



MINISTÉRIO DA SAÚDE

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

ROBERTO RODRIGUES CAPELA DE MATOS

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANOMALIAS NOVAS E RECORRENTES EM
CARIÓTIPOS COMPLEXOS NA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA DA INFÂNCIA: UM
ESTUDO POR CITOGENÉTICA CLÁSSICA, ABORDAGENS MOLECULARES E
AVALIAÇÃO DE DADOS CLÍNICOS**

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Macedo Silva

Coorientador: Prof. Dr. Raul C. Ribeiro

RIO DE JANEIRO

2019



MINISTÉRIO DA SAÚDE

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

ROBERTO RODRIGUES CAPELA DE MATOS

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANOMALIAS NOVAS E RECORRENTES EM
CARIÓTIPOS COMPLEXOS NA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA DA INFÂNCIA: UM
ESTUDO POR CITOGENÉTICA CLÁSSICA, ABORDAGENS MOLECULARES E
AVALIAÇÃO DE DADOS CLÍNICOS**

Tese de Doutorado do
Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em
Oncologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA)

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Macedo Silva
Coorientador: Prof. Dr. Raul C. Ribeiro

RIO DE JANEIRO

2019

M433d Matos, Roberto Rodrigues Capela
Detecção e caracterização de anomalias novas e recorrentes em cariótipos complexos na leucemia mieloide aguda da infância: um estudo por citogenética clássica, abordagens moleculares e avaliação de dados clínicos. / Roberto Rodrigues Capela de Matos. – Rio de Janeiro, 2019.
141 f.: il. color.

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

Orientadora: Dra. Maria Luiza Macedo Silva

Co-orientador: Dr. Raul C. Ribeiro

1. Leucemia mielóide aguda. 2. Cariótipo. 3. Análise Citogenética. I. Silva, Maria Luiza Macedo (Orient.). II. Ribeiro, Raul C. (Co-orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

Catálogo na fonte

Kátia Simões CRB7/5952

Palavras chave: 1. Leucemia da infância, 2. Leucemias agudas, 3. Leucemia mielóide aguda pediátrica, 4. Citogenética, 5. Citogenética molecular, 6. Cariótipo complexo.



MINISTÉRIO DA SAÚDE

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

AUTOR: ROBERTO RODRIGUES CAPELA DE MATOS

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANOMALIAS NOVAS E RECORRENTES EM
CARIÓTIPOS COMPLEXOS NA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA DA INFÂNCIA: UM
ESTUDO POR CITOGENÉTICA CLÁSSICA, ABORDAGENS MOLECULARES E
AVALIAÇÃO DE DADOS CLÍNICOS

ORIENTADOR: Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Macedo Silva

COORIENTADOR: Prof. Dr. Raul C. Ribeiro

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof.^a Dr.^a Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá

Prof.^a Dr.^a Raquel Ciuvalschi Maia

Prof.^a Dr.^a Sima Ferman

Prof. Dr. Marcelo Gerardin Poirot Land

Prof.^a Dr.^a Renata Binato Gomes

Prof.^a Dr.^a Gilda Alves Brown

RIO DE JANEIRO

2019

**À minha filha, minha esposa,
e a todas as crianças com câncer,
dedico**

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, meu refúgio e minha fortaleza;

Aos meus pais **Marize e Roberto**, pela minha vida, minha formação, e apoio incansável;

À minha orientadora, a **Dr.^a Maria Luiza**, por me incentivar e por me introduzir no campo da citogenética humana;

Ao meu coorientador, o **Dr. Raul Ribeiro**, por toda a contribuição intelectual nos manuscritos publicados e neste trabalho;

À **Dr.^a Eliana Abdelhay**, por sua excelente didática e por toda a estrutura física e suporte material, para a realização deste trabalho;

Aos pacientes, **crianças e adolescentes**, protagonistas deste trabalho, e a seus **responsáveis**;

Ao **Programa de Pós-graduação em Oncologia do INCA**, pela oportunidade;

Ao **corpo docente** do Programa de Pós-graduação em Oncologia do INCA, por toda contribuição e incentivo na minha formação acadêmica;

Aos membros da **banca examinadora**, pela contribuição em minha formação, e pela gentileza de aceitar o convite;

Aos **funcionários da secretaria** de Pós-Graduação do INCA, Rodrigo, Danielle e Andreia, por toda sua dedicação e presteza;

Ao **Dr. Thomas Liehr**, pelos projetos em colaboração com nosso laboratório através do intercâmbio CAPES (PROBRAL/DAAD - n^o. 419/14);

Aos **hematologistas** que colaboraram com este estudo, e com nosso projeto, fornecendo material e dados clínicos;

Às agências de fomento, pelo aporte financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste projeto;

Aos meus amigos **Mariana, Kelly, Amanda, Daniela, Luana, Elaine, Deborah e Thiago**, pelos ensinamentos no dia a dia, por toda ajuda em discussões científicas, e por aquele “ombro amigo”;

Aos **amigos do CEMO**, pela convivência alegre e agradável do dia a dia;

À **minha querida esposa Alice**, e à **nossa amada filha Helena**, que pelo amor me motivam e impulsionam todos os dias.

**“Bem-aventurada aquela que acreditou,
porque será cumprido
o que o Senhor lhe prometeu.”**

**“A minha alma engrandece o Senhor,
e o meu espírito se alegra em Deus, meu Salvador,
porque olhou para a humildade de sua serva.”**

Lc 1,39-56



MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANOMALIAS NOVAS E RECORRENTES EM CARIÓTIPOS COMPLEXOS NA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA DA INFÂNCIA: UM ESTUDO POR CITOGENÉTICA CLÁSSICA, ABORDAGENS MOLECULARES E AVALIAÇÃO DE DADOS CLÍNICOS

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Roberto Rodrigues Capela de Matos

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) representa um grupo bastante heterogêneo de malignidades hematológicas. Na LMA podem ser encontradas alterações citogenéticas associadas com os grupos de risco, de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), e relacionadas aos subtipos morfológicos, de acordo com a classificação Franco-Americano-Britânica (FAB). Por exemplo, a $t(8;21)(q22;q22) / RUNX1-RUNX1T1$, também associada ao subtipo FAB M2, a $t(15;17)(q22;q21) / PML-RAR\alpha$, associada ao FAB M3, e a $inv(16)(p13;q22) / CBF\beta-MYH11$, associada ao M4, as quais estão relacionadas a um prognóstico favorável, de acordo com a resposta ao tratamento. Por outro lado, pacientes que apresentam -5 ou a $del(5q)$, -7 , a $del(7q)$, a $inv(3q) / t(3;3)(q21;q26) / GATA2 / MECOM$, a $t(6;9)(p23;q34) / DEK-NUP214$, $del(9q)$, $t(9;22)(q34;q11) / BCR-ABL1$, rearranjos do gene *KMT2A* e, cariótipos complexos com estas anormalidades e/ou outras aberrações crípticas, são selecionados para protocolo de alto risco, incluindo o transplante de medula óssea. Cariótipos complexos (CC) (10% da LMA) podem carrear, crípticamente, uma ou mais anomalias cromossômicas as quais podem ser responsáveis por um prognóstico adverso. A literatura vem sugerindo uma correlação entre o conjunto das aberrações detectadas em um cariótipo complexo, e a resposta clínica, o que torna clara a necessidade de uma refinação deste perfil cariotípico. A citogenética ainda é considerada uma das mais poderosas ferramentas para compreensão dos rearranjos cromossômicos e mecanismos subjacentes à transformação leucêmica, portanto, com este trabalho, nós objetivamos detectar e caracterizar, através da combinação de técnicas de citogenética convencional (bandeamento G) e molecular (*fluorescence in situ hybridization*, *Multiplex-FISH* e *multicolor chromosome banding*), cariótipos complexos e/ou inconclusivos, de modo a contribuir para uma melhor definição do perfil cariotípico, de pacientes pediátricos diagnosticados com LMA. Em nossa amostra total de pacientes pediátricos diagnosticados com LMA, 22 (16,5%) foram caracterizados apresentando cariótipos complexos. Neste contexto, este estudo foi importante para discutir pela primeira vez a prevalência dos CCs na LMA da infância no Brasil. Além disto, os resultados deste trabalho demonstraram a eficácia das abordagens cito-moleculares na caracterização de cariótipos complexos, permitindo a contribuição com novos achados para a literatura, através da detecção de anomalias subcariotípicas raras, e novas variantes complexas, que apresentaram impacto prognóstico na leucemia mielóide aguda da infância.



MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

**DETECTION AND CHARACTERIZATION OF NOVEL AND RECURRENT
ABNORMALITIES IN CHILDHOOD ACUTE MYELOID LEUKEMIA
COMPLEX KARYOTYPES: CLASSICAL CYTOGENETICS, MOLECULAR
APPROACHES AND CLINICAL DATA EVALUATION**

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

Roberto Rodrigues Capela de Matos

Acute Myeloid Leukemia (AML) represents a heterogeneous group of hematologic malignancies. In the AML, cytogenetic alterations can be found associated with the risk groups according to the World Health Organization (WHO) classification and related to morphological subtypes according to the Franco-American-British classification (FAB). For example, the $t(8;21)(q22;q22)$ / *RUNX1-RUNX1T1*, also associated with the FAB M2 subtype, $t(15;17)(q22;q21)$ / *PML-RAR α* , associated with FAB M3, $inv(16)(p13;q22)$ / *CBF β -MYH11*, associated with M4, which are related to a favorable prognosis, according to the treatment response. On the other hand, patients with -5 or $del(5q)$, -7 or $del(7q)$, $inv(3q)$ / $t(3;3)(q21;q26)$ / *GATA2 / MECOM*, the $t(6;9)(p23;q34)$ / *DEK-NUP214*, $del(9q)$, $t(9;22)(q34;q11)$ / *BCR-ABL1*, *KMT2A* gene rearrangements, and complex karyotypes, with these abnormalities and/or other cryptic aberrations, are selected for high-risk protocol, including bone marrow transplantation. Complex karyotypes (CC) (10% of AML) may cryptically carry one or more chromosomal abnormalities which may be responsible for an adverse prognosis. The literature has been suggesting a correlation between the set of aberrations detected in a complex karyotype, and the clinical response, which makes clear the need for refining this karyotype profile. Cytogenetic studies are still considered one of the most powerful tools for understanding the chromosomal rearrangements and mechanisms underlying the leukemic transformation. In this work, we aim to detect and characterize, through the combination of conventional (G-banding) and molecular (fluorescence *in situ* hybridization, Multiplex-FISH, and multicolor chromosome banding), complex and / or inconclusive karyotypes, in order to contribute to a better definition of the karyotype profile of pediatric patients diagnosed with AML. From our total sample of pediatric patients diagnosed with AML, 22 (16.5%) were characterized as presenting complex karyotypes. In this context, this study was important to discuss for the first time the prevalence of CCs in Brazilian childhood AML. In addition, the results of this work demonstrated the efficacy of the cyto-molecular approaches in the characterization of complex karyotypes, allowing the contribution with new findings for the literature, through the detection of rare subcariotypical anomalies, and new complex variants that presented a prognostic impact on childhood acute myeloid leukemia.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
1. Introdução	19
1.1. Leucemias Agudas.....	19
1.2. Leucemia Mielóide Aguda.....	21
1.2.1. Epidemiologia da LMA Pediátrica	22
1.3. Classificação e diagnóstico laboratorial da LMA	23
1.4. Patogênese da LMA.....	27
1.5. Padrão citogenético da LMA pediátrica.....	28
1.5.1. Leucemia Mielóide Aguda Core Binding Factor	30
1.5.2. Leucemia Promielocítica Aguda – Translocação t(15;17) – PML-RAR α ...33	
1.5.3. Leucemia Mielóide Aguda com rearranjo do gene KMT2A.....	34
1.5.4. Anormalidades cromossômicas sub-cariotípicas (Crípticas).....	36
1.6. A relevância da caracterização citogenética tumoral	38
1.7. Fatores prognósticos e classificação de risco da LMA.....	43
1.8. Cariótipos complexos.....	46
1.8.1. Mecanismos de formação dos cariótipos complexos.....	46
1.8.2. Cariótipos complexos na LMA	48
2. Objetivos	50
2.1. Objetivos específicos	50
3. Material e métodos.....	51
3.1. Desenho Experimental.....	51
3.2. Amostra e considerações éticas	52
3.3. Critérios de inclusão e exclusão.....	52
3.4. Estudo cromossômico pela técnica de bandeamento G	53
3.5. Estudo por citogenética molecular	54
3.5.1. Técnicas de FISH e M-FISH.....	54
3.5.2. Técnica de MCB	55
4. Resultados	57
4.1. Pacientes e local de estudo	57
4.2. Cromossomos, anormalidades e subtipos morfológicos	60
4.3. Casos com anormalidades associadas a LMA CBF	62
4.3.1. Envolvimento dos cromossomos 8, 21 e 22	62

