1; E-F) BACs RP11-567 M27 da região 11q24.3 (esquerda) e RP11-356 E17 da região 11q23.3 (direita), respectivamente, ambos em vermelho, provando o ponto de quebra sugerido pelo MCB.

Com relação ao paciente P101, no cariótipo por bandeamento G, 46,XY,t(2;8)(p12;q24),add(13?q), foi detectada a presença de uma anormalidade cromossômica secundária envolvendo o cromossomo 13, associada a t(2;8)(p12;q24) (Fig. 5.5). O rearranjo do *MYC* neste paciente foi confirmado através de FISH com sondas comercial e caseira para detectar esse rearranjo (Fig. 5.6) e por meio de pinturas cromossômicas totais e sondas de MCB para os cromossomos 2 e 8 (Fig. 5.7A e B). A investigação da origem da porção “extra” no cromossomo 13 foi feita através de FISH com sondas de pintura cromossômica, onde foi revelado que existia uma porção extra do cromossomo 7 envolvida na anormalidade cromossômica secundária, além das duas cópias normais do cromossomo 7 (Fig. 5.7C e D). A aplicação sondas de bandeamento multicolorido e sondas pontuais de BACs, nesse paciente, possibilitou caracterizar o cariótipo final como 46,XY,t(2;8)(p12;q24), der(13)(13pter->13q34::13q21->13q32::7q21->7qter) (Fig. 5.8 e Fig. 5.9), fornecendo a informação sobre o ponto de quebra exato da duplicação do cromossomo 13, mas, além disso, também identificou uma trissomia parcial do cromossomo 7, localizada no cromossomo derivativo 13, enfatizando a natureza complexa deste cariótipo, onde o cromossomo derivativo foi produto de 2 anormalidades cromossômicas diferentes.

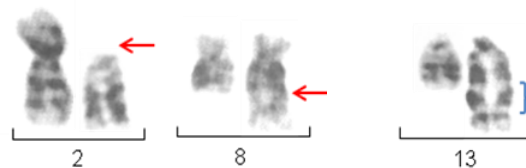


Figura 5.5: Cariótipo parcial do paciente P101: As setas vermelhas indicam a t(2;8)(p12;q24), acompanhada de uma anormalidade envolvendo o cromossomo 13 (chave azul).

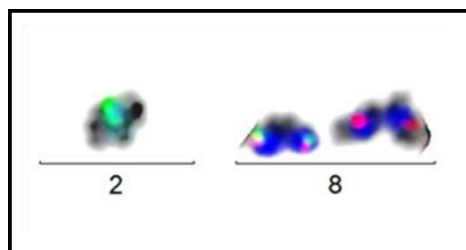


Figura 5.6: Confirmação do rearranjo do *MYC* no P101 através de FISH: Aplicação da sonda LSI *MYC break apart* com PCP8q em azul confirmou o rearranjo do gene *MYC*, no cromossomo 2, resultante da t(2;8).

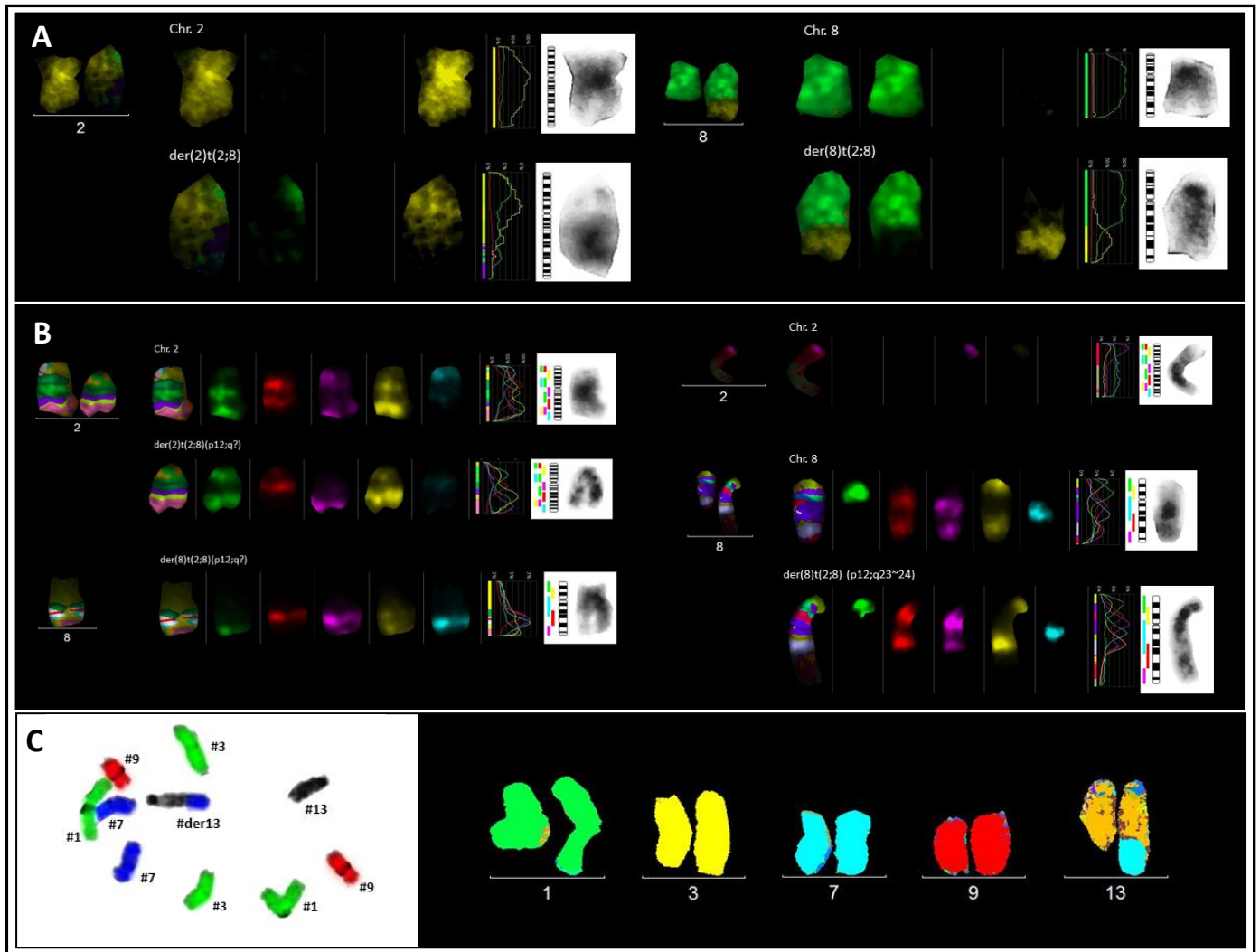


Figura 5.7: Investigação da origem da anormalidade secundária envolvendo o cromossomo 13 no P101: A) Aplicação das sondas WCP2 em amarelo e WCP8 em verde confirmou a $t(2;8)$; B) MCB2 e MCB8 confirmou a $t(2;8)(p12;q24)$; C) Pinturas cromossômicas para os cromossomos 1 (verde), 3 (amarelo), 7 (azul) e 9 (vermelho) caracterizou que o der(13) possuía uma porção do cromossomo 7.

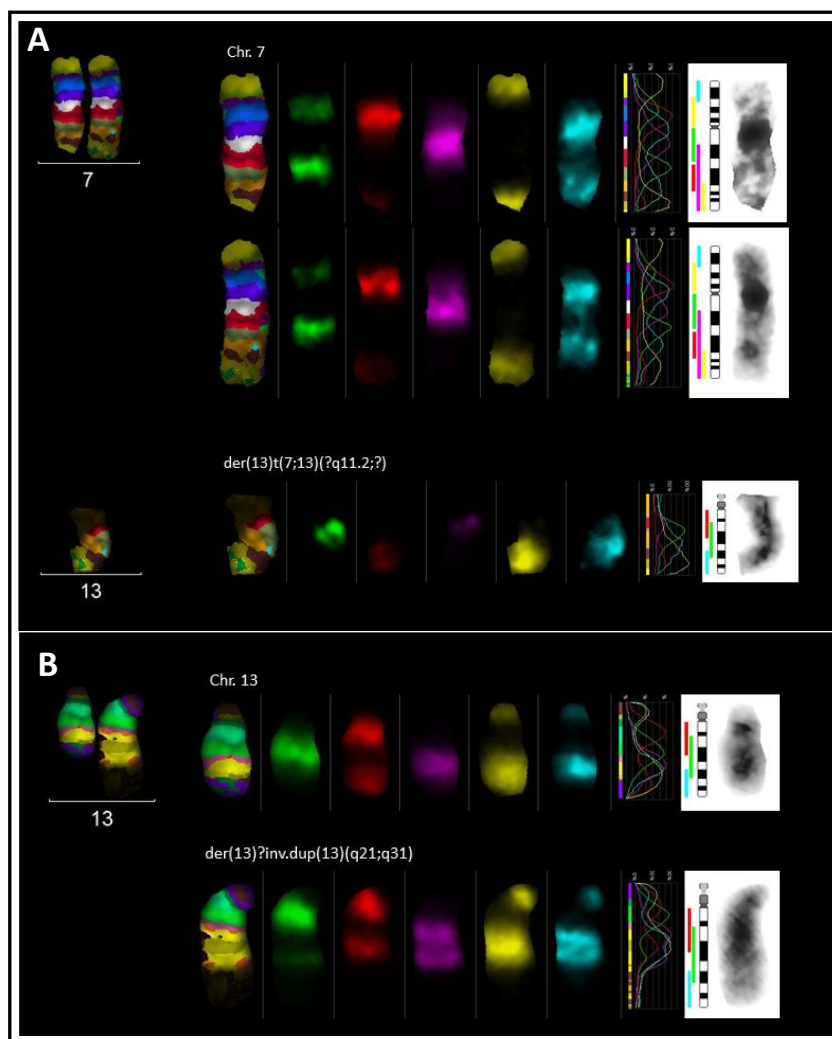


Figura 5.8: Refinamento dos pontos de quebra do cromossomo 13 envolvido na anormalidade cromossômica secundária no P101: A) MCB7 mostrando a presença de um par de cromossomos 7 normais não envolvidos na alteração e caracterizando uma trissomia parcial do cromossomo 7 no cromossomo derivativo 13; B) MCB13 caracterizando uma duplicação no cromossomo 13 e sugerindo o ponto de quebra $\text{dup}(13)(?q21;?q32)$.

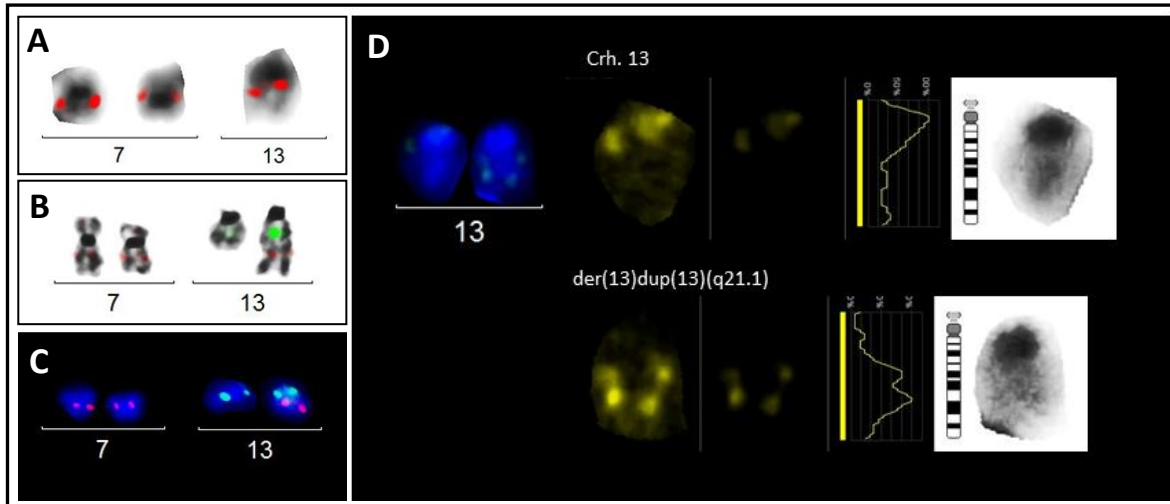


Figura 5.9: Refinamento dos pontos de quebra do cromossomo 7 envolvido na anormalidade cromossômica secundária no P101: Aplicação de BACs definiu o ponto de quebra nos cromossomos 7 e 13. A) RP11-313 n23 (7q21.2) em vermelho; B) RP11-380 G21 (7q21.3) em vermelho e RP11-520 F9 (13q21.31) em verde; C) RP11-90 N9 (7q21.11) em vermelho e RP11-538 C21 (13q21.1) em verde; D) RP11-98 F3 (13q21.1) em amarelo. A aplicação dos BACs possibilitou a caracterização dos pontos de quebra do der(13) como der(13)t(7;13)(13pter->13q34::13q21->13q32::7q21->7qter)

O cariótipo inicial por bandeamento G do paciente P103 foi caracterizado por uma adição de material cromossômico no cromossomo 14 e no cromossomo 1 (Fig. 5.10). O estudo por FISH utilizando sonda comercial para o rearranjo *IGH/MYC*, neste paciente, não mostrou o rearranjo, de modo que procurou-se caracterizar essa anormalidade envolvendo o cromossomo 14 através da aplicação de sondas caseiras, que possibilitaram detectar a t(8;14) (Fig. 5.11A). Através da aplicação de sondas *locus* específicas e de bandeamento multicolorido foi possível definir os pontos de quebra da duplicação do cromossomo 1, caracterizando o cariótipo final 46,XY,dup(1)(q21.2q32.1),t(8;14)(q24;q32) (Fig. 5.11B).

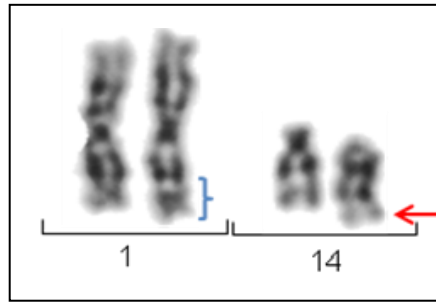


Figura 5.10: Cariótipo parcial do paciente P103 por bandeamento G: A chave azul indica a duplicação no cromossomo 1 e a adição no cromossomo 14 está indicada pela seta vermelha.

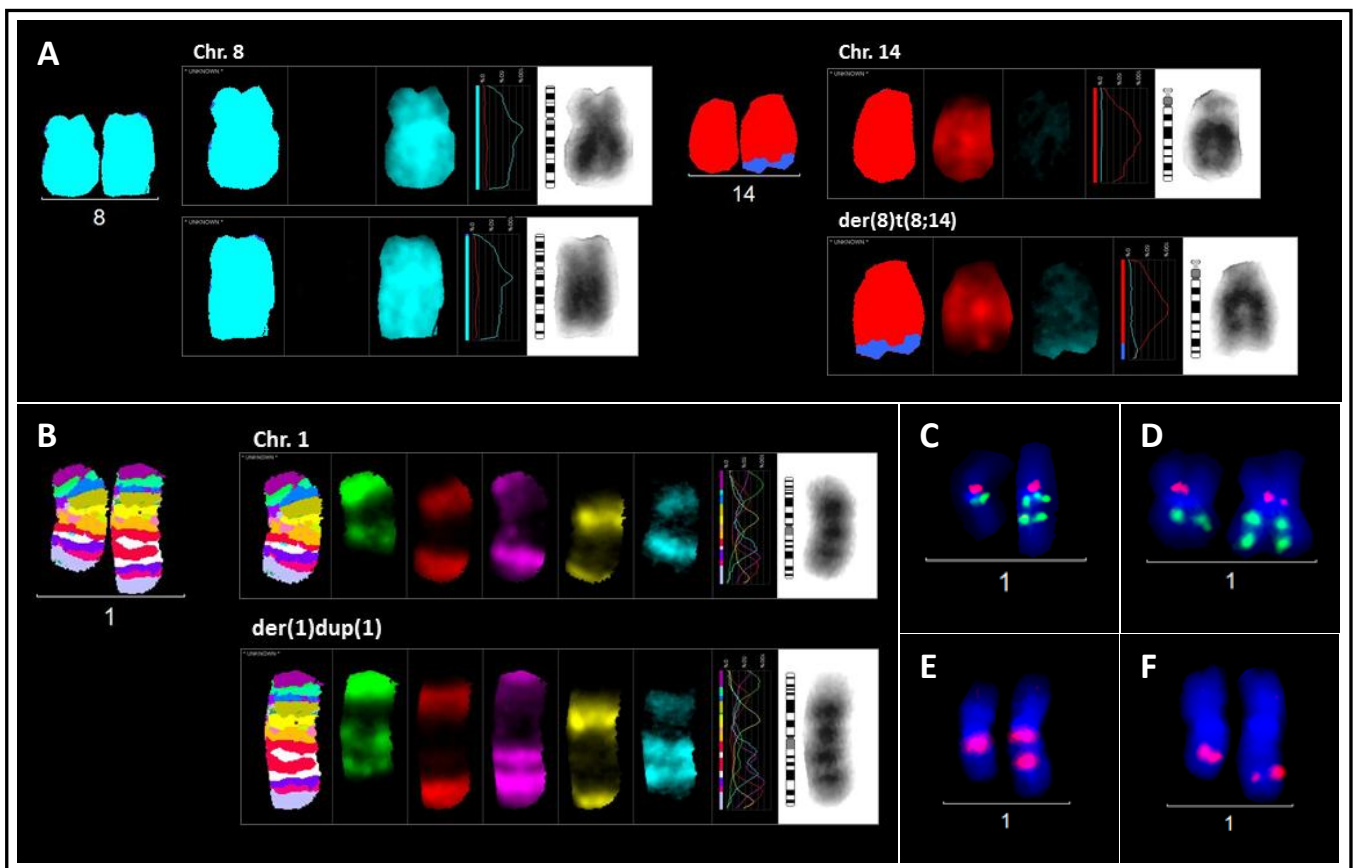


Figura 5.11: Refinamento das anormalidades cromossômicas do paciente P103: A) Aplicação das sondas WCP8 em azul e WCP14 em vermelho caracterizou a $t(8;14)$; B) MCB1 confirmou a duplicação do cromossomo 1, sugerindo o ponto de quebra $q22;q33$; C) Sonda comercial LSI MCL1/1p12 caracterizando um dos pontos de quebra da duplicação como $q21.2$; D) Sonda comercial LSI MDM4/1p12 caracterizando o outro ponto de quebra como $q32.1$; E) BAC RP11-301 M17 (1q21.2) em vermelho confirmando o ponto de quebra 1q21.2; F) BAC RP11-57 I17 (q32.2) em vermelho confirmando o ponto de quebra 1q32.

Finalmente, o paciente P22 foi um caso atípico, pois através do estudo por bandeamento G e FISH com sondas comerciais, seu cariótipo foi inicialmente sugerido como 46,XY,i(8)(q10) (Fig. 5.12A). Sua apresentação clínica e todos os aspectos morfológicos eram compatíveis com o diagnóstico de L/LB/LLA-L3, apesar do oncogene *MYC* não estar rearranjado com uma imunoglobulina, mas apresentar 3 cópias (Fig. 5.12B-C). Através de uma caracterização molecular mais precisa, com sondas de MCB para os cromossomos 8 e 11, sondas PCP para os braços longo e curto do cromossomo 8 e combinação de sondas *MYC break apart* com PCP8q, foi possível estabelecer uma translocação t(8;8), com uma trissomia parcial do cromossomo 8, além de um cromossomo 8 normal (Fig. 5.13), de forma que o cariótipo final ficou descrito como 46,XY,der(8)t(8;8)(qter->q21;p22->qter) (Fig. 5.14).

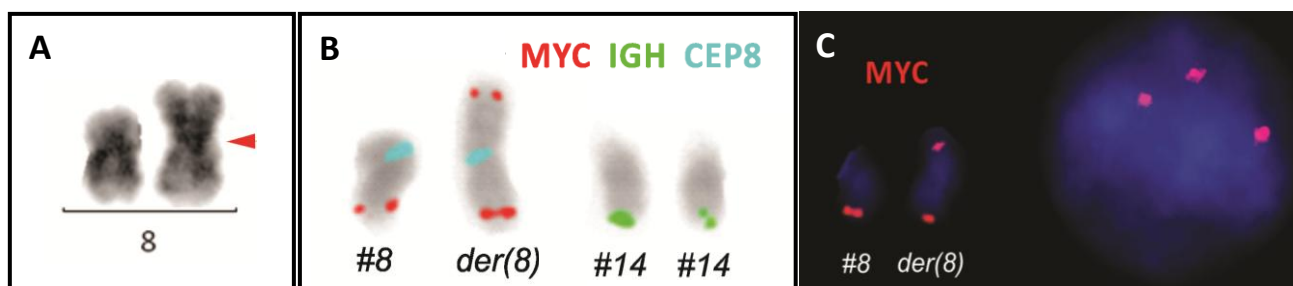


Figura 5.12: Caracterização inicial do paciente P22 por bandeamento G e FISH: A) Cariótipo parcial por bandeamento G mostrando o derivativo do cromossomo 8, apontado pela seta vermelha; B) Análise por FISH com a sonda IGH/*MYC*/CEP8 *Tri-Color Dual Fusion* mostrando a presença de 3 cópias do *MYC*, além de um cromossomo 8 e dois cromossomos 14 não rearranjados entre si; C) FISH com sonda LSI *MYC Spectrum Orange* mostrando o derivativo do cromossomo 8 com duas cópias de *MYC*, somando um total de 3 cópias por célula.

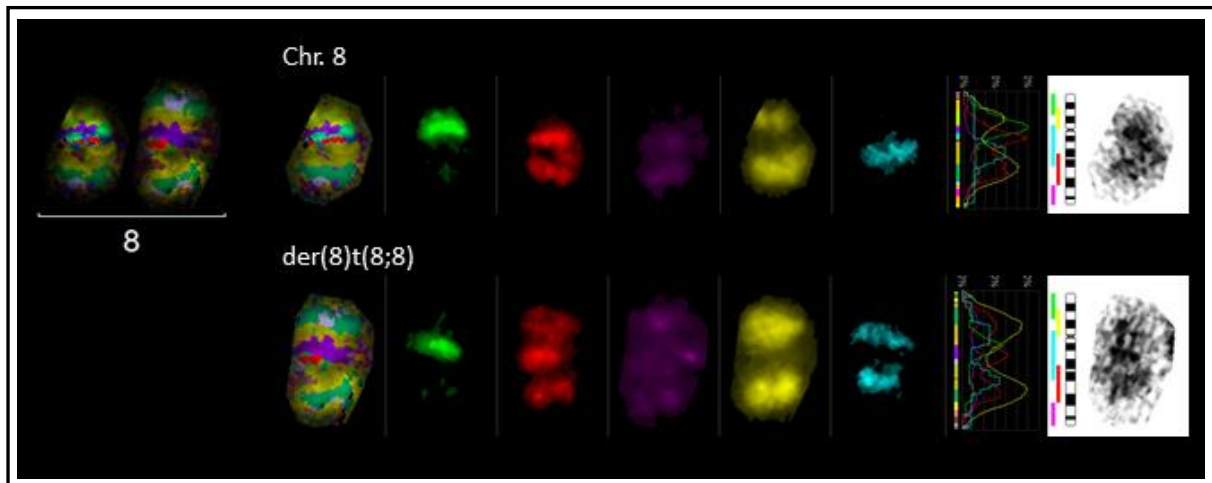


Figura 5.13: Investigação da origem do terceiro sinal do *MYC* no P22 através de bandeamento multicolorido: MCB para o cromossomo 8 caracterizou o cromossomo derivativo como resultado de uma $t(8;8)(qter \rightarrow q21::p22 \rightarrow qter)$.

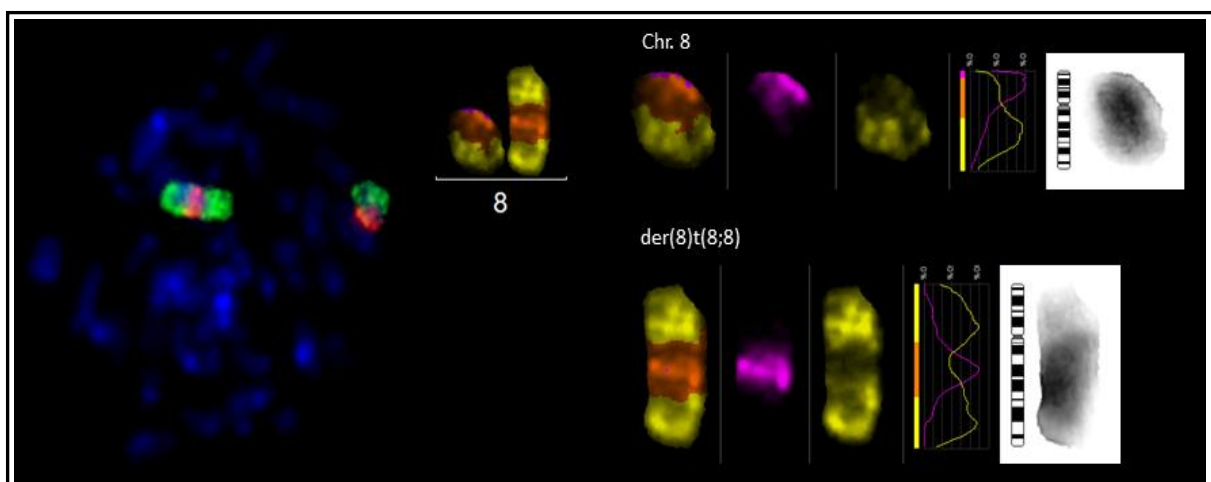


Figura 5.14: Confirmação dos achados do bandemaneto multicolorido utilizando pinturas cromossômicas: Sondas de pinturas cromossômicas PCP8p (rosa/vermelho) e PCP8q (verde/amarelo) confirmando a presença do braço curto no der(8) e uma trissomia parcial do 8.

Devido à importância e às peculiaridades desse caso, outros experimentos foram feitos a fim de provar o diagnóstico de leucemia de Burkitt/LLA-L3. Esses experimentos estão detalhados no capítulo 5 (seção 5.3) deste documento, e a compilação desses resultados foi transformada em um manuscrito publicado no periódico *Annals of Laboratory Medicine* (Anexo III).

5.2.3 Avaliação da frequência da *t(8;14)* e de anormalidades cromossômicas secundárias envolvendo o 1q e 13q em pacientes com tumores FFPE

De acordo com a disponibilidade e qualidade do material biológico, foi possível obter sucesso ao aplicar as sondas de FISH específicas para o rearranjo *IGH/MYC* e para as regiões cromossômicas 1q25 e 1q34 em 30 pacientes dos 59 pacientes com tumor FFPE da nossa coorte de LB pediátrico. O rearranjo *IGH/MYC* esteve presente em 23 pacientes (77%) (Fig. 5.15A-C) e ausente em 20% dos pacientes (N=6) (Fig. 5.15D-F) estudados por FISH. Em um paciente (P60) foi observado um sinal extra menor para a região 8q24, caracterizando o rearranjo do *MYC* (Fig. 5.16). Foi possível obter resultados de hibridização para as regiões 1q25 e 1q34 em 15 e 14 pacientes respectivamente, nos quais a região 1q25 apresentou uma cópia a mais em 12 pacientes (80%) (Fig. 5.17) e a região 13q34 apresentou um padrão de hibridização compatível com duplicação da região 13q34 somente em 3 pacientes (21%) (Fig. 5.18).

É importante ressaltar que por se tratar de material de parafina, visamos confirmar esses resultados através de técnicas moleculares mais sensíveis. Em vista disso, nós iniciamos experimentos de MLPA para confirmação desses achados, porém a qualidade da fixação das amostras não nos possibilitou reproduzir a técnica.

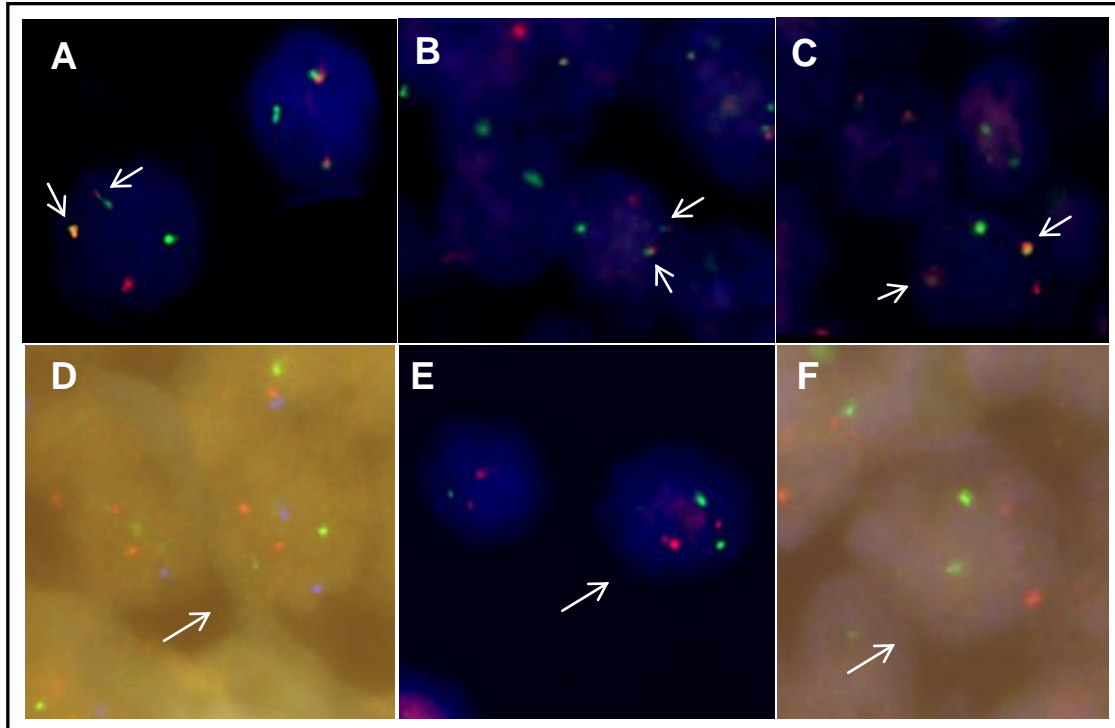


Figura 5.15: Avaliação e caracterização por FISH de pacientes com amostras de tumor FFPE, utilizando a sonda *IGH/MYC/CEP8*. A-C) Fusão *IGH/MYC*, e seu derivativo, indicados pelas setas brancas, caracterizando a $t(8;14)(q24;q32)$; D-F) As setas brancas indicam núcleos interfásicos com dois alelos normais dos genes *MYC* (sinal vermelho) e *IGH* (sinal verde), observados nos pacientes sem a $t(8;14)(q24;q32)$, em D, observa-se também o dois sinais azuis (*Aqua*) marcando os centrômeros do par cromossômico 8.

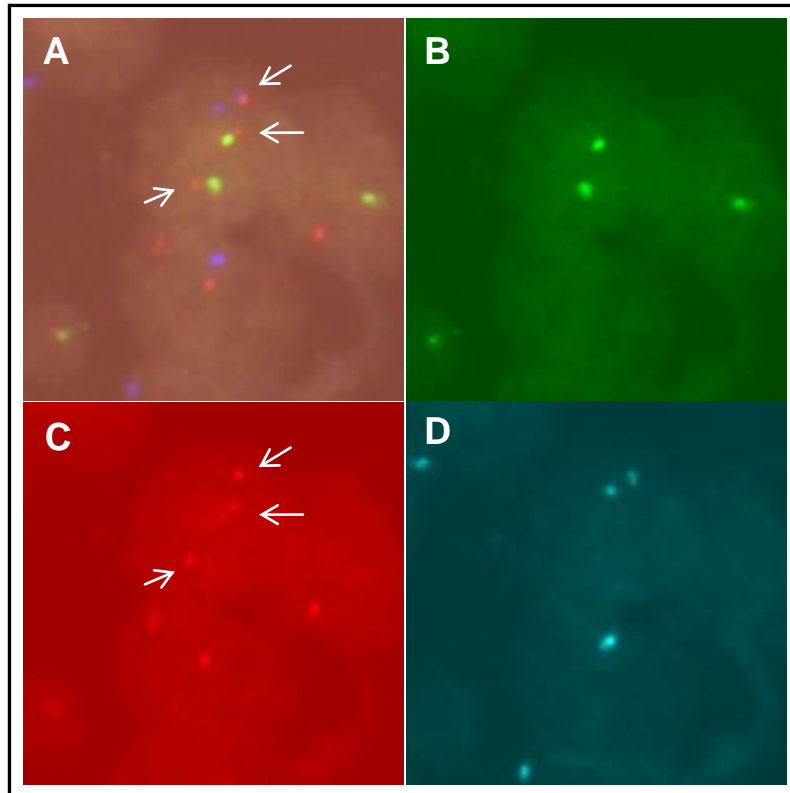


Figura 5.16: Avaliação e caracterização do paciente P60 por FISH com a sonda IGH/MYC/CEP8: A) Núcleo interfásico negativo para o rearranjo *IGH/MYC*, mas com 3 sinais para o *MYC* (indicados pelas setas brancas), mostrando uma possível quebra ou amplificação deste gene; B-D) Imagens separadas de cada fluorocromo, referente a imagem A, mostrando dois alelos normais do *IGH* (B), três sinais para o *MYC* (C) e dois centrômeros do cromossomo 8, caracterizando a presença de apenas dois cromossomos 8.

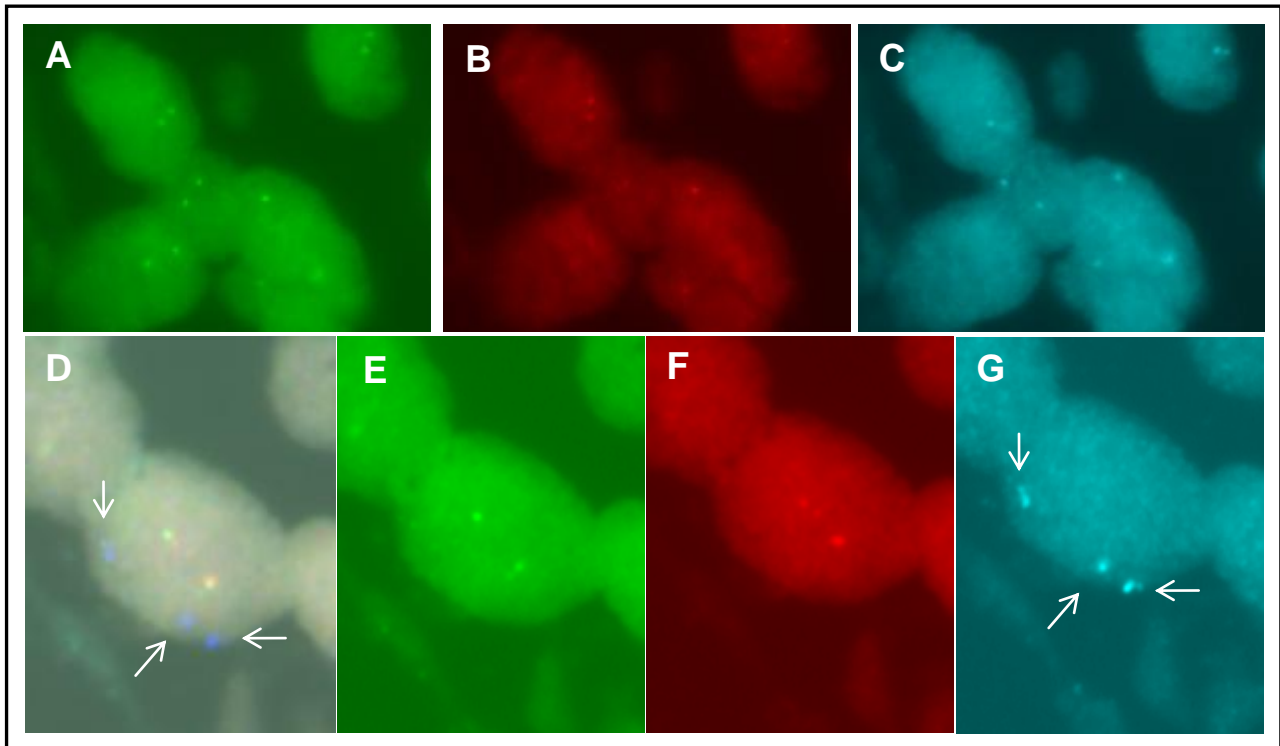


Figura 5.17: FISH com a sonda LSI p58/TelVysion1p/1q25: A-C) Imagem dos fluorocromos separados, em núcleos interfásicos, para cada região que a sonda identifica, ilustrando a região telomérica do cromossomo 1 (sinais verdes), e as regiões 1p36 (sinais vermelhos) e 1q25 (sinais azuis), respectivamente, característicos de um paciente sem a duplicação da região 1q25; D-F) Núcleo interfásico de uma paciente com a região 1q25 duplicada, caracterizada pela presença de 3 sinais azuis, em E e F, imagens dos fluorocromos separados, mostrando duas cópias das regiões telomérica (E) e da região 1p36 (F); G: Fluorocromo *aqua* (azul) aparece 3 vezes, caracterizando a duplicação da região 1q25.

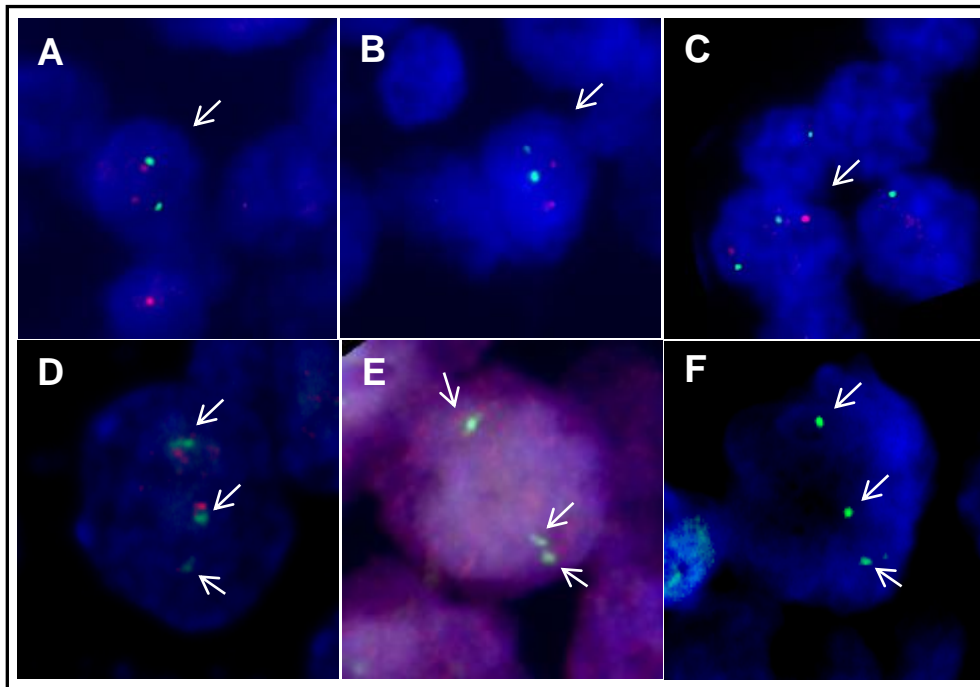


Figura 5.18: FISH com a sonda LSI D13s319/13q34: A-C) Núcleos interfásicos normais mostrando dois sinais de cada para cada região que a sonda individualiza, sinal vermelho (1q14.3) e sinal verde (1q34); D-F) Núcleos interfásicos com a região 1q34 duplicada, mostrando 3 sinais verdes em cada núcleo.

5.3 Estudo da expressão gênica e de microRNAs

Durante este estudo, nós identificamos um paciente com características clínico-patológicas de LB e ausência da t(8;14), e que possuía três cópias de *MYC* (P22). Com o intuito de testar a hipótese de que este paciente se trataria de um LB atípico sem *MYC* translocado, realizamos ensaios de expressão dos genes *MYC*, *CD10* e *BCL2* assim como dos miRNAs miR150, miR155, miRLet7a, miRLet7b, miRLet7e, miR21 e miR9*, que entre outros genes, compõem a assinatura molecular do L/LB.

Nesses ensaios, foi utilizada amostra de tumor FFPE do paciente em questão e, como controle, amostras de 4 pacientes com tumor FFPE de casos de L/LB (P62, P65, P65 e P66), nos quais a t(8;14) foi confirmada por FISH, além de três linhagens celulares derivadas de LB (Namalwa, Raji e Ramos), duas linhagens de linfoma difuso de grandes células (LDGCB) (Farage e Pfeiffer), três linfonodos de hiperplasia folicular reativa, e 2 aspirados de MO normais como controle, para comparar os níveis de expressão.

Em relação aos níveis de expressão de *MYC* e *BCL2* do paciente P22, foi possível observar que este apresentava níveis similares (FC \pm DP: *MYC*: 3,05 \pm 0,81;

BCL2: $0,01 \pm 0,00$) à média dos pacientes com LB (FC \pm DP: *MYC*: $7,45 \pm 3,42$; *BCL2*: $0,80 \pm 0,62$) (Fig. 5.19A-B). O nível de RNAm de *CD10* (FC \pm DP: $0,75 \pm 0,12$) diferiu da média dos níveis dos pacientes com LB (FC \pm DP: $2,54 \pm 0,88$) (Fig. 5.19C).

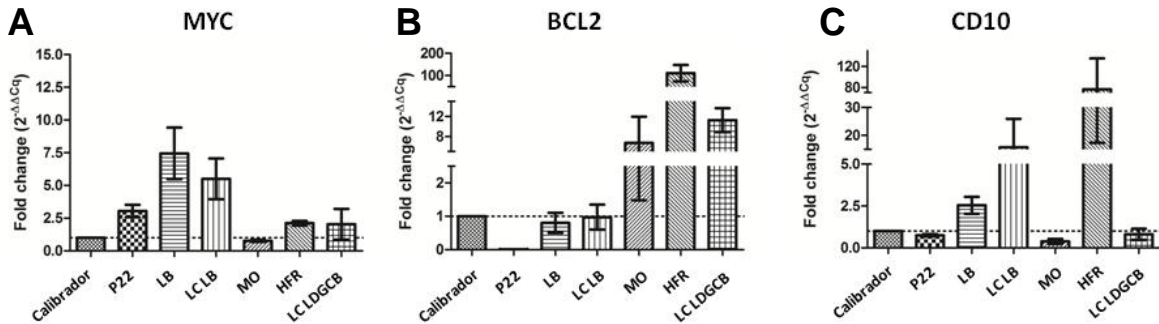


Figura 5.19: Distribuição da expressão gênica representada pela *Fold change* ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) obtida para *MYC* (A), *BCL2* (B) e *CD10* (C) para o paciente P22, e os valores médios dos casos controle (LB), 3 linhagens celulares derivadas de LB (LC LB; Namalwa, Raji e Ramos), 2 aspirados de MO normal (MO), 2 hiperplasias foliculares reativas (HFR) e 2 linhagens celulares derivadas de LDGCB (LC LDGCB; Farage e Pfeiffer). Para normalização foram usados como genes de referência *ACTB* e *GUSB* para a expressão de *MYC* e *ACTB* e *B2M* para o *BCL2* e *CD10*.

Em relação aos níveis de expressão dos miRNAs, baixos níveis foram encontrados para o miR155, miRLet7a, miRLet7b e miRLet7e tanto no P22 (FC \pm DP: miR155: $0,19 \pm 0,07$; miRLet7a: $1,17 \pm 0,34$; miRLet7b: $1,06 \pm 0,16$; miRLet7e: $0,37 \pm 0,34$), quanto na média dos casos com L/LB (FC \pm DP: miR155: $1,03 \pm 0,55$; miRLet7a: $2,13 \pm 0,77$; miRLet7b: $0,14 \pm 0,20$; miRLet7e: $0,38 \pm 0,31$) (Fig. 5.20A-D). Resultados similares foram observados para os miRNAs miR9*, miR21 e miR150 que se expressaram em baixos níveis no paciente P22 (FC \pm DP: miR9*: $0,00 \pm 0,00$; miR21: $0,13 \pm 0,06$; miR150: $1,62 \pm 0,31$) e na média de todos os controles, a saber: casos com LB (FC \pm DP: miR9*: $0,15 \pm 0,17$; miR21: $0,52 \pm 0,36$; miR150: $1,12 \pm 1,66$), linhagens de LB (FC \pm DP: miR9*: $0,24 \pm 0,39$; miR21: $0,09 \pm 0,12$; miR150: $0,00 \pm 0,00$), linhagens de LDGCB (FC \pm DP: miR9*: $1,02 \pm 0,52$; miR21: $0,06 \pm 0,06$; miR150: $0,00 \pm 0,00$) (Fig. 5.21A-C).

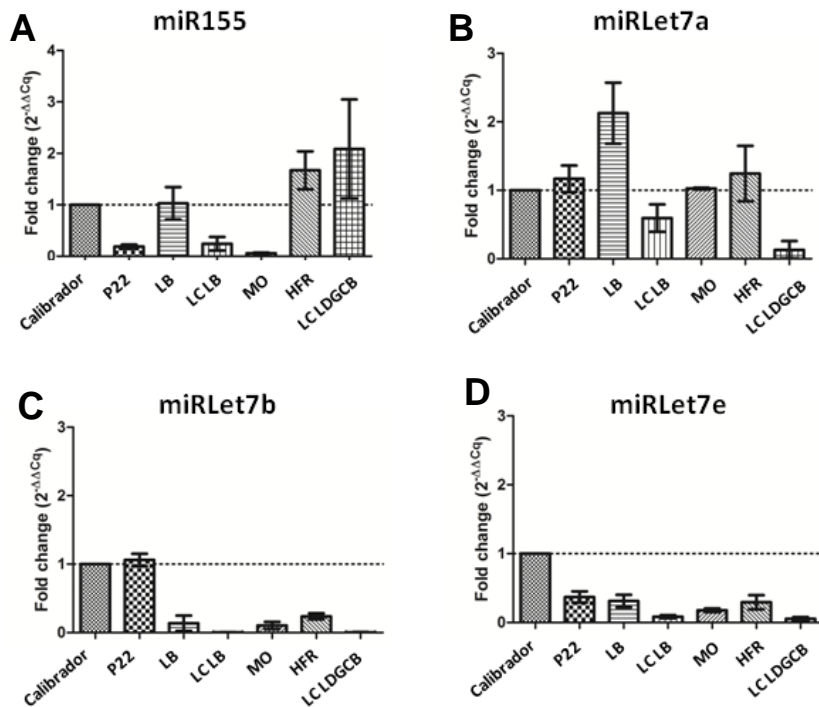


Figura 5.20: Quantificação da expressão de miRNAs representada pela *Fold change* ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) obtida para miR155 (A), miRlet7a (B), miRlet7b (C), miRlet7e (D) para o paciente P22, e os valores médios dos casos controle (LB), 3 linhagens celulares derivadas de LB (LC LB; Namalwa, Raji e Ramos), 2 aspirados de MO normal (MO), 2 hiperplasias foliculares reativas (HFR) e 2 linhagens celulares derivadas de LDGCB (LC LDGCB; Farage e Pfeiffer).

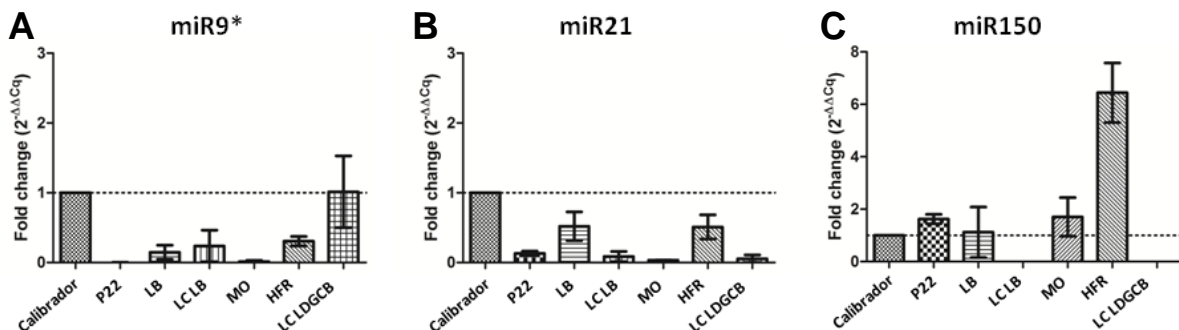


Figura 5.21: Quantificação da expressão de miRNAs representada pela *Fold change* ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) obtida para miR9* (A), miR21 (B), miR150 (C) para o paciente P22 e os valores médios dos casos controle (LB), 3 linhagens celulares derivadas de LB (LC LB; Namalwa, Raji e Ramos), 2 aspirados de MO normal (MO), 2 hiperplasias foliculares reativas (HFR) e 2 linhagens celulares derivadas de LDGCB (LC LDGCB; Farage e Pfeiffer).

5.4 Detecção do EBV e suas variantes moleculares e sua associação com características clínicas e resposta terapêutica

5.4.1 Detecção e tipagem do EBV

A detecção do EBV foi realizada inicialmente pela técnica de EBER-ISH em 52 pacientes (88%) do grupo de LB pediátrico e em todos os 17 pacientes (100%) dos adultos incluídos neste estudo. O RNA viral foi detectado nas células tumorais em 25 dos 52 casos pediátricos com material disponível (48%) e em 71% dos adultos (12/17). Um exemplo de tumor expressando os RNAs EBERs é mostrado na Fig 5.22.

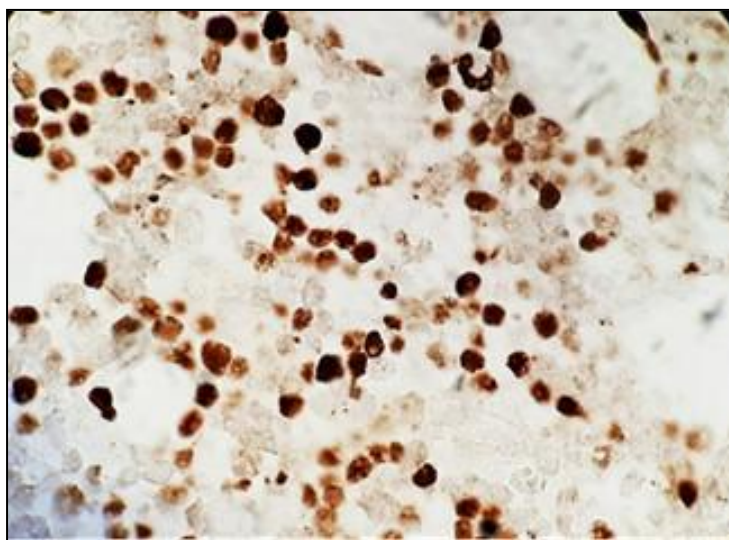


Figura 5.22: ISH para EBERs: Caso com linfoma de Burkitt exibindo núcleos celulares positivos para a presença dos transcritos EBERs detectado por hibridização *in situ* com sondas de RNA marcadas (Magnificação 100 X).

Utilizando a amplificação por PCR do gene viral EBNA3c, que é polimórfico para os tipos virais 1 e 2 (EBV-1 e EBV-2), foi possível determinar os tipos virais nas amostras estudadas. Nas crianças, 21 tumores (84%) foram infectados com o EBV-1, 3 (12%) com o EBV-2 e um caso (P45) mostrou co-infecção com ambos (4%) (Fig. 5.23). Nos adultos, o EBV-1 foi prevalente (100%).

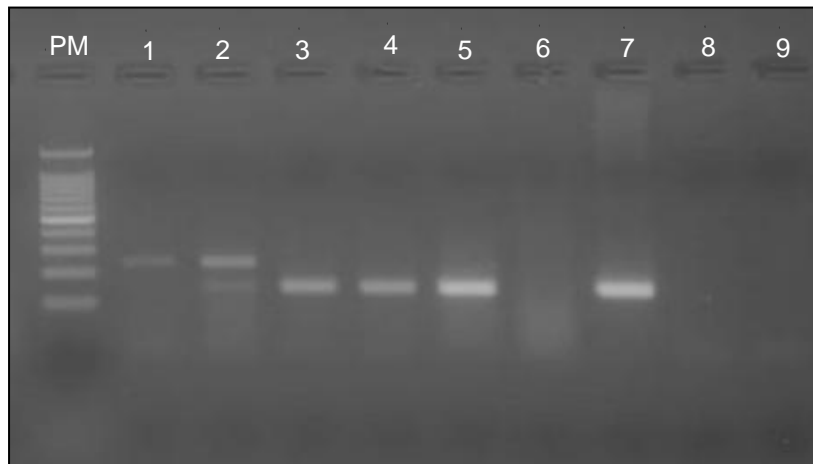


Figura 5.23: Tipagem do vírus Epstein-Barr por PCR para o gene EBNA3-C em amostras de linfoma de Burkitt. Poço 1: caso com EBV-2, poço 2: caso com coinfeção de EBV-1 e EBV-2; poços 3-5: casos com EBV-1; poço 6: caso EBV negativo; poço 7: controle positivo para EBV-1 (linhagem celular Namalwa); poço 8: Controle negativo para EBV (doador saudável); poço 9: controle de PCR. MWM: peso molecular 100 pb. Gel de agarose 3% corado com corante Gel Red.

Embora a associação com o EBV tenha sido mais prevalente no grupo de crianças ≤ 10 anos (76% vs. 24% no grupo de idade > 10 anos), este resultado não foi significativo ($P= 0,12$; teste X^2). Não houve relação entre presença do EBV ou tipos virais com sexo, estádios clínicos ou características laboratoriais dos pacientes incluídos ($P > 0,05$).

5.5 Análise de mutações nos genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3* e sua associação com características clínicas, presença do EBV e resposta terapêutica

5.5.1 Frequência de mutações patogênicas nos genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3*

Neste estudo, o DNA extraído dos tumores pertencentes a 59 crianças e 17 pacientes adultos foram avaliados quanto às sequências correspondentes a toda a região codificadora do gene *ID3* (éxons 1 e 2), o éxon 17 do gene *TCF3* e o éxon 5 do gene *CCND3*. Em 36, 55 e 23 pacientes respectivamente, foi possível obter um produto de amplificação analisável. Resultados de sequenciamento completo para os 3 alvos foram obtidos em 19 pacientes. A baixa taxa de sucesso na amplificação foi devida

provavelmente à qualidade do material genético obtido, mesmo após 2 ou 3 tentativas de amplificação nos casos sem sucesso inicial.

Do ponto de vista funcional, no gene *ID3* foram descritas 31 mutações que levaram a mudança de aminoácidos, códon de parada (*stop codon*) ou perda de marco de leitura (*frameshift*) (30 mutações potencialmente patogênicas e 1 polimorfismo de base única benigno), 20 mutações intrônicas (1 afetando sítio de *splicing*) e 19 substituições sinônimas (total 31 mutações potencialmente patogênicas).

No gene *TCF3* foram descritas 10 substituições que levaram a mudança de aminoácidos ou *stop codon* (as 10 potencialmente patogênicas), 19 mutações intrônicas (1 afetando sítio de *splicing*) e 4 substituições sinônimas (total 11 mutações potencialmente patogênicas).

No gene *CCND3* foram descritas 10 mutações que levaram a mudança de aminoácidos, *stop codon* ou perda de marco de leitura (*frameshift*) (9 potencialmente patogênicas e 1 polimorfismo de base única benigno) e 3 substituições sinônimas (total 9 mutações potencialmente patogênicas).

Na tabela 5.4, encontram-se descritas todas as mutações potencialmente patogênicas, junto com a predição da proteína resultante, encontradas em 32 pacientes.