4.3.2. Envolvimento dos cromossomos 8, 13 e 21	63
4.3.3. Envolvimento dos cromossomos 8, 17 e 21	64
4.3.4. Envolvimento dos cromossomos 8, 19 e 21	65
4.3.5. t(8;21) associada a outras anomalias cromossômicas	66
4.3.6. inv(16) associada a alterações numéricas.....	67
4.3.7. inv(16) associada a alterações estruturais.....	68
4.3.8. del(16).....	69
4.3.9. t(16;21)	69
4.4. Casos com anormalidades associadas a LPA.....	70
4.4.1. t(15;17) associada a inv(6)	70
4.4.2. t(15;17) associada a three-way t(6;9;10)	71
4.5. Casos com anormalidades envolvendo a região 11q23/r-KMT2A	72
4.5.1. r-KMT2A na t(6;11)	72
4.5.2. r-KMT2A na t(9;11)	73
4.5.3. r-KMT2A na t(10;11)	74
4.5.4. Envolvimento dos cromossomos 1, 8 e 11	76
4.5.5. Envolvimento dos cromossomos 10, 11 e 14	76
4.5.6. Envolvimento dos cromossomos 11, 16 e 19	77
4.6. Envolvimento do cromossomo 11 sem r-KMT2A.....	78
4.7. Envolvimento dos cromossomos 5 e/ou 7.....	78
4.7.1. del(5q).....	78
4.7.2. t(3;7)	79
4.7.3. t(5;19) e t(7;13)	80
4.8. Trissomias e outras anormalidades adicionais.....	81
5. Discussão.....	85
6. Conclusões.....	100
7. Referências	101
Anexos	118
Anexo I - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do INCA	118
Anexo II - Manuscrito publicado	119
Anexo III - Manuscrito publicado.....	122
Anexo IV - Manuscrito publicado	127
Anexo V - Manuscrito aceito para publicação	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1.	Classificação morfológica, imunológica e citoquímica da LMA.....	23
Tabela 1.2.	Classificação da Leucemia Mielóide Aguda proposta pela Organização Mundial da Saúde (2016).....	25
Tabela 1.3.	Sumário das anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais na LMA.....	40
Tabela 1.4.	Estratificação de risco, recaída e sobrevida da LMA.....	44
Tabela 4.1.	Dados demográficos e clínicos dos pacientes diagnosticados com LMA apresentando cariótipos complexos – Sexo, idade ao diagnóstico, leucócitos, plaquetas e evolução clínica.....	57
Tabela 4.2.	Pacientes diagnosticados com LMA apresentando cariótipos complexos – Bandeamento G, FISH e MCB.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Medula óssea hiperclular com diversos blastos mielóides.....	19
Figura 1.2.	Sintomas comuns de Leucemia.....	19
Figura 1.3.	Esquemática da maturação das células hematopóéticas e suas respectivas linhagens de acordo com a classificação FAB.....	22
Figura 1.4.	Esquemática do modelo <i>multistep</i> para a formação da LMA.....	26
Figura 1.5.	As anormalidades genômicas na LMA.....	28
Figura 1.6.	Translocação t(8;21)(q22;q22).....	30
Figura 1.7.	Inversão inv(16)(q22;p13).....	31
Figura 1.8.	Translocação t(15;17)(q22;q21).....	33
Figura 1.9.	Rearranjo do gene <i>KMT2A</i>	35
Figura 1.10.	Translocação críptica envolvendo os cromossomos 8, 13 e 21.....	36
Figura 1.11.	Cromoanagênese.....	45
Figura 3.1.	<i>Multicolor Chromosome Banding</i>	55
Figura 4.1.	Subtipos FAB associados às diferentes faixas etárias observadas no presente estudo.....	59
Figura 4.2.	Prevalência dos cromossomos envolvidos nas anormalidades observadas neste estudo.....	60
Figura 4.3.	Prevalência dos subtipos FAB presentes neste estudo.....	60
Figura 4.4.	Alterações associadas às diferentes faixas etárias observadas no presente estudo.....	61
Figura 4.5.	Caracterização citogenético-molecular – Paciente 5.....	62
Figura 4.6.	Caracterização citogenético-molecular – Paciente 10.....	63
Figura 4.7.	Caracterização citogenético-molecular – Paciente 12.....	64
Figura 4.8.	Caracterização citogenético-molecular – Paciente 22.....	65
Figura 4.9.	Caracterização citogenético-molecular – Paciente 11.....	65
Figura 4.10.	Caracterização citogenético-molecular – Paciente 2.....	66
Figura 4.11.	Caracterização citogenético-molecular – Paciente 17.....	67
Figura 4.12.	Caracterização citogenético-molecular – Paciente 6.....	68
Figura 4.13.	Caracterização citogenético-molecular – Paciente 9.....	69
Figura 4.14.	Caracterização citogenético-molecular – Paciente 7.....	70
Figura 4.15.	Caracterização citogenético-molecular – Paciente 20.....	71
Figura 4.16.	Caracterização citogenético-molecular – Paciente 14.....	72
Figura 4.17.	Caracterização citogenético-molecular – Paciente 19.....	73

Figura 4.18. Caracterização citogenético-molecular – Paciente 8.....	74
Figura 4.19. Caracterização citogenético-molecular – Paciente 4.....	75
Figura 4.20. Caracterização citogenético-molecular – Paciente 16.....	76
Figura 4.21. Caracterização citogenético-molecular – Paciente 21.....	76
Figura 4.22. Caracterização citogenético-molecular – Paciente 1.....	77
Figura 4.23. Caracterização citogenético-molecular – Paciente 13.....	78
Figura 4.24. Caracterização citogenético-molecular – Paciente 15.....	79
Figura 4.25. Caracterização citogenético-molecular – Paciente 3.....	80
Figura 4.26. Caracterização citogenético-molecular – Paciente 18.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL	<i>C-Abl Oncogene 1, Non-Receptor Tyrosine Kinase</i>
ALM	<i>Activating Loop Mutations</i>
AML	<i>Acute Myeloid Leukemia – Leucemia mielóide aguda</i>
APC	<i>Adenomatosis Polyposis Coli Tumor Suppressor</i>
AXL	Receptor de tirosina quinase AXL
BACs	<i>Bacterial Artificial Chromosomes – Cromossomos artificiais bacterianos</i>
BCR	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
BFM	Berlim-Frankfurt-Münster
CBF	<i>Core-Binding Factor</i>
CBF β	<i>Core-Binding Factor, Subunidade Beta</i>
CC	Cariótipo(s) Complexo(s)
CCD	<i>Charge Coupled Device / Dispositivo de carga acoplada</i>
CEP	<i>Centromere probes / Sondas para centrômero</i>
CD	<i>Cluster Differentiation / Antígeno de diferenciação</i>
CDK6	<i>Cyclin Dependent Kinase 6</i>
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>
CEMO	Centro de Transplante de Medula Óssea
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization / Hibridização Genômica Comparativa</i>
CTNNA1	<i>Catenin Alpha 1</i>
DAPI	4,6-Diamino-2-Fenilindol
DEK	<i>DEK Oncogene</i>
DIAPH1	<i>Diaphanous Related Formin 1</i>
DNA	<i>Desoxorribonucleic acid / Ácido Desoxirribonucleico</i>
DOP-PCR	<i>Degenerate oligonucleotide primed – polymerase chain reaction / Reação em cadeia da polimerase com oligonucleotídeos degenerados</i>
EGR1	<i>Early Growth Response 1</i>
ELL	<i>Elongation Factor For RNA Polymerase II</i>
EVI1/MECOM	<i>Ecotropic Virus Integration Site 1 Protein Homolog</i>

FAB	<i>French-American-British Classification</i> / Classificação Franco-americano-britânica
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridization</i> – Híbridização <i>in situ</i> por fluorescência
FLT3	<i>FMS-like Tyrosine Kinase 3</i>
GAS6	<i>Growth Arrest Specific 6</i>
GLRA1	<i>Glycine Receptor Alpha 1</i>
HLA-DR	Antígeno humano do complexo de histocompatibilidade de classe 2
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IPPMG	Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira
ISCN	<i>International System for Chromosome Nomenclature</i> / Sistema Internacional de Nomenclatura Cromossômica
ITD	<i>Internal Tandem Duplication</i>
KCl	Cloreto de Potássio
KMT2A	<i>Lysine (K)-Specific Methyltransferase 2A</i>
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
LSI	<i>Locus Specific</i> - lócus específico
M	Molar
M4Eo	Subtipo M4 com eosinofilia
MAL	<i>Mal, T-Cell Differentiation Protein</i>
mb	<i>megabases</i>
MCB	<i>Multicolor Chromosome Banding</i> / Bandeamento cromossômico multicolorido
M-FISH	<i>Multiplex-FISH</i> / FISH multicolorido
mL	Mililitro
MLLT (1/3/4/10/11)	<i>Mixed-Lineage Leukemia; Translocated To (1/3/4/10/11)</i>
mm	Milímetro
MPO	Mieloperoxidase
MRC	<i>Medical Research Council</i>
MYH11	<i>Myosin, Heavy Chain 11</i>

NPM1	<i>Nucleophosmin</i>
NUP214	<i>Nucleoporin 214kDa</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OTT	<i>One-Twenty Two Protein</i>
PCP	<i>Partial Chromosome Painting</i> - Pintura Cromossômica Parcial
Ph	Cromossomo Philadelphia
pH	Potencial Hidrogeniônico
PML	<i>Promyelocytic Leukemia Protein</i>
PTPN11	<i>tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11</i>
QT	Quimioterapia
RAR α	<i>Retinoic Acid Receptor Alpha</i> / Receptor de Ácido Retinóico Alfa
RAS	<i>GTPase activating protein</i>
RPS14	<i>Ribosomal Protein S14</i>
RQ-PCR	<i>Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> / Transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
RUNX1	<i>Runt-Related Transcription Factor 1</i>
RUNX1T1	<i>Runt-Related Transcription Factor 1; Translocated To 1</i>
SB	<i>Sudan Black B</i>
SEC	<i>Super Elongation Complex</i>
SKY	<i>Spectral Karyotype</i> / Cariótipo Espectral
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism array</i>
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SSC	Solução salina de citrato
ST	Sobrevida Total
TdT	<i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase</i>
UBE2D2	<i>Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 D2</i>
WCP	<i>Whole Chromosome Painting</i> - Pintura cromossômica total
WT1	<i>Wilms Tumor 1</i>
(gene) - (gene)	Fusão gênica entre os genes discriminados

Termos citogenéticos - Simbologia da nomenclatura:

c	constitucional
del	Deleção
der	Derivativo
dic	Dicêntrico
dup	Duplicação
inv	Inversão cromossômica
ter	Região cromossômica terminal
mar	Cromossomo marcador
p	Braço curto do cromossomo
q	Braço longo do cromossomo
subtel	Região Subtelomérica
t	translocação
(-)	sinal negativo Perda de material genético
(+)	sinal positivo Ganho de material genético
()	parênteses Delimita os cromossomos alterados e os pontos de quebra
[Nº], nº entre []	Representa o número de células com determinada alteração
(,) vírgula	Separa nº 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
(/) barra inclinada	Separa os clones de um cariótipo
(?) interrogação	Identificação questionável de cromossomo ou estrutura cromossômica
X e Y	Cromossomos sexuais
(:) dois pontos	Quebra
::) dois pontos	Quebra e união
duplos	
(~)	Alcance aproximado
->	de – à

1. Introdução

1.1. Leucemias Agudas

A leucemia é um tipo câncer que acomete a medula óssea (MO) e o sangue periférico (SP). Dependendo do curso clínico, as leucemias podem ser classificadas como crônicas ou agudas. As leucemias agudas (LAs) são um grupo heterogêneo de doenças que se originam da interação entre alterações genéticas e epigenéticas em progenitores hematopoiéticos, levando à desregulação de múltiplas importantes vias de transdução de sinais, resultando em insuficiência hematopoiética devido a uma proliferação clonal de precursores imaturos (ROSS *et al.*, 2011).

Estas células precursoras neoplásicas são originadas na medula óssea, e podem se infiltrar no sangue periférico e tecidos tais como amígdalas, linfonodos, pele, baço, rins, sistema nervoso central, entre outros. (GILLILAND; JORDAN; FELIX, 2004; INCA, 2018). As LAs são divididas em dois grupos, leucemia mielóide, quando acometem a linhagem dos mieloblastos, ou leucemia linfóide, quando acometem a linhagem linfoblástica. Os grupos de LAs diferem um do outro em características específicas no que diz respeito as anormalidades citogenéticas e genômicas, perfil morfológico e imunofenotípico, resposta à terapia e ao curso clínico da doença (LO-COCO & AMMATUNA, 2006; ARCECI & ALPENC, 2009).

Assim como outros tipos de câncer, a LA pode resultar da consequência de múltiplas etapas mutacionais de diversos genes, nas células progenitoras, dentro do microambiente medular (ALBERTS *et al.*, 2004).

No primeiro estágio, uma mutação ocasiona uma hematopoese clonal. São oriundas desta etapa, alterações clonais comumente associadas à perda de genes supressores de tumor. Contudo, sabe-se que, isoladamente, este único tipo de mutação não é suficiente para o desenvolvimento da leucemia, sendo, para isso, necessária a aquisição de anormalidades cariotípicas e/ou mutações nas células da medula óssea. Neste último estágio, prévio ao estabelecimento da doença, é evidenciada a parada maturativa, seguido por uma infiltração de blastos leucêmicos na medula (GILLILAND; JORDAN; FELIX, 2004).

A MO, de pacientes diagnosticados com LA, normalmente se apresenta hiper celular, e no sangue periférico é observada uma leucocitose, predominando as células imaturas (Fig. 1.1), sugerindo que as células alteradas possuem vantagem

na sobrevivência. Conforme aumenta o acúmulo e infiltração destas células imaturas na medula óssea, elas acabam por substituir mielócitos, megacariócitos, eritrócitos ou seus progenitores, culminando na perda da função da medula óssea e levando a complicações como hemorragias, infecções e anemia. Ao exame físico, o paciente pode apresentar palidez, febre, visceromegalias, sangramento nasal, hemorragias conjuntivais, sangramentos gengivais, equimoses e petéquias (Fig. 1.2), sendo a susceptibilidade a infecções e as hemorragias, os principais fatores que podem levar a óbito. No entanto, o diagnóstico acurado só é feito no exame da MO (mielograma) (BENNETT *et al.*, 1976; BLOOMFIELD; FOON; LEVINE, 1993), que é de fundamental importância para ajudar os médicos a estimar como a doença tende a progredir e a determinar a abordagem terapêutica mais adequada.

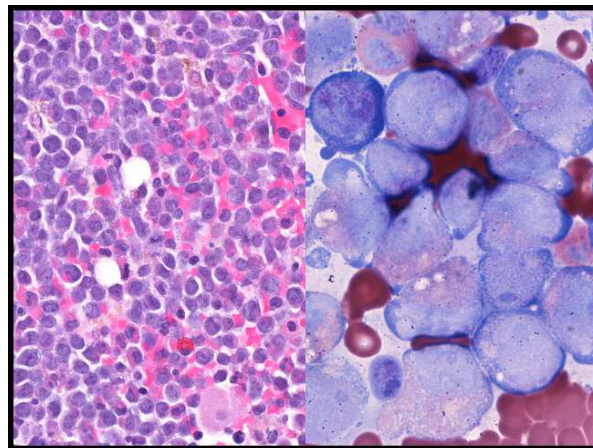


Figura 1.1. Medula óssea hipercelular com diversos blastos mielóides. Fonte: <<http://www.flickr.com/photos/lunarcaustic/2938630316/in/set-72157603324290191>>.

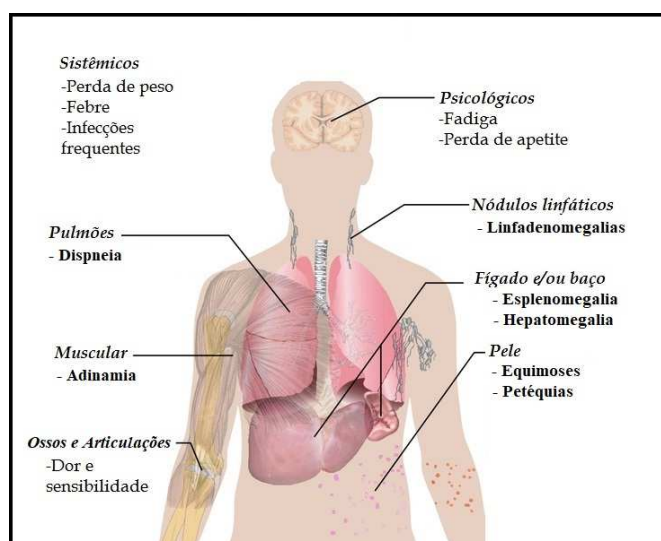


Figura 1.2. Sintomas comuns de Leucemia. Fonte: Modificado de <http://www.tabletsmanual.com/wiki/read/anemia_and_leukemia>.