Tabela 5.4: Descrição do estado mutacional e das mutações patogênicas encontradas nos genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3* em 32 pacientes com Linfoma de Burkitt

Caso	Idade	Rearranjo MYC	c.ID3 ¹	p.ID3 ²	c.TCF3 ³	p.TCF3 ⁴	c.CCND3 ⁵	p.CCND3 ⁶
1	3	sim	c.46T>A; c.74C>A	p.Cys16Ser; p.Ala25Asp	wt	wt	N/D	NA
5	4	não	c.19G>A; c.211C>T	p.Val7Met; p.Gln71Ter	wt	wt	wt	wt
6	8	N/D	c.53C>T; c.58C>T	p.Ser18Leu; p.Arg20Cys	wt	wt	NA	NA
9	11	não	NA	NA	c.1760T>C	p.Leu587Pro	c.808C>T; c.818C>T	p.Pro270Ser; p.Ser273Phe
14	11	N/D	NA	NA	NA	NA	c.810_811dupCC	p.Arg271ProfsTer53
18	14	sim	c.77G>A; c.79G>A	p.Arg26Gln; p.Gly27Ser	NA	NA	NA	NA
28	5	sim	c.108G>C; c.300+1G>A	p.Glu36Asp	wt	wt	wt	Wt
30	4	sim	c.181_182insCTCG	p.Gly61AlafsTer6	c.1670T>A	p.Val557Glu	wt	Wt
31	12	N/D	NA	NA	c.1711C>T; c.1726C>T	p.Arg571Cys; p.His576Tyr	NA	NA
37	7	N/D	c.72C>G; c.89A>C	p.Ile24Met; p.Lys30Thr	c.1587-73C>T		NA	NA
43	N/D	sim	NA	NA	c.1751C>T	p.Thr584Ile	NA	NA
50	8	sim	c.322C>G	p.Leu108Val	wt	wt	wt	wt
59	8	sim	NA	NA	c.1630G>A	p.Asp544Asn	NA	NA
60	4	sim	c.125_293del	p.Asp42AlafsTer28	wt	wt	NA	NA
62	9	N/D	c.46T>A; c.74C>A	p.Cys16Ser; p.Ala25Asp	wt	wt	wt	Wt
64	7	N/D	wt	wt	c.1589G>C	p.Ser530Thr	NA	NA
65	7	N/D	c.22C>T; c.349T>G; c.140_145delGCTACT	p.Arg8Cys; p.Phe117Val; p.Cys47_Tyr48del	wt	wt	c.722G>A; c.742G>A; c.815_816insC	p.Arg241Gln; p.Glu248Lys; p.Ser273LeufsTer51
69	5	N/D	c.20dupT; c.190C>T; c.211C>T	p.Arg8AlafsTer28; Leu64Phe; p.Gln71>Ter	wt	wt	wt	wt
72	4	N/D	c.176het_delC	p.Pro59ArgfsTer24	wt	wt	wt	wt
75	5	N/D	c.68C>T	p.Ala23Val	wt	wt	NA	NA
76	13	N/D	c.166C>A	p.Pro56Thr	wt	wt	NA	NA
77	6	N/D	c.220A>T; c.136_139dup	p.Ile74Phe; p.Cys47SerfsTer20	wt	wt	NA	NA
79	5	N/D	c.16C>T	p.Pro6Ser	wt	wt	wt	wt
80	15	N/D	c.190C>T	p.Leu64Phe	c.1667G>A	p.Arg556Gln	c.808_810delCCCinsTGG	p.Pro270Trp
83	38	N/D	c.260C>T	p.Pro87Leu	wt	wt	wt	wt
87	22	N/D	c.190C>T	p.Leu64Phe	wt	wt	NA	NA
89	39	N/D	c.190C>T	p.Leu64Phe	wt	wt	NA	NA
90	52	N/D	c.288_300het_delCCTTCCC ATCCAG	p.His96GlnfsTer26	wt	wt	NA	NA
91	43	N/D	NA	NA	c.1771C>T	p.Gln591Ter	NA	NA
92	60	N/D	310C>T; c.347G>A	p.Leu104Phe; p.Ser116Asn	wt	wt	wt	wt
93	46	N/D	c.298C>T	p.Gln100Ter	c.1653T>A	p.Asn551Lys	c.826C>T	p.Gln276Ter
94	74	N/D	NA	NA	wt	wt	c.743A>G	p.Glu248Gly

N/D: Não disponível; NA: Não amplificou; wt: wild-type; MO: medula óssea; 1 Anotado de acordo com NM_002167.4; 2 Anotado de acordo com NP_002158.3; 3 Anotado de acordo com NM_001136139.4; 4 Anotado de acordo com NP_001129611.1; 5 Anotado de acordo com NM_001760.4; 6 Anotado de acordo com NP_001751.

O gene *ID3* apresentou-se mutado em 24 pacientes, com 67% de frequência mutacional (considerando apenas as mutações possivelmente patogênicas) na coorte completa. Treze pacientes foram portadores de 1 mutação, enquanto que 11 pacientes (46%) foram portadores de mutações múltiplas, sendo 9 pacientes com 2 mutações, e 2 pacientes com 3 mutações.

Mutações patogênicas no gene *TCF3* foram encontradas em 18% (10/55) da coorte. Apenas um paciente foi portador de 2 mutações, enquanto os outros 9 possuíam apenas uma mutação.

O gene *CCND3* esteve mutado em 26% dos tumores (6/23), sendo 4 pacientes com uma mutação, e 2 com mais de uma mutação (33%), sendo 1 paciente com 2 mutações e outro com 3 mutações.

Nos 19 casos em que os 3 genes foram avaliados, foi possível verificar que 6/19 (31,6%) não apresentavam nenhuma mutação patogênica; 4/19 (21%) apresentavam mutações em um dos 3 genes e 9/19 (47,3%) apresentavam mutações em mais de um gene, ou mais de uma mutação por gene (Fig. 5.24). Esta distribuição de frequências não foi significativamente diferente da encontrada nos 40 casos em que pelo menos um gene foi analisado ($P= 0,113$). Em dois pacientes (P80 e P93), foram encontradas mutações em todos os 3 genes e em 4 pacientes foi possível observar mutações em dois genes, sendo *TCF3* e *CCND3* no paciente P9, *ID3* e *TCF3* nos pacientes P30 e P37; e *ID3* e *CCND3* no paciente P65 (Tabela 5.4).

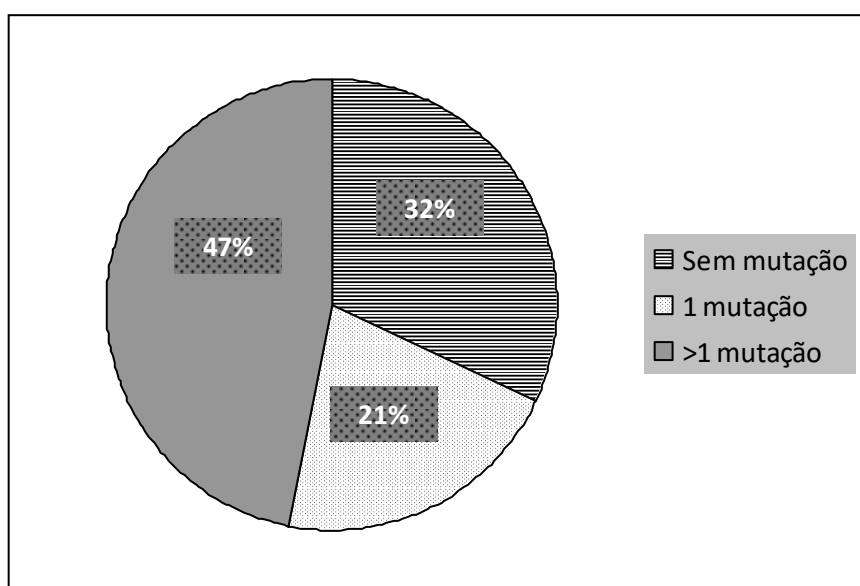


Figura 5.24: Distribuição dos padrões de mutação agrupados dos três genes no grupo estudado

No gene *ID3* foram encontradas 21 mutações do tipo *missense* (67,7%), 7 *indels* e 2 mutações *nonsense* (29,05%), além de 1 mutação intrônica. Três mutações, localizadas nas regiões c.46 (p.16), c.74 (p.25) e c.211 (p.71) foram encontradas 2 vezes cada uma em nossa coorte (Fig. 5.25).

A nível proteico, apenas 11 de 31 (35,5%) mutações afetaram a região codificante funcional HLH. As restantes 20 distribuíram-se da seguinte maneira: um *cluster* na região 5' do motivo HLH (10 mutações, todas *missense*), um pequeno *cluster* na região 5' do éxon 1 (2 mutações *missense*, 1 *nonsense* e 1 *indel*), na região 3' do motivo HLH (1 *missense*, 1 *nonsense* e 1 *indel*), e finalmente a mutação intrônica e 4 mutações no início do éxon 2 (Fig. 5.25). De maneira interessante, 8 mutações do *cluster* 5' HLH faziam parte de casos em que foram detectadas duas mutações, sendo todas as duplas formadas por pares dentro do *cluster*. Cinco mutações, fora do *cluster* mencionado, formavam parte de duplas ou trios com mutações dentro do domínio HLH (ver detalhes em Tabela 5.4).

No gene *TCF3* foram descritas 9 mutações *missense* e 1 *nonsense*, além de 1 mutação intrônica. A nível proteico, 8 de 10 (80%) mutações afetaram a região codificante funcional *basic*-HLH (bHLH) (Fig. 5.26).

No gene *CCND3*, o segmento de PCR amplificado do éxon 5 corresponde ao domínio PEST, responsável pela rápida rotatividade (*turnover*) da proteína. Das 9 mutações patogênicas, 5 foram do tipo *missense*, 3 *indels* e 1 *nonsense*. Não houve mutação afetando os resíduos T283, P284 e I290 que fazem parte do motivo de fosforilação proteica (Fig. 5.27).

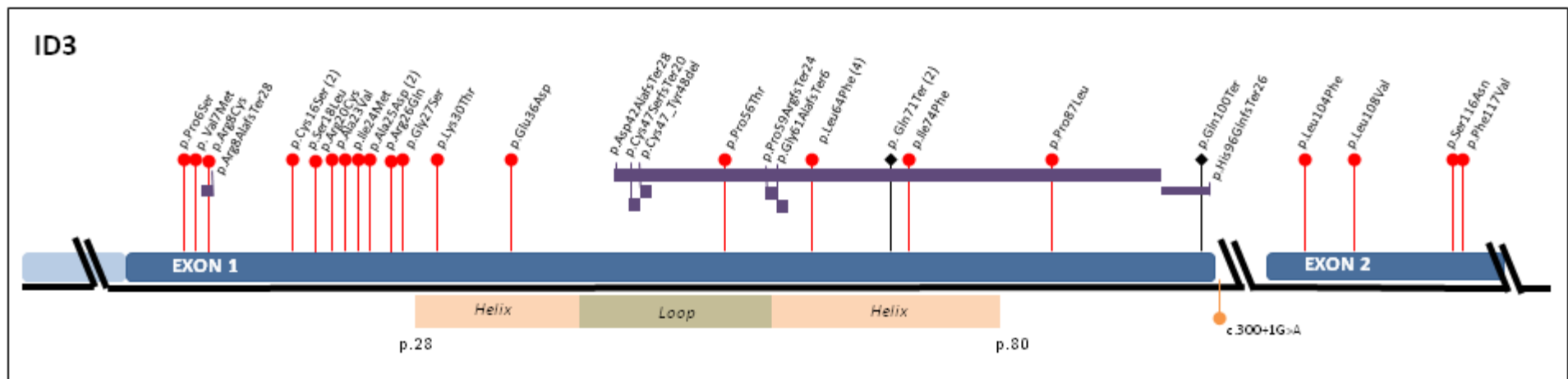


Figura 5 25: Esquema do gene *ID3* com as mutações encontradas na coorte do estudo. No esquema, são ilustrados os éxons 1 e 2 da região codificadora. As mutações estão anotadas segundo nível proteico. O marcador vermelho indica mutações *missense*, as barras roxas determinam inserções/deleções, marcador preto mutações *nonsense* e o marcador coral indica mutação intrônica. Nos parênteses estão anotados o número de vezes em que a mutação foi encontrada na coorte. O domínio HLH está mapeado de acordo com a descrição de sítios funcionais no UniProt (Q02535).

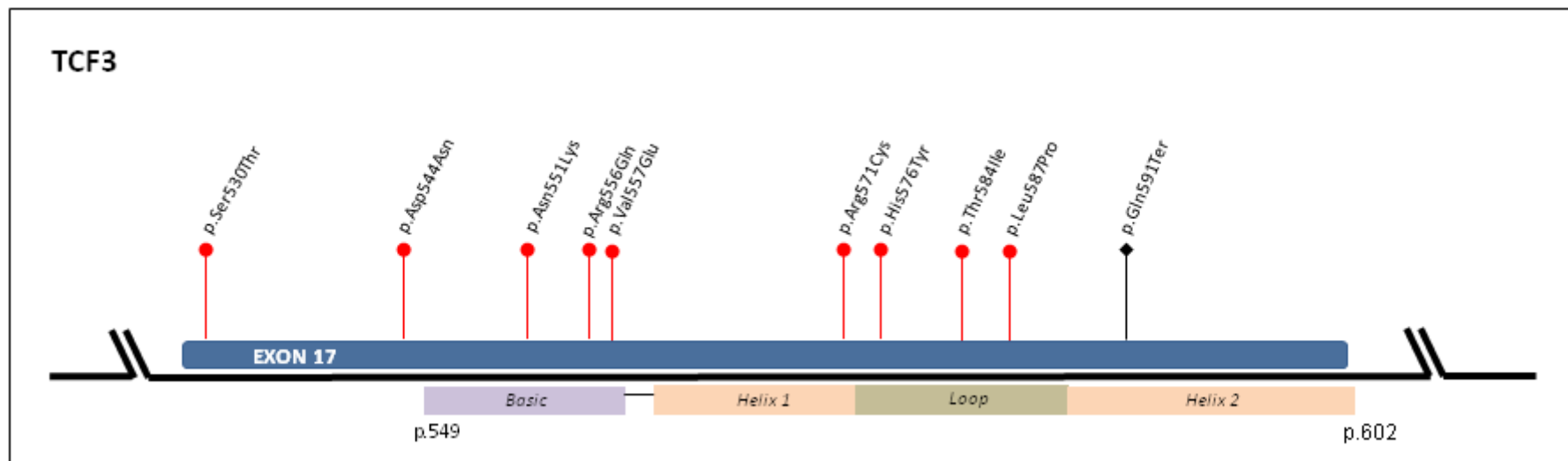


Figura 5.26: Esquema do gene *TCF3* com as mutações potencialmente patogênicas encontradas na coorte do estudo. No esquema, é ilustrado o éxon 17 da região codificadora. As mutações estão anotadas segundo nível da proteína. O marcador vermelho identifica as mutações *missense* e o marcador preto as mutações *nonsense*. Uma mutação intrônica possivelmente patogênica (c.1587-73C>T) foi mapeada na região 5' do éxon 17 e não está plotada no esquema. O domínio bHLH está mapeado de acordo com a descrição de sítios funcionais no UniProt (P15923).

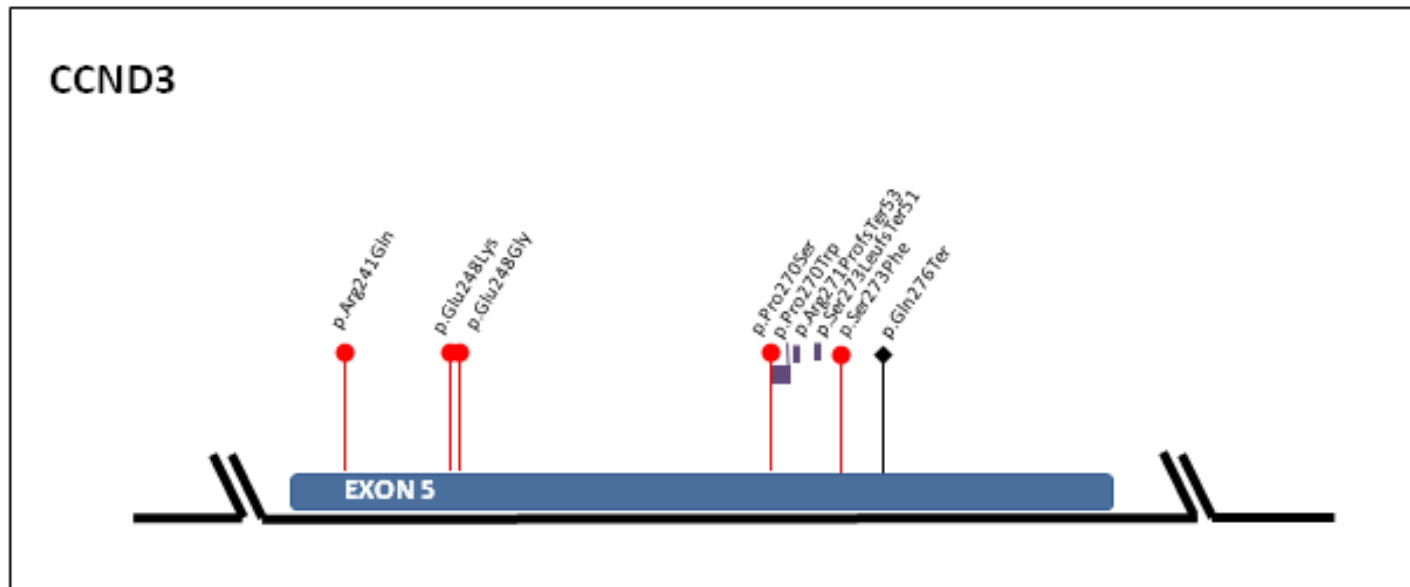


Figura 5.27: Esquema do gene *CCND3* com as mutações encontradas na coorte do estudo. No esquema, é ilustrado o éxon 5 da região codificadora. As mutações estão anotadas segundo nível da proteína. O marcador vermelho indica mutações *missense*, as barras roxas determinam inserções/deleções e o marcador preto mutações *nonsense*.

A Tabela 5.5 e a Figura 5.28 apresentam um resumo das características das mutações encontradas nos genes estudados.

Tabela 5.5: Caracterização genética das mutações patogênicas encontradas

Mutações Patogênicas	<i>ID3</i>	%	<i>TCF3</i>	%	<i>CCND3</i>	%
Missense	21	67,7	9	81,8	5	55,55
Nonsense	2	6,45	1	9,1	1	11,11
Indels	7	22,6	0	0,0	3	33,33
Intrônica	1	3,23	1	9,1		
N total	31		11		9	

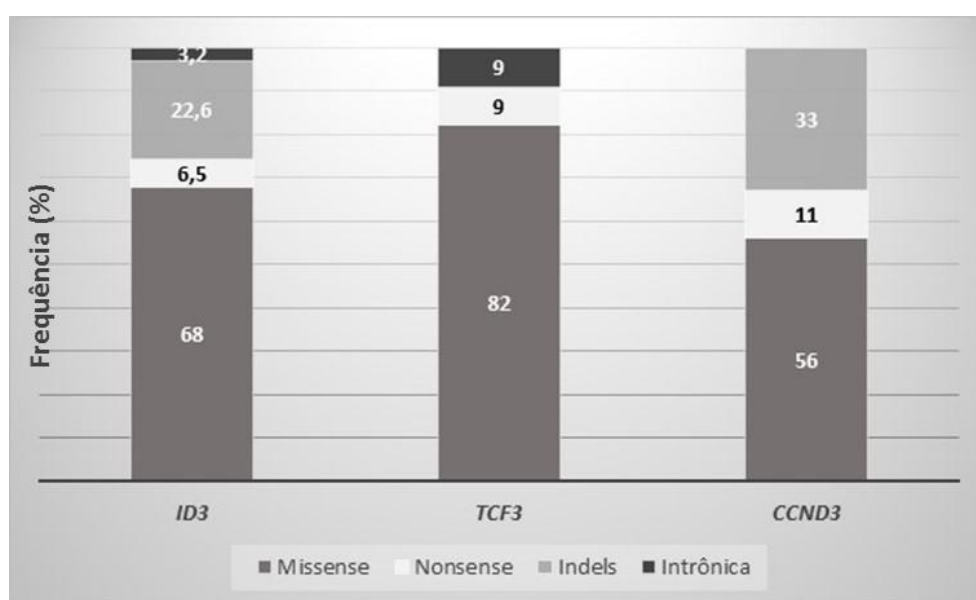


Figura 5.28: Distribuição das frequências de mutações patogênicas em cada gene

Entre as mutações patogênicas, 10 mutações no gene *ID3*, 2 no *TCF3* e 2 no *CCND3* foram descritas como polimorfismos de base única (SNP) no banco de dados dbSNP, e foram classificadas como patogênicas baseadas na predição funcional *in silico* ou foram descritas previamente em associação a diversos cânceres. Dentre essas mutações/SNPs, uma mutação no *ID3* (c.190C>T; p.Leu64Phe) foi encontrada em 17% dos nossos pacientes comparado com 0,00002% nos bancos de dados. Na tabela 5.6, apresentada abaixo, estão descritas as mutações/SNPs previamente descritas.

Tabela 5.6: Mutações e polimorfismos de base única com potencial patogênico previamente descritos, que foram encontrados na coorte do estudo

GENE	POSIÇÃO/POTEÍNA GERADA	FREQUENCIA NA COORTE	REFERÊNCIA SNP (dbSNP)	FREQUÊNCIA DO ALELO MUTADO NA POPULAÇÃO	TUMORES ASSOCIADOS / REFERÊNCIAS
ID3	c.53C>T; p.Ser18Leu	0,04	rs1226961546	ND	dbSNP/ND
	c.58C>T; p.Arg20Cys	0,04	rs201697476	0,00002478/ 0.00006468	dbSNP/ND
	c.68C>T; p.Ala23Val	0,04	rs1470870629	0,000004126	dbSNP/ND
	c.72C>G; p.Ile24Met	0,04	rs373642618	ND	dbSNP/ND
	c.77G>A; p.Arg26Gln	0,04	rs765414579	0,00002885	dbSNP/ND
	c.79G>A; p.Gly27Ser	0,04	rs960108335	ND	dbSNP/ND
	c.190C>T; p.Leu64Phe	0,17	rs1055074154	0,00001625	Rohde <i>et al.</i> , 2016
	c.211C>T / p.Gln71Ter	0,04	ND	ND	Linfoma / Gebauer <i>et al.</i> , 2013
	c.310C>T; p.Leu104Phe	0,04	rs757505053 / COSM6987195	0,000008124	Linfoma folicular / Gebauer <i>et al.</i> , 2013
	c.298C>T; p.Gln100Ter	0,04	COSM6208766	0,008299	Neoplasias linfoides
TCF3	c.1653T>A / p.Asn551Lys	0,1	COSM3284374	0,004	Linfoma / Rohde <i>et al.</i> , 2017
	c.1670T>A; p.Val557Glu	0,1	MU1395506	0,008299	Linfoma
CCND3	c.722G>A; p.Arg241Gln	0,16	rs767328984 / COSM3874049	0,000008844	Carcinoma gástrico
	c.810_811dupCC; p.Arg271ProfsTer34	0,16	MU3861637	0,004149	Linfoma / Rohde <i>et al.</i> , 2017

c: posição da mutação no RNAm; p. posição do aminoácido mutado na proteína; ND: não disponível.

5.5.2 Polimorfismos de base única (SNP) benignos na coorte de estudo

Foram identificadas 2 variantes polimórficas funcionalmente benignas. Em 61% dos pacientes, foi identificada uma variante na posição c.313 do gene *ID3*, com alteração do alelo de referência A para o alternativo G, gerando a alteração na proteína p.Thr105Ala (rs11574, 0,78). A outra variante, no gene *CCND3*, foi observada em 61% da coorte, levando à alteração na proteína p.Ser259Ala (rs1051130, 0,54) devido a substituição do alelo T pelo G na posição c.775 deste gene.

5.5.3 Mutações silenciosas e intrônicas na coorte de estudo

Na nossa população de estudo, foram encontradas 26 variantes genômicas silenciosas, sem alteração a nível proteico predita, sendo 19 no gene *ID3* (c.6G>A, c.10C>T, c.51G>A, c.75C>G, c.84A>C, c.99A>G, c.108G>A, c.156G>A, c.234C>T, c.234C>A, c.249C>T, c.252G>A, c.255C>A, c.273C>T, c.282C>T, c.285C>T, c.324T>G, c.336C>T, c.348C>T), 4 no *TCF3* (c.1617G>A, c.1683T>C, c.1765C>T, c.1789C>T) e 3 no *CCND3* (c.759G>A, c.765C>T, c.774C>T). Somente 7 delas foram encontradas isoladas, enquanto as outras vieram acompanhadas de pelo menos uma segunda mutação com potencial patogênico, com exceção das encontradas no *TCF3*, que não foram acompanhadas de nenhuma outra mutação.

Em relação às mutações encontradas nos introns, analisamos a sua localização nos sítios doadores de *splicing* (5'ss) (CA) e aceptores de *splicing* (3'ss) AG. Adicionalmente, analisamos a região em torno do 3'ss, para inferir se a mutação estaria afetando a sequência de ramificação (especialmente a presença de A no sítio de ramificação), ou se estaria afetando a distância entre estes motivos e o dinucleotídeo da extremidade 3'ss. Foram detectadas 39 mutações nas sequências intrônicas de 42 pacientes (20 entre os éxons 1 e 2 do gene *ID3* e 19 entre os éxons 16, 17 e 18 do gene *TCF3*) (Tabela suplementar 1 – Anexo III). Destas, 37 mutações não foram consideradas patogênicas por não afetarem nenhum sítio de *splicing*. Apenas duas mutações intrônicas encontradas, uma no gene *ID3*, c.300+1G>A (P28) e outra no *TCF3* c.1587-73C>T (P37) afetam sítios de *splicing*, sendo consideradas patogênicas, onde uma delas (c.300+1G>A, COSM2049199) já foi associada a linfomas (frequência: 0,004).

Na tabela 5.7 é apresentada uma análise das características bioquímicas das mutações patogênicas e sinônimas encontradas no estudo.

Tabela 5.7: Caracterização genética das mutações patogênicas e silenciosas encontradas

Mutações Patogênicas	ID3	%	TCF3	%	CCND3	%
Substituições	24		11		6	
Transições	15	62,5	8	72,72	5	83,33
C>T	14		7		4	
T>C	1		1		1	
Transversões	9	37,5	3	27,28	1	16,67
C>G	3		1		0	
C>A	2		0		0	
T>G	2		0		1	
T>A	2		2		0	
Mutações sinônimas	19		4		3	
Transições	14	73,7	4	100	3	100
C>T	13		3		3	
T>C	1		1		0	
Transversões	5	26,3	0		0	
C>G	1					
C>A	3					
T>G	0					
T>A	1					

As substituições foram codificadas nos seis tipos de substituições pela pirimidina do par Watson–Crick mutado. Por exemplo, as transições C>T e G>A foram consideradas equivalentes e contadas como parte da classe C>T porque não é possível diferenciar em qual fita de DNA (forward ou reverse) a substituição ocorreu inicialmente.

Como evidenciado pelos resultados, o gene *ID3* foi o mais frequentemente mutado, tanto em relação às mutações patogênicas como às sinônimas, indicando ser alvo preferencial do processo mutagênico. As transições (TS) foram mais frequentes que as transversões (TV), tanto nas mutações patogênicas como nas sinônimas, como esperado para o processo mutacional em eucariotos (ZAHA *et al.* 2014). Dentre as transições, a classe C>T foi super-representada, mostrando um marcado viés de cadeia (foi muito mais frequente C>T que G>A), nos três genes analisados. Já para as transversões não foi observado um padrão preferencial. Isto sugere uma assinatura mutacional mediada pela molécula AID (*Activation induced cytidin-deaminase*).

5.5.4 Associação entre as mutações nos genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3* e as características clínicas, presença do EBV e resposta terapêutica

Na tabela 5.8 estão sumarizadas as características clínico-biológicas dos pacientes em relação a presença ou não de mutações possivelmente patogênicas nos genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3*.

Tabela 5.8: Características dos pacientes com LB em relação ao status de mutação de *ID3*, *TCF3* e *CCND3*

Características		<i>ID3</i> mutado	<i>ID3</i> wt	<i>TCF3</i> mutado	<i>TCF3</i> wt	<i>CCND3</i> mutado	<i>CCND3</i> wt
Todos os pacientes		24 (67%)	12 (33%)	10 (18%)	45 (82%)	6 (26%)	17 (74%)
Sexo	Masculino	17 (71%)	7 (58%)	6 (60%)	28 (62%)	4 (67%)	11 (65%)
	Feminino	7 (29%)	5 (42%)	4 (40%)	17 (38%)	2 (33%)	6 (35%)
Idade	≤21a	18 (75%)	8 (67%)	7 (78%)	31 (70%)	4 (67%)	12 (71%)
	>21a	6 (25%)	4 (33%)	2 (22%)	13 (30%)	2 (33%)	5 (29%)
	ND			1	1		
Estadiamento	I/II	4 (22%)	2 (25%)	0 (0%)	9 (31%)	1 (17%)	3 (25%)
	III/IV	14 (78%)	6 (75%)	7 (100%)	20 (69%)	5 (83%)	9 (75%)
	ND	6	4	3	16		5
Envolvimento da MO	Sim	4 (20%)		3 (43%)	3 (8%)	2 (33%)	2 (12%)
	Não	16 (80%)	10 (100%)	4 (57%)	33 (92%)	4 (67%)	15 (88%)
	ND	4	2	3	9		
Envolvimento do SNC	Sim	2 (11%)	1 (13%)		3 (9%)		2 (17%)
	Não	16 (89%)	7 (88%)	6 (100%)	29 (91%)	4 (100%)	10 (83%)
	ND	6	4	4	13	2	5
LDH	<500U/l	4 (21%)	3 (43%)	1 (17%)	13 (41%)	3 (50%)	3 (23%)
	>500U/l	15 (79%)*	4 (57%)	5 (83%)	19 (59%)	3 (50%)	10 (77%)
	ND	5	5	4	13		4
EBV	Sim	16 (67%)	7 (58%)	7 (70%)	29 (65%)	3 (50%)	13 (76%)
	Não	8 (33%)	5 (42%)	3 (30%)	16 (35%)	3 (50%)	4 (24%)
	ND						
Óbito	Sim	9 (43%)*	0 (0%)	3 (43%)	7 (19%)	2 (33%)	5 (29%)
	Não	12 (57%)	10 (100%)	4 (57%)	30 (81%)	4 (67%)	12 (71%)
	Não informado	3	2	3	8		

Wt: *wild-type*; a: anos; MO: medula óssea; SNC: sistema nervoso central; LDH: nível sérico de lactato desidrogenase. * denota tendência ou significação estatística.