O principal evento causador da leucemia ainda é desconhecido, porém alguns fatores podem estar associados com o desenvolvimento desta neoplasia no ser humano, como o estilo de vida, que engloba a alimentação, consumo de álcool, tabagismo, exposição a radiações ionizantes e agentes químicos como o benzeno, os quais danificam o DNA de células saudáveis da MO, viroses e a susceptibilidade genética. Além disto, estudos recentes apontam que outro fator associado a um aumento do risco de leucemia na infância é a idade materna >35 anos, ao nascimento do bebê. Este risco aumentado é evidente mesmo após isoladas as variáveis de controle para síndrome de Down, paridade e idade paterna (ESTEY & DÖHNER, 2006; ROSS *et al.*, 2011).

Com o advento das técnicas moleculares, houveram progressos no entendimento das transformações malignas a nível molecular, como por exemplo o conhecimento dos mecanismos de ativação de oncogenes e suas conseqüentes alterações no DNA, as quais se destacaram como fatores de risco em potencial para elucidar os mecanismos etiopatológicos das leucemias. Mais especificamente, expressões aberrantes de determinados proto-oncogenes também já estão bem estabelecidas como fatores que podem induzir o aparecimento da leucemia mieloide aguda (SANDLER & ROSS, 1997; ESTEY & DÖHNER, 2006).

1.2. Leucemia Mielóide Aguda

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença bastante heterogênea caracterizada pela transformação e expansão de uma célula-tronco progenitora de origem mieloide (HEAD, 2009). Através desta, no microambiente da medula óssea, ocorrerá um acúmulo excessivo de precursores mielóides, os quais perderam a competência para diferenciação e a capacidade de resposta a reguladores normais de proliferação (KASPERS & REINHARDT, 2011). Ainda é desconhecido o mecanismo que leva a célula progenitora mieloide a perder o controle da proliferação celular, causando a expansão do clone leucêmico. Se hipotetiza que estas aberrações genéticas podem ser oriundas de diferentes eventos mutacionais, como, por exemplo, translocações cromossômicas que podem gerar fusões gênicas responsáveis pelo fenótipo da doença, e deleções que podem nocautear genes reguladores de transcrição, dentre outras (ROWLEY, 1999; BRAEKELEER *et al.*, 2015).

A LMA pode se apresentar como uma doença *de novo* ou pode ser secundária a: uma evolução de mielodisplasia, uma crise blástica de leucemia mielóide crônica, tratamentos que utilizam agentes alquilantes, inibidores de topoisomerase e/ou radiação ionizante (RUND & BEN-YEHUDA, 2004; CREUTZIG *et al.*, 2018).

É uma doença mais comum em adultos, correspondendo a cerca de 80% dos casos de leucemias agudas em pacientes com uma média de 70 anos de idade, apresentando uma incidência de 4 casos a cada 100.000 indivíduos (REINHARDT, 2011).

1.2.1. Epidemiologia da LMA Pediátrica

Em pacientes pediátricos, a cada ano, a LMA alcança a marca de 7.6 milhões de novos casos no mundo – com aproximadamente 750 novos casos/ano no Brasil – o que corresponde a 20% das leucemias agudas nesta faixa etária e a cerca de 5% de todos os tipos de cânceres pediátricos. A LMA da infância apresenta dois picos de incidência, um logo ao nascer, diminuindo até o primeiro ano de vida, correspondendo a aproximadamente 40% dos casos, e outro na adolescência variando entre 25-30% dos casos (HEAD, 2009; KASPERS & REINHARDT, 2011; INCA, 2018; SOBOPE, 2018).

A literatura demonstra uma diferença geográfica relevante em relação à incidência de leucemias pediátricas, inclusive relatados entre diferentes grupos étnicos. Por exemplo, Arceci e Aplenc (2009), relataram que a incidência em crianças negras é de 5.8 casos por milhão, comparados a 4.8 casos por milhão em crianças brancas. Em relação às diferenças geográficas no surgimento da LMA, já foi descrita uma alta incidência da doença nas crianças de origem latina, hispânica e asiática, sendo a leucemia promielocítica aguda o subtipo mais encontrado entre as crianças de origem hispânica e latina (JÁCOMO; DE FIGUEIREDO-PONTES; REGO, 2008; ARCECI & ALPENC, 2009). Tais diferenças podem conter informações importantes, as quais possivelmente ajudarão no entendimento dos mecanismos etiológicos da LMA.

1.3. Classificação e diagnóstico laboratorial da LMA

Devido à alta heterogeneidade de apresentação desta neoplasia, foram estabelecidas classificações com o intuito de uniformizá-la. Inicialmente, a classificação francesa-americana-britânica (FAB) (BENNETT *et al.*, 1976; BENNETT *et al.*, 1985) foi a primeira classificação utilizada para as LMAs. Esta utiliza critérios morfológicos e citoquímicos, considera um percentual >30% de blastos na MO e divide as LMAs em oito subtipos que variam do M0 ao M7 de acordo com o grau de maturação celular predominante (Fig. 1.3), cada qual com suas respectivas peculiaridades (Tabela 1.1).

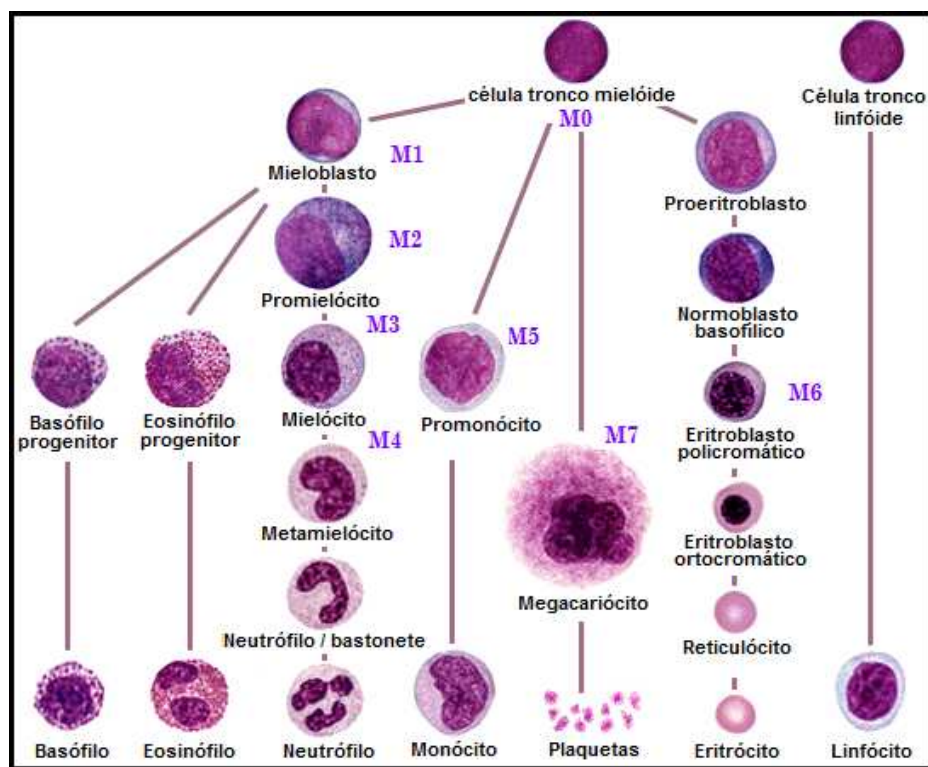


Figura 1.3. Esquemática da maturação das células hematopoiéticas e suas respectivas linhagens de acordo com a classificação FAB. Fonte: Modificado de <<http://demo.pleksus.com.tr/klimud.org/public/atlas/idrar/web/www.irvingcrowley.com/cls/maturation.htm>>. M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7 – Subtipos morfológicos FAB da LMA.

Tabela 1.1. Classificação morfológica, imunológica e citoquímica da LMA

Subtipo FAB	Identificação / Frequência (%)	Morfologia (tipo celular predominante), Citoquímica e Imunofenotipagem
M0	LMA com diferenciação mínima (2%)	Blastos indiferenciados; SB e EN (-), TdT(+/-), aMPO (+), CD33 ou CD13 (+), CD7+/-, CD14, CD15+/-, CD34
M1	LMA sem maturação (10-20%)	Mieloblastos pouco diferenciados; MPO(+) e SB (+), aMPO (+), TdT, CD13 ou CD33, HLA-DR +, CD14, CD15, CD34, CD4+/-
M2	LMA c/ maturação (27-29%)	Mieloblastos; MPO (+) SB (+), EN (-); CD14(+/-); CD11(+), CD33 e/ou CD13 (+), aMPO(+), HLA-DR +, CD14, CD4
M3	Leucemia promielocítica aguda (5-19%)	Promielócitos anormais hipergranulares; MPO (+), SB (+), CD14(-); CD11(+); CD15(+); HLA(-), CD33/CD13 (+), aMPO (+)
M4	Leucemia mielomonocítica aguda (16-25%)	Mielócitos com aumento de células monocíticas; MPO (+) SB (+) e EN (+) CD14(+); CD11(+/-); HLA(+), CD33/CD13 (+), CD13, CD33, CD15, CD36, HLA-DR +/-, CD4, CD34+/-, TdT+/-
M4Eo (variante M4)	Leucemia mielomonocítica aguda c/ eosinófilos anormais (5-10%)	Aumento de eosinófilos; MPO (+) SB (+) EN (+) CD14(+/-); CD11(+); HLA (+), CD33/CD13 (+/-), CD15, CD36, CD34+/-, TdT+/-
M5	Leucemia monocítica aguda (10-22%)	Monócitos; CD11c, CD13, CD33, CD36, HLA-DR +, CD15, CD14, CD4, CD34, CD7+/-, MPO (-) SB (-), EN (+)
M6	Eritroleucemia (2-5%)	Eritroblastos; Eritrócito: Glicoproteína A+, CD71, CD45+/-, Mieloblasto: os mesmos da M1, SB (+), MPO (+), EN (-)
M7	Leucemia megacariocítica aguda (4-8%)	Megacariócitos com aumento de fibroblastos; CD36, CD41, CD42, ou CD61+, CD34, CD13, CD33+/-, HLA-DR+, SB (-), MPO(-), EN (+)

M0, M1, M2, M3, M4, M4Eo, M5, M6 e M7 – Subtipos morfológicos da classificação FAB para a LMA, CD – *Cluster Differentiation*, SB – *Sudan Black*, MPO – mieloperoxidase, aMPO – anti-mieloperoxidase, TdT *Terminal deoxynucleotidyl Transferase*, EN – Esterase não-específica, HLA-DR – Antígeno humano do complexo de histocompatibilidade de classe 2. Fonte: Adaptado de Bennett *et al.*, 1976.

Porém, mesmo que a classificação FAB reconheça a heterogeneidade da LMA, e que a mesma ainda seja utilizada, ela nem sempre consegue abranger toda a diversidade clínica e genética da doença. Contudo, a morfologia, que leva em consideração o tipo de célula predominante, seu grau de maturação e o delineamento mais preciso da linhagem hematopoiética, não poderia ser descartada, e por isto foi incorporada aos sistemas de classificação atuais (HEEREMA-MCKENNEY & ARBER, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu uma nova classificação (Tabela 1.2), atualizando as propostas da classificação FAB e levando em consideração a importância do padrão citogenético e sua associação na doença. Esta classificação requer a avaliação dos blastos leucêmicos através de análises moleculares e de citometria de fluxo (HARRIS *et al.*, 1999; ARBER *et al.*, 2016).

A observação da combinação dos quatro métodos de avaliação, aspectos clínicos, biológicos, imunofenotípicos e genéticos, não apenas melhor diferenciam a LMA da leucemia linfoblástica aguda, mas também categorizam seus subtipos, deste modo, definindo mais claramente as distintas entidades envolvidas na LMA. Através da introdução de informações citogenéticas e moleculares, podemos caracterizar melhor o subgrupo leucêmico a que um determinado paciente foi acometido, e ajudar a prever o comportamento clínico da doença, seu prognóstico, bem como indicar o tratamento mais adequado (REGO & FALCÃO, 2002; CUCUIANU, 2005; DE ROOIJ; ZWAAN; HEUVEL-EIBRINK, 2015).

Neste contexto, as duas diferenças mais marcantes entre a classificação FAB e a atual classificação da OMS são: (a) um limite de blastos inferior para estabelecer o diagnóstico de LMA. A OMS estabelece uma suspeita de diagnóstico de LMA quando o percentual de blastos na MO chega a 20%, ao invés dos pelo menos 30% estipulados anteriormente pela FAB. (b) Pacientes com anormalidades citogenéticas clonais recorrentes como a $t(8;21)(q22;q22)$, $t(16;16)(p13;q22)$, $inv(16)(p13;q22)$, ou a $t(15;17)(q22;q12)$, devem ser diagnosticados com LMA, independente do percentual de blastos presentes na MO (BACHER *et al.*, 2005; ABDUL-HAMID, 2011).

Tabela 1.2. Classificação da Leucemia Mielóide Aguda proposta pela Organização Mundial da Saúde (2016)

Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e neoplasias relacionadas
LMA com anormalidades genéticas recorrentes
LMA com t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LMA com inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFβ-MYH11</i>
Leucemia Promielocítica Aguda com t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARα</i>
LMA com t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i> e demais rearranjos do gene <i>KMT2A</i>
LMA com t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
LMA com inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
LMA com mutação no <i>NPM1</i>
LMA com mutação no <i>CEBPA</i>
Entidade provisória: LMA com <i>BCR-ABL1</i>
Entidade provisória: LMA com <i>RUNX1</i> mutado
LMA com alterações associadas à mielodisplasia
- Seguida de Síndrome Mielodisplásica (SMD)
- Sem antecedente de SMD
LMA e SMD associadas a tratamento
- Associada a agentes alquilantes/radiação
- Associada a inibidores de topoisomerase-II
Sarcoma mielóide
Proliferações mielóides relacionadas à Síndrome de Down
- Mielopoese anormal transitória
- Leucemia mielóide associada à Síndrome de Down
Neoplasia de células dendríticas plasmocitóides blásticas

LMA – Leucemia Mielóide Aguda, t – translocação, inv – inversão, p – braço curto do cromossomo, q – braço longo do cromossomo, SMD – Síndrome Mielodisplásica. Fonte: Adaptado de Dohner *et al.*, 2010; ARBER *et al.*, 2016.

1.4. Patogênese da LMA

Apesar do conhecimento de diversas anormalidades citogenéticas, alterações moleculares e epigenéticas, as tentativas de definir um único evento causador para a LMA não obtiveram sucesso até agora. Em contraste com a leucemia mielóide crônica, na qual a translocação $t(9;22) / BCR-ABL1$, como um único evento, é associado à patogênese da doença, a LMA não parece compartilhar de um mecanismo de formação único. Diferentes grupos de pesquisadores demonstraram, através de estudos *in vivo*, que somente a presença de anormalidades citogenéticas recorrentes como a $t(8;21)$ ou a $inv(16)$, ou ainda a presença de determinadas mutações em genes relacionados à doença, não são suficientes para o surgimento da LMA. Estes achados, levaram à hipótese de que dois ou mais eventos são necessários para a patogênese da doença (PUI *et al.*, 2011; ROSS *et al.*, 2011).