Embora a diferença nas frequências de mutações dos genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3* tenham sido maiores nas crianças e adolescentes que nos adultos (Fig. 5.29), esta diferença não foi significativa, provavelmente pelo baixo número de casos no grupo dos adultos ($P > 0,05$; Teste exato de Fisher).

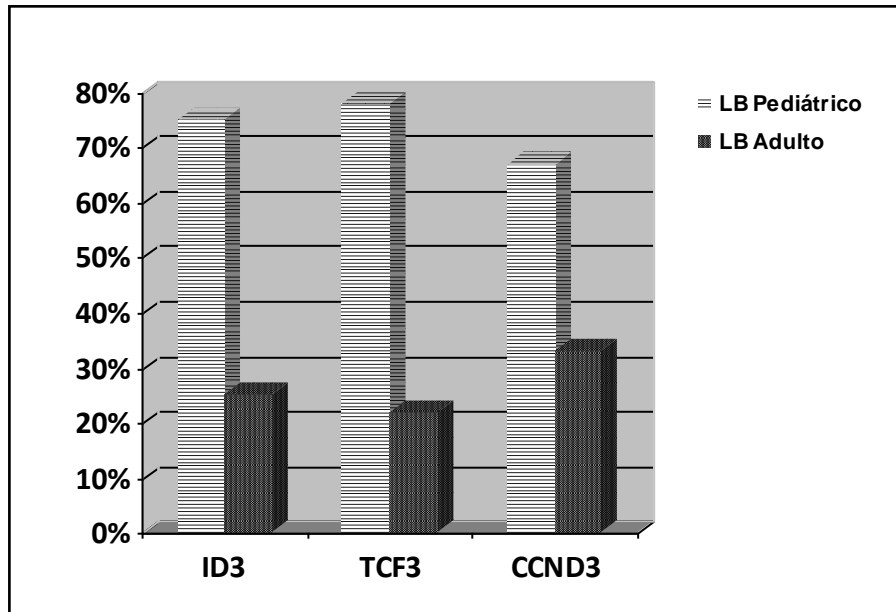


Figura 5.29: Comparação das frequências de mutações patogênicas nos genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3* nos grupos pediátrico vs. adultos.

Quando analisada a relação entre frequência mutacional e idade no grupo pediátrico, as mutações de *CCND3* mostraram afetar crianças mais velhas [idade mediana dos pacientes com mutações em *CCND3* 11 anos (7-15 anos); vs 5 anos (3-11 anos) naqueles sem mutação] ($P= 0,02$; Teste de Mann-Whitney) (Figura 5.30 A). De fato, 3/4 crianças com mutações tinham mais de 10 anos ($P= 0,027$; Teste exato de Fisher). Já as mutações de *ID3* mostraram uma tendência a acumular-se em crianças menores [idade mediana dos pacientes com mutações em *ID3* 5 anos (3-15 anos); vs 10 anos (3-17 anos) naqueles sem mutação de *ID3*] ($P= 0,083$; Teste de Mann-Whitney) (Figura 5.30 B).

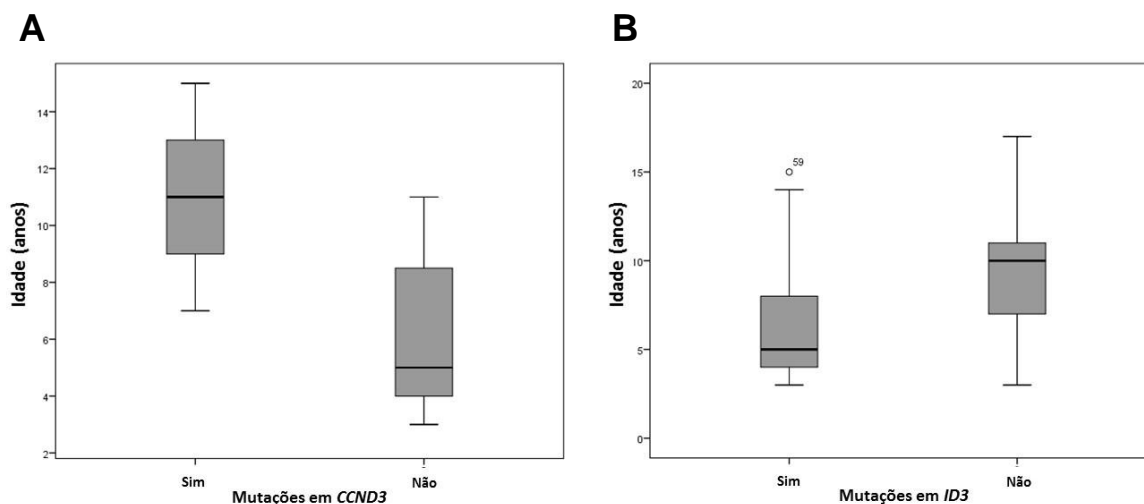


Figura 5.30: Distribuição das idades de acordo à presença ou não de mutações patogênicas nos pacientes pediátricos. A) Gene *CCND3* B) Gene *ID3*. Gráfico de Box-plot, as caixas representam os valores entre o primeiro e terceiro quartil, a linha dentro da caixa representa a mediana e as barras representam a amplitude (mínimo e máximo).

Para os 3 genes, houve uma predominância de mutações nos pacientes em estádios clínicos mais avançados da doença (EC III/IV), sem significação estatística ($P > 0,05$). Não foram observadas associações com sexo, EBV ou outros parâmetros clínico-laboratoriais ($P > 0,05$). Pacientes com mutações em *ID3* mostraram uma tendência a ter valores elevados de LDH ($P = 0,06$). Houve uma associação entre a presença de mutações no *ID3* e óbito durante o tempo de acompanhamento deste estudo (45% dos casos com mutações foram a óbito comparados com 0% no grupo sem mutações; $P = 0,012$; Teste exato de Fisher). Este resultado verificou-se como tendência no grupo pediátrico ($P = 0,06$; Teste exato de Fisher).

Quando analisados os 19 casos em que foi possível avaliar as mutações nos três genes, a presença de 1 ou mais mutações em qualquer gene foi associada ao desfecho óbito (100% dos casos com ≥ 1 mutação foram a óbito, comparado com 50% dos casos sem mutação; $P = 0,04$; Teste exato de Fisher). Este resultado foi replicado considerando o grupo inteiro de casos ($N = 47$; $P = 0,029$).

5.6 Análise de Sobrevida

A sobrevida global (SG) de toda a coorte de pacientes com tumor FFPE foi de 79% (Fig. 5.31A) e a sobrevida livre de doença (SLD), considerando recaída ou progressão da doença como evento, foi de 88% (Fig. 5.31B). No grupo de crianças com

tumor FFPE, a SG foi maior (84%) em comparação à coorte total (Fig. 5.31C) e a SLD foi de 86% (Fig. 5.31D).

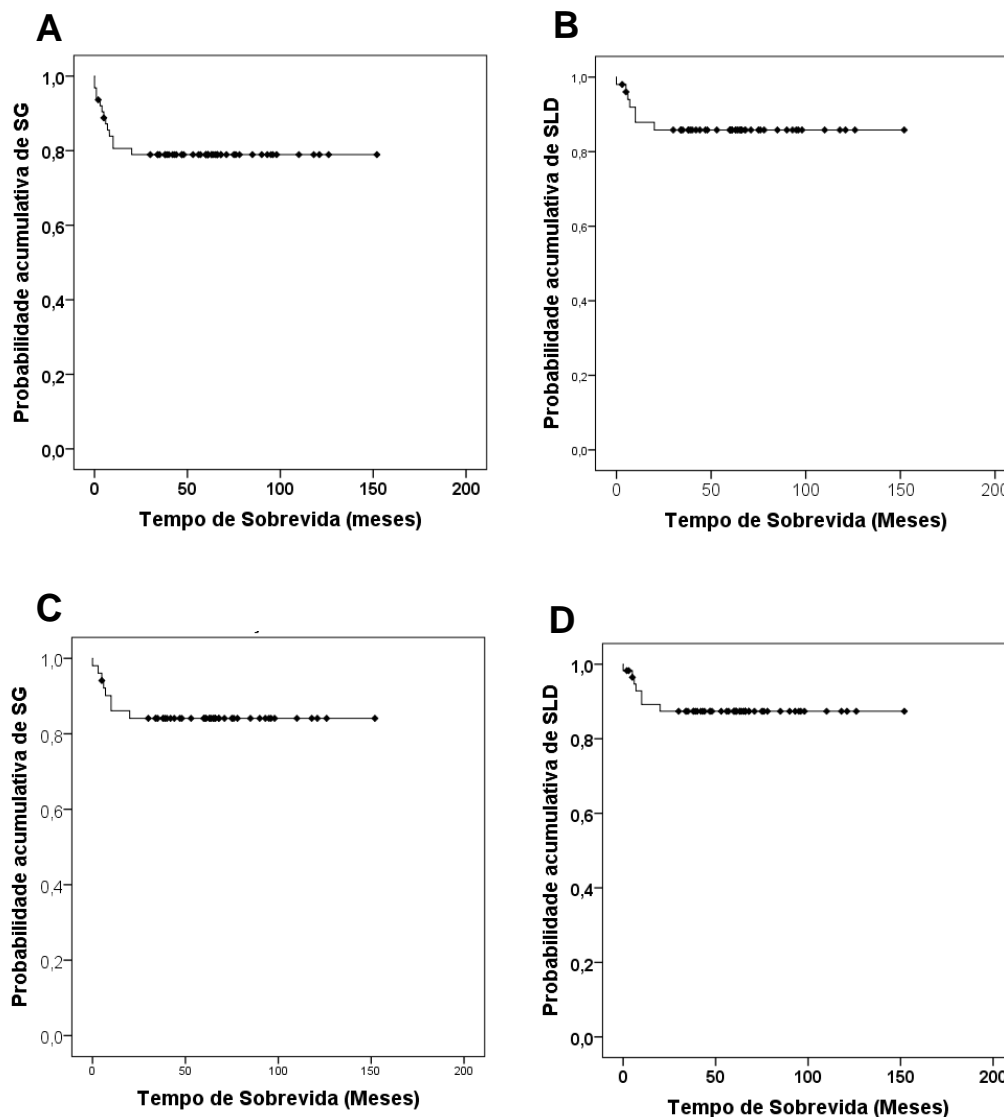


Figura 5.31: Curvas de *Kaplan-Meier* para a sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) na coorte total de pacientes com tumor FFPE (A e B) e entre os pacientes com LB pediátrico (C e D).

Em termos de biomarcadores clássicos de prognóstico da doença, o estadiamento da doença foi associado com uma pior SG, sendo que a pior sobrevida foi associada ao estágio IV (45,5%, $P= 0,002$; teste Log-Rank) (Fig. 5.32A).

Valores aumentados de LDH estiveram associados com uma pior SG (68,4% vs 100% no grupo com valores normais; $P= 0,014$; teste Log-Rank) no grupo total (Fig. 5.32B). Da mesma maneira, o acometimento da MO também esteve associado com SG

mais curta (55,6% vs. 84,0% para os pacientes sem acometimento da MO; $P= 0,02$; teste Log-Rank) (Fig. 5.32C).

Não foram encontradas outras associações entre sobrevida global e as variáveis clínico-biológicas investigadas.

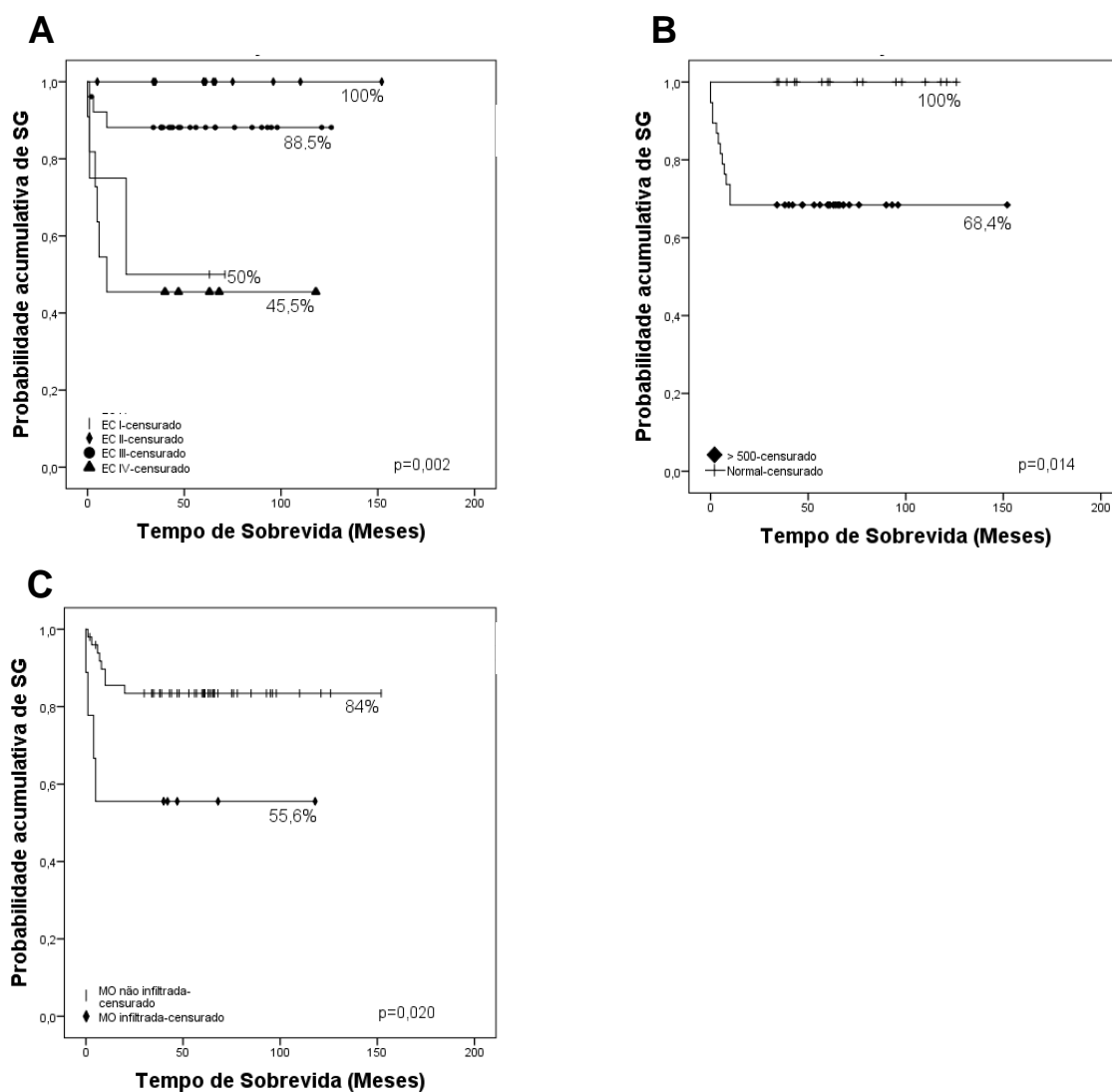


Figura 5.32: Curvas de *Kaplan-Meier* para a sobrevida global (SG) na coorte total de pacientes com tumor FFPE em relação ao estadiamento da doença (A), aos níveis de LDH (B) e a infiltração da MO (C).

No grupo em que foi possível estudar a presença de mutações no gene *ID3*, foi observado que esta impactou significativamente na SG, estando associada a 57% de SG comparada com 100% no grupo sem mutações ($P= 0,027$; teste Log-Rank) (Fig. 5.33 A). A presença de mutações no *TCF3* também foi associada a uma SG menor (57,1% vs. 81,1% para os casos sem mutação), porém sem significação estatística ($P= 0,164$;

teste Log-Rank) (Fig. 5.33B). Já a presença de mutações no gene *CCND3* não teve impacto na SG ($P= 0,98$; teste Log-Rank) (Fig. 5.33C).

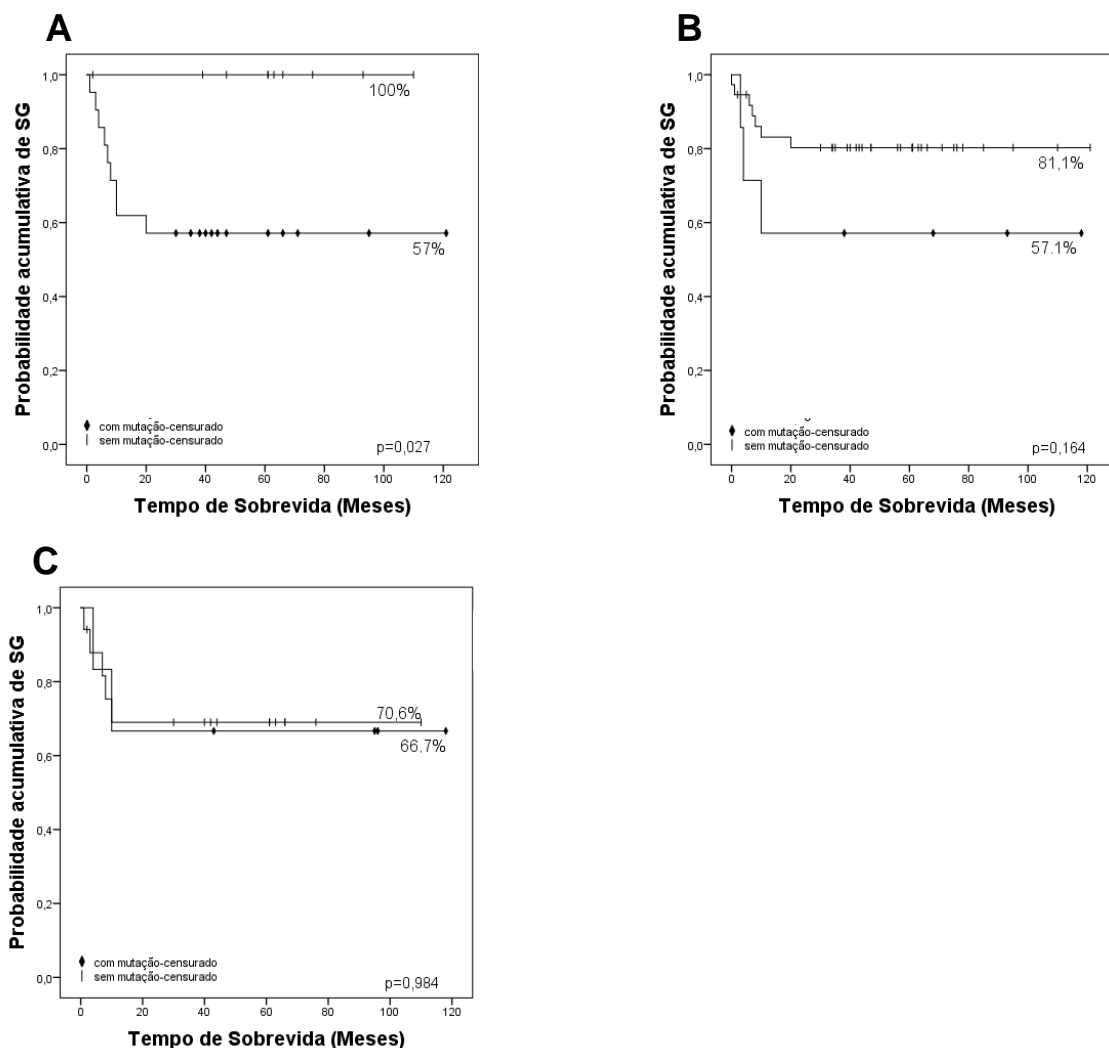


Figura 5.33: Curvas de *Kaplan-Meier* para a sobrevida global (SG) na coorte total de pacientes com tumor FFPE em relação à presença ou não de mutações nos genes *ID3* (A), *TCF3* (B) e *CCND3* (C). Não mutado: sem presença de mutações patogênicas.

Quando considerado o estado mutacional, a ausência de mutações em qualquer dos genes foi associada a uma melhor SG (95%), comparada com a presença de uma mutação (83,3%), sendo que a presença de mais de uma mutação esteve associada com uma sobrevida significativamente pior que as duas categorias anteriores (53,3%) ($P= 0,015$; teste Log-Rank) (Fig. 5.34). Estes resultados se mantiveram como tendência quando considerado apenas o grupo pediátrico (93,3%, 88,9% e 69,2% respectivamente; $P= 0,088$; teste Log-Rank).

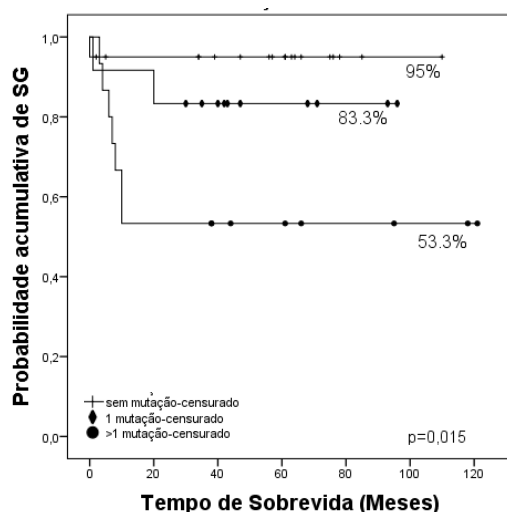


Figura 5.34: Curva de *Kaplan-Meier* para a sobrevida global (SG) na coorte total de pacientes com tumor FFPE em relação ao estado mutacional dos pacientes, considerando ausência de mutação, presença de uma e presença de mais de uma mutação.

Na SLD, nenhuma variável foi associada significativamente a pior prognóstico; entretanto houve efeito marginal da LDH aumentada ($P= 0,07$), estadiamento ($P=0,05$) e presença de mutações de *ID3* (72% vs. 100% para aqueles sem mutação) ($P= 0,082$; teste Log-Rank) (Fig. 5.35).

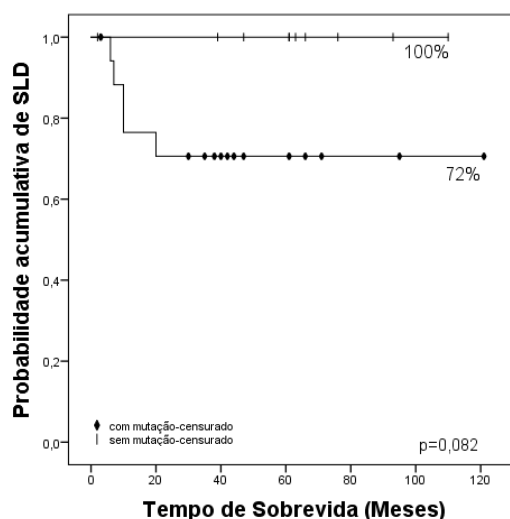


Figura 5.35: Curva de *Kaplan-Meier* para a sobrevida livre de doença (SLD) na coorte total de pacientes com tumor FFPE em relação à ausência ou presença de mutação em *ID3*

6. DISCUSSÃO

Considerando sua primeira descrição, há 60 anos, no continente africano (BURKITT 1958) e posteriormente em áreas externas, o linfoma de Burkitt possui uma epidemiologia bastante conhecida, além de representar um importante modelo de estudo em câncer, uma vez que pode possuir alterações em diversos níveis, cromossômico, e molecular (MAGRATH 2012, SLACK & GASCOYNE 2011), além de sua associação com fatores etiológicos externos, tais como a infecção pelo vírus EBV e a associação a condições imunológicas específicas (ROCHFORD *et al.* 2005). Sabe-se que a distribuição geográfica representa uma importante variável na epidemiologia dessa doença, que possui três variantes clínicas reconhecidas pela OMS, a endêmica, a esporádica e a associada à imunodeficiência (SWERDLOW 2008). O Brasil, assim como outros lugares do mundo em que a descrição epidemiológica não se encaixa nessas três variantes, parece encontra-se numa situação epidemiológica intermediária entre os subtipos endêmico, no qual a mediana de idade encontra-se em torno de 6 anos e a doença tem uma proporção de sexos de ~2:1 (masculino:feminino) e o subtipo esporádico, que acomete mais adolescentes e jovens adultos, com uma proporção de sexos de ~3-5 indivíduos do sexo masculino para cada uma do sexo feminino afetada (SWERDLOW 2008, MAGRATH 2012, KLUMB *et al.* 2004). Na nossa coorte de pacientes com tumor FFPE e aspirado de medula óssea, a mediana de idades variou de 8 a 10 anos respectivamente, e a frequência foi maior no sexo masculino, variando de ~3 a 6 meninos para cada menina afetada, dados estes que estão acordo com essa situação epidemiológica intermediária sugerida por alguns estudos no Brasil (KLUMB *et al.* 2004, HASSAN *et al.* 2008).

Em relação ao EBV, no presente estudo observamos uma frequência de associação de 48% em nossa coorte pediátrica de tumores de Burkitt. Estes valores estão de acordo com estudos prévios realizados no SE do Brasil, na década passada (KLUMB *et al.* 2004; HASSAN *et al.* 2008, QUEIROGA *et al.* 2008, PIZZA *et al.* 2008), indicando a persistência do patógeno como fator etio-patogênico de ~50% dos LB na nossa região.

Assim como a epidemiologia do LB, alguns fatores em associação a um prognóstico adverso já estão bem estabelecidos, e incluem idade mais elevada, doença disseminada, uma resposta ruim a terapia de indução, LDH elevado, e infiltração de MO

e SNC (FERRY 2006). Em nossa coorte total, alguns desses fatores, tais como estadiamento, altos níveis de LDH, e acometimento da MO estiveram associados a uma SG pior, como é observado amplamente na doença.

A marca genética do L/LB é a t(8;14)(q24;q32) ou uma das suas variantes, onde o *MYC* está rearranjado com as cadeias leves da imunoglobulina, *IGK*, no cromossomo 2 e *IGL*, no cromossomo 22 (SWERDLOW 2008, GREENOUGH & DAVE 2014). A t(8;14)(q24;q32) foi detectada em 4/7 pacientes da coorte com aspirado de MO e a t(2;8)(p12;q24) em 1/7 pacientes, por bandeamento G e FISH. A baixa resolução do bandeamento G, e algumas vezes a morfologia cromossômica, que pode variar de acordo com os pacientes, limita a detecção precisa de anormalidades cromossômicas, que assim, necessitam de ferramentas mais sensíveis para serem observadas. Geralmente a t(8;14) é de fácil visualização por bandeamento G, no entanto, o ponto de quebra nos cromossomos 8 e 14 pode sofrer variações importantes (SHIRAMIZU *et al.* 1991, GUTIÉRREZ *et al.* 1992), o que pode dificultar sua detecção por bandeamento G ou mesmo com o uso de FISH com sondas comerciais. Em um paciente (P103), a translocação só foi detectada após estudo com técnicas cito-moleculares, totalizando 5/7 dos pacientes de LLA-L3 com t(8;14). Em vista disso, a utilização de sondas caseiras de regiões menores e específicas pode auxiliar na definição desses casos. Um achado importante nesse estudo, diz respeito ao paciente P22, onde não foi observado rearranjo do *MYC* com a imunoglobulina, mas foram encontrados três sinais correspondentes ao *MYC*, levando à hipótese de que este gene estaria rearranjado. Com a aplicação de técnicas de citogenética molecular mais sensíveis, nós identificamos a origem deste sinal extra.

O rearranjo *IGH/MYC* foi observado em 77% dos pacientes da nossa coorte com tumores FFPE estudados por FISH, além de um paciente (P60), onde foi observado outro rearranjo de *MYC*, que não o *IGH/MYC*, que podemos inferir ser resultante de uma das translocações variantes encontradas no LB.

A classificação WHO incorporou o conceito de que ~10% dos pacientes com LB podem não apresentar o *MYC* rearranjado, considerando os rearranjos com os 3 genes de imunoglobulina que ele pode sofrer (SWERDLOW, 2016). Em 20% dos nossos pacientes com tumor FFPE estudados por FISH, o rearranjo *IGH/MYC*, resultante da t(8;14), não foi detectado, e esta porcentagem está em desacordo com a literatura. Entretanto, esta limitação pode estar relacionada ao tipo de sonda utilizado

no estudo, já que utilizamos uma sonda que detecta somente a t(8;14)(q24;q32). É importante ressaltar que em alguns casos é possível observar o rearranjo do *MYC* com outros alvos, utilizando apenas a sonda que utilizamos (*IGH/MYC/CEP8 dual color dual fusion*), quando se observa a quebra de um dos alelos através de um pequeno sinal extra vermelho, o que foi, inclusive, visto em um dos nossos pacientes (P60), como citado acima. Além disso, faz-se necessário considerar que a baixa qualidade das amostras FFPE, além do tempo de armazenamento destas amostras, pode ter influenciado nessa falha de detecção de outros rearranjos do *MYC* além da t(8;14) em nossos casos.

Na última década, uma diversidade de estudos tem mostrado que apesar de ser uma marca genética importante da doença, a translocação t(8;14)(q24;q32) não é essencial para a patogênese do L/LB, e que o *MYC* pode estar desregulado através de outros mecanismos biológicos que envolvem fatores além da regulação a nível cromossômico (ROSCHKE *et al.* 1997, RICHTER *et al.* 2012, CAMPO, 2012; SOLDINI & CAMPO, 2013). Nesse sentido, a desregulação do *MYC* já foi observada em pacientes apresentando ou não o rearranjo dele com uma das cadeias da imunoglobulina (LEUCCI *et al.*, 2008; ONNIS *et al.*, 2010), além da translocação t(8;14)(q24;q32) já ter sido detectada em células sanguíneas de indivíduos saudáveis (JANZ *et al.* 2003). Essas observações reforçam a ideia de que outros fatores, além do rearranjo do *MYC* com uma das cadeias da imunoglobulina, possam causar também sua desregulação, e mais, de que a translocação isolada não seja suficiente para desencadear a doença.

Neste contexto, um dos mecanismos que pode levar à desregulação do *MYC* em pacientes com LB, sem o rearranjo deste gene, é o controle pós transcricional através de microRNAs (LEUCCI *et al.* 2008, ONNIS *et al.* 2010). Além dos microRNAs, estudos de expressão gênica introduziram uma assinatura molecular para esta neoplasia incluindo casos sem o rearranjo do oncogene e diferenciando-a de outros linfomas de células B, e ela considera expressão diferenciada de *CD10* e *BCL2* para esses casos, além da expressão do *MYC* (HUMMEL *et al.* 2006, DAVE *et al.* 2006). Com base nessas premissas, conduzimos estudos de expressão no paciente P22, que não apresentou a t(8;14)(q24;q32), comparando-o com outros pacientes da nossa coorte com LB (P62, P63, P64, P65), com a t(8;14)(q24;q32) detectada através de FISH, a fim de verificar essas variáveis, para corroborar com seu diagnóstico clínico de LB. Com

relação aos níveis de expressão de genes celulares, encontramos níveis de expressão de *MYC* e *BCL2* similares tanto no paciente como no grupo de casos controle com LB. Com relação aos microRNAs, encontramos baixos níveis de expressão de miR155, miRLet7a, miRLet7b, miRLet7e no P22 e nos casos com L/LB, além de baixos níveis de miR150 e miR21, não só no P22, como em todos os controles utilizados. Os miR155 e Let7a, Let7b e Let7e, geralmente são regulados negativamente pelo *MYC*, superexpresso não só no P22, como nos casos controle com LB, o que explica os resultados que achamos. O miR9* também apresentou baixos níveis de expressão, comparáveis no P22 e nos pacientes controle com LB. O miR9* é geralmente encontrado negativamente expresso em pacientes sem a translocação envolvendo o *MYC* (LEUCCI *et al.* 2008). Além disso, é importante citar que investigamos por citogenética molecular rearranjos envolvendo o *BCL2* e o *BCL6*, que estão comumente envolvidos em alterações em outros LNH de células B, a fim de fazer um diagnóstico diferencial, e também excluímos qualquer anormalidade cromossômica envolvendo o cromossomo 11, que já foi associada a casos de L/LB sem o rearranjo do *MYC* (SALAVERRIA *et al.* 2011). Nossos achados corroboram para um perfil molecular no P22 similar ao perfil encontrado no LB e possibilita consideramos esse paciente como parte do grupo de pacientes com LB sem rearranjo do *MYC* (10%), incluso desde 2008 na classificação WHO. No paciente em questão, com a aplicação de sondas cromossômicas e gênicas específicas, também descrevemos, pela primeira vez, uma translocação nova envolvendo o cromossomo 8, a t(8;8), e uma cópia extra do *MYC* no L/LB, cuja expressão aumentada foi provada por estudos de expressão gênica, corroborando com a proposição de que essa cópia extra do gene, observada no cariótipo do paciente, estaria funcionalmente ativa. Uma peculiaridade interessante dessa criança foi a sua condição patológica genética, ataxia-telangiectasia (A-T), que está relacionada a um risco elevado de desenvolver malignidades, principalmente LNHS (SCHOENAKER *et al.* 2016), e apesar da associação com L/LB ser rara nessa condição, já foi sugerido que pacientes portadores de A-T podem apresentar rearranjos não usuais do *MYC*, o que provavelmente é causado pela instabilidade cromossômica global que esses pacientes possuem, o que poderia explicar esta translocação nova encontrada no estudo (SANDLUND *et al.* 2014).

Os protocolos de tratamento já são muito bem estabelecidos para o L/LB e geralmente levam a altas taxas de cura de até 90% na infância, grupo onde a doença

predomina (HUMMEL *et al.* 2006, WORCH *et al.*, 2013). A recorrência de recaída e óbito por LB é baixa, e nessa condição, esse desfecho desfavorável é visto em associação com fatores específicos no diagnóstico (FERRY, 2006). As anormalidades cromossômicas secundárias também podem ter papel no desfecho desfavorável desses pacientes e dentre elas há relatos importantes de associação cromossômica como possíveis fatores de mau prognóstico para os pacientes com LB pediátrico (LONES *et al.* 2004, ONCIU *et al.* 2006, POIREL 2009, TOUJANI *et al.* 2009, SHIFFMAN *et al.* 2011). Estudos citogenômicos tem mostrado que as anormalidades cromossômicas secundárias mais frequentes envolvem os cromossomos 1 e 13 (ONCIU *et al.* 2006, BOERMA *et al.* 2009, TOUJANI *et al.* 2009, SCHIFFMAN *et al.* 2011). O papel adverso das anormalidades cromossômicas envolvendo o cromossomo 13 já está bem estabelecido, no entanto, com relação ao cromossomo 1, o significado ainda é controverso (LONES *et al.*, 2004, ONCIU *et al.*, 2006; POIREL *et al.*, 2009, TOUJANI *et al.*, 2009). Uma vez que confirmamos a presença dessas alterações em crianças brasileiras, anteriormente apenas em aspirados de medula óssea (DE SOUZA *et al.* 2014), nós buscamos extrapolar aqui esses resultados para tumores FFPE. Além disso, a maioria dos estudos na literatura encontrou deleções no cromossomo 13 (LONES *et al.* 2004, TOUJANI *et al.* 2009, NELSON *et al.* 2010), diferente do nosso grupo que detectou apenas duplicações, envolvendo as mesmas regiões cromossômicas, ora reportadas nos estudos internacionais. Apesar do pequeno número de pacientes com tumor FFPE para os quais conseguimos obter resultados de hibridização, nós conseguimos reproduzir nossos achados anteriores, que também estão de acordo com o que a literatura vem reportando, e observamos anormalidades envolvendo a região 1q25 e a região 1q34 em 74% dos 19 pacientes em que conseguimos hibridização para essas regiões cromossômicas, e a duplicação do 13q foi a única alteração no cromossomo 13 encontrada na nossa coorte, confirmando nossos resultados anteriores. No entanto, não foi possível fazer uma associação significativa com o desfecho desses pacientes devido ao baixo número amostral ou pela indisponibilidade de dados clínicos para fazer as associações.

Uma frequência de 60% de anormalidades cromossômicas secundárias também foi reproduzida em nossa coorte de pacientes com aspirado de MO. Devido à complexidade das alterações encontradas por bandeamento G, nós refinamos estes cariótipos com técnicas de citogenética molecular, utilizando bandeamento

multicolorido. Uma observação interessante que surgiu durante o estudo desses pacientes foi que em todos onde conseguimos definir exatamente as anormalidades cromossômicas secundárias (P98, P101 e P103), essas anormalidades eram sempre duplicações de regiões cromossômicas distintas envolvendo outros cromossomos, caracterizando um cariótipo complexo, que passamos a considerar como trissomias parciais, visto que os pacientes possuíam, além do fragmento duplicado em um outro cromossomo, duas cópias normais dele nos cromossomos de origem.

Em geral, a grande maioria das alterações cromossômicas secundárias a t(8;14) ou variantes encontradas no L/LB são alterações no número de cópias (CNA), representadas por duplicações e perdas de regiões cromossômicas (LONES *et al.* 2009, NELSON *et al.* 2009, TOUJANI *et al.* 2009, SCHOLTYSIK *et al.* 2010). A adição ou perda de material cromossômico em um cariótipo parece resultar da seleção de células submetidas a não disjunção de um homólogo, contendo uma mutação específica que por sua vez acaba por conferir vantagem proliferativa a célula (ONODERA *et al.* 1992). A vantagem proliferativa gerada pela desregulação do *MYC* nas células portadoras do seu rearranjo com uma das cadeias da imunoglobulina poderia muito bem estar intrinsecamente ligada a um escape dos mecanismos de reparo de DNA, causado pela instabilidade genômica, que por sua vez já é sabidamente uma marca do processo carcinogênico, dando vantagem à formação dessas CNAs (NEGRINI *et al.* 2010, HANAHAN & WEINBERG 2011). Análises de genoma inteiro têm mostrado que muitas variações estruturais no DNA, observadas a nível cromossômico, não são eventos independentes, mas adquiridas através de eventos únicos, que são posteriormente seguidos por rearranjos complexos, através de mecanismos de formação de cariótipos complexos. Dentre esses mecanismos, a cromotripsis gera diversas quebras cromossômicas, que posteriormente, por erro de vias de reparo, resultam em uma reorganização dos fragmentos em ordem ou local incorreto, podendo gerar inclusive deleções, sendo essa série de eventos catastróficos para a célula, uma consequência de erros ocorridos durante o ciclo celular (YI & JU 2018). O papel ímpar exercido pelo *MYC* no controle do ciclo celular, nos leva a pensar que sua atividade descontrolada poderia de alguma forma estar relacionada ao aparecimento dessas variações estruturais, através da desregulação de vias de reparo de DNA, nos cariótipos dos pacientes com L/LB. Já foi visto que quando superexpresso, o *MYC* pode reduzir a resposta contínua ao reparo de DNA, reduzindo o reparo de quebras de fita dupla, que

teriam papel primordial no reparo das quebras ocorridas durante a cromotripsis (AMBROSIO *et al.* 2015). No entanto, somente estudos funcionais poderiam dar embasamento a esta hipótese e provar se o *MYC* também estaria exercendo esse papel no L/LB, de modo a favorecer o aparecimento dessas anormalidades cromossômicas secundárias.

A introdução de novas tecnologias moleculares de larga escala tem aberto um vasto leque de possibilidades no campo da pesquisa científica, e nesse âmbito, elas têm permitido acessar informações no genoma de pacientes com tumores de Burkitt que podem responder questionamentos que até então intrigavam os cientistas, dentre eles a questão do rearranjo do *MYC* e da infecção pelo EBV serem fatores importantes, mas não suficientes, para explicar o comportamento do tumor (MAGRATH, 2012, GREENOUGH & DAVE 2014). Os mais recentes estudos de sequenciamento de nova geração promoveram um panorama valioso e interessante acerca de alterações genômicas em LNH de células B, e introduziram novos participantes na biologia da doença, que parecem estar relacionados à patogênese do L/LB (LOVE *et al.* 2012, RICHTER *et al.*, 2012; SCHMITZ *et al.* 2012, CAMPO 2012; SOLDINI & CAMPO 2013). Nesse sentido, dentre outros genes implicados em vias já conhecidas do LB, um achado surpreendente foi a recorrência de mutações envolvendo os genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3* (LOVE *et al.* 2012, RICHTER *et al.* 2012, SCHMITZ *et al.* 2012). Love e colaboradores (2012), dentre 70 genes recorrentemente mutados no LB, identificaram mutações no gene *ID3* em 34% da sua coorte de LB. No mesmo ano, outro grupo encontrou mutações no *TCF3* ou no *ID3* em 70%, 67% e 40% de casos de LBs, LB-HIV+ e LBe, respectivamente, sendo a frequência em *ID3* (58%) maior do que em *TCF3* (11%) e em 13% da sua coorte, ambos os genes estavam mutados concomitantemente (SCHMITZ *et al.* 2012). O *CCND3*, em que já se havia encontrado mutações ativadoras em diferentes tipos de LNH de células B (SONG *et al.* 2004, CATO *et al.* 2011) e que é um alvo direto do *TCF3*, foi encontrado mutado na série de Schmitz e colaboradores em 38% dos LBs, 67% dos LB-HIV+ e 1,8% dos LBe. O terceiro estudo que corroborou com os anteriores, acrescentando esses genes como potenciais participantes da patogênese do LB, identificou mutações em *ID3* em 67% da sua coorte (RICHTER *et al.* 2012). Juntos, esses estudos, que também promoveram experimentos funcionais, provando a interação do *ID3* com o *MYC*, propõem que a alteração na função de *ID3* seria um mecanismo chave na linfomagenese do LB,

independente da t(8;14)(q24;q32), considerando que foram encontradas mutações neste gene em todos os subtipos geográficos do LB e em casos de LB sem a translocação.

É importante notar que todos os estudos acima envolveram séries heterogêneas de pacientes, com relação à idade. Somente em 2016, começou-se a separar as séries para identificar diferenças nesse perfil mutacional entre as crianças e adultos, onde foi observada uma frequência maior de mutações em *ID3* em adultos e uma distribuição similar das mutações em *CCND3* para as duas faixas etárias, em uma coorte onde 87% dos pacientes apresentaram mutações em *ID3* e/ou *CCND3*, Esse estudo não encontrou mutações em *TCF3*, o que pode ter ocorrido em vista do seu número limitado de apenas 24 pacientes (HAVELANGE *et al.*, 2016). O panorama dessas mutações no LB pediátrico foi melhor acessado em outro estudo em uma coorte estritamente pediátrica, onde a frequência de mutações em *ID3* foi de 78%, 13% em *TCF3* e 36% em *CCND3* (ROHDE *et al.* 2017).

Ao acessar o panorama dessas mutações na nossa população, que inclui pacientes com L/LB em uma situação epidemio-geográfica intermediária entre os subtipos LBe e LBs, nos quais estas mutações já foram descritas, encontramos uma frequência de mutações possivelmente patogênicas no *ID3* em 67% dos pacientes, no *TCF3* em 18% e no *CCND3* em 26% dos pacientes. Desta forma, conseguimos reproduzir dados bastante similares à literatura em relação ao grupo completo de LB estudado, para os genes *ID3* e *TCF3*. As mutações no gene *CCND3* ocorreram em uma frequência menor em nosso estudo. É possível que por problemas de sequenciamento, em parte por eficiência dos iniciadores, tamanho elevado dos fragmentos alinhado a qualidade do material tumoral utilizado, tivemos perda de amplificabilidade.

Para definir se as diferenças com os dados previamente publicados são devido a um efeito do pequeno número amostral, pois foi o gene com menor taxa de sucesso na amplificação, ou refletem uma situação biológica particular, são necessários novos estudos incluindo uma coorte independente e maior.

Nós incluímos pacientes adultos a fim de comparar as frequências das mutações com o grupo pediátrico e encontramos uma frequência maior de mutações no grupo pediátrico que nos adultos. Entretanto, o baixo número de adultos incluídos e a falta de significação estatística não permite firmar esta associação. Apenas um estudo, com uma coorte de 24 pacientes, fez essa comparação, onde o *ID3* esteve mutado em uma

proporção maior em adultos e não houve diferença de distribuição de mutações em *CCND3* nos dois grupos (HAVELANGE *et al.* 2016).

Quando analisamos a frequência de mutações em relação à idade do grupo pediátrico observamos uma tendência à acumulação de mutações em *ID3* em crianças de idade menor (mediana de 5 anos). Este resultado está de acordo com vários outros estudos, que descrevem associação de mutações do *ID3* com idades menores (RICHTER *et al.* 2012, GEBAUER *et al.* 2013, ROHDE *et al.* 2017). Já para o *CCND3* encontramos uma acumulação estatisticamente significativa de mutações em crianças mais velhas, onde a mediana de idade de crianças com a mutação foi de 11 anos enquanto nas sem mutação foi de 5 anos. Essa relação não foi descrita previamente em outras séries estudadas e é necessário ampliar o estudo para entender se existem fatores de risco para essas mutações associados a idades maiores e se há um contínuo entre adolescentes e adultos na prevalência delas.

Em relação aos parâmetros clínicos, só a presença de mutações no gene *ID3* mostrou associações. Houve um efeito marginal entre LDH aumentado e mutações no *ID3*. Na literatura, só houve associação significativa entre uma doença em estádios mais avançados e a presença de mutações em *ID3*, assim como uma tendência de associação com estágios mais avançados em pacientes com mutações em *CCND3* (ROHDE *et al.* 2012).

De maneira significativa, observamos que pacientes com mutação em *ID3* tiveram uma SG menor, em relação aos pacientes sem a presença de mutações nesse gene, e esse resultado foi observado também como uma tendência no grupo pediátrico. As mutações no *ID3* também tiveram impacto negativo na probabilidade de recaída ou progressão (SLD), porém com associação marginal. Esses resultados são os primeiros na literatura a apontar para esse efeito, sendo que um estudo com coorte estritamente pediátrica não encontrou relação entre o desfecho clínico e a presença de mutações (ROHDE *et al.* 2017), enquanto que um estudo prévio a ele encontrou um desfecho mais favorável em pacientes com mutações em *ID3*, numa coorte heterogênea (RICHTER *et al.* 2012).

Ainda neste estudo, foi observado um sinergismo das mutações em relação ao desfecho clínico, em que os pacientes que eram portadores de mais de uma mutação (em genes distintos ou no mesmo gene) mostraram uma sobrevida significativamente menor que àqueles sem mutação ou com apenas uma mutação. Este resultado põe de relevo a

importância da perda de funcionalidade da via ID3-TCF3-CCND3 na patogênese da doença, como indicado em estudos anteriores; além disso, os resultados aqui apresentados, se confirmados em séries maiores e independentes, sugerem que pelo menos as mutações no *ID3* e um potencial sinergismo na via, podem estar envolvidos na resposta à terapia no linfoma de Burkitt.

Em relação aos modelos de patogênese molecular associado às mutações estudadas, quase todas as mutações em *ID3* reportadas em estudos anteriores foram encontradas no domínio altamente conservado da proteína HLH, sendo a maioria mutações do tipo *nonsense* e *frameshift*, e mutações fora do domínio foram associadas a pelo menos uma mutação dentro do domínio, culminando em uma perda de função da proteína ID3 (LOVE *et al.* 2012; RICHTER *et al.* 2012). Foi demonstrado experimentalmente que estas mutações alteram a função inibitória do *ID3* sob o *TCF3*, podendo levar a um crescimento e proliferação descontrolada de células (LOVE *et al.* 2012, ROHDE *et al.* 2012), sugerindo que o *ID3* teria um papel supressor no LB. Dentre as mutações encontradas no gene *ID3* no nosso estudo, apenas 29% (9/31) eram mutações do tipo *nonsense* ou *frameshift* e 16% (5/31) das mutações fora do domínio HLH estiveram associadas a pelo menos uma mutação dentro desse domínio. Em contraparte, descrevemos um cluster novo, na posição 5' do motivo HLH, cujo mecanismo ainda não se conhece, mas onde a alta frequência de duplas e triplas mutações dentro desse *cluster* poderia explicar a inibição da função gênica do *ID3*.

Na análise bioquímica preliminar das mutações encontradas na nossa coorte, encontramos uma assinatura indicativa da ação da AID na origem das mutações (assinatura 2 COSMIC). Isto está de acordo com um linfoma originado no centro germinativo, com o processo de hipermutação somática ativado (SHAFFER *et al.* 2002) e cujo evento patogênico inicial (translocação de *MYC*) já foi demonstrado ser mediado pela ação da AID (RAMIRO *et al.* 2004; DE YÉBENES *et al.* 2006). Os estudos visando identificar os motivos moleculares subjacentes às mutações (ÁLVAREZ-PRADO *et al.* 2018), assim como a clonagem do fragmento de *ID3* correspondente ao *cluster* 5' encontram-se em curso e poderão elucidar aspectos interessantes dos mecanismos moleculares deste gene no LB.

Considerando-se que os genes *ID3* e *TCF3* estão mutados em ~70% dos casos de L/LB, como descrito previamente e confirmado neste trabalho, e uma vez que os estudos feitos até o momento têm mostrado que ele é de fato o principal alvo de

mutações em termo de frequência, além de, junto com o *TCF3*, já ter sido incorporado à nova revisão da classificação WHO (SWERDLOW *et al.* 2016), consideramos estes genes como bons biomarcadores de diagnóstico.

O diagnóstico diferencial entre LB/B e outros linfomas B agressivos é difícil em casos particulares através de métodos padrões de diagnóstico, e um teste para identificar essas mutações em pacientes com L/LB poderia facilitar o diagnóstico diferencial. Com as novas categorias incorporadas a partir da descrição de casos *MYC*- (LEUCCI *et al.* 2008, SWERDLOW *et al.* 2008), LB-*MYC*-,del11q+ (GONZALES-FARRE *et al.* 2019, WAGENER *et al.* 2019) e linfomas *double hit* (KHELFA *et al.* 2017, MERRON & DAVIES 2018), a validação de novos biomarcadores *MYC* independentes se tornam valiosas ferramentas para o diagnóstico diferencial destas categorias (GEBAUER *et al.* 2013). Mais ainda, se os nossos resultados puderem ser replicados em séries maiores envolvendo grupos bem definidos de pacientes com L/LB agrupados homogeneamente de acordo com diferentes faixas etárias, o *ID3* poderia ser considerado um biomarcador com utilidade prognóstica.

Além disso, sugere-se que devido à alta frequência de pacientes com mutações nessa via, ela pode representar um alvo interessante de terapia. Casos sem a mutação direta de genes na via *ID3*, *TCF3* e *CCND3* poderiam ainda ser afetados pela perda focal do *ID3* ou mutações em vias de sinalização que agem funcionalmente em sinergia com a via *ID3*-*TCF3*-*CCND3*. Uma evidencia promissora da utilização de terapias alvo para esses pacientes seriam inibidores de CDK4/6, que já estão disponíveis, e já mostraram eficiência na redução de tumores em modelos murinos de L/LB (SCHMITZ *et al.* 2012, ROHDE *et al.* 2012).

Em suma, neste trabalho nós corroboramos com a literatura com mais casos de L/LB com anormalidades cromossômicas secundárias a t(8;14)(q24;q32) e variantes em pacientes com tumor *in situ* e acometimento de MO, e encontramos um padrão anormalidades envolvendo trissomias parciais em cariótipos complexos, sugerindo uma possível participação do *MYC* na formação desses cariótipos, através da desregulação de vias de reparo de DNA. Além disso, realizamos a primeira descrição da frequência e impacto clínico de mutações envolvendo os genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3* em crianças da nossa região geográfica, onde pela primeira vez foi observada uma associação entre a presença de mutações no gene *ID3* e uma probabilidade menor de sobrevida global.

7. CONCLUSÃO

- 1) A análise das características demográficas do grupo de pacientes pediátricos estudados mostrou que o linfoma de Burkitt acometeu crianças e adolescentes com uma mediana de idade de 8 anos em uma proporção aproximadamente duas vezes maior nos pacientes de sexo masculino. Já os pacientes pediátricos com LLA-L3 apresentaram uma mediana maior, de 10 anos de idade, e uma proporção maior também no sexo masculino. A maioria da coorte apresentou doença em estágio avançado, onde 67% apresentaram os estádios clínicos III/IV, e compatível com esse achado, 69% da coorte apresentou níveis de LDH acima dos esperados. As descrições clínico-demográficas do LB dos nossos pacientes vai ao encontro da idéia postulada sobre os pacientes brasileiros terem uma apresentação de doença com características intermediárias entre o LB endêmico e o LB esporádico.

- 2) Na coorte desse estudo, fatores, já sabidamente associados com um prognóstico adverso, incluindo estadiamento, acometimento da MO e altos níveis séricos de LDH foram associados a uma sobrevida global pior.

- 3) Através da combinação de técnicas de bandeamento G, FISH e badeamento multicolorido, a t(8;14) foi detectada em aproximadamente 72% dos pacientes cujo aspirado de medula óssea foi estudado, a t(8;22) em 14% e um paciente apresentou uma heterogeniedade de rearranjo do *MYC* primeiramente reportada neste trabalho, envolvendo 3 cópias do gene, sem fusão com nenhuma cadeia da imunoglobulina. Esses dados são comparáveis ao que a classificação WHO propõe para o diagnóstico citogenético de L/LB.

- 4) Em 80% dos pacientes deste estudo em que foi possível estudar seus tumores FFPE, foi detectado rearranjo do *MYC*, sendo a fusão *IGH/MYC* em 23 pacientes e um rearranjo do *MYC*, possivelmente uma variante da t(8;14) em um paciente. No restante dos pacientes (20%), a fusão *IGH/MYC* não foi detectada, no entanto, a limitação do uso apenas da sonda específica para a fusão em questão, pode ter

subestimado a presença de rearranjos do *MYC* com as cadeias leves da imunoglobulina.

- 5) Em um paciente deste estudo, P22, sem a $t(8;14)(q24;q32)$ ou variantes, estudos de expressão gênica dos genes celulares *MYC* e *BCL2* e dos micro RNAs miRLet7a, miRLet7b, miRLet7e, miR9*, miR21, miR150 e miR155 corroboraram com o diagnóstico de L/LB deste paciente. Além disso, estudos utilizando bandeamento multicolorido possibilitaram descrever uma alteração nova no L/LB, a $t(8;8)$, com a presença no cariótipo de 3 cópias do gene *MYC*.
- 6) A frequência de anormalidades cromossômicas secundárias envolvendo as regiões cromossômicas 1q25 e 13q34 foi de 74% nos pacientes pediátricos cujos tumores FFPE foram estudados por FISH e em aproximadamente 60% dos pacientes estudados através dos seus aspirados de medula óssea. Esses dados estão de acordo com a literatura acerca da frequência de anormalidades cromossômicas secundárias no L/LB e refletem o panorama encontrado anteriormente pelo nosso grupo. No entanto não foi possível fazer uma associação significativa com o desfecho clínico desses pacientes.
- 7) Em relação ao vírus EBV, no presente estudo, observamos uma frequência de associação com o diagnóstico de LB em 48% da nossa coorte pediátrica, o que está de acordo com estudos anteriores realizados na década passada no sudeste do Brasil, e isso indica a persistência do patógeno como fator etio-patogênico de aproximadamente metade dos LB da nossa região geográfica. Em 84% da coorte pediátrica houve infecção com o tipo 1 do vírus, o tipo 2 foi encontrado em 12% e um paciente pediátrico apresentou co-infecção dos tipos 1 e 2.
- 8) Considerando nossa coorte de pacientes total cujos tumores FFPE foram estudados, incluindo crianças e adultos, nós encontramos mutações possivelmente patogênicas nos genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3* em 67%, 18% e 26%, respectivamente, reproduzindo o que a literatura tem observado em relação ao estado mutacional dos

genes *ID3* e *TCF3* no L/LB. A frequência menor observada para o gene *CCND3* precisa ser confirmada em um número amostral maior, a fim de confirmar se refletem uma condição biológica particular da nossa população, ou se só refletiu o pequeno número amostral utilizado para o estudo desse gene.

- 9) Em relação as associações de parâmetros clínicos e presença de mutações nos genes *ID3*, *TCF3* e *CCND3*, nosso estudo mostrou pela primeira vez que pacientes com mutações em *ID3* tiveram uma sobrevida global menor, em relação aos pacientes sem a mutação. Essa associação foi observada como uma tendência também no grupo pediátrico. Além disso, foi observada uma associação marginal entre a presença de mutações no *ID3* e a probabilidade de recaída ou progressão da doença.

8. REFERENCIAS

ÁLVAREZ-PRADO, Á. F.; PÉREZ-DURÁN, P.; PÉREZ-GARCÍA, A.; *et al.* A broad atlas of somatic hypermutation allows prediction of activation-induced deaminase targets. *J Exp Med*, v. 215(3), p. 761-71, mar 2018.

AMBROSIO, S.; AMENTE, S.; NAPOLITANO, G.; *et al.* *MYC* impairs resolution of site-specific DNA double-strand breaks repair. *Mutat Res*, v. 774, p.6-13, abr 2015.

AQUINO, G.; MARRA, L.; CANTILE, M.; *et al.* *MYC* chromosomal aberration in differential diagnosis between Burkitt and other aggressive lymphomas. *Infect Agent Cancer*, v. 8(1), p. 37, set. 2013.