Até o momento, um modelo bem aceito é o modelo *multistep*, no qual a LMA se origina a partir da cooperação entre duas classes de mutações genéticas responsáveis por regular a diferenciação e a auto renovação hematopoética. As mutações de tipo II, as translocações cromossômicas, alteram a habilidade de diferenciação das células precursoras, enquanto que as mutações de tipo I, FLT-ITD e mutações no KIT, dentre outras, fornecem um sinal proliferativo, favorecendo uma vantagem clonal (Fig. 1.4). Além disto, mutações em reguladores epigenéticos tais como o EZH2, ASXL1 e DNMT3A, adicionam outro nível de complexidade, também contribuindo para a parada maturativa e proliferação, levando ao surgimento da LMA (DASH & GILLILAND, 2001; DE ROOIJ; ZWAAN; HEUVEL-EIBRINK, 2015).

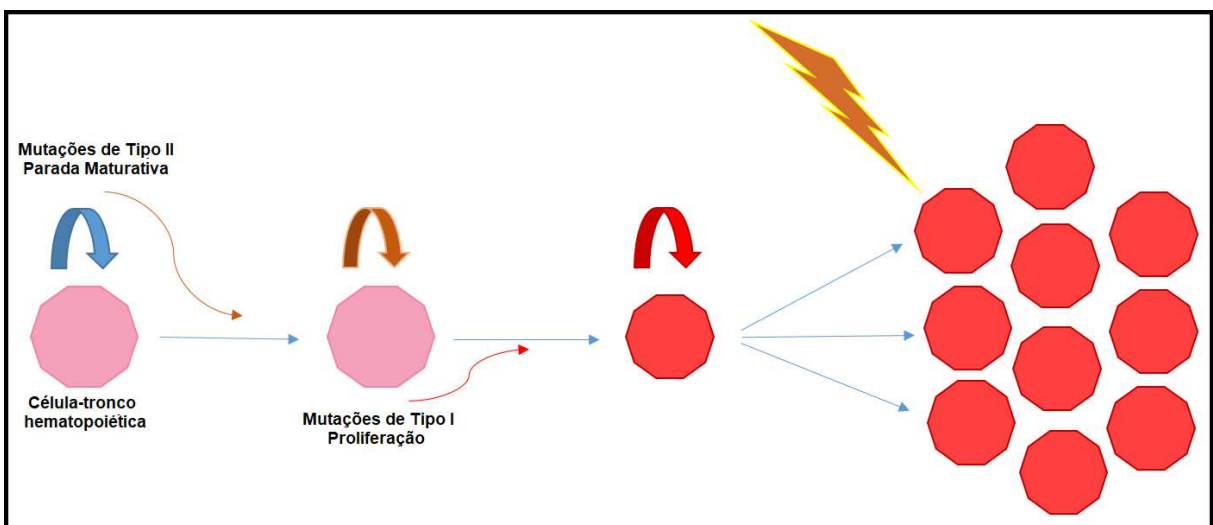


Figura 1.4. Esquematização do modelo *multistep* para a formação da LMA. As setas finas representam as transições entre as etapas para a leucemogênese. As setas espessas representam a transformação da célula de acordo com a ocorrência dos tipos de mutação. O raio representa a leucemogênese. Fonte: Modificado de Arceci & Meshinchi, 2011.

1.5. Padrão citogenético da LMA pediátrica

A literatura mostra, até o momento, que aproximadamente 80% das crianças com LMA apresentam alterações cromossômicas nas células blásticas da MO e/ou do SP, no momento do diagnóstico (RAIMONDI *et al.*, 1999; MANOLA, 2009); um número consideravelmente maior em comparação aos pacientes adultos acometidos pela doença, nos quais estas alterações são detectadas em aproximadamente 60% dos casos (MRÓZEK; HEEREMA; BLOOMFIELD, 2004).

Na LMA, podem ser encontradas alterações citogenéticas dos tipos numéricas e/ou estruturais. As alterações numéricas abrangem monossomias e nulissomias, o que resulta em um cariótipo com menos de 46 cromossomos ou, trissomias, tetrassomias, dentre outras, demonstrando um cariótipo hiperdiplóide, com mais de 46 cromossomos. As anomalias estruturais são principalmente as translocações, inserções e inversões (MANOLA, 2009).

Uma vez que 80% das crianças com LMA apresentam alterações estruturais genômicas associadas à doença, e cerca de 76% daquelas que apresentam cariótipo normal têm ao menos uma mutação conhecida, em seu perfil mutacional, observa-se que, atualmente, 90% dos pacientes pediátricos com LMA têm pelo menos uma anormalidade genômica recorrente (Fig. 1.5) (PUI *et al.*, 2011).

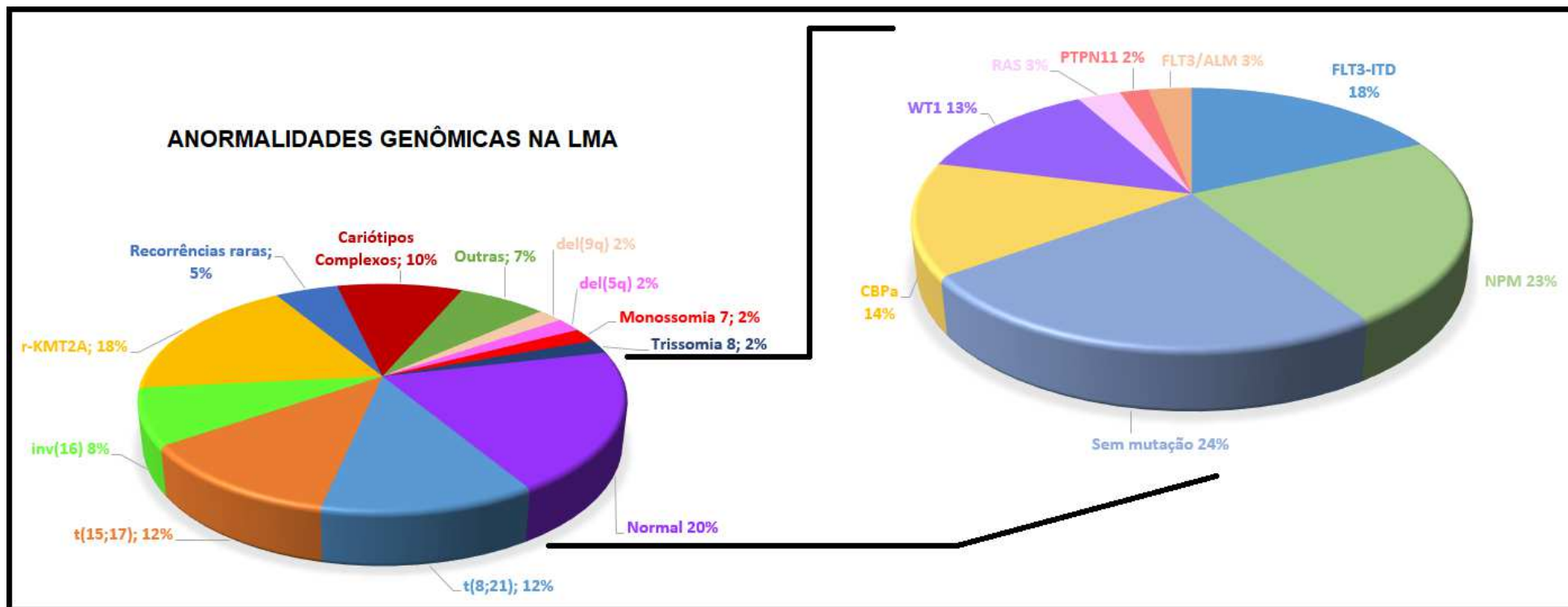


Figura 1.5. As anormalidades genômicas na LMA. O painel da esquerda mostra as alterações cariotípicas mais comuns. O Perfil de mutação naqueles sem anomalias citogenéticas (cariótipo normal) é mostrado no painel da direita. Fonte: Modificado de Pui *et al.*, 2011. del – deleção, (-) – monossomia, (+) – trissomia, t – translocação, inv – inversão, q – braço longo do cromossomo.

As alterações cariotípicas nos blastos leucêmicos são consideradas como um dos marcadores mais significativos, que definem a biologia da LMA, uma vez que a presença de anormalidades citogenéticas específicas tem implicações prognósticas importantes para a doença. Além das alterações cariotípicas, as mutações gênicas, com relevância clínica associadas à doença, também são parte do esquema de classificação das LMAs (RAIMONDI *et al.*, 1999; MANOLA, 2009; ARCECI & MESHINCHI, 2011).

1.5.1. Leucemia Mielóide Aguda Core Binding Factor

Algumas anormalidades resultam em rearranjos cromossômicos que podem envolver genes que codificam fatores de transcrição. O *Core Binding Factor* (CBF) é um fator de transcrição heterodimérico alfa/beta, envolvido na regulação transcricional de diversos genes importantes na hematopoese. As leucemias CBF correspondem a cerca de 25% dos casos de LMA, e são caracterizadas por uma subunidade de ligação ao DNA (CBF-alfa; codificada pelo gene *RUNX1*) e uma subunidade que não se liga ao DNA (CBF-beta; codificada pelo gene *CBFβ*). A quebra da subunidade alfa está relacionada à translocação t(8;21)(q22;q22), enquanto que a quebra da subunidade beta está relacionada à inv(16)(p13;q22) (MRÓZEK *et al.*, 1997; ARCECI & MESHINCHI, 2011).

1.5.1.1. Translocação t(8;21) – RUNX1-RUNX1T1

A translocação recíproca t(8;21)(q22;q22), justapõe o gene *RUNX1* localizado no cromossomo 21, região q22, ao gene *RUNX1T1* no cromossomo 8, região q22, resultando na fusão gênica *RUNX1-RUNX1T1* (Fig. 1.6). Esta translocação rompe o gene *RUNX1* entre seus domínios Runt e de transativação, enquanto que o domínio de transativação do gene *RUNX1T1* permanece quase intacto. Neste sentido, a literatura propõe que a oncogênese possa ser consequência de uma regulação transcricional alterada em genes normais, alvos do *RUNX1*. A t(8;21) apresenta uma das maiores incidências na LMA da infância, correspondendo a cerca de 12% dos casos, e é associada ao subtipo FAB LMA-M2. Esta anormalidade está relacionada a um prognóstico favorável, com boa taxa de remissão. Entretanto, cerca de 50% dos pacientes com esta anormalidade tendem a recair, de modo que a heterogeneidade de apresentação da fusão *RUNX1-RUNX1T1* e seu perfil

mutacional emergiram atualmente como motivo de discussão na literatura, sendo incluída na atual classificação da OMS como uma entidade provisória (MANOLA, 2009; BRAOUDAKI & TZORTZATOU-STATHOPOULOU, 2012; CAPELA DE MATOS *et al.*, 2015; ARBER *et al.*, 2016).

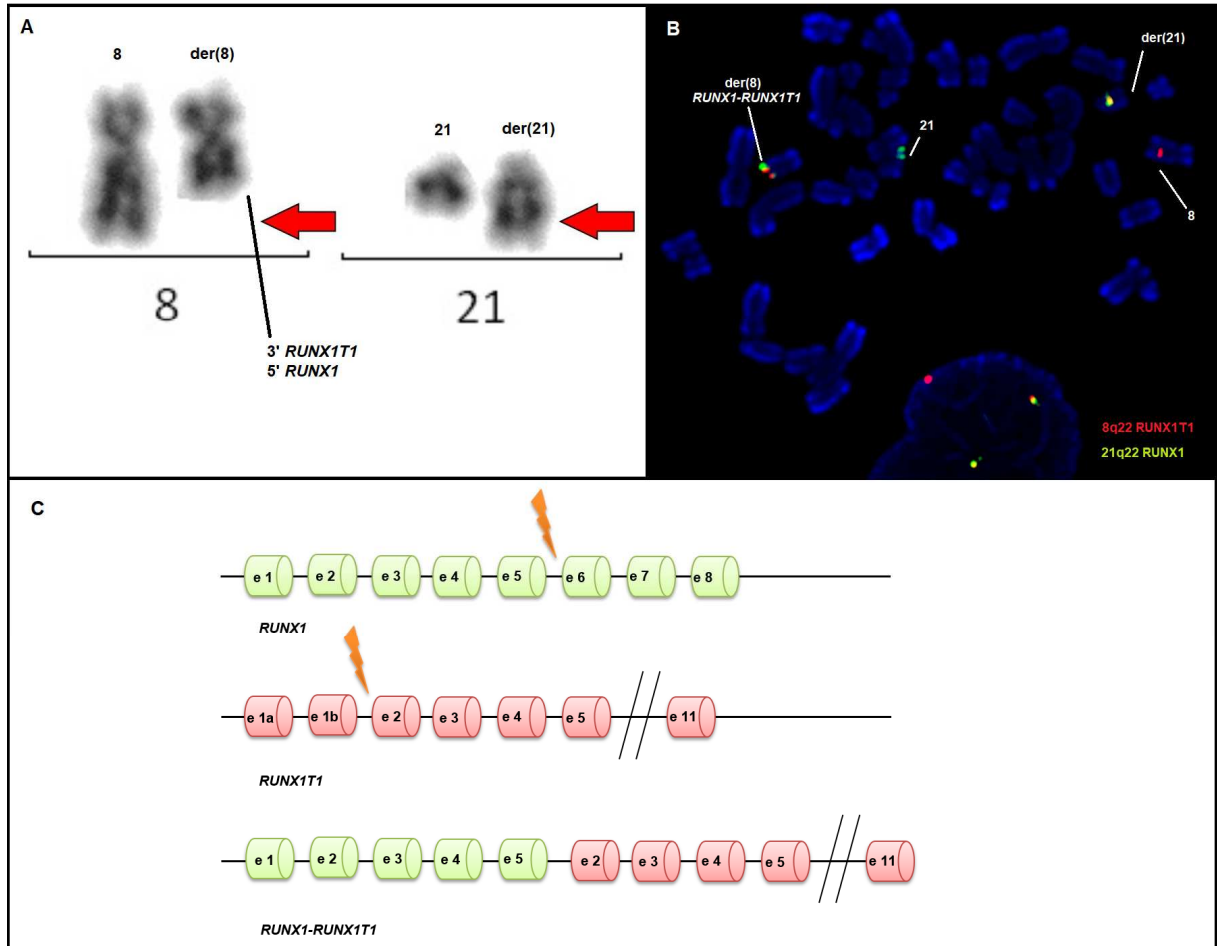


Figura 1.6. Translocação $t(8;21)(q22;q22)$. **A)** $t(8;21)$ vista pela técnica de bandeamento G. As setas vermelhas apontam as regiões translocadas. **B)** Padrão de apresentação da $t(8;21)$ com a fusão $RUNX1-RUNX1T1$, visto pela técnica de FISH em metáfase. Fonte: Capela de Matos, R.R. – Laboratório de Citogenética – CEMO – INCA. **C)** Esquematização molecular da fusão $RUNX1-RUNX1T1$. Os raios indicam o local nos genes onde ocorrem as quebras. Fonte: Modificado de *Atlas of Hematological Cytology* <<http://www.leukemia-cell.org/atlas>>. der – cromossomo derivativo, e – éxon.