BOERMA, E. G.; SIEBERT, R.; KLUIN, P. M.; *et al.* *Translocations involving 8q24 in Burkitt lymphoma and other malignant lymphomas: a historical review of cytogenetics in the light of today's knowledge.* *Leukemia*, v. 23(2), p. 225-34, fev 2009.

BOWMAN, P. W.; SHUSTER, J. J.; COOK, B.; *et al.* *Improved survival for children with B-cell acute lymphoblastic leukemia and stage IV small noncleaved-cell lymphoma: a pediatric oncology group study.* *J Clin Oncol*, v. 14(4), p. 1252-61, abr. 1996.

BOXER, L. M.; DANG, C. V. *Translocations involving c-myc and c-myc function.* *Oncogene*, v. 20, n. 40, p. 5595-610, set. 2001.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A. *et al.* *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.* *Clin Chem*, v. 55, n. 4, p. 611-22, abr 2009.

BURKITT D. *A sarcoma involving the jaws in African children.* *Br J Surg*, v. 46(197), p.218-23, nov 1958.

BURKHARDT, B.; OSCHLIES, I.; KLAPPER, W.; *et al.* *Non-Hodgkin's lymphoma in adolescents: experiences in 378 adolescent NHL patients treated according to pediatric NHL-BFM protocols.* Leukemia, v. 25(1), p.153-60, jan 2011.

BURMEISTER, T.; SCHWARTZ, S.; HORST, H. A.; *et al.* *Molecular heterogeneity of sporadic adult Burkitt-type leukemia/lymphoma as revealed by PCR and cytogenetics: correlation with morphology, immunology and clinical features.* Leukemia, v. 19, p. 1391–8, ago 2005.

CAMPO, E. *New pathogenic mechanisms in Burkitt lymphoma.* Nat Genet, v. 44(12), p. 1288-9, dez 2012.

CATO, M. H.; CHINTALAPATI, S. K.; YAU, I. W.; *et al.* *Cyclin D3 is selectively required for proliferative expansion of germinal center B cells.* Mol Cell Biol, v. 31(1), p.127-37, jan 2011.

CHEN, J.; BYRNE, G. E., JR.; LOSSOS, I. S. *Optimization of RNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded lymphoid tissues.* Diagn Mol Pathol, v. 16, n. 2, p. 61-72, jun 2007.

CHOI SJ, JUNG SW, HUH S, CHO H, KANG H. Phylogenetic comparison of Epstein-Barr virus genomes. J Microbiol, v. 56(8), p.525-533, ago 2018.

CORREIA, S.; PALSER, A.; ELGUETA KARSTEGEL C.; *et al.* *Natural Variation of Epstein-Barr Virus Genes, Proteins, and Primary MicroRNA.* J Virol. v. 91(15), pii: e00375-17, jul 2017.

CRAWFORD, D. H. *Biology and disease associations of Epstein-Barr virus.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, v.356(1408), p.461-73, abr 2001.

DANG, C. V. *MYC on the path to cancer*. Cell. v.149(1), p.22-35, mar 2012.

DAVE, S. S.; FU, K.; WRIGHT, G. W.; *et al.* *Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma*. N Engl J Med, v. 354(23), p. 2431-42, jun 2006.

DE SOUZA, M.T.; MKRTCHYAN, H.; HASSAN, R.; *et al.* *Secondary abnormalities involving 1q or 13q and poor outcome in high stage Burkitt leukemia/lymphoma cases with 8q24 rearrangement at diagnosis*. International Journal of Hematology, v. 93(2), p.232-236, jan 2011.

DE SOUZA, M. T.; AMARAL B. A. S.; BARROS J. E. X. S.; *et al.* *Classical and molecular cytogenetic studies revealed cryptic chromosomal abnormalities and heterogeneity of IGH/MYC gene fusion in Brazilian childhood Burkitt Lymphoma cases*. In: Fourth International Symposium on Childhood, Adolescent and Young Adult Non-Hodgkin's Lymphoma, 2012, New York. British Journal of Haematology, v. 159. p. 56-7, nov 2012.

DE SOUZA, M. T.; HASSAN, R.; LIEHR, T.; *et al.* *Conventional and molecular cytogenetic characterization of Burkitt lymphoma with bone marrow involvement in Brazilian children and adolescents*. Pediatr Blood Cancer, v. 61(8). p.1422-6, ago 2014.

DE-THÉ, G. *Epidemiology and nature of the association between herpesviruses (EBV and herpes simplex) and several human tumors*. Recent results. Bull Cancer. v. 63(3), p. 417-26, jul-set 1976.

DE YÉBENES, V. G.; RAMIRO, A. R. *Activation-induced deaminase: light and dark sides*. Trends Mol Med, v. 12(9), p. 432-9, set 2006.

DIMITRAKOPOULOS, I. P. K.; KATOPODI, T.; IORDANIDIS, F.; *et al.* *Burkitt's lymphoma with loss of the long arm of chromosome 1*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics, v. 103, n. 5, p. 42-47, mai 2007.

DOZZO, M.; CAROBOLANTE, F.; DONISI, P. M.; *et al.* *Burkitt lymphoma in adolescents and Young adults: management challenges*. Adolesc Health Med Ther, v. 8, p. 11-29, dez 2016.

DUNLEAVY, K.; LITTLE, R. F.; WILSON, W. H. *Update on Burkitt Lymphoma*. Hematol Oncol Clin North Am, v. 30(6), p. 1333-43, dez. 2016.

EPSTEIN, M. A.; ACHONG, B. G.; BARR, Y. M. *Virus Particles In Cultured Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma*. Lancet, v.1(7335), p.702-3, mar 1964.

FERREIRA, J. M. O.; KLUMB, C. E.; REIS, R. S. *Lymphoma subtype incidence rates in children and adolescents: First report from Brazil*. Cancer Epidemiol, v. 36(4), 221-6, Ago 2012.

FERRY, J. A. *Burkitt's lymphoma: clinicopathologic features and differential diagnosis*. Oncologist, v.11, n. 4, p.375-83, abr. 2006.

GANDHI, M. K. *Epstein-Barr virus-associated lymphomas*. Expert Rev Anti Infect Ther, v. 4(1), p.77-89, fev. 2006.

GARCIA, J. L.; HERNANDEZ, J. M.; GUTIÉRREZ, N. C.; *et al.* *Abnormalities on 1q and 7q are associated with poor outcome in sporadic Burkitt's lymphoma. A cytogenetic and comparative genomic hybridization study*. Leukemia. v. 17(10), p. 2016-24, out. 2003.

GEBAUER, N.; BERNARD, V.; FELLER, A. C.; *et al.* *ID3 mutations are recurrent events in double-hit B-cell lymphomas.* Anticancer Res, v. 33(11), p. 4771-8, nov 2013.

GIULINO-ROTH, L.; GOLDMAN, S. *Recent molecular and therapeutic advances in B-cell non-Hodgkin lymphoma in children.* Br J Hematol, v. 173, 531-44, mai 2015.

GOD, J. M.; HAQUE, A. *Burkitt lymphoma: pathogenesis and immune evasion.* J Oncol., 14 pages, out 2010

GONZALEZ-FARRE, B.; RAMIS-ZALDIVAR, J. E.; SALMERON-VILLALOBOS, J.; *et al.* *Burkitt-like lymphoma with 11q aberration: A germinal center derived lymphoma genetically unrelated to Burkitt lymphoma.* Haematologica, *in press*, fev 2019.

GREENOUGHT, A; DAVE, S. S. *New clues to the molecular pathogenesis of Burkitt lymphoma revealed through next-generation sequencing.* Curr Opin Hematol, v. 21(4), p. 326-32, jul. 2014.

GUTIÉRREZ, M. I.; BHATIA, K.; BARRIGA, F.; *et al.* *Molecular epidemiology of Burkitt's lymphoma from South America: differences in breakpoint location and Epstein-Barr virus association from tumors in other world regions.* Blood, v. 79(12), p.3261-6, jun 1992.

HALL, T. *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.* Nucl. Acids. Symp. Ser., v. 41, p. 95–8, 1999.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, v. 144(5), p. 646-74, mar 2011.

HARTMANN, E. M.; OTT, G.; ROSENWALD, A. *Molecular biology and genetics of lymphomas*. Hematol Oncol Clin North Am, v. 22(5), p. 807-23, out 2008.

HASSAN, R. WHITE, L. R.; STEFANOFF, C. G.; *et al.* *Epstein-Barr virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma*. Diagnostic Pathology, v. 1, p. 17, ago 2006.

HASSAN, R.; FELISBINO, F.; STEFANOFF, C. G.; *et al.* *Burkitt lymphoma/leukaemia transformed from a precursor B cell: clinical and molecular aspects*. European Journal of Haematology, v. 80, n. 3, p. 265-70, nov 2008.

HAVELANGE, V.; PEPERMANS, X.; AMEYE, G.; *et al.* Genetic differences between paediatric and adult Burkitt lymphomas. Br J Haematol, v. 173(1), p.137-44, abr 2016.

HECHT, J. L.; ASTER, J. C. *Molecular biology of Burkitt's lymphoma*. J Clin Oncol, v. 118(21), p. 3707-21, nov 2000.

HUANG, H.; LIU, Z. L.; ZHANG, S. H. *et al.* *Clinicopathological study of sporadic Burkitt lymphoma in children*. Chin Med J, v. 128(4), p. 510-4, fev 2015.

HUMMEL, M.; BENTINK, S.; BERGER, H.; *et al.* *A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling*. N Engl J Med, v. 354(23), p.2419-30, jun 2006.

HUNGERFORD, D. A. *Leukocytes cultures from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic (KCL)*. Stain Technology, v. 40(6), p. 333-8, nov 1965.

JANZ, S.; POTTER, M.; RABKIN, C. S. *Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals*. *Genes Chromosomes Cancer*, v. 36(3), p.211-23, mar 2003.

JAWHAR, N. M. *Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool*. *Ann Saudi Med.*, v. 29(2), p.123-7, mar-abr. 2009.

KHANIM, F.; YAO, Q. Y.; NIEDOBITEK, G.; *et al.* *Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations*. *Blood*, v. 88, p.3491–501, nov 1996.

KHELFA, Y.; LEBOWICZ, Y.; JAMIL, M. O. *Double-Hit Large B Cell Lymphoma*. *Curr Oncol Rep*. v. 19(11), p. 74, set 2017.

KELEMEN. K.; BRAZIEL, R. M.; GATTER, K.; *et al.* *Immunophenotypic Variations of Burkitt Lymphoma*. *Am J Clin Pathol*, v.134, p.127-138, jul 2010.

KLUMB, C. E.; SCHRAMM, M. T.; DE RESENDE, L. M.; *et al.* *Treatment of Children with B-cell Non-Hodgkin's Lymphoma in Development Countries: The experience of a single center in Brazil*. *J Ped Hematol Oncol*, v. 28(7), p. 432-468, jul 2004.

KLUMB, C. E.; HASSAN, R.; DE OLIVEIRA, D. E.; *et al.* *Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil*. *Int J Cancer*, v.108(1), p.66-70, jan 2011.

KRIJGSMAN, O.; ISRAELI, D.; HAAN, J. C.; *et al.* *CGH arrays compared for DNA isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded material*. *Genes Chromosomes Cancer*, v. 51(4), p. 344-52, abr 2012.

LENZE, D.; LEONCINI, L.; HUMMEL, M. *et al.* *The different epidemiologic subtypes of Burkitt lymphoma share a homogenous micro RNA profile distinct from diffuse large B-cell lymphoma.* Leukemia, v. 25(12), p. 1869-76, dez. 2011.

LEUCCI, E.; COCCO, M.; ONNIS, A. *et al.* *MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenic mechanism involving miRNA deregulation.* J Pathol, v. 216, p.440-50, dez 2008.

LIEHR, T.; CLAUSSEN, U. *Current developments in human molecular cytogenetic techniques.* Curr Mol Med, v. 2(3), p. 283-97, mai 2002.

LONES, M. A.; SANGER, W. G.; LE BEAU, M. M.; *et al.* *Chromosome abnormalities may correlate with prognosis in Burkitt/Burkitt-like lymphomas of children and adolescents: a report from Children's Cancer Group Study CCG-E08.* J Pediat Hematol Oncol, v. 26(3), p. 169-78, mar 2004.

LOVE, C.; SUN, Z.; JIMA, D.; *et al.* *The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma.* Nat Genet, v.44(12), p.1321-5, dez 2012.

MAGLUTA, E. P. S.; KLUMB, C. E. *Resistência ao tratamento no linfoma de Burkitt: Associação com mutações específicas no gene TP53?* Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 30, n. 1, p. 41-46, 2008.

MAGRATH, I. *The pathogenesis of Burkitt's lymphoma.* Adv Cancer Res, v. 55, p.133-270, 1990.

MAGRATH, I. *Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma.* Br J Haematol, v. 156(6), p.744-56, mar 2012.

MAY, P. C.; FOOT, N.; DUNN, R.; *et al.* *Detection of cryptic and variant IGH-MYC rearrangements in high-grade non-Hodgkin's Lymphoma by fluorescence in situ*

hybridization: implications for cytogenetic testing. Cancer Genetics and Cytogenetics, v. 198, n. 1, p. 71-75, abr. 2010.

McGOWAN-JORDAN, J.; SIMONS, A.; SCHMID, M. *ISCN 2016: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* Basel: Karger; 2016.

MERRON, B.; DAVIES, A. *Double hit lymphoma: How do we define it and how do we treat it?* Best Pract Res Clin Haematol, v. 31(3), p. 233-240, set 2018.

MILES, R. R.; SHAH, R. K.; FRAZER, J. K. *Molecular genetics of childhood, adolescent and young adult non-hodgkin lymphoma.* Br J Haematol, v. 173, p. 582-96, mai 2016.

MINARD-COLIN, V.; BRUGIÈRES, L.; REITER, A.; *et al.* *Non-Hodgkin Lymphoma in Children and Adolescents: Progress Through Effective Collaboration, Current Knowledge, and Challenges Ahead.* J Clin Oncol, v. 33(27), p. 2963-74, set 2015.

MOLYNEAUX, E.; ROCHFORD, R.; GRIFFIN, B.; *et al.* *Burkitt's Lymphoma.* Lancet, v. 379, p. 1234-1244, mar 2012.

MURPHY, S. B. *Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults.* Semin Oncol, v. 7, p. 332-9, set 1980.

NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. *Genomic instability-an evolving hallmark of cancer.* Nat Rev Mol Cell Biol, v. 11(3), p. 220-8, mar 2010.

NELSON, M.; PERKINS, S. L.; DAVE, B. J.; *et al.* *An increased frequency of 13q deletions detected by fluorescence in situ hybridization and its impact on survival in*

children and adolescents with Burkitt lymphoma: results from the Children's Oncology Group study CCG-5961. Br J Haematol, v. 148(4), p. 600-10, fev 2010.

NGUYEN, L.; PAPENHAUSEN, P.; SHAO, H. *The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects.* Genes, v. 8(4), pii: E116, abr 2017.

ONCIU, M.; SCHLETTE, E.; ZHOU, Y.; *et al.* *Secondary chromosomal abnormalities predict outcome in pediatric and adult high-stage Burkitt lymphoma.* Cancer, v. 107, n. 5, p. 1084-1092, set. 2006.

ONNIS, A.; DE FALCO, G.; ANTONICELLI, G.; *et al.* *Alteration of microRNAs regulated by c-Myc in Burkitt Lymphoma.* PloS One, v. 23, p. 909-20, set 2010.

ONODERA, N.; MCCABE, N. R.; RUBIN, C. M. *Formation of a hyperdiploid karyotype in childhood acute lymphoblastic leukemia.* Blood, v. 80(1), p. 203-8, jul 1992.

PALSER, A. L.; GRAYSON, N. E.; WHITE, R. E.; *et al.* *Genome diversity of Epstein-Barr virus from multiple tumor types and normal infection.* J Virol, v. 89(10), p.5222-37, mai 2015.

PATTE, C.; AUPERIN, A.; MICHON, J.; *et al.* *The Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique LMB89 protocol: highly effective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia.* Blood, v. 97; p. 3370–3379, jun 2001.

PATTE C. *Treatment of mature B-ALL and high grade B-NHL in children.* Best Pract Res Clin Haematol, v. 15(4), p.695-711, 2002.

PERKINS, A. S.; FRIEDBERG, J. W. *Burkitt Lymphoma in Adults*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, p. 341-8, 2008.

PIZZA, M.; BRUNIERA, P.; LUPORINI, S. M.; *et al.* *Detection of Epstein-Barr virus in children and adolescents with Burkitt's lymphoma by in situ hybridization using tissue microarrays*. Hematology, v. 13(2), p.114-8, abr 2008.

POIREL, H. A.; CAIRO, M. S.; HEEREMA, N. A.; *et al.* *Specific cytogenetic abnormalities are associated with a significantly inferior outcome in children and adolescents with mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of the FAB/LMB 96 international study*. Leukemia, v. 23(2), p. 323-31, fev. 2009.

QUEIROGA, E. M.; GUALCO, G.; WEISS, L. M.; *et al.* *Burkitt lymphoma in Brazil is characterized by geographically distinct clinicopathologic features*. Am J Clin Path, v. 130, n. 6, p. 946-56, dez. 2008.

RAMIRO, A. R.; JANKOVIC, M.; EISENREICH, T.; *et al.* *AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo*. Cell, v. 118(4), p. 431-8, ago 2004.

RICKINSON, A.; KLEFF, E. *Epstein-Barr virus*. In KNIPE, D.; HOWLEY, P: eds. *Fields Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001. p. 2575-627.

RICHTER, J. 1.; SCHLESNER, M.; HOFFMANN, S.; *et al.* *Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing*. Nat Genet, v.44(12), p.1316-20, dez 2012.

ROBERTUS, J. L.; KLUIVER, J.; WEGGEMANS, C.; *et al.* *MiRNA profiling in B non-Hodgkin lymphoma: a MYC-related miRNA profile characterizes Burkitt lymphoma*. Br J Haematol, v. 149, p. 896-9, jun 2010.

ROCHFORD, R. & MOORMANN, A. M. *Burkitt's Lymphoma*. *Curr Top Microbiol Immunol*. v. 390(1), p.267-85, 2015.

ROHDE, M.; BONN, B. R.; ZIMMERMANN, M.; *et al.* *Relevance of ID3-TCF3-CCND3 pathway mutations in pediatric aggressive B-cell lymphoma treated according to the non-Hodgkin Lymphoma Berlin-Frankfurt-Münster protocols*. *Haematologica*, v.102(6), p.1091-8, jun 2017.

ROSCHKE, V.; KOPANTZEV, E.; DERTZBAUGH, M.; *et al.* *Chromosomal translocations deregulating c-myc are associated with normal immune responses*. *Oncogene*, v. 14(25), p. 3011-6, jun 1997.

ROSOLEN, A.; MUSSOLIN, L.; BONVINI, P.; *et al.* *Non Hodgkin lymphoma in adolescents and young adults*. *European Journal of Cancer*, v.5(5), p. 217-25, 2007.

SAID, J.; LONES, M.; YEA, S. *Burkitt Lymphoma and MYC: What else is new?* *Adv Anat Pathol*, v. 21(3), p.160-5, mai 2014.

SALAVERRIA, I.; MARTIN-GUERRERO, I.; WAGENER, R.; *et al.* *A recurrent 11q aberration pattern characterizes a subset of MYC-negative high-grade B cell lymphomas resembling Burkitt lymphoma*. *Blood*, v. 123, p. 1187-98, fev 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDLUND, J. T.; DOWNING, J. R.; CRIST, W. M. *Non-Hodgkin's lymphoma in childhood*. *N Engl J Med*, v. 334, p. 1238-48, mai 1996.

SANDLUND, J. T.; HUDSON, M. M.; KENNEDY, W.; *et al.* *Pilot study of modified LMB-based therapy for children with ataxia-telangiectasia and advanced stage high grade mature b-cell malignancies*. *Pediatr Blood Cancer*, v. 61, p. 360–2, fev 2014.

SCHIFFMAN, J. D.; LORIMER, P. D.; RODIC, V.; *et al.* *Genome wide copy number analysis of paediatric Burkitt lymphoma using formalin-fixed tissues reveals a subset with gain of chromosome 13q and corresponding miRNA over expression.* British Journal of Haematology, v. 155(4), p.477-86, nov. 2011.

SCHMITZ, R.; YOUNG, R. M.; CERIBELLI, M.; *et al.* *Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics.* Nature, v. 490(7418), p.116-20, out 2012.

SCHOENAKER, M. H. D.; SUAREZ, F.; SZCZEPANSKI, T.; *et al.* *Treatment of acute leukemia in children with ataxia-telangiectasia (A-T)* Eur J Med Genet, v. 59, p. 641–6, dez 2016.

SCHOLTYSIK, R.; KREUZ, M.; KLAPPER, W.; *et al.* *Detection of genomic aberrations in molecularly defined Burkitt's lymphoma by array-based, high resolution, single nucleotide polymorphism analysis.* Haematologica, v. 95(12), p. 2047-55, dez 2010.

SEABRIGHT, M. *A rapid banding technique for human chromosomes.* Lancet, v. 2, p. 971-2, out 1971.

SHAFFER, A. L.; ROSENWALD, A.; STAUDT, L. M. *Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation.* Nat Rev Immunol, v. 2(12), p. 920-32, dez 2002.

SHIRAMIZU, B.; BARRIGA, F.; NEEQUAYE, J.; *et al.* *Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association.* Blood, v. 77(7), p.1516-26, abr 1991.

SLACK, G. W.; GASCOYNE, R. D. *MYC and aggressive B-cell lymphomas*. *Advances in Anatomic Pathology*, v. 18, n. 3, p. 219-28, mai 2011.

SOLDINI, D; CAMPO, E. *Genetic sequencing studies in Burkitt's lymphoma: what can we learn about tumorigenesis?* *Expert Rev Hematol*, v. 6(3), p. 219-21, jun 2013.

SONG, S.; COOPERMAN, J.; LETTING, D. L.; *et al.* *Identification of cyclin D3 as a direct target of E2A using DamID*. *Mol Cell Biol*, v. 24(19), p. 8790-802, out 2004.

SOUZA, M. T.; VIEIRA, T. P.; LIEHR, T.; *et al.* *Classic and molecular cytogenetic studies of Brazilian childhood and adolescent Burkitt lymphoma/leukemia*. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2012, Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 34. p. 338, nov 2012.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; *et al.* *WHO Classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues*. (4th ed.) IARC Press, Lyon, 2008.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; PILERI, S. A.; *et al.* *The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms*. *Blood*, v. 127(20), p. 2375-90, mai 2016.

TESTA, J. R.; MISAWA, S.; OGUMA, N.; *et al.* *Chromosomal alterations in acute leukemia patients studied with improved culture methods*. *Cancer Research*, v. 45(1), p. 430-4, jan 1985.

THOMAS, D. A.; O'BRIEN, S.; FADERL, S.; *et al.* *Burkitt Lymphoma and atypical Burkitt or Burkitt-like Lymphoma: should these be treated as different diseases?* *Current Hematology Malignancy Reports*, v. 6, n. 1, p. 58-66, mar 2011.

TOUJANI, S.; DESSEN, P.; ITHZAR, N.; *et al.* *High Resolution Genome-Wide Analysis of chromosomal alterations in Burkitt's Lymphoma.* PloS One. v. 4(9), e.7089, set 2009.

VERA-LOZADA, G.; SCHOLL, V.; BARROS, M. H.; *et al.* *Analysis of biological and technical variability in gene expression assays from formalin-fixed paraffin-embedded classical Hodgkin lymphomas.* Exp Mol Pathol, v. 97, p.433-9, dez 2014.

WAGENER, R.; SEUFERT, J.; RAIMONDI, F.; *et al.* *The mutational landscape of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration is distinct from that of Burkitt lymphoma.* Blood, v. 133(9), p.962-6, fev 2019.

WANG, L.; WANG, H.; XIA, Z. J. *et al.* *Peripheral blood lymphocyte to monocyte ratio identifies high-risk adult patients with sporadic Burkitt lymphoma.* Ann Hematol, v. 94(10), p. 1645-54, jun. 2015.

WEISE, A.; MRASEK, K.; FICKELSCHER, I.; *et al.* *Molecular Definition of high-resolution Multicolor Banding Probes: First within the human DNA sequence anchored FISH banding probe set.* J Histochem Cytochem, v. 56(5), p. 487-93, mai 2008.

WHITE, J.A.; MCALPINE, P. J.; ANTONARAKIS, S. *et al.* *Guidelines for human gene nomenclature (1997).* HUGO Nomenclature Committee. Genomics, v. 45(2), p. 468-71, out 1997.

WORCH, J.; ROHDE, M.; BURKHARDT, B. *Mature B-cell lymphoma and leukemia in children and adolescents-review of standard chemotherapy regimen and perspectives.* Pediatr Hematol Oncol, v. 30(6), p. 465-83, set 2013.

YI, K.; JU, Y. S. *Patterns and mechanisms of structural variations in human cancer.* Exp Mol Med, v. 50(8), p.98, ago 2018.

YOUNG, L. S.; ARRAND, J. R.; MURRAY, P. G. *EBV gene expression and regulation*. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K, editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. Chapter 27

YOUNG, L. S.; YAP, L. F.; MURRAY, P. G. *Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises*. *Nat Rev Cancer*, v.16(12), p.789-802, dez 2016.

ZAHA, A.; BUNSELMEYER FERREIRA, H.; PASSAGLIA, L. *Biologia Molecular Básica* - 5.ed. 2014

9. ANEXO I

Carta de aprovação do CEP INCA



Memo 171/11-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 22 de junho de 2011.

A(o): Dra. Maria Luiza Macedo Silva
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP nº 20/11 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
CAAE - 0054.0.007.000-11

Título do Estudo: Estudo citogenético clássico e molecular na Leucemia Aguda B madura (LLA-L3) e Linfoma de Burkitt (LB) da infância e da adolescência

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer aprovou após re-análise o estudo intitulado: **Estudo citogenético clássico e molecular na Leucemia Aguda B madura (LLA-L3) e Linfoma de Burkitt (LB) da infância e da adolescência (versão 2)**, bem como o seu TCLE para os pacientes versão 2 e TCLE para os responsáveis versão 2, em 16 de junho de 2011.

Ressalto que o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo.

Atenciosamente,

Dra. Maria Luiza Macedo Silva
Pesquisador(a) Principal
Comitê de Ética em Pesquisa
INCA

C/c – Dr. Luis Fernando Bouzas – Diretor do CEMO

10. ANEXO II

Informação mínima para publicação em experimentos de Quantificação em pcr em tempo real (MIQE), sugeridas por Bustin *et al.* (2009).