1.5.1.2. Inversão $inv(16)/translocação t(16;16)$ – $CBF\beta$ - $MYH11$

A $inv(16)(p13;q22)$ e a $t(16;16)(p13;q22)$ resultam na fusão do gene $CBF\beta$ no cromossomo 16, região q22, ao gene *smooth muscle myosin heavy chain* ($MYH11$), no cromossomo 16, região p13 (Fig. 1.7). Mais especificamente, a subunidade CBF-beta é codificada pelo gene $CBF\beta$ no loci 16q22, e é rompida no evento dos rearranjos causados na $inv(16)(p13;q22)$ e na $t(16;16)(p13;q22)$. Se hipotetiza que a

proteína de fusão tanto reduz quanto compete com a quantidade de CBF ativa, devido ao acúmulo de multímeros (CBFβ / MYH11) no núcleo (MANOLA, 2009).

Ainda não se conhece totalmente o mecanismo no qual a fusão gênica *CBFβ-MYH11* contribui para a transformação maligna, no entanto, através de estudos *in vitro*, com modelos animais transgênicos, pesquisadores sugeriram que as fusões gênicas, criadas por estes rearranjos, desempenham um papel dominante negativo que pode levar ao fenótipo leucêmico, provavelmente, através de uma via comum (ARCECI & MESHINCHI, 2011).

A frequência da *inv(16)/t(16;16)*, em pacientes pediátricos, corresponde a 8% dos casos e é comumente associada à Leucemia Mielomonocítica Aguda, FAB LMA-M4, com eosinofilia anormal. Os pacientes normalmente apresentam um bom prognóstico, com boa resposta ao tratamento. É importante notar que a presença da trissomia do cromossomo 22, como uma anormalidade isolada, é um marcador importante para o diagnóstico de LMA com *inv(16)*, tendo em vista que esta anormalidade é difícil de ser caracterizada pela citogenética convencional, muitas vezes, se apresentando de modo críptico no cariótipo (SILVA *et al.*, 2008; MANOLA, 2009; ARCECI & MESHINCHI, 2011).

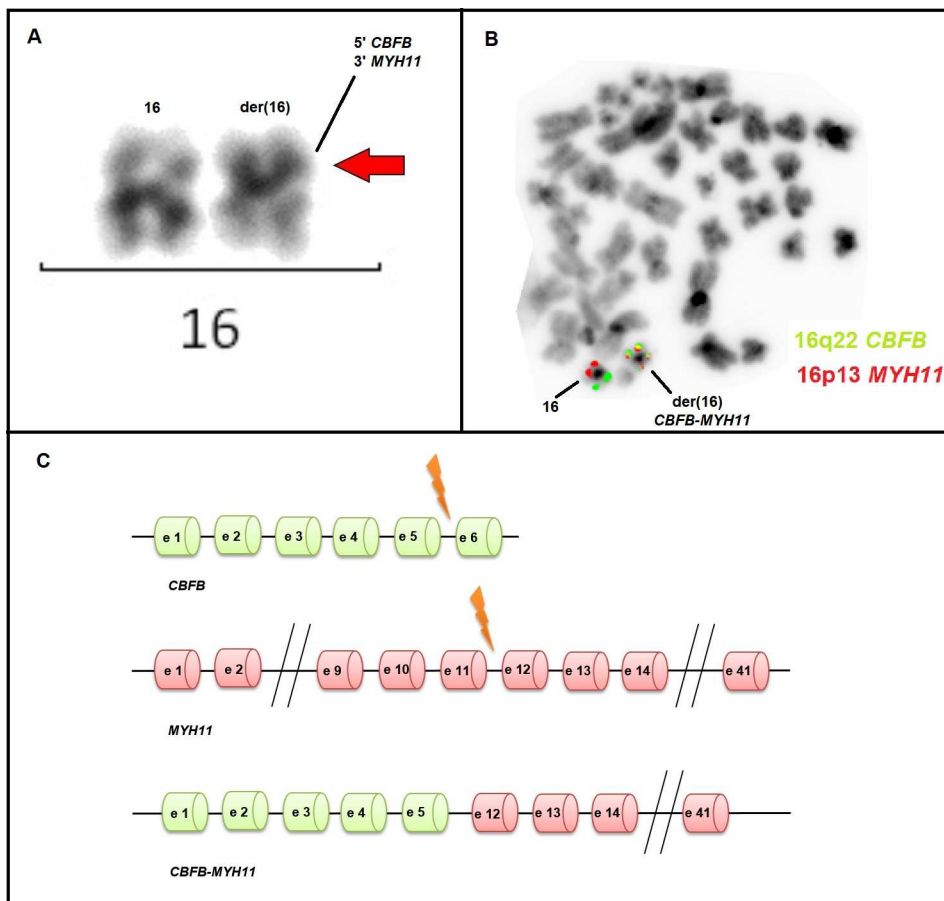


Figura 1.7. Inversão inv(16)(q22;p13). **A)** inv(16) vista pela técnica de bandeamento G. A seta vermelha indica a região da anormalidade. **B)** Padrão de apresentação da inv(16) com a fusão *CBFβ-MYH11*, visto pela técnica de FISH em metáfase. Fonte: Capela de Matos, R.R. – Laboratório de Citogenética – CEMO – INCA. **C)** Esquematização molecular da fusão *CBFβ-MYH11*. Os raios indicam o local nos genes onde ocorrem as quebras. Fonte: Modificado de *Atlas of Hematological Cytology* <<http://www.leukemia-cell.org/atlas>>. der – cromossomo derivativo, e – éxon.

1.5.2. Leucemia Promielocítica Aguda – Translocação t(15;17) – PML-RARα

A translocação t(15;17)(q22;q21), compreende cerca de 12% das LMAs pediátricas, e é a base para o surgimento da Leucemia Promielocítica Aguda (LPA). Esta translocação funde o gene *Retinoic Acid Receptor alfa (RARα)*, localizado no cromossomo 17, região q21, ao gene *Promyelocytic Leukemia (PML)*, no cromossomo 15, região q22. Isto leva a formação do transcrito de fusão *PML-RARα* (Fig. 1.8), sendo este novo produto de fusão, competente no recrutamento de repressores transcricionais, os quais são resistentes à de-repressão feita por concentrações fisiológicas de ácido retinóico. Isto ocasionará uma parada de maturação, e conseqüente acúmulo de blastos em estágio de promielócito, sendo, portanto, associada ao subtipo FAB LMA-M3 (MANOLA, 2009; BRAOUDAKI & TZORTZATOU-STATHOPOULOU, 2012).

Esta parada maturativa pode ser superada através da admissão de doses farmacológicas de ácido all-trans retinóico (ATRA), que irá induzir a diferenciação de células de LPA atacando a *PML-RARα*, garantindo um excelente desfecho clínico com uma taxa de cura de 70-90% em crianças e adultos (MANOLA, 2009).

Entretanto, dos pacientes com LPA em remissão, cerca de 10% eventualmente recaem. Estima-se que fatores como uma doença persistente após a consolidação, alta contagem leucocitária no diagnóstico, mutações FLT3-ITD e alterações citogenéticas secundárias, as quais estão presentes em 30% dos casos de LPA, podem ser responsáveis pela recaída. Porém, para se chegar à identificação de marcadores prognósticos, é necessário que sejam conduzidos maiores estudos, de caracterização citogenética molecular e abordagens de sequenciamento, com uma ampla coorte de pacientes sistematicamente testados e uniformemente tratados (ARCECI & MESHINCHI, 2011; MATOS *et al.*, 2013).

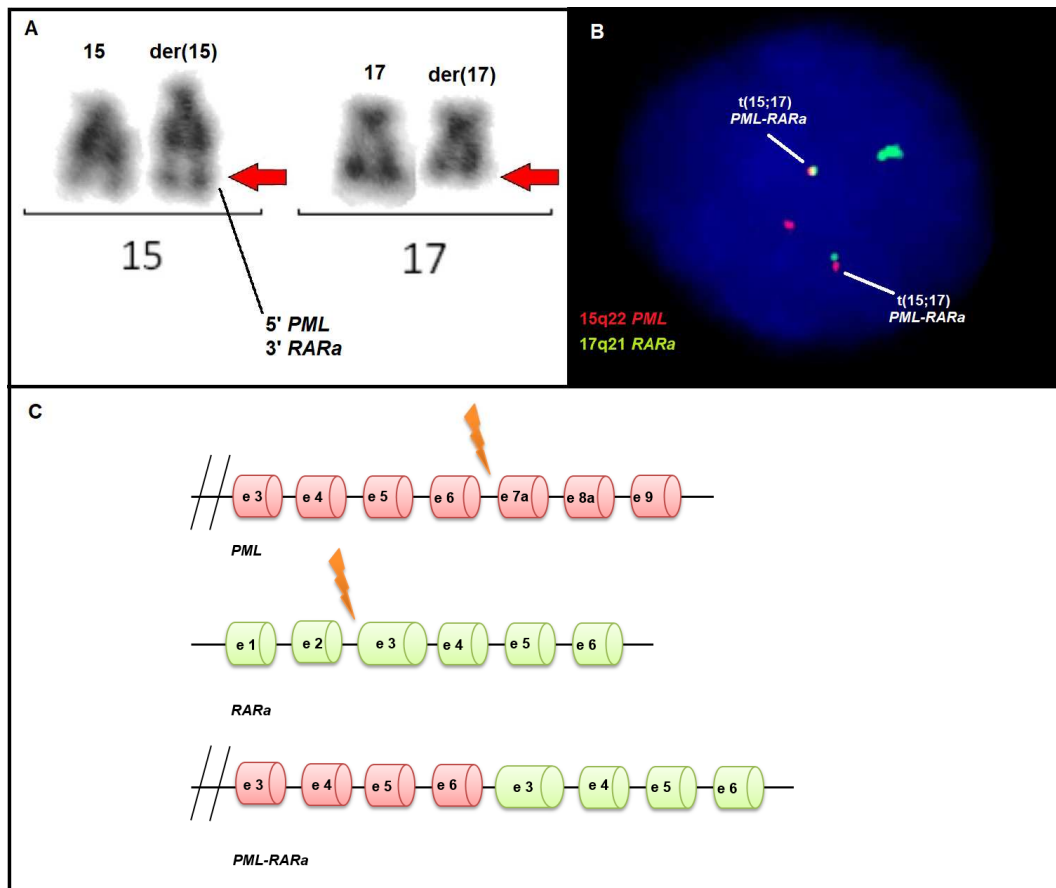


Figura 1.8. Translocação t(15;17)(q22;q21). **A)** t(15;17) vista pela técnica de bandeamento G. As setas vermelhas apontam as regiões translocadas. **B)** Padrão de apresentação da t(15;17) com a fusão *PML-RARα*, visto pela técnica de FISH em núcleo interfásico. Fonte: Capela de Matos, R.R. – Laboratório de Citogenética – CEMO – INCA. **C)** Esquemática molecular da fusão *PML-RARα*. Os raios indicam o local nos genes onde ocorrem as quebras. Fonte: Modificado de *Atlas of Hematological Cytology* <<http://www.leukemia-cell.org/atlas>>. der – cromossomo derivativo, e – éxon.

1.5.3. Leucemia Mielóide Aguda com rearranjo do gene *KMT2A*

A *Lysine Methyltransferase 2A* (*KMT2A*) é uma proteína grande, com múltiplos domínios funcionais que está expressa de modo onipresente em células hematopoiéticas, bem como envolvida na regulação de sua diferenciação e proliferação. O gene *KMT2A*, antes conhecido como *mixed lineage leukemia* (*MLL*), é localizado no cromossomo 11, região q23, e é definido como uma metiltransferase que é envolvida na regulação da expressão do gene *Homeobox* (*HOX*) e na metilação do resíduo de histona H3K4 (BRAOUDAKI & TZORTZATOU-STATHOPOULOU, 2012).

Experimentos *in vitro* confirmaram o importante papel do *KMT2A* na manutenção celular e regulação hematopoiética, demonstrando que proteínas de fusão que compreendem o *KMT2A* podem transformar precursores hematopoiéticos em células com potencial leucemogênico (KRIVTSOV *et al.*, 2009).

Devido ao seu prognóstico mutável, os rearranjos do gene *KMT2A* (*r-KMT2A*) são segregados em um subgrupo único de leucemia aguda, heterogeneamente divergente na apresentação clínica e na resposta à terapia, dependendo do tipo celular envolvido (mielóide/linfóide), da faixa etária de acometimento e do gene parceiro envolvido na translocação. Este gene apresenta alta susceptibilidade a translocações, tendo até o momento cerca de 80 genes parceiros documentados (DASER & RABBITS, 2004; MEYER *et al.*, 2017).

Especificamente na LMA pediátrica, a identificação e caracterização de *r-KMT2A* são de grande interesse para o tratamento, sendo sua presença observada em um número quatro vezes maior do que em pacientes adultos. A incidência de *r-KMT2A* na LMA da infância diminui de acordo com o aumento da idade. Tais anormalidades são prevalentes em cerca de 50% em bebês, e 9% em crianças acima de 2 anos. *r-KMT2A* são as anormalidades mais frequentes na LMA pediátrica, compreendendo 18% dos casos totais. Este subgrupo abrange os subtipos FAB LMA-M4 e M5, com as translocações mais comumente observadas sendo a $t(10;11)(p12;q23) / KMT2A-MLLT10$, $t(11;19)(q23;p13.3) / KMT2A-MLLT1$, $t(6;11)(q27;q23) / KMT2A-MLLT4$ e a $t(9;11)(p22;q23) / KMT2A-MLLT3$ (Fig. 1.9) (BRAOUDAKI & TZORTZATOU-STATHOPOULOU, 2012).

Com relação ao impacto prognóstico na LMA da infância, tais anormalidades envolvendo a região 11q23 são distribuídas de forma variável, estando compreendidas entre os grupos de risco intermediário e adverso (BRAOUDAKI & TZORTZATOU-STATHOPOULOU, 2012; MANOLA, 2009). A maioria dos *r-KMT2A* são detectáveis pela citogenética convencional, entretanto, cerca de 20% destes rearranjos ocorrem no contexto de cariótipos complexos, de modo que o gene parceiro na translocação muitas vezes é de difícil identificação. Para tais casos, é importante que os *r-KMT2A* sejam caracterizados através de técnicas moleculares de alta resolução, assim permitindo, tanto uma devida estratificação de risco, quanto uma possível associação prognóstica (MARSCHALEK, 2015; NEY-GARCIA *et al.*, 2016).

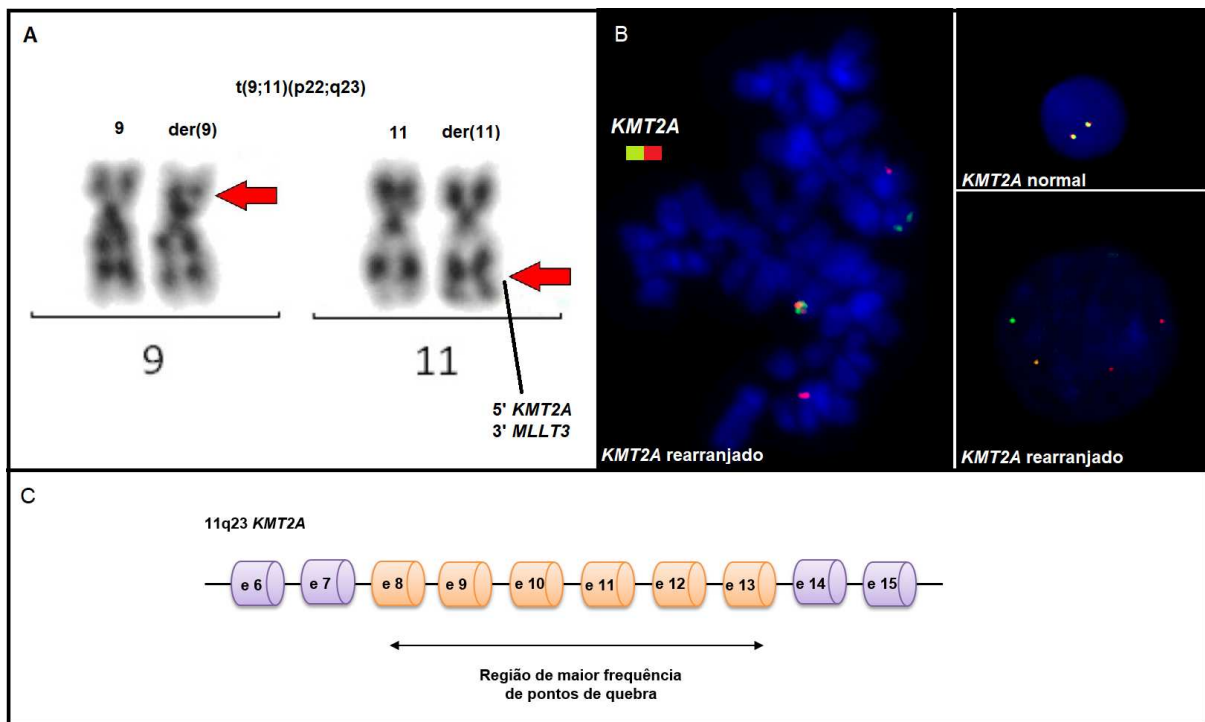


Figura 1.9. Rearranjo do gene *KMT2A*. **A)** Translocação t(9;11)(p22;q23) vista pela técnica de bandeamento G. As setas vermelhas apontam as regiões translocadas. **B)** Padrões de apresentação normal/alterado do *KMT2A*, visto pela técnica de FISH em metáfase e núcleo interfásico. Fonte: Capela de Matos, R.R. – Laboratório de Citogenética – CEMO – INCA. **C)** Esquematização molecular dos r-*KMT2A*. Os éxons na cor laranja estão compreendidos na região-alvo da maioria dos r-*KMT2A*. Fonte: Modificado de Marschalek, 2015. t – translocação, der – cromossomo derivativo, e – éxon.

1.5.4. Anormalidades cromossômicas sub-cariotípicas (Crípticas)

Anormalidades citogenéticas recorrentes evidentes, abrangendo grandes regiões cromossômicas (>5 mb do DNA), podem ser detectadas pela citogenética convencional, de modo que as frequências e implicações destas anormalidades já foram descritas, conforme supracitado. Entretanto, pequenas alterações estruturais no cariótipo, incluindo translocações, deleções, inserções ou duplicações, podem passar despercebidas, sendo invisíveis à sensibilidade das técnicas de citogenética convencional. Além disto, é importante ressaltar que tais alterações podem contribuir para o fenótipo da doença, por exemplo, contendo pequenas deleções que levam a uma haplo-insuficiência, podendo coadjuvar para a transformação à malignidade (ARCECI & MESHINCHI, 2011; CAPELA DE MATOS *et al.*, 2015). Portanto, é fundamental o emprego de técnicas especializadas para a detecção e devida caracterização destas anormalidades.

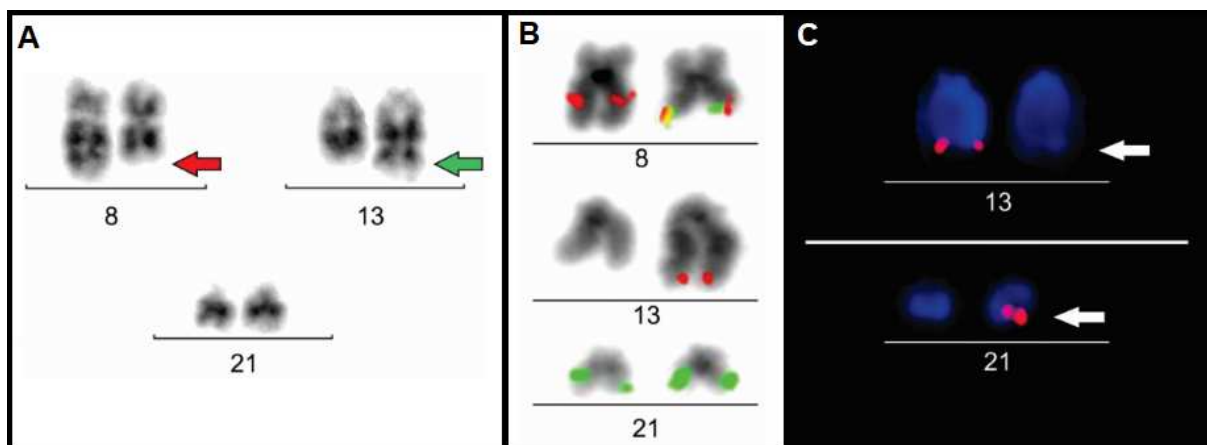


Figura 1.10. Translocação críptica envolvendo os cromossomos 8, 13 e 21. **A)** Bandeamento G em cariótipo parcial. A seta vermelha aponta uma região perdida no cromossomo 8 derivativo, e a seta verde mostra um ganho de material cromossômico no 13 derivativo. Ambos os cromossomos 21 aparecem normais no bandeamento G. **B)** FISH com a sonda AML1-ETO, duas cores, dupla fusão, mostrando a fusão *RUNX1-RUNX1T1* no 8 derivativo, e um sinal partido do gene *RUNX1T1* (vermelho) no 13 derivativo. **C)** FISH com uma sonda subtelomérica para a região terminal do cromossomo 13, mostrando uma porção do 13 derivativo translocada para o 21 derivativo. Fonte: Capela de Matos *et al.*, 2015.

Além das anormalidades mencionadas acima, que juntas contabilizam cerca de 70% de toda a LMA da infância, outras alterações numéricas e estruturais, menos frequentes, são descritas apresentando relevância biológica e prognóstica para a doença. Destacamos como exemplo a monossomia do cromossomo 7 e a deleção da região 7q, além da monossomia do cromossomo 5 e a deleção da 5q, que correspondem juntas a cerca de 5% das LMAs pediátricas. Embora até o presente momento, genes especificamente relacionados a doença, localizados nestas regiões cromossômicas, ainda não foram identificados, a literatura associa a presença de tais anormalidades com resistência à quimioterapia (QT) e a uma péssima taxa de sobrevida (HASLE *et al.*, 2007; DE ROOIJ; ZWAAN; HEUVEL-EIBRINK, 2015; DE FIGUEIREDO *et al.*, 2015), ressaltando a importância de uma devida caracterização citogenética tumoral.

1.6. A evolução da caracterização citogenética tumoral

Recentes dados da literatura têm confirmado que a análise citogenética de genes envolvidos em translocações específicas à doença, é considerada uma das mais poderosas ferramentas, levando a uma melhor compreensão dos rearranjos cromossômicos e dos mecanismos subjacentes à transformação leucêmica. Mais precisamente, a análise citogenética vem propiciando conhecimentos notáveis quanto à heterogeneidade de uma população celular, além de permitir a detecção de diversas anormalidades genéticas e cromossômicas em diversos tipos de malignidades mielóides, incluindo a LMA, e os demais tipos de leucemia. Por exemplo, para tais neoplasias, a presença ou ausência de determinadas aberrações cromossômicas é um fator prognóstico fundamental (BRAOUDAKI & TZORTZATOU-STATHOPOULOU, 2012; BINT; DAVIES; OGILVIE, 2013; BOCHTLER *et al.*, 2013).

Porém, até chegar ao presente nível de conhecimento, foi a uma longa jornada, pois, inicialmente, o potencial da citogenética tumoral estava limitado aos recursos tecnológicos e científicos da primeira metade do século XX. Se fazia necessário o aprimoramento das técnicas de obtenção cromossômica e também das técnicas de análise cariotípica. O desenvolvimento da análise dos cromossomos pode ser acompanhado em uma linha temporal dividida em 6 fases principais.

A citogenética tumoral deu seus *primeiros passos* com a descoberta de métodos para obtenção de células metafásicas em culturas celulares *in vitro*, e se estendeu até 1969, levando à descoberta do cromossomo philadelphia (Ph) na leucemia mielóide crônica (NOWELL & HUNGERFORD, 1960). Nesta fase, devido aos cromossomos serem corados por corante de Giemsa sem tratamento prévio, era muito difícil a distinção confiável entre os pares não-homólogos.

A *fase 2* teve seu marco com o desenvolvimento da técnica de bandeamento cromossômico (1969–1971), a qual tornou possível dar uma identidade precisa aos pares de cromossomos, bem como caracterizar as alterações cromossômicas de diversas doenças. Foi então descrita a primeira translocação no câncer humano, a t(8;21)(q22;q22), em pacientes com LMA (ZECH, 1969) e a natureza do cromossomo Ph como produto de uma translocação recíproca, envolvendo os cromossomos 9 e 22, a t(9;22)(q34;q11) (ROWLEY, 1999).

A *fase 3* se iniciou com o uso de sondas específicas de DNA marcadas com material fluorescente, que permitiam identificar genes ou lócus gênicos específicos. Estas sondas originaram a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) (VAN PROOIJEN-KNEGT *et al.*, 1982). O advento desta técnica permitiu a

identificação de anormalidades cromossômicas que envolvem segmentos de DNA ainda menores, por exemplo, ajudando a revelar os pontos de quebra envolvidos na inversão pericêntrica do cromossomo 16, auxiliando a melhor caracterizar o subtipo FAB LMA-M4 (KUNDU & LIU, 2001). Contudo, a maior vantagem alcançada com a implementação desta técnica foi a possibilidade da identificação de aberrações cromossômicas diretamente em células interfásicas, obtidas a partir de suspensões de tecidos, congelados ou fixados, e inclusos em parafina, além da análise em preparações cromossômicas. Assim, não era mais mandatória a necessidade de obter metáfases de boa qualidade para uma análise fidedigna.

A *fase de número 4* começou quando, com a valiosa ideia da combinação de mais de três fluorocromos, foram desenvolvidas sondas para cromossomos inteiros, gerando assim um padrão específico de cor para cada um dos 24 pares de cromossomos (SPEICHER; BALLARD; WARD, 1996; SCHRÖCK *et al.*, 1996). Esta técnica, chamada de cariótipo espectral (SKY) ou FISH *Multiplex* (M-FISH), desde sua implementação, tem se mostrado uma importante ferramenta na detecção de cromossomos marcadores, translocações, e principalmente, para detectar anomalias cromossômicas complexas. Antes, ampliações de regiões localizadas nos braços longos dos cromossomos 11, 21 e 22, as quais apresentam relevância prognóstica para as leucemias, não eram possíveis de ser detectadas em pacientes com LMA que apresentavam cariótipos complexos (MRÓZEK *et al.*, 2002; DAS & TAN, 2013).

A *fase 5* surgiu imediatamente após o advento do M-FISH e esta fez uma grande diferença na refinação da caracterização cariotípica. Nesta técnica, são aplicadas sondas que foram confeccionadas a partir da microdissecção de fragmentos de todos os cromossomos humanos. Posteriormente, este material é marcado com cinco fluorocromos diferentes. Quando estas sondas são sobrepostas é gerado um padrão de pseudo-cores, baseado na mudança da taxa de intensidade de fluorescência ao longo do cromossomo, para cada um dos 24 pares de cromossomos humanos (WEISE *et al.*, 2008). Denominada *Multicolor Chromosome Banding* (MCB), esta técnica tem se mostrado muito importante na caracterização de cariótipos complexos, e/ou cariótipos com anormalidades crípticas nas LMA (SILVA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2008; MARQUES-SALLES *et al.*, 2009).

Contudo, em meio a todo o avanço proporcionado pelas técnicas de FISH multicolorido, estas apresentam uma limitação bastante pontual, pois necessitam de metáfases de boa qualidade para uma análise fidedigna. Esta limitação foi superada através da implementação da hibridização genômica comparativa (CGH), técnica

baseada na comparação do DNA genômico normal com o DNA genômico neoplásico. Nesta, as amostras de DNA são, cada qual, marcadas com fluorocromos verde e vermelho, respectivamente, misturados em quantidades iguais e posteriormente é feita a co-hibridização (DAS & TAN, 2013).

O advento desta técnica trouxe avanços na compreensão da biologia de diversas doenças, como por exemplo, no estudo de tumores sólidos, onde a citogenética convencional apresenta como limitação a dependência da obtenção de metáfases com boa morfologia para análise (KEARNEY, 2001). Porém, as técnicas de FISH não podem ser deixadas para trás, uma vez que para os rearranjos que não envolvem perdas genômicas, a exemplo das translocações balanceadas e as inversões, o uso da CGH é limitado, pois, não é capaz de detectar rearranjos estruturais nos quais não ocorrem perdas ou ganhos de material cromossômico, não fornecendo, portanto, informações sobre os segmentos cromossômicos envolvidos nestes rearranjos.

A *fase 6*, ou fase moderna, começa em meados da década de 90, com o *array* CGH, uma técnica de alta sensibilidade que faz uso de pequenas regiões específicas do genoma humano. Estes *arrays* cobrem todo o genoma com apenas um clone para cada megabase (mb) de DNA. Esta técnica é aplicada tanto na pesquisa em genética clínica quanto em genética tumoral, além de ser uma técnica complementar essencial para o MCB, identificando com precisão os pontos de quebra presentes em determinado(s) rearranjo(s). Estes *arrays* também foram aplicados, devido a sua flexibilidade, na detecção de perdas de heterozigosidade de nucleotídeos únicos ou de alterações no número de cópias de determinados segmentos cromossômicos. Estes foram nomeados *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) *array* e diferentemente do *array* CGH, no *array* SNP é hibridizada apenas uma amostra genômica, possibilitando então a identificação de alterações no número de cópias pela comparação com a hibridização de um controle independente (EMANUEL & SAITTA, 2007).