Desenho experimental

- *Grupo experimental:* Amostras de tumor (em diversos sitios) de crianças e adolescentes com Linfoma/Leucemia de Burkitt, amostras de hiperplasia folicular reativa, linhagens celulares (Namalwa, Raji, Ramos, Farage e Pfeifer) e células de medula óssea de doadores saudáveis.
- *Número de pacientes:* 4 LB, 2 HFR, 2 MO e 5 Linhagens Celulares

Amostras

- *Descrição:* Amostras de tumor fixados em formalina e impregnados em parafina (FFPE)
- *Quantidade de amostra processada:* 6 cortes de parafina de 3µm cada e 5x10⁶ células de doadores saudáveis de MO e de linhagens celulares.
- *Procedimento do processamento de fixação:* formol 10% por 24 horas.
- *Tempo e condições de armazenamento das amostras:* 4-8 anos a 20-22°C em ambiente fechado

Extração do RNA

- *Kits utilizados:* Máster Pure™ RNA purification kit (MP) (Epicentre®, Madison, WI) com 480 µL de solução de lise celular e tecidual e 60µL de proteinase K 60 mg/dL a 65°C por 16-20 horas.
- *Reagentes adicionais usados:* proteinase K (Invitrogen, Life Technologies™, Carlsbad, CA) a 60 mg/dL.
- *Tratamento com DNase:* 200 µL da solução DNase I (5 µL de DNase I e 200 µL de 1X de tampão de DNase) supridos pelo kit a 37°C por 30 minutos.
- *Avaliação de contaminação por DNA:* não se aplica
- *Quantificação do RNA:*
 - *Método e aparelho:* espectrofotometria no Nanodrop® (Wilmington, Delaware USA).
 - *Pureza:* 260/280: 1,8 - 2,0

260/230: 2,0 – 2,2

- *Integridade do RNA:*
 - *Eletroforese:* gel de agarose 1,2% em tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,01M) com coloração de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- *Teste de inibição:* não realizado.
- *Armazenamento do RNA:* -80°C

Transcrição reversa

- *Condições da reação:* kit *High Capacit cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Life Technologies). Cat. 4368814. Volume da reação 20 μ . Mix: tampão RT 1X (5,5mM Mg^{2+}); 1mM de dNTPs, iniciadores randômicos (2,5 μM); 2,5U de MultiScribe RT, 10 μL de cDNA.
- *Quantidade de RNA e volume da reação:* 0,5 μg de RNA total/10 μL de água DEPC
- *Estratégia de iniciadores:* Iniciadores randômicos
- *Transcritase reversa e concentração:* MultiScribe™ Reverse Transcriptase em 50 U/ μL .
- *Temperatura e tempo:* 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos.
- *Estocagem do cDNA:* -80°C

Pré-amplificação

- *Condições da reação:* 1) TaqMan® *PreAmp Master Mix kit* (Applied Biosystems, Life Technologies™). Cat. 4384267. Volume da reação: 10 μL . Mix: 1X *PreAmp master mix*, iniciadores/sondas (iniciadores: 6,25-112,5 nM cada, sondas: 31,25nM) diluídos em tampão TE pH 8,0, mais 2,5 μL de cDNA; 2) SYBRgreen (Applied Biosystems, Life Technologies). Volume da reação: 10 μL . Mix: 2X RT² *PreAMP PCR Master mix*, iniciadores e 2,5 μL de cDNA diluído 1:5.
- *Aditivos:* Não incluídos
- *Concentração de cDNA:* Não calculada
- *Estratégia de iniciadores:* Iniciadores específicos
- *Temperatura e tempo:* 1) TaqMan®: 95°C por 10 minutos, 14 ciclos a 95°C por 25 segundos e 60°C por 4 minutos; 2) SYBRgreen: 95°C por 10 minutos, 14 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 2 minutos

- *Estocagem da Pré-amp*: -80°C
- *Diluição da Pré-amplificação*
 - *Diluição*: A reação de pré-amp foi diluída em 1:20 com água DEPC.
 - *Estocagem da diluição*: -80°C
 - *Screening de especificidade in silico* (BLAST): Feito para iniciadores desenhados
 - *Variante de splicing nos alvos*: Não feito

Oligonucleotídeos

- *Sequência dos iniciadores*: Especificadas na Tabela 4.2 de Metodologia
- *Sequência das sondas*: Especificadas na Tabela 4.1 de Metodologia
- *Localização e identidade de alguma modificação*: Não teve modificação
- *Fabricante dos oligonucleotídeos*: Applied Biosystems, Life Technologies

Protocolo de qPCR

- *Condições da reação*: 1) TaqMan: TaqMan® *universal PCR Master Mix* 1X (Cat. 4304437), 1X mix de iniciadores/sondas, água livre de nucleases e 4µL de cDNA pré-amplificado diluído; 2) SYBRGreen: 1X *GoTaq qPCR Master Mix*, 60Nm iniciador *forward*, 60Nm iniciador *reverso*, 0,5X *enhancer*, água livre de nucleases e 4µL de cDNA pré-amplificado diluído.
- *Volume da reação e quantidade de cDNA*: Volume final de 15µL; 4µL de cDNA pré-amplificado (diluído previamente na razão 1:20 em água livre de nucleases).
- *Concentração dos iniciadores, sonda, Mg⁺⁺ e dNTP*: padrão do reagente TaqMan® *universal PCR Master Mix* (Applied, Life Technologies) e *GoTaq qPCR Master Mix*.
- *Identificação e concentração da Taq polimerase*: padrão do reagente *TaqMan universal PCR Master Mix* (Applied, Life Technologies) e *GoTaq qPCR Master Mix*.
- *Aditivos*: Não incluídos
- *Fabricante das placas e número de catálogo*: Applied Biosystems, Cat. N8010560
- *Parâmetros da termociclagem*: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos
- *Instrumento de qPCR e fabricante*: ViiA™ 7 (Applied Biosystems, Life Technologies).

Validação de qPCR

- *Especificidade*: Gel de agarose 3%
- *NTC*: $Cq > 40$
- *Variação do Cq no limite baixo*: $SD \leq 0,5$
- *Evidência para o limite de detecção*: Não estimado
- *Multiplex, eficiência e LOD para cada ensaio*: Não estimado

Dados de análise

- *Programa de análise de qPCR (fonte e versão)*: Genex enterprise (MultiD analyses)
- *Método de determinação Cq*: $2^{-\Delta\Delta Cq}$
- *Identificação e disposição dos outliers*: Teste de Grubbs
- *Resultados dos NTCs*: $Cq > 40$
- *Justificação do número de genes de referência selecionados*: Foram selecionados os 2 genes mais estáveis para LNH para os 2 ensaios
- *Descrição do método de normalização*: Cq do gene de interesse - Cq do gene de referência
- *Número e estado (qPCR) de replicatas técnicas*: 2 qPCR
- *Métodos estatísticos para significância dos resultados*: Teste Mann-Whitney, teste Wilcoxon, teste de Spearman e nested-ANOVA de 6 fatores com efeitos randômicos.
- *Software (fonte e versão)*: GENEX enterprise (MultiD), SPS (BPI Consulting, LLC) e *Statistical Package for Social Sciences* 20.0 (SPSS)

11. ANEXO III

Manuscritos publicados durante este estudo

- De Souza MT, Vera-Lozada G, Othman M, Marques-Salles TJ, Pinto LW, da Rocha MM, Rouxinol S, Liehr T, Ribeiro RC, Hassan R, Silva MLM. *Molecular and Cytogenetic Studies in a Child with Burkitt Lymphoma and Ataxia-Telangiectasia Syndrome Harboring MYC Overexpression and Partial Trisomy 8*. Ann Lab Med. 2018 Jan;38(1):63-66.
- De Souza MT, Hassan R, Liehr T, Marques-Salles TJ, Boulhosa AM, Abdelhay E, Ribeiro RC, Silva ML. *Conventional and molecular cytogenetic characterization of Burkitt lymphoma with bone marrow involvement in Brazilian children and adolescents*. Pediatr Blood Cancer. 2014 Aug;61(8):1422-6



Molecular and Cytogenetic Studies in a Child with Burkitt Lymphoma and Ataxia-Telangiectasia Syndrome Harboring *MYC* Overexpression and Partial Trisomy 8

Mariana T. De Souza, M.S.^{1,2}, Gabriela Vera-Lozada, Ph.D.^{2,3}, Moneeb Othman, Ph.D.⁴, Teresinha J. Marques-Salles, Ph.D.⁵, Luciana W. Pinto, Ph.D.⁶, Moisés M. da Rocha, B.S.¹, Soraia Rouxinol, M.D.⁷, Thomas Liehr, Ph.D.⁴, Raul C. Ribeiro, M.D.^{8,9}, Rocio Hassan, Ph.D.^{2,3}, and Maria Luiza M. Silva, Ph.D.^{1,2}

Cytogenetics Department¹, Bone Marrow Transplantation Center, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; Post Graduation Oncology Program², Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; Oncovirology Laboratory³, Bone Marrow Transplantation Center, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; Institute of Human Genetics⁴, Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Jena, TH, Germany; Department of Genetics⁵, Pernambuco University, Recife, PE, Brazil; Integrated Department of Pathology⁶, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; Pediatric Hematology Department⁷, Hospital Federal da Lagoa, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; Department of Oncology⁸, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA; Instituto Pelé Pequeno Príncipe⁹, Postgraduate Program in Child Adolescent Health, Curitiba, Paraná, Brazil

Dear Editor,

Burkitt lymphoma/leukemia (BL/L) was the first neoplasia associated with rearrangement in *MYC* that is the molecular hallmark of this disease. Particularly, immunoglobulin genes are associated with *MYC* in BL/L, where the juxtaposition with heavy chain locus (14q32) or light chain loci (2p12 and 22q11) leads to *MYC* overexpression, which is believed to play a central role in BL/L pathogenesis [1].

During investigation of the clinical significance of secondary chromosomal abnormalities in pediatric BL/L, we identified a patient with BL/L without detectable *MYC* translocation [2]. Here, we aimed to refine cytogenetic and molecular characteristics, such as expression levels of *MYC*, other genes, and microRNAs, to contribute to the diagnosis of BL/L without *MYC* translocations. Clinical data are described in Table 1.

G-banding of bone marrow (BM) cells revealed 46,XY,der(8) in 31.5% of the metaphases analyzed (Fig. 1A). FISH analysis revealed three *MYC* signals, two in the derivative chromosome

8, apart from a normal chromosome 8 (Fig. 1B, C). FISH analysis of *BCL6* and *BCL2* loci ruled out abnormalities common to other B cell non-Hodgkin lymphomas (NHL) (Fig. 1D). Multicolor FISH excluded the presence of any other chromosomal abnormality, including changes in chromosome 11, recently associated with *MYC*-negative BL/L cases in the WHO classification [3]. Multicolor probes helped define the final karyotype as 46,XY,der(8)t(8;8)(qter->q21::p22->qter) (Fig. 1E, F).

In 2006, Hummel *et al* [4] proposed a molecular signature for BL/L, including in their sample cases with lymphomas lacking *MYC* rearrangement. Among them, *CD10* and *BCL2*, besides *MYC*, were found to be differentially expressed and are used as classifiers for BL/L signature. Moreover, supporting the idea of *MYC* post-transcriptional deregulation in BL/L, some studies have revealed differential expression patterns of specific miRNAs in comparison to that in other NHL [5, 6]. For molecular characterization, tumor samples from four patients with BL/L harboring t(8;14)(q24;q32) (median age, nine years; BCL6-pos-

Received: April 19, 2017

Revision received: June 28, 2017

Accepted: September 11, 2017

Corresponding author: Maria Luiza Macedo Silva

Cytogenetics Department, Instituto Nacional de Câncer (INCA)
Praça da Cruz Vermelha, 23 – 6th floor, Rio de Janeiro, RJ, 20.230-130,
Brazil

Tel: +55-21-32071701, Fax: +55-21-32076865

E-mail: luizamacedo@inca.gov.br

© Korean Society for Laboratory Medicine.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Clinical characteristics of the patient

Clinical parameters	Case features
Age and gender	7 years, male
History	4 months of vomiting, diarrhea, fever, sweating, weight loss; 10 days of joint pain; abdominal mass (6 cm); genetically and clinically diagnosed with AT at the age of 18 months with the use of gamma aminobutyric acid for 3 years for treatment and control of ataxia.
Adenomegalies	Hepatomegaly (3 cm)
WBC count	$6.1 \times 10^9/L$
Platelet count	$534.0 \times 10^9/L$
LDH	2,378 U/L
BM morphology and immunohistochemistry	Hypercellularity; 92% of the lymphoid blasts with basophilic cytoplasm and vacuoles characteristic of L3 (BL/L) morphology; CD20+, EMA-, CD3-, CD99-, Myeloperoxidase-, TdT-, BCL2-
BM immunophenotype (flow cytometry)	Positive for: HLA-Dr, CD20, CD22, CD45, CD19, CD38, CD79b, cCD79a, sIgκ, IgM. Negative for: CD8, CD5, CD13, CD33, CD34, CD23, CD15, TdT
Protocol	BFM-95 for BL/L modified for the treatment of AT (ICD: 10 G11.3) associated NHL
Clinical outcome	Relapse 5 months after initial diagnosis and death by disease progression

Abbreviations: cm, centimeters; AT, ataxia-telangiectasia; L, liter; U/L, units per liter; WBC, white blood cell; LDH, lactate dehydrogenase; BM, bone marrow; BL/L, Burkitt lymphoma/leukemia; BFM-95, Berlin, Frankfurt and Munster 95 protocol; ICD, International Classification of Diseases; NHL, non-Hodgkin lymphoma.

itive and BCL2-negative), cells from three BL and two diffuse large B-cell lymphoma cell lines, three reactive follicular hyperplasia lymph nodes, and two normal BM samples were used for comparison.

MYC and *BCL2* expression levels in our patient were similar to those in the BL/L group, although *BCL2* levels were lower than those observed in all the cases with BL/L (Fig. 1G, H). Similarly, *CD10* levels were lower than those in the BL/L group (Fig. 1I). These differences are likely to have arisen from the different types of samples used for molecular testing. miR155 and Let7a, 7b, and 7e, which are downregulated by *MYC* [7], were in general at low levels in the BL/L group (Fig. 1J-M). miR9*, usually downregulated in patients lacking the *MYC* translocation [6], was downregulated in our patient as well as in the BL/L group (Fig. 1N). miR150 and miR21 were downregulated in all the cases (Fig. 1O-P) [7]. Thus, gene expression analysis of our patient suggests a BL-like molecular profile despite the lack of *MYC* translocation.

To the best of our knowledge, this is the first report on a patient with a partial trisomy 8 lacking the typical t(8;14)(q24;q32), which resulted in three copies of *MYC*, and *MYC* overexpression was comparable to that generally found in BL/L. In rare cases, *MYC* rearrangement cannot be identified [1, 5], and the gene expression profile appears to be comparable to that observed in BL/L [4]. This suggests that other pathogenic mechanisms could lead to deregulation, such as post-transcriptional control by microRNA, of *MYC* expression [5, 6]. In this context, since 2008,

the WHO classification includes BL/L cases without a demonstrable *MYC* translocation [3].

Ataxia-telangiectasia (A-T) is a rare neurodegenerative disorder associated with an elevated risk (10–30%) of developing malignancies. NHL was the most frequently detected cancer (53–64%) in patients with A-T [8]; however, BL/L is rarely reported. Despite its rarity, Sandlund *et al* [9] suggested that BL/L in patients with A-T tends to carry non-canonical *MYC* rearrangements, probably because of global chromosome instability. This hypothesis is in agreement with that observed in our patient.

In summary, our results, obtained using molecular cytogenetics and expression approaches, add new information about BL/L without *MYC* translocation. Whether the altered *MYC* expression in our patient resulted from microRNA deregulation, a known alternative pathogenic mechanism [5, 6], or from trisomy 8, which might result in *MYC* overexpression by an increased gene dosage, remains to be elucidated.

Authors' Disclosures of Potential Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

CAPES-PROBRAL/DAAD (419/14), Ministério da Saúde, Monika Kutzner Stiftung (Germany), the St. Jude Children's Research

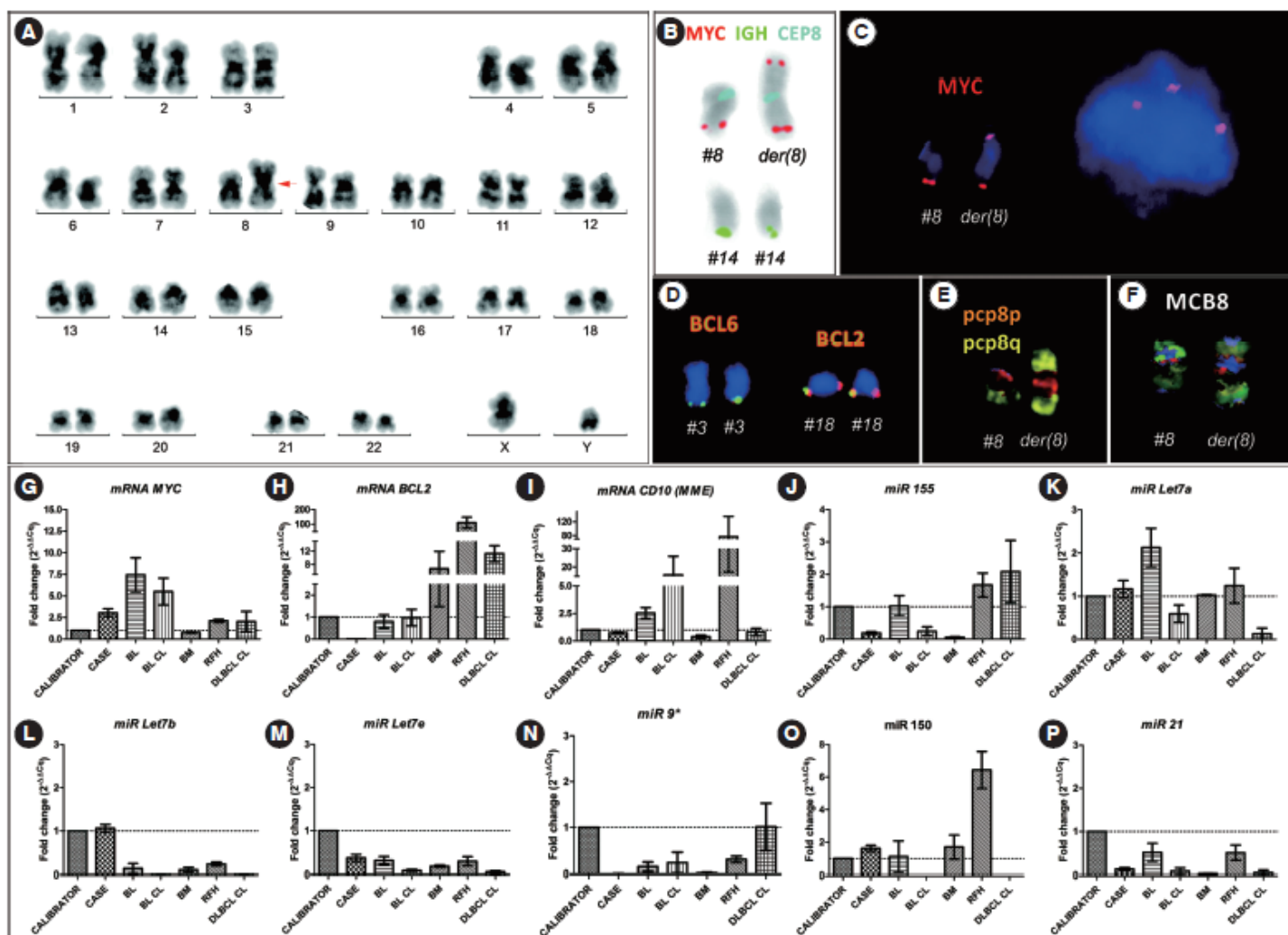


Fig. 1. Cytogenetics and molecular characterization. (A) G-banding cytogenetics: GTG banding karyotype showing the derivative chromosome 8 pointed by the red arrow. (B–F) Molecular cytogenetics: (B) FISH analysis using *IGH/MYC/CEP8* Tri-Color Dual Fusion Probe (04N10-020, Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA). Green signal: *IGH*; red signal: *MYC*; aqua signal: *CEP8*; (C) LSI *MYC* Spectrum Orange Probe (02N22-020, Abbott Molecular) shows derivative chromosome 8 with 2 copies of *MYC*, 3 in total per cell; (D) Complementary FISH analyses using *BCL6* Break Apart Probe (Z-2177-50, ZytoVision GmbH, Bremerhaven, HB, DE) and *BCL2* Break Apart Probe (Z-2192-50, ZytoVision GmbH) showed normal partners for both chromosomes 3 and 18, respectively; (E) FISH using partial chromosome paintings for 8p and 8q arms showed partial trisomy 8; (F) Multicolor chromosome banding probe for chromosome 8 characterized the derivative chromosome 8 as a result of t(8;8)(pter->q21::p22->qter); (G–P) Comparisons between cellular genes and microRNA (miRNA) expressions among our patient and classical Burkitt lymphomas, healthy bone marrow (BM) cells, reactive follicular hyperplasias (RFH), and BL- and diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)-derived cell lines. (G) *MYC*; (H) *BCL2*; (I) *CD10*; (J) miR-155; (K) miR-Let7a; (L) miR-Let7b; (M) miR-Let7e; (N) miR-9*; (O) miR-150; (P) miR-21. Case: study patient; BL: classical Burkitt lymphoma; BL-CL: represent the mean values of BL-derived cell lines—Namalwa, Raji, and Ramos; DLBCL-CL: represents the mean values of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)-derived cell lines—Farage and Pfeiffer; BM: bone marrow cells from healthy donors; RFH: reactive follicular hyperplasia of lymph nodes. The line set at 1 represents the calibration reference. RNA was extracted from FFPE BM biopsy (case) and BL and RFH lymph node using MasterPure™ RNA Purification Kit (Epicentre, Madison, WI, USA). RNA from BM and cell lines was extracted with Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Relative expression of *CD10* and *BCL2* was evaluated by TaqMan® assays, as previously described [10], using the average of *ACTB* and *B2M* reference genes for normalization. *MYC* expression was quantified with SYBR green® assays using the average of *ACTB* and *GUSB* for normalization. miRNAs were quantified with stem-loop TaqMan® assays (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) after reverse transcription with MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies) for each miRNA and the reference small RNA RNU48. Quantification values were expressed as fold change ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) after calibration with the classical BL sample exhibiting the lowest expression level. Bars represent the mean of fold change values in each category, except for the case, in which the mean of two different experiments was represented. Error bars represent standard error of the mean.

Hospital, and the Center of Excellence Grant from the State of Tennessee (USA).

REFERENCES

1. Greenought A and Dave SS. New clues to the molecular pathogenesis of Burkitt lymphoma revealed through next-generation sequencing. *Curr Opin Hematol* 2014;21:326-32.
2. De Souza MT, Hassan R, Liehr T, Marques-Salles TJ, Boulhosa AM, Abdelhay E, et al. Conventional and molecular cytogenetic characterization of Burkitt lymphoma with bone marrow involvement in Brazilian children and adolescents. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61:1422-69.
3. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;127:2375-90.
4. Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TFE, et al. Molecular mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfe. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* 2006;354:2419-30.
5. Onnis A, De Falco G, Antonicelli G, Onorati M, Bellan C, Sherman O, et al. Alteration of microRNAs regulated by c-Myc in Burkitt lymphoma. *PLoS One* 2010;23:909-20.
6. Leucci E, Cocco M, Onnis A, De Falco G, van Cleef P, Bellan C, et al. MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenic mechanism involving miRNA deregulation. *J Pathol* 2008;216:440-50.
7. Robertus JL, Kluiver J, Weggemans C, Harms G, Reijmers RM, Swart Y, et al. miRNA profiling in B non-Hodgkin lymphoma: a MYC-related miRNA profile characterizes Burkitt lymphoma. *Br J Haematol* 2010;149:896-9.
8. Schoenaker MHD, Suarez F, Szczepanski T, Mahlaoui N, Loeffen JL. Treatment of acute leukemia in children with ataxia-telangiectasia (A-T). *Eur J Med Genet* 2016;59:641-6.
9. Sandlund JT, Hudson MM, Kennedy W, Onciu M, Kastan MB. Pilot study of modified LMB-based therapy for children with ataxia-telangiectasia and advanced stage high grade mature b-cell malignancies. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61:360-2.
10. Vera-Lozada G, Scholl V, Barros MH, Sistic D, Guescinic M, Stocch V, et al. Analysis of biological and technical variability in gene expression assays from formalin-fixed paraffin-embedded classical Hodgkin lymphomas. *Exp Mol Pathol* 2014;97:433-9.

Conventional and Molecular Cytogenetic Characterization of Burkitt Lymphoma with Bone Marrow Involvement in Brazilian Children and Adolescents

Mariana T. De Souza, MSc,^{1,2,3} Rocio Hassan, PhD,^{3,4} Thomas Liehr, PhD,⁵ Terezinha J. Marques-Salles, MD, PhD,⁶ Alice M. Boushosa, MD,⁷ Eliana Abdelhay, PhD,^{1,3,8} Raul C. Ribeiro, MD,⁹ and Maria Luiza Macedo Silva, PhD^{2,3*}

Background. Burkitt lymphoma/leukemia (BL/L) is cytogenetically characterized by the t(8;14)(q24;q32) or its variants, t(2;8)(p11;q21), and t(8;22)(q24;q11.2), which juxtapose the *MYC* oncogene to one of the three immunoglobulin loci. The overall cure rate of BL/L in children is 70–90%, but patients diagnosed with advanced-stage disease have a less favorable prognosis. It is possible that secondary chromosomal abnormalities contribute to this unfavorable prognosis via chemotherapy resistance, but the results of genetic studies have been inconsistent. This study aimed to identify and characterize secondary chromosomal abnormalities associated with the t(8;14) and its variants in children with French-American-British-L3 leukemia or Burkitt lymphoma with bone marrow involvement at the time of diagnosis. **Procedure.** Chromosome analysis was based on G-banding. Fluorescence *in situ* hybridization technique was applied

using *IGH/MYC/CEP8* dual-fusion and *MYC* break-apart probes. Multicolor chromosome banding was performed according to standard protocol. **Results.** We describe a group of BL/L with extreme adverse clinical outcome, in which secondary chromosomal abnormalities, particularly those involving the long arms of chromosomes 1 and 13, were found in 71% of cases. The *IGH/MYC* fusion showed molecular heterogeneity in 14% of cases and two cases exhibited three *IGH/MYC* fusion signals. **Conclusions.** Secondary chromosomal abnormalities were found in a high proportion of patients. We observed an extent of *IGH/MYC* heterogeneity not previously reported in Burkitt lymphoma, including the novel finding of three fusion signals in two cases. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61:1422–1426. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: Burkitt lymphoma/leukemia; *IGH/MYC* gene fusion; pediatric; secondary chromosomal abnormalities; t(8;14)(q24;q32)

INTRODUCTION

Burkitt lymphoma (BL) is a highly aggressive hematological malignancy usually diagnosed in children and young adults but also rarely seen during middle age. It accounts for 40–50% of childhood non-Hodgkin lymphoma (NHL) in non-endemic areas [1–3].

Historically, BL was diagnosed on the basis of small non-cleaved cells or lymphoblasts with French-American-British (FAB) L3 morphology and was classified and staged according to lymphatic nodal versus extranodal involvement. Patients with more than 25% bone marrow involvement were considered to have acute lymphoblastic leukemia of L3 type (ALL-L3) [4]. According to the World Health Organization (WHO), BL is characterized by its specific morphological, immunophenotypic, and genetic features and, together with its leukemic form, is termed Burkitt lymphoma/leukemia (BL/L) [5]. Three clinical variants are recognized: (1) endemic BL occurs in African children, usually those 4–7 years old, and has a male:female ratio of 2:1; Epstein–Barr Virus (EBV) is implicated in nearly 100% of cases; (2) sporadic BL accounts for as many as 40% of cases of childhood lymphoma in the United States and Western Europe. Neoplastic cells are EBV+ in 15–30% of cases [3,5]; and (3) immunodeficiency-associated BL occurs mainly in patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection but also in allograft recipients and individuals with congenital immunodeficiency [5]. An epidemiologic type intermediate between endemic and sporadic BL has recently been suggested to describe BL in less developed regions, such as parts of Brazil; young children are most often affected, and EBV infection is identified in 50–70% of cases [6].

The genetic hallmark of BL is the t(8;14)(q24;q32), found in 70–80% of cases, which juxtaposes the *MYC* oncogene (at 8q24) with the immunoglobulin heavy chain gene locus (*IGH*) at 14q32. This translocation leads to *MYC* overexpression, which is believed to play a central role in BL oncogenesis [7]. Approximately 20% of cases have the variant translocations t(2;8)(p11;q24)

or t(8;22)(q24;q11.2), which juxtapose *MYC* with the immunoglobulin light chain genes Ig kappa (*IGK*, at 2p11) or Ig lambda (*IGL*, at 22q11). Identification of these translocations is crucial for the accurate diagnosis and optimal treatment of BL [7,8].

Additional (secondary) genetic changes have been associated with unfavorable prognosis [9,10], suggesting that such changes may be useful in refining risk stratification for patients with BL or leukemia. The current short-duration, intensive, risk-adapted

¹Post Graduation Program in Oncology, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ²Cytogenetics Department, Bone Marrow Transplantation Unit, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ³National Institute of Science and Technology for Cancer Control, Rio de Janeiro, Brazil; ⁴Oncovirology Laboratory, Bone Marrow Transplantation Unit, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ⁵Institute for Human Genetics, Jena University, Jena, Germany; ⁶Pediatric Oncology/Hematology Service, Pernambuco University, Recife, PE, Brazil; ⁷Martagão Gesteira Institute of Pediatrics and Child Development, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ⁸Stem Cell Department, Bone Marrow Transplantation Unit, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ⁹Department of Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee

Grant sponsor: CAPES (PROBRAL/DAAD—project no. 419/14); Grant sponsor: CNPq (project no. 473878/2011-9); Grant sponsor: FAPERJ (project no. E-26/110.868/2013); Grant sponsor: INCT para Controle do Câncer, Brazil; Grant number: CNPq 573806/2008-0; Grant sponsor: American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC); Grant sponsor: Center of Excellence Grant from the State of Tennessee

Conflict of interest: Nothing to declare.

*Correspondence to: Maria Luiza Macedo Silva, Praça da Cruz Vermelha, 23, 6th floor, Rio de Janeiro, RJ 20230-130, Brazil. E-mail: luizamacedo@inca.gov.br

Received 24 September 2013; Accepted 19 February 2014

chemotherapy regimens produce overall cure rates of approximately 70–90% in children [11–13]. However, the prognosis is less favorable for those with advanced-stage disease or the ALL-L3 subtype. Here, we describe a study that sought to identify and characterize secondary genetic abnormalities in a group of pediatric patients with FAB-L3 leukemia or Burkitt lymphoma with bone marrow involvement at the time of diagnosis.

PATIENTS AND METHODS

Patient Selection

From 2000 through 2012, the Cytogenetics Laboratory of the Brazilian National Cancer Institute's Bone Marrow Transplantation Unit processed chromosome preparations from bone marrow ($n=42$) and/or tumor ($n=2$) from 44 pediatric patients (<18 years) with a initial diagnosis of BL/L. Samples were referred by the Hematology Service of INCA (Rio de Janeiro); Martagão Gesteira Institute of Pediatrics and Child Development, Federal University of Rio de Janeiro (Rio de Janeiro); Lagoa Federal Hospital (Rio de Janeiro); Pedro Ernesto University Hospital (Rio de Janeiro); and Oswaldo Cruz University Hospital (Recife). All samples were subjected to new chromosomal preparations and G-banding. From the initial 44 patients, 30 were excluded because a rearranged *MYC* was not detected in bone marrow cells, either due to a different diagnosis or to lack of bone marrow tumor infiltration. The remaining 14 cases, in which a rearranged *MYC* was detected in bone marrow cells, were included in this study. Whenever remaining samples were available, probe-based fluorescence *in situ* hybridization (FISH) assays were performed to identify the $t(8;14)(q24;q32)$ or one of its variants; and/or multicolor chromosome banding (MCB) assays to better characterize the karyotypes. BL/L diagnosis was confirmed by the presence of the diagnostic $t(8;14)(q24;q32)$ or one of its variants, or by detection of a cryptic rearrangement between *MYC* and immunoglobulin genes.

Primary ALL-L3 was diagnosed when more than 25% of bone marrow mononuclear cells were L3 blast cells, according to the FAB criteria [4]. Clinical and demographic characteristics of patients at the time of diagnosis were obtained from their medical records. Disease was staged according to the St. Jude/Murphy Staging System [11]. Four cases were previously described by our group [14]. This study was approved by the Ethics Committee of the Brazilian National Cancer Institute (CEP #20/11).

Conventional and Molecular Cytogenetics

Cytogenetic analysis was performed on bone marrow and/or tumor biopsy specimens, according to standard protocols; G-banded karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature [15]. FISH experiments were performed on metaphase spreads and interphase cells by using the LSI *IGH/MYC/CEP8* dual-fusion (Abbott Molecular, Des Plaines, IL) and *MYC* break-apart (CytoCell/Aquarius, United Kingdom) probes according to the manufacturer's instructions; we also used centromeric probes (CEP) for chromosomes 1 and 14/22; whole chromosome painting (WCP) probes for chromosomes 1, 4, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, and 20; the partial chromosome painting (PCP) probes *subtel8q* and *subtel14qter*; MCB probes for chromosomes 1, 4, 8, 10, 12, 13, 14, and 17; and bacterial artificial chromosome (BAC) probes for the regions 1q25 (RP11-415M14), 13q14.2 (RP11-305D15), 13q14.3 (RP11-43101), 13q21.1 (RP11-

100C24), 13q21.31 (RP11-151g10), 13q31.1 (RP11-417i19, RP11-80N10), 13q34 (RP11-245B11), and 14q (RP11-80K22). The WCP, PCP, and MCB probes were produced and labeled in the Molecular Cytogenetics Laboratory of the Institute of Human Genetics, Jena, Germany. BAC probes were selected from the UCSC Genome Browser website (<http://genome.ucsc.edu/>), February 2009 (GRCh37hg19). Clones were obtained from an RP11 library. BAC probes were cultivated in Luria-Bertini culture medium supplemented with chloramphenicol. DNA was extracted and purified by using the QIA-prep kit (Qiagen, Hilden, Germany). The DNA was then quantified and marked by nick translation (Roche, Castle Hill, NSW, Australia). These procedures were previously described in detail [16,17].

RESULTS

Patient Characteristics

The 14 patients studied were confirmed to have bone marrow involvement (8–100% infiltrating blast cells); 2 patients had L3-ALL (P1, P9). Selected clinical features at presentation are listed in Table I. The male:female ratio was 12:2 and age was 2–17 years (median, 8.8 years). One patient (P11) had AIDS-associated BL. All patients had Stage IV disease. Their treatment regimens were LNH-98 (five patients), BFM-90 (four patients), BFM-95 (three patients), COMP (one patient), and not available (one patient). The most common sites of involvement at presentation were bone marrow ($n=14$), abdomen ($n=5$), lymph nodes ($n=3$), and jaw ($n=3$). Lactate dehydrogenase (LDH) levels at diagnosis were $>1,000$ U/L in all patients but one (Table I).

Cytogenetic Evaluation

Karyotyping, FISH, and MCB results are listed in Table II. GTG-banding analysis was successful in 12 (86%) cases but was of low quality in the remaining two cases (14%, P2 and P3). The $t(8;14)(q24;q32)$ was observed in nine patients (64%), while the $t(8;22)(q24;q11.2)$ was seen in two (14%). In one patient (P1), no chromosomal abnormality was detected, although the morphological and immunophenotypic data were compatible with a BL/L diagnosis. Molecular studies confirmed the diagnosis of BL/L.

We found secondary chromosomal abnormalities, particularly those involving the long arms of chromosomes 1 and 13, in 71% of cases; they comprised gains in the chromosome 1 long (1q) arm ($n=5$; P4, P5, P6, P7, and P14), in the chromosome 13q arm ($n=2$; P8 and P9), and in the chromosome 11q arm ($n=1$; P9). Additional findings included a derivative chromosome 1 ($n=2$; P10 and P12), a derivative chromosome 10 ($n=1$; P12), a derivative chromosome 14 ($n=1$; P11), and a marker chromosome ($n=3$; P10, P11, and P12). Two patients had numerical chromosome abnormalities involving chromosomes 13, 15, and 21 in one and only chromosome 17 in the other (P12). One patient (P7) with the $t(8;22)(q24;q22)$ also showed a gain in the chromosome 1q arm.

FISH analysis using LSI *IGH/MYC/CEP8* dual-fusion probes was performed in 9/14 patients who had enough sample (P1–P4, P6, P11–P14); *IGH/MYC* fusions were detected in 8 patients, while in the remaining patient an *MYC* rearrangement without evidence of *IGH* involvement was observed. Interestingly, in two of eight patients (P11 and P12) (14%), three *IGH/MYC* fusion signals were detected and patient's characteristics are detailed below.

TABLE I. Characteristics of Patients in the Study Group

Case	Age*	Sex	Sites of involvement (% BM involvement)*	WBC ($\times 10^9/L$)*	Platelets ($\times 10^9/L$)*	LDH (U/L)*	Treatment protocol	Clinical status
P1	16 yr	M	BM (40–50%)	55.5	38.0	10.810	LNH-98	ER-D
P2	4 yr	M	Column, BM (31%)	32.4	45.0	14.990	LNH-98	CCR-LFU
P3	9 yr 3 mo	M	Lymph node, BM (100%)	10.1	23.7	1.801	LNH-98	ER-D
P4	8 yr	M	Abdomen, BM (8%)	23.0	570.0	1.098	LNH-98	CCR
P5	2 yr	M	Mediastinum, Jaw, BM (80%)	3.0	84.0	6.630	BFM-90	ER-D
P6	8 yr 8 mo	M	Lymph node, Face, BM (25%)	16.6	103.0	7.103	LNH-98	CCR
P7	9 yr	M	Jaw, BM (80%)	21.0	142.0	3.340	BFM-90	NR-D
P8	7 yr	M	Jaw, BM (50%)	13.0	36.4	1.075	BFM-90	ER-D
P9	11 yr	M	BM (80%)	115.0	181.0	1.305	BFM-90	ER-D
P10	10 yr	F	Abdomen, BM (>25%)	7.40	508.0	4.352	BFM-95	ER-D
P11	7 yr	F	Abdomen, BM (30%) **HIV+	10.8	284.0	2.920	BFM-95	NR-D
P12	17 yr 7 mo	M	Lymph node, BM (>25%)	3.63	357.0	350	COMP	NR-D
P13	6 yr	M	Abdomen, BM (>25%)	8.80	569.0	2.375	NA	D
P14	9 yr	M	Soft tissues, abdomen, BM (>25%)	9.90	540.0	1.587	BFM-95	ER-D

yr, years; mo, months; HI, home institution; LDH, lactate dehydrogenase (reference = 240–480 U/L); M, male; F, female; BM, bone marrow; LNH-98, NHL treatment protocol based on BFM-90 European protocol with modifications; BFM-90 e BFM-95, treatment protocol from Berlin–Frankfurt–Münster (BFM) Group for Childhood and Adolescent Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL); COMP, cyclophosphamide, vincristine, methotrexate, and prednisone; ER, early relapse; CCR, complete clinical remission; D, died; LFU, lost to follow-up; NR, non-responder. *At the time of diagnosis. **AIDS-associated BL.

Patient 11, a 7-year-old HIV+ female, was admitted with a 5-day history of facial palsy, squint, and intense headache. Physical examination revealed a suprapubic mass. Peripheral blood findings were as follows: leukocytes, $10.8 \times 10^9/L$; platelets, $284 \times 10^9/L$; hemoglobin, 12.3 g/dl; and LDH, 2,920 U/L. Bone marrow was

hypercellular having L3 morphology, and flow cytometry showed blast cell surface protein expression compatible with BL/L. The child's disease was resistant to chemotherapy, and she died after 6 months on the BFM-95 protocol. GTG banding showed an additional derivative chromosome 14 and a marker chromosome

TABLE II. Karyotype, FISH, and MCB Data of the Studied Patients

Case	G-banding karyotype	FISH	MCB
P1	46,XY	IGH/MYC+	ND
P2	ND	IGH/MYC+	ND
P3	ND	IGH/MYC+	ND
P4	46,XY,?dup(1),t(8;14)(q24;q32)	IGH/MYC+	46,XY,der(1)(pter->q21::q32->q21::q21->qter), t(8;14)(q24;q32)
P5	46,XY,der(1),t(8;14)(q24;q32)	ND	46,XY,der(1)(pter->q21.1::q25->q21.1::q21.1->qter),t(8;14)(q24;q32)
P6	46,XY,dup(1)(q21),t(8;14)(q24;q32)	IGH/MYC+	46,XY,dup(1)(q12q25),t(8;14)(q24;q32)
P7	46,XY,der(1)(pter->q12::p13->p3?6.3::q21->qter),t(8;22)(q24;q22)	ND	ND
P8	46,XY,t(8;14)(q24;q32),add(13)(q34)	ND	46,XY,t(8;14)(q24;q32),der(13)(pter->q33::q33->q21.1)
P9	46,XY,t(8;14)(q24;q32),dup(11)(q23q25), der(13)(pter->q3?3::q3?3->?pter)	ND	ND
P10	44,XX,der(1),t(8;14)(q24;q32),der(12),-13,-15,-21,+mar	ND	46,XX,der(1)t(1;12)(1pter->1q1?4::1q12->1q2?4::12p13->12pter),der(13)t(10;13)(?p;?q), der(13)t(13;15)(q?;q?),der(14)t(8;14)(q24;q32),? dic(14;22)(q?p?),der(21)(?10;21)(?p?)
P11	47,XX,t(8;14)(q24;q32),der(14),+mar	IGH/MYC+ (3 signals)	47,XX,t(8;14)(q24.1;q32),der(14)(q24;q32),+20
P12	46,XY,der(1),t(8;14)(q24;q32),-17,+mar	IGH/MYC+ (3 signals)	46,XY,der(1)(1pter->1q42::1q32->1q23::4q26->4qter),der(4)t(4;10)(q12;q25), t(8;14)(q24;q32),der(10)t(10;8;14)(q25;q24;q32), der(17)(:17p11.2->17q21::21p11.2->21pter), der(21)t(17;21)(q21;p11.2)
P13	46,XY,t(8;22)(q24;q11)	MYC break+	ND
P14	46,XY,?dup(1),t(8;14)(q24;q32)	IGH/MYC+	ND

ND, not done; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; MCB, multicolor chromosome banding.

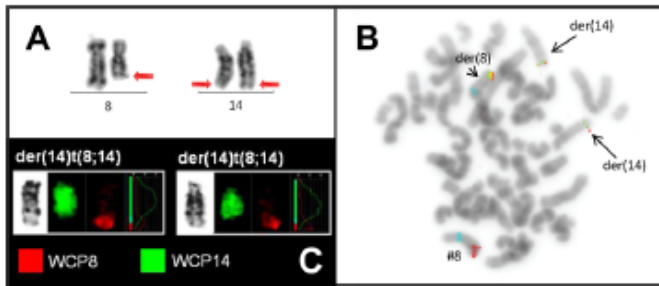


Fig. 1. Cytogenetics of case 11. **A:** Conventional cytogenetics: G-banded partial karyotype showing one derivative chromosome 8 and two derivative chromosomes 14 (red arrows). **B:** FISH: Application of IGH/MYC/CEP8 dual-fusion probe revealed three IGH/MYC fusion signals (black arrows). **C:** Multicolor chromosome banding: The MCB14 probe characterized both chromosomes 14 as derivatives of the t(8;14)(q24;q32).

other than t(8;14)(q24;q32) (Fig. 1A). FISH analysis revealed three *IGH/MYC* gene fusion signals, clarifying that the additional derivative 14 also carried an *IGH/MYC* fusion (Fig. 1B). MCB and WCP probes defined the marker chromosome as chromosome 20 and defined both derivative chromosomes 14 as resulting from the t(8;14)(q24;q32) (Fig. 1C).

Patient 12, a 17-year 7-month-old male, was admitted with the following peripheral blood findings: leukocytes, $3.63 \times 10^9/L$; platelets, $357 \times 10^9/L$; hemoglobin, 10.5 g/dl, and LDH, 350 U/L. His bone marrow was infiltrated with blast cells having L3 morphology, and flow cytometry showed blast cell surface protein expression compatible with BL/L. The patient was treated on the COMP protocol but did not achieve remission and died of progressive disease. GTG banding showed the karyotype 46,XY, der(1),t(8;14)(q24;q32),-17,+mar. FISH analysis showed three *IGH/MYC* gene fusion signals (Fig. 2A). MCB finally characterized a three-way translocation involving chromosomes 8, 10, and 14 and other secondary abnormalities involving chromosomes 1, 4, 17, and 21 (Fig. 2B and C).

To better characterize the secondary karyotypic abnormalities, we examined samples from seven cases by using PCP, WCP, MCB,

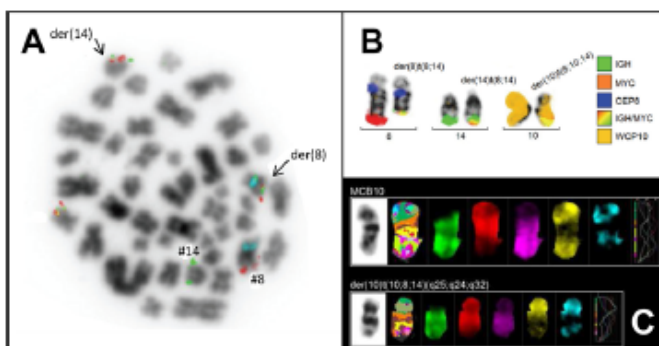


Fig. 2. Cytogenetics of case 12. **A:** FISH: Application of IGH/MYC/CEP8 dual-fusion probe showed three IGH/MYC fusion signals (arrows). **B:** Molecular cytogenetics: FISH with IGH/MYC/CEP8 dual-fusion and WCP10 probes revealed three fusion signals, one of which was in chromosome 10, characterizing a three-way translocation involving chromosomes 8, 10, and 14. **C:** Multicolor chromosome banding: The MCB10 probe characterized the three-way translocation between chromosomes 8, 10, and 14 as t(10;8;14)(q25;q24;q32).

Pediatr Blood Cancer DOI 10.1002/pbc

and BAC probes to identify the breakpoints of the gains in the chromosome 1q arm, which were 1q21q32 (P4), 1q21 (P5), and 1q12q25 (P6). In Patient 8, MCB defined the chromosome 13q arm abnormality as der(13)(pter->q21.32::q21.32->q33). MCB studies also further defined structural chromosome abnormalities involving chromosomes 1, 4, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 21, and 22. Complete data were available for eight cases with secondary abnormalities. In these cases, no association was found between the presence of secondary chromosome abnormalities and the percentage of bone marrow involvement: three of seven patients with secondary abnormalities had <50% blast cells and four of seven patients with secondary abnormalities had >50% blast cells. Nor was any trend detected type of abnormality and percentage of blast cells in the bone marrow.

DISCUSSION

Our series included 14 patients with bone marrow infiltration by L3 lymphoblasts. Half of these malignancies relapsed and three (21%) were refractory to therapy. Overall survival was 21%, which is markedly lower than the median survival reported for Stage IV Burkitt lymphoma/L3-ALL (approximately 70%) in the United States, Western Europe, and Southeastern Brazil [2,11–13,18], where short-duration, intensive chemotherapy, including CNS-directed therapy, has resulted in an overall 5-year survival rate of about 90% [2]. The high rate of relapse and resistant disease among our patients identify them as a group at very high risk. The causes of the disease aggressiveness in our series cannot be addressed with the present study design, but comorbidities related to advanced disease stage, delayed diagnosis, and other yet unexplained biological characteristics might have contributed to the severity of the disease. Late diagnosis was also the probable cause of elevated LDH at diagnosis in our study group; this factor is associated with poor event-free survival in children and adolescents with mature B-cell NHL [2,18].

No biomarkers other than LDH and primary site have been shown to improve the risk stratification of Burkitt lymphoma [18], and the identification of additional markers is an important goal. Secondary chromosomal abnormalities have been implicated in prognosis, but not consistently so [9,10,14,19–21]. Because our patients had extremely advanced-stage disease, we postulated that cytogenetic findings would reveal clonal abnormalities associated with outcome. The most frequent secondary chromosomal abnormalities in our cases were observed in chromosome arms 1q and 13q, as reported previously [9,10,19–21]. Although 13q losses are known to adversely affect BL prognosis, the prognostic significance of rearrangements involving 1q remains controversial [9,10,19–21]. Seventy-one percent of our patients with 1q abnormalities had a poor response to therapy. Therefore, our data support the frequent occurrence of 1q and 13q abnormalities in childhood BL/L with bone marrow involvement. Several genes in the 1q region that encode proteins involved in prevention of apoptosis, such as *BCL9* and *MCL1*, may be involved in BL pathogenesis. *MCL1* alterations were found in 22% of BL cases in a genomic profile-based study [22]. Most of the previously reported 13q alterations have been del(13q) involving the 13q34 region [19,21]. In contrast, we detected two 13q additions involving chromosomal band q34; clinical and pathological differences between losses and gains in this chromosomal region have not been described. Chromosome 13 candidate genes include *BAFF*

(13q32q34), shown to be involved in BL apoptosis [20], and a new family of regulatory micro-RNA genes [23].

We observed a degree of heterogeneity of IGH/MYC gene fusion not previously reported in Burkitt lymphoma. In two patients, our initial FISH studies showed three IGH/MYC fusion signals rather than the two expected from a balanced t(8;14) translocation. The third signal could reflect duplication of the IGH/MYC gene fusion on chromosome 14. However, in one patient the MYC signal originated from chromosome 10, suggesting a different manner of rearrangement. Further study will be required to determine whether such additional MYC rearrangements have prognostic implications.

Clonal variation and routes of cytogenetic evolution in Burkitt lymphoma have not been explored. Although detection of secondary cytogenetic abnormalities in the bone marrow may add information of value to current staging approaches, we were unable to demonstrate an association between the presence and type of secondary cytogenetic abnormalities and the level of bone marrow infiltration probably due to the small number of cases. Moreover, secondary chromosomal abnormalities do not appear to be restricted to advanced disease stage, as they have been reported at earlier stages [19,21,23]. Hence, the contribution of cytogenetic analysis to prognosis remains unknown. It is possible that larger molecular and cytogenetic studies with more patients systematically tested may add prognostic information, particularly for advanced-stage disease.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Amanda F. de Figueiredo, Tarsis P. Vieira, and Roberto R. C. de Matos for their support, and pathologists Paulo Antônio Roberto Faria and Luciana Pinto for their contributions. We are grateful to Sharon Naron for editing the manuscript.

REFERENCES

- Magnath IT. African Burkitt's lymphoma. History, biology, clinical features, and treatment. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991;13:222-246.
- Yustein JT, Dang CV. Biology and treatment of Burkitt's lymphoma. *Curr Opin Hematol* 2007;14:375-381.
- Ferry JA. Burkitt's lymphoma: Clinicopathologic features and differential diagnosis. *Oncologist* 2006;11:375-383.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33:451-458.
- Sweetlow S, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues, 4th edition. Lyon: IARC Press; 2008.
- Hassan R, Klumb CE, Felisbino FE, et al. Clinical and demographic characteristics of Epstein-Barr virus-associated childhood Burkitt's lymphoma in Southeastern Brazil: Epidemiological insights from an intermediate risk region. *Haematologica* 2008;93:780-783.
- Hecht JL, Aster JC. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000;18:3707-3721.
- May PC, Foot N, Dunn R, et al. Detection of cryptic and variant IGH-MYC rearrangements in high-grade non-Hodgkin's Lymphoma by fluorescence *in situ* hybridization: Implications for cytogenetic testing. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;198:71-75.
- Onciu M, Schlette E, Zhou Y, et al. Secondary chromosomal abnormalities predict outcome in pediatric and adult high-stage Burkitt lymphoma. *Cancer* 2006;107:1084-1092.
- García JL, Hernandez JM, Gutiérrez NC, et al. Abnormalities on 1q and 7q are associated with poor outcome in sporadic Burkitt's lymphoma. A cytogenetic and comparative genomic hybridization study. *Leukemia* 2003;17:2016-2024.
- Murphy SB. Classification, staging and end-results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphoma—Dissimilarities from lymphoma in adults. *Semin Oncol* 1980;7:332-339.
- Pate C. Treatment of mature B-ALL and high grade B-NHL in children. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002;15:695-711.
- Klumb CE, Schramm MT, De Resende LM, et al. Treatment of children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma in developing countries: The experience of a single center in Brazil. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004;26:462-468.
- de Souza MT, Mkrichyan H, Hassan R, et al. Secondary abnormalities involving 1q or 13q and poor outcome in high stage Burkitt leukemia/lymphoma cases with 8q24 rearrangement at diagnosis. *Int J Hematol* 2011;93:232-236.
- Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. ISCN, 2009: An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: Karger; 2009.
- Starke H, Nietzel A, Weise A, et al. Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): Genotype-phenotype correlation and classification. *Hum Genet* 2003;114:51-67.
- Weise A, Masek K, Fickelscher I, et al. Molecular definition of high-resolution multicolor banding probes: First within the human DNA sequence anchored FISH banding probe set. *J Histochem Cytochem* 2008;56:487-493.
- Cairo MS, Spoto R, Gerrard M, et al. Advanced stage, increased lactate dehydrogenase, and primary site, but not adolescent age (≥ 15 years), are associated with an increased risk of treatment failure in children and adolescents with mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Results of the FAB/LMB 96 study. *J Clin Oncol* 2012;30:387-393.
- Lopes MA, Sanger WG, Le Beau MM, et al. Chromosome abnormalities may correlate with prognosis in Burkitt/Burkitt-like lymphomas of children and adolescents: A report from Children's Cancer Group Study CCG-E08. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004;26:169-178.
- Poirel HA, Cairo MS, Heemaa NA, et al. Specific cytogenetic abnormalities are associated with a significantly inferior outcome in children and adolescents with mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Results of the FAB/LMB 96 international study. *Leukemia* 2009;23:323-331.
- Nelson M, Perkins SL, Dave BJ, et al. An increased frequency of 13q deletions detected by fluorescence *in situ* hybridization and its impact on survival in children and adolescents with Burkitt lymphoma: Results from the Children's Oncology Group study CCG-5961. *Br J Haematol* 2010;148:600-610.
- Giulino-Roth L, Wang K, MacDonald TY, et al. Targeted genomic sequencing of pediatric Burkitt lymphoma identifies recurrent alterations in antiapoptotic and chromatin-remodeling genes. *Blood* 2012;120:5181-5184.
- Shiffman JD, Lorimer PD, Rodic V, et al. Genome wide copy number analysis of paediatric Burkitt lymphoma using formalin-fixed tissues reveals a subset with gain of chromosome 13q and corresponding miRNA over expression. *Br J Haematol* 2011;155:477-486.

12. ANEXO IV

Tabela Suplementar 1: Mutações intrônicas encontradas na coorte do estudo

GENE	POSIÇÃO	ALTERAÇÃO DE SITIOS DE SPLICING#	REFERENCIA
	c.300+1G>A	Sim	MU82525564/COSM2049199 (0,004149)
	c.300+10G>A	Não	ND
	c.300+14T>A	Não	ND
	c.300+19A>G	Não	ND
	c.300+25C>T	Não	ND
	c.300+27G>A	Não	ND
	c.360+28G>A	Não	ND
	c.300+31A>G	Não	ND
	c.300+34C>A	Não	ND
	c.300+38C>G	Não	ND
	c.300+56C>G	Não	ND
	c.300+58C>G	Não	ND
	c.300+59G>A	Não	ND
	c.300+64T>G	Não	ND
	c.300+68G>A	Não	ND
	c.300+75T>G	Não	ND
	c.300+76C>G	Não	ND
	c.300+81A>G	Não	ND
	c.300+90C>T	Não	ND
	c.300+105C>G	Não	ND
TCF3	c.1813+14C>T	Não	ND
	c.1813+25C>T	Não	ND
	c.1813+31C>A	Não	ND
	c.1813+32C>T	Não	ND
	c.1813+35C>T	Não	ND
	c.1813+42C>T	Não	ND
	c.1813+45C>T	Não	ND
	c.1813+77T>G	Não	ND
	c.1813+83C>G	Não	ND
	c.1813+90insC	Não	ND
	c.1587-365C>G	Não	ND
	c.1587-317G>A	Não	ND
	c.1587-78A>C	Não	ND
	c.1587-73C>T	Sim	ND
	c.1587-63C>T	Não	ND
	c.1587-58C>T	Não	ND
	c.1587-54C>T	Não	ND
	c.1587-16C>T	Não	ND
	c.1587-11C>T	Não	ND

Predição feita de acordo com análise no banco de dados *Human Splicing Finder 3.1* (<http://www.umd.be/HSF3/index.html>)

13. ANEXO V

Manuscritos publicados em colaboração durante o período do doutorado

- Capela de Matos RR, Othman MAK, Ferreira GM, Costa ES, Melo JB, Carreira IM, de Souza MT, Lopes BA, Emerenciano M, Land MGP, Liehr T, Ribeiro RC, Silva MLM. *Molecular approaches identify a cryptic MECOM rearrangement in a child with a rapidly progressive myeloid neoplasm*. Cancer Genet. 2018 Feb;221:25-30.
- Ney Garcia DR, de Souza MT, de Figueiredo AF, Othman MAK, Rittscher K, Abdelhay E, Capela de Matos RR, Meyer C, Marschalek R, Land MGP, Liehr T, Ribeiro RC, Silva MLM. *Molecular characterization of KMT2A fusion partner genes in 13 cases of pediatric leukemia with complex or cryptic karyotypes*. Hematol Oncol. 2017 Dec;35(4):760-768.
- Capela de Matos, RR.; Ney Garcia, DR.; Cifoni, E; Othman, MAK.; De Souza, MT; Carboni, EK.; Ferreira, GM.; Liehr, T; Ribeiro, RC; Silva, MLM. GAS6 Oncogene and Reverse MLLT3-KMT2A Duplications in an Infant with Acute Myeloid Leukemia and a Novel Complex Hyperdiploid Karyotype: Detailed High-Resolution Molecular Cytogenetic Studies. Cytogenetic And Genome Research. 2017;152:33-37.
- de Matos RR, De Figueiredo AF, Liehr T, Alhourani E, De Souza MT, Binato R, Ribeiro RC, Silva ML. *A Novel Three-Way Variant t(8;13;21)(q22;q33;q22) in a Child with Acute Myeloid Leukemia with RUNX1/RUNX1T1 : The Contribution of Molecular Approaches for Revealing t(8;21) Variants*. Acta Haematol. 2015;134(4):243-5.
- Ney Garcia DR; Vieira, TP; Liehr, T; Abdelhay, E; Binato, R; Neves, F; De Souza MT; Ribeiro, RC; Silva, MLM. Cryptic t(19;19)(p13.3;q13.2), involving the TCF3/E2A gene, detected and described by molecular cytogenetics in a patient with childhood B-cell progenitor acute

lymphoblastic leukemia. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 2014;18:217-221.