Tabela 1.3. Sumário das anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais na LMA

Anormalidades cromossômicas numéricas na LMA			
Anormalidade	Número de cromossomos	Métodos citogenéticos moleculares para detecção	Prognóstico
Alta hiperdiploidia	51-67	Citogenética convencional, FISH, M-FISH e CGH	Favorável
del (7q)	-	Citogenética convencional, FISH, M-FISH e CGH	Desfavorável
-5	45	Citogenética convencional, FISH, M-FISH e CGH	Desfavorável
+8	47	Citogenética convencional, FISH, M-FISH e CGH	Favorável
+21	47	Citogenética convencional, FISH, M-FISH e CGH	Desfavorável
Anormalidades cromossômicas estruturais na LMA			
Anormalidade	Fusão gênica	Métodos citogenéticos moleculares para detecção	Prognóstico
t(8;21)(q22;q22)	<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	FISH, RT-PCR	Favorável
Inv(16)(p13;q22)	<i>CBFβ-MYH11</i>	FISH, MCB, RT-PCR, RQ-PCR	Favorável
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i>	FISH, RT-PCR, RQ-PCR	Desfavorável
t(15;17)(q22;q21)	<i>PML/RARα</i>	FISH, RT-PCR	Favorável
11q23	<i>r-KMT2A</i>	FISH, MCB, RT-PCR	Intermediário / Desfavorável
t(11;19)(q23;p13.3)	<i>KMT2A-MLLT1</i>	FISH, MCB, RT-PCR	Desfavorável
t(6;11)(q27;q23)	<i>KMT2A-MLLT4</i>	FISH, MCB, RT-PCR	Desfavorável
t(9;11)(p22;q23)	<i>KMT2A-MLLT3</i>	FISH, MCB, RT-PCR	Favorável
t(10;11)(p12;q23)	<i>KMT2A-MLLT10</i>	FISH, MCB, RT-PCR	Desfavorável
9q	Desconhecido	FISH, RT-PCR	Desfavorável
t(1;22)(p13;q13)	<i>OTT-MAL</i>	FISH, MCB	Desfavorável
Cariótipos complexos e/ou crípticos	Desconhecido	FISH, MCB, aCGH, NGS	Desfavorável

del – deleção, (-) – monossomia, (+) – trissomia, p – braço curto do cromossomo, q – braço longo do cromossomo, t – translocação, FISH – *Fluorescence in situ Hybridization*, MCB – *Multicolor Chromosome Banding*, CGH – *Comparative Genomic Hybridization*, RQ-PCR – *Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR – *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, NGS – *Next Generation sequencing*. Fonte: Adaptado de Braoudaki & Tzortzou-Stathopoulou, 2012; ARBER *et al.*, 2016.

A segunda geração da fase moderna se iniciou com o advento dos *next generation sequencing* (NGS). Estas abordagens utilizam *arrays* de diversos modelos de sequenciamento em paralelo, gerando centenas de milhões de *reads* de sequência de DNA por experimento. As técnicas de NGS vem sendo eficazes para estudos de transcriptomas, exomas e até mesmo na caracterização de genomas inteiros de diversos tipos de câncer (MARGULIES *et al.*, 2005).

Basicamente, sua metodologia implica em processar uma fragmentação de DNA, ligar os adaptadores e imobilizar os fragmentos através destes adaptadores para criar bibliotecas. Estas bibliotecas são então amplificadas, gerando múltiplas cópias de cada fragmento de DNA, as quais são então sequenciadas por métodos variados, dependendo da plataforma utilizada. Assim, são geradas diversas *reads* de sequencias curtas, e estas *reads* são então comparadas ao genoma humano normal de referência, de modo a mapear estes genomas investigados (DAS & TAN, 2013).

Entretanto, mesmo com sua comprovada efetividade, o custo para uma padronização deste tipo de abordagem na prática clínica ainda é alto, atingindo cerca de mil dólares por genoma. Além disto, existem os gastos com os reagentes necessários para o sequenciamento, que chegam a cerca de 25 mil dólares por corrida. Deste modo, técnicas que conseguem analisar todo o genoma, como o M-FISH (~450 dólares/amostra), MCB (~140-450 dólares/amostra) e o aCGH (~250 dólares/amostra), de custo mais baixo – apresentando uma maior proximidade com a atual realidade econômica brasileira – são fundamentais no que diz respeito a uma refinação cariotípica detalhada; ainda permitindo uma seleção prévia adequada, quando cabível, de casos candidatos a estudos genômicos mais específicos, pela abordagem de NGS (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; CAPELA DE MATOS *et al.*, 2017). Assim, através desta combinação de técnicas, avanços importantes vêm sendo conquistados na pesquisa da LMA – e outros tipos de câncer – permitindo o descobrimento de possíveis mutações causadoras, e buscando uma individualização terapêutica, inclusive apontando novos alvos moleculares para drogas (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016).

Em suma, a técnica de bandeamento G consegue revelar um cariótipo complexo, porém, não pode apontar a origem dos rearranjos envolvidos, enquanto que o M-FISH pode identificar os rearranjos cromossômicos presentes, entretanto, não consegue precisar informações sobre os desbalanceamentos genômicos. Além disto, o ponto forte do M-FISH está em definir translocações e cromossomos marcadores em cariótipos complexos, enquanto que a técnica de CGH pode revelar

amplificações e/ou deleções escondidas. Portanto, as tecnologias M-FISH, MCB, aCGH e o NGS se provaram parceiros eficazes, e ferramentas poderosas, tanto na compreensão do papel de fusões gênicas conhecidas quanto na descoberta de novos genes (BISHOP, 2010; GREISMAN; HOFFMAN; HI, 2011; DAS & TAN, 2013).

Neste contexto, devido à heterogeneidade da LMA pediátrica, e seu número cada vez maior de significância prognóstica individualizada, é importante o uso combinado do maior arsenal de técnicas disponível, de modo a melhor caracterizar e desvendar rearranjos cromossômicos complexos (Tabela 1.3).

1.7. Fatores prognósticos e classificação de risco da LMA

A caracterização – e extensões – da LMA, descritas acima, possuem relevância prognóstica. Acima de aspectos clínicos como idade, sexo, contagem leucocitária, extensão da doença e morfologia das células, as anormalidades cromossômicas dominam a nível de fatores prognósticos, em todas as faixas etárias (KASPERS & REINHARDT, 2011; BOCHTLER *et al.*, 2013). Devido à ampla e crescente evolução das técnicas utilizadas na detecção destas anormalidades, cada vez mais é possível identificar e caracterizar alterações moleculares e seu papel na leucemogênese (Tabela 1.3). Neste contexto, nos últimos 20 anos, o prognóstico das crianças com LMA melhorou, chegando atualmente a uma taxa de sobrevida livre de recidiva (SLR) em cinco anos de quase 40%, para o conjunto de pacientes (HEAD, 2004; BRAOUDAKI & TZORTZATOU-STATHOPOULOU, 2012; PELOQUIN; CHEN; FATHI, 2013).

A citogenética *per se* pode dividir os pacientes com LMA em três amplos grupos de risco (Tabela 1.4), abordando o impacto sobre o risco de recaída, a sobrevida livre de doença e a sobrevida total (ST): favorável (baixo risco), intermediário, e desfavorável (alto risco). O grupo com LMA favorável inclui o das leucemias CBF, que carregam a $t(8;21)(q22;q22)$ / *RUNX1-RUNX1T1*, $inv(16)(p13;q22)$ / *CBF β -MYH11*, bem como a $t(15;17)(q22;q21)$ / *PML-RAR α* . O grupo com LMA desfavorável inclui pacientes que apresentam monossomia do cromossomo 7, $del(7q)$, monossomia do 5, $del(5q)$, $t(6;9)(q23;q34)$ / *DEK-NUP214*, $t(9;22)(q34;q11)$ / *BCR-ABL1*, $t(10;11)(p12;q23)$ / *KMT2A-MLLT10*, anormalidades envolvendo o cromossomo 3, e cariótipos complexos, que, por sua vez, podem carrear estas aberrações supracitadas e/ou, cripticamente, outras anormalidades e fusões gênicas novas. O grupo de risco intermediário inclui as demais anormalidades vistas comumente na LMA, como a trissomia do cromossomo 8 e a trissomia do

cromossomo 21, além de algumas anormalidades associadas à região 11q23 (r-*KMT2A*), bem como pacientes com cariótipo normal (RADHI; MESHINCHI; GAMIS, 2010; KASPERS & REINHARDT, 2011; DE ROOIJ; ZWAAN; HEUVEL-EIBRINK, 2015).

Um estudo relevante apontou que cerca de 20% das LMAs apresentam cariótipo normal pela análise da citogenética convencional, sendo necessários então estudos moleculares para detectar rearranjos crípticos ou aberrações moleculares, como por exemplo, mutações pontuais que não podem ser detectadas na análise por citogenética clássica (YAMAMOTO *et al.*, 2001; CUNEO *et al.*, 2002; GAMERDINGER *et al.*, 2003; KLAUS *et al.*, 2004).

Ainda como um grupo de anormalidades mal definido, os cariótipos complexos são possíveis indicadores de mau prognóstico, inclusive em pacientes pediátricos, o que em parte se deve à raridade da doença, sendo poucos os dados publicados até o momento. Neste contexto, concomitantemente, terapias atuais ainda são falhas para tratar pacientes que apresentam cariótipos complexos. A principal causa da recaída é a falha no tratamento, ilustrando a ineficiência das abordagens terapêuticas atuais em erradicar o clone maligno na maioria dos pacientes, até mesmo naqueles que receberam transplante de medula óssea allogenética (SCHOCH *et al.*, 2001; BETTS *et al.*, 2007).

Portanto, na medida em que as técnicas de citogenética molecular tais como FISH, M-FISH e MCB são aplicadas na prática, e a caracterização molecular vem sendo incorporada, as anormalidades citogenéticas podem ser melhor compreendidas e diferenciadas por seus respectivos impactos sobre o prognóstico (RADHI; MESHINCHI; GAMIS, 2010; DAS & TAN, 2013). Capela de Matos e colaboradores (2017), por exemplo, demonstraram que abordagens de citogenética molecular puderam precisar detalhadamente a caracterização de um cariótipo complexo com anomalias citogenéticas crípticas, nunca revelado por quaisquer ensaios prévios, que teve importância na citogenética inicial, e estratificação de risco do paciente. Portanto, com pacientes sistematicamente testados e uniformemente tratados – explorando anormalidades complexas e revelando suas especificidades moleculares – marcadores prognósticos podem ser identificados, para serem então avaliados como possíveis alvos terapêuticos (MATOS *et al.*, 2017).

Tabela 1.4. Estratificação de risco, recaída e sobrevida da LMA

Estratificação de risco			
	Anormalidades genéticas tipo II	Anormalidades genéticas tipo I	
Favorável	t(8;21) (<i>RUNX1/RUNX1T1</i>), t(15;17) (<i>PML/RARα</i>), t(16;16), inv(16) (<i>MYH11/CBFβ</i>)	Cariótipo normal: com mutação de <i>NPM1</i> ou uma mutação isolada de <i>CEBPA</i> na ausência de <i>FLT3</i> mutado	
Intermediário	Cariótipo normal, +8, t(9;11) (<i>KMT2A-MLLT3</i>)	Mutação no <i>c-KIT</i> concomitante à t(8;21), t(16;16), inv(16): mutação <i>FLT3-ITD</i> com mutação de <i>NPM1</i>	
Desfavorável	Cariótipos complexos, -5, -5q, -7, 7q-, anormalidades na região 11q23 (r-<i>KMT2A</i>)	Cariótipo normal com mutação <i>FLT3-ITD</i> na ausência de mutação no <i>NPM1</i>	
Recaída e sobrevida			
		Risco de Recaída (RR) %	Sobrevida Total (ST) %
Favorável	Pacientes pediátricos	32	78
	Todas as idades (≤ 55)	35	65
Intermediário	Pacientes pediátricos	40	55
	Todas as idades (≤ 55)	51	41
Desfavorável	Pacientes pediátricos	61	42
	Todas as idades (≤ 55)	76	14

t – translocação, inv – inversão, q – braço longo do cromossomo, (+) – trissomia, (-) – ausência, (%) – por cento, (RR) – Risco de Recaída, (ST) – Sobrevida Total.
 Fonte: Adaptado de Radhi; Meschini; Gami, 2010; Arceci & Meschini, 2011; ARBER *et al.*, 2016.

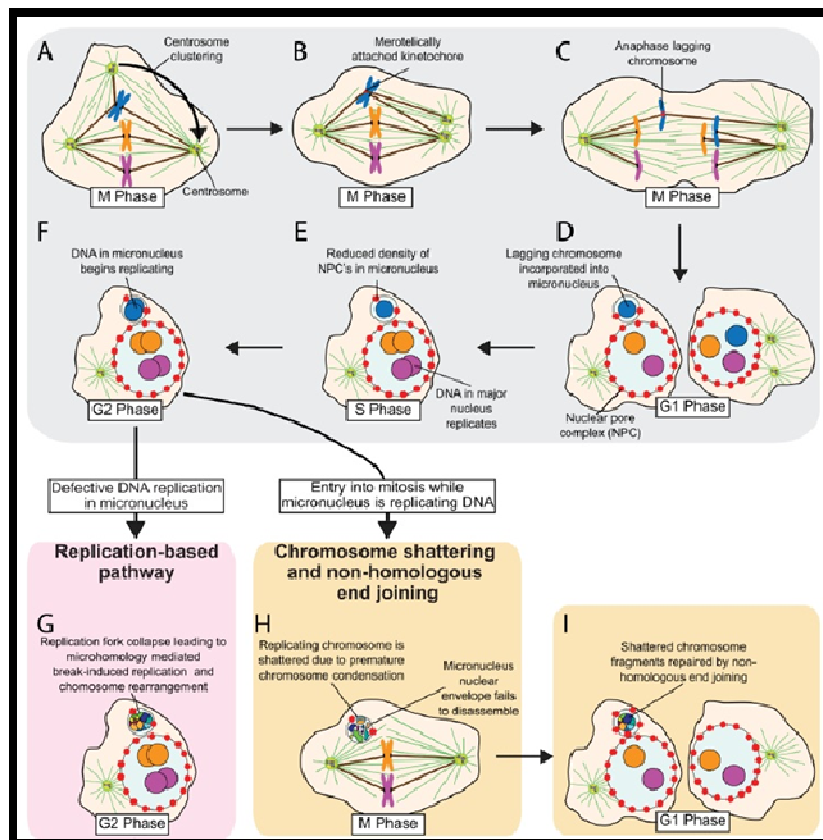
1.8. Cariótipos complexos

A citogenética é considerada um dos mais importantes parâmetros de prognóstico na LMA, e embora algumas aberrações cromossômicas já sejam bem descritas e associadas à subtipos citomorfológicos, ainda, até o momento, cerca de 10% de todos os pacientes acometidos pela doença, apresentam cariótipos com múltiplos rearranjos cromossômicos, muitas vezes de modo críptico (MARCHESI *et al.*, 2011; AL-ACHKAR *et al.*, 2013).

Qualquer cariótipo com pelo menos três aberrações cromossômicas, independentemente do seu tipo e os cromossomos individuais envolvidos, pode ser referido como cariótipo complexo (CC) (MRÓZEK, 2008; OROZCO & APPELBAUM, 2012; AL-ACHKAR *et al.*, 2013).

1.8.1. Mecanismos de formação dos cariótipos complexos

Com relação à formação destes CCs, dois mecanismos são propostos na literatura como causadores, ambos facilitados por um erro de segregação na fase mitótica.



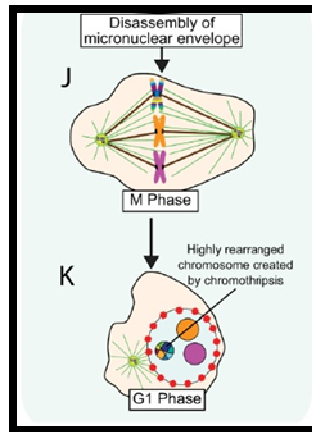


Figura 1.11 (A-I, J-K). Cromoanagênese. O erro de segregação e os mecanismos propostos como provocadores dos rearranjos e cariótipos complexos. Fonte: Modificado de Holland & Cleveland, 2012.

Durante a fase mitótica, com o agrupamento de centrossomos, aumenta a concentração de cinetócoros anexados em uma orientação merotética, um erro no qual microtúbulos vindo dos fusos opostos, se anexam a um mesmo cinetócoro. Apesar dos mecanismos de correção, cinetócoros merotelicamente anexados podem persistir até a anáfase, fazendo com que as cromátides se atrasem no fuso mitótico, prejudicando o sincronismo em sua segregação e impedindo que se juntem à demais massa genômica nos polos da célula (Fig. 1.11 A-C) (GREGAN *et al.*, 2011).

Enquanto o restante do DNA é associado ao núcleo maior normal, o cromossomo em atraso é então associado a um micronúcleo, que contém um menor número de poros nucleares em seu envelope micronuclear. Por haver uma menor concentração de poros nucleares, a entrada de componentes essenciais é reduzida, conseqüentemente levando a um reparo defeituoso de DNA e uma lentidão na replicação. O DNA no núcleo maior inicia sua replicação na fase S, como esperado, já o micronúcleo só inicia sua replicação na fase G2 (Fig. 1.11 D-F). A partir deste erro de segregação, se dividem as hipóteses propostas nos dois mecanismos descritos abaixo.

1.8.1.1. Cromoanasíntese

A cromoanasíntese é caracterizada por uma replicação induzida por quebra, mediada por micro homologia. Este mecanismo é baseado em uma replicação defeituosa do DNA no micronúcleo, que vai gerar uma quebra de dupla fita em um dos braços da forquilha de replicação. No entanto, uma vez que não existe uma

terminação de DNA adicional para ser usado no reparo da quebra de dupla fita, vai haver uma alteração no padrão de replicação do DNA, causando os rearranjos complexos (Fig. 1.11 G, J-K) (HOLLAND & CLEVELAND, 2012).

1.8.1.2. Cromotripsis

A literatura apresenta a cromotripsis como o mecanismo predominante para a formação da maioria dos cariótipos complexos. Este se baseia no fato de que a replicação lenta no micronúcleo vai fazer com que o DNA chegue na fase mitótica ainda sem ter concluído sua replicação, e portanto, sofrendo uma condensação cromossômica prematura, causando uma massiva quebra de dupla fita. Na metáfase, o envelope do núcleo maior é dispersado, porém, o envelope micronuclear permanece intacto. Se hipotetiza que devido a menor concentração de poros nucleares, nesta fase, o micronúcleo ainda não recebeu os estímulos necessários para que ocorra a dispersão de seu envelope micronuclear. Sendo assim, o material cromossômico quebrado fica retido no micronúcleo. Na próxima intérfase, este micronúcleo segrega randomicamente entre uma das células filha e é reparado por *non-homologous end joining*. Finalmente, na próxima fase mitótica ocorre a dispersão do envelope micronuclear e é possível observar os rearranjos criados pela cromotripsis (Fig. 1.11 H-K).

Reconhecendo que pelo menos dois mecanismos produzem rearranjos complexos e localizados, a literatura propõe a palavra cromotripsis como descritora desta classe de rearranjo cromossômico (HOLLAND & CLEVELAND, 2012).

1.8.2. Cariótipos complexos na LMA

Especificamente na LMA, alguns trabalhos têm mostrado que a presença de CCs, nos blastos da MO, representam um possível indicador de mau prognóstico, podendo influenciar negativamente na evolução clínica do paciente. A literatura também tem demonstrado que, na maior parte dos casos, a doença tem sido resistente ao tratamento inicial, com recaída prematura dos pacientes (BETTS *et al.*, 2007; MARCHESI *et al.*, 2011).

Além disto, pesquisadores do *Medical Research Council* demonstraram uma relação entre o grau de complexidade do cariótipo – número de anormalidades adicionais em um cariótipo – com o aumento do risco do paciente não atingir remissão completa (RC) e aumento do risco de mortalidade (OROZCO & APPELBAUM, 2012). Corroborando, Bochtler e colaboradores (2017) mostraram –

em 2 grandes ensaios consecutivos, prospectivos, randomizados, multicêntricos – que cromossomos marcadores apresentam uma maior frequência nas LMAs de alto risco e com alta heterogeneidade clonal (40.3% e 33.6% respectivamente), especialmente no contexto de cariótipos complexos. O grupo também observou que, por outro lado, cariótipos com translocações e inversões recorrentes, mesmo que determinantes de risco adverso, quando ocorrendo isoladamente, apresentavam uma menor frequência de cromossomos marcadores (9.4%). Neste mesmo estudo, os autores demonstram que a presença de cromossomos marcadores está relacionada a uma pior SLR e ST (BOCHTLER *et al.*, 2017).

Outros relatos têm demonstrado que a incidência de CCs aumenta com a idade, uma vez que a frequência de CCs é significativamente menor em pacientes pediátricos com LMA, quando comparados a adultos também acometidos por esta neoplasia. Neste contexto, um estudo envolvendo pacientes pediátricos relatou que a taxa mais alta de CCs foi observada em crianças com menos de três anos, porém poucos dados de significância prognóstica foram publicados sobre pacientes nesta faixa etária até o momento (MRÓZEK, 2008; MANOLA, 2009; BOCHTLER *et al.*, 2017).

Os CCs são mais comuns na LMA secundária – aproximadamente duas vezes mais frequentes do que na LMA *de novo* – embora, para ambas, seja um possível indicador de mau prognóstico – proveniente de um acúmulo progressivo de aberrações cromossômicas oriundas de tratamento prévio (agentes alquilantes ou radiação), ou de outra doença hematológica (BETTS *et al.*, 2007; OROZCO & APPELBAUM, 2012). Neste contexto, a literatura também relata que há um alto percentual de chance de pacientes com SMD, e que apresentam CCs, evoluírem para LMA, e ainda mais, que a complexidade do cariótipo está associada à baixa taxa de ST na SMD, bem como a esta evolução para LMA (VALCÁRCEL *et al.*, 2013; BOCHTLER *et al.*, 2017).

Como relatado acima, os CCs têm sido relacionados, na literatura, com uma evolução clínica desfavorável, e faz-se importante ressaltar que estes cariótipos podem carrear, dentre suas alterações, de modo críptico, anomalias cromossômicas que podem ser responsáveis por um prognóstico adverso (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2012; NEY-GARCIA *et al.*, 2012). Deste modo, uma vez que tem sido sugerida uma possível correlação entre a combinação das aberrações detectadas em um CC e a resposta clínica, torna-se clara a necessidade de uma refinação na caracterização deste tipo de perfil cariotípico.

2. Objetivos

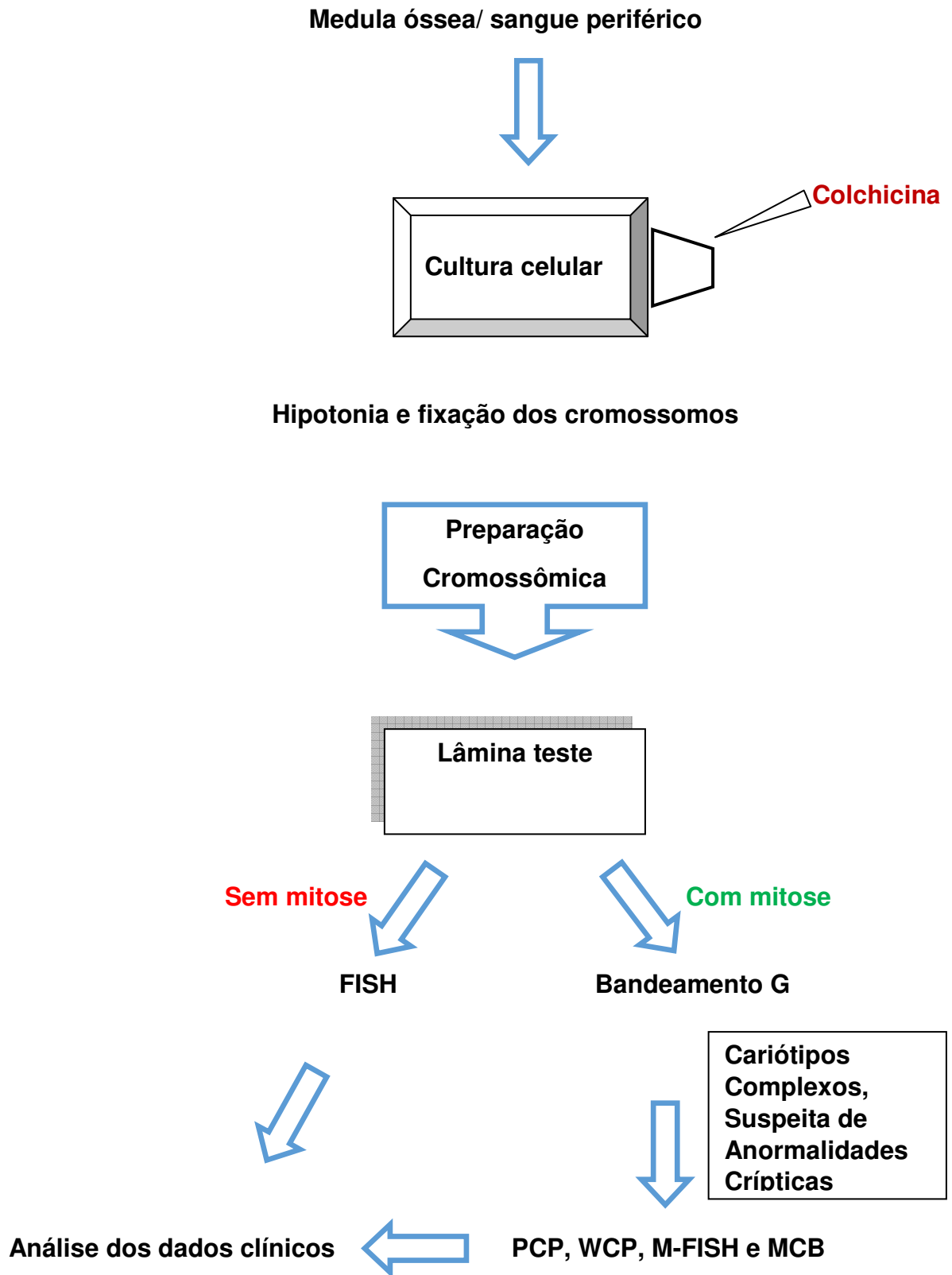
Detectar e caracterizar cariótipos complexos e/ou inconclusivos, de modo a contribuir para uma melhor definição do perfil cariotípico, de pacientes pediátricos diagnosticados com LMA.

2.1. Objetivos específicos

- a) Refinar os cariótipos complexos destes pacientes, caracterizando e elucidando os pontos de quebra das anomalias novas e recorrentes;
- b) Avaliar a prevalência de cariótipos complexos em nossa amostra;
- c) Analisar descritivamente os dados clínicos dos pacientes pediátricos com LMA.

3. Material e métodos

3.1. Desenho Experimental



3.2. Amostra e considerações éticas

Este estudo utilizou amostras – coletadas no período que compreende de Maio de 2007 a Agosto de 2018 – provenientes de 7 diferentes instituições hospitalares, de variados estados brasileiros, incluindo no Rio de Janeiro, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o Hospital Federal da Lagoa, o Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG), e o Hospital dos Servidores do Estado (HSE), na Bahia, o Hospital ONCOSUL e a Santa Casa de Misericórdia de Itabuna e, em Santa Catarina, o Hospital Pequeno Príncipe.

Os dados clínicos da apresentação da doença, evolução e resposta do paciente, bem como os exames citoquímicos, de imunofenotipagem e morfológicos, foram cedidos por intermédio dos hematologistas responsáveis – nas respectivas instituições de admissão – pelos tutores dos pacientes.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INCA, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, sob o cadastro #088/07 (Anexo I).

3.3. Critérios de inclusão e exclusão

Com relação aos critérios de inclusão do presente estudo, foram selecionadas as amostras de MO e/ou SP de crianças com idades entre 0-18 anos, e com diagnóstico de LMA *de novo*, nas quais a análise por bandeamento G revelou um cariótipo complexo e/ou inconclusivo, representado por:

- Cariótipos que apresentaram metáfases ou cromossomos com morfologia inadequada para análise;
- Cariótipos que apresentaram cromossomos marcadores;
- Cariótipos que apresentaram alterações cromossômicas não possíveis de serem total ou parcialmente caracterizadas pela citogenética convencional.

Nos critérios de exclusão estavam:

- Os cariótipos de pacientes que, após a análise citogenética com uma boa morfologia, foram normais ou não apresentaram alterações duvidosas.

3.4. Estudo cromossômico pela técnica de bandeamento G

Os estudos cromossômicos foram realizados em aspirado de MO e/ou SP, seguindo os critérios descritos por Silva e colaboradores (2008). Para obtenção de mitoses, foram cultivadas 5×10^6 células em 5mL de meio de cultura composto de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) (80%) e soro bovino fetal (HyClone) (20%) em tubos tipo Falcon de 15mL. As células foram incubadas durante 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Após 22-23 horas, foi adicionada uma solução de colchicina (Difco) em uma concentração de 0,05µg/mL. Ao término do período de incubação, seguiu-se a retirada da cultura e o preparo das lâminas. As células foram centrifugadas e o precipitado obtido foi submetido a choque hipotônico, 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 ressuspenso em um pequeno volume de fixador para o preparo de lâminas, pingando-se uma gota da suspensão em lâmina limpa e umedecida. Uma lâmina de cada tubo Falcon foi observada em microscopia para verificação dos resultados, e então o material foi estocado na geladeira para posterior análise cromossômica.

Para análise cromossômica, as lâminas de 2-10 dias de preparo foram incubadas em uma solução de tripsina (Sigma-Aldrich®) 0,1% aquecida a 37°C em tempos que variaram de 1 segundo a 1 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 de uma média de 20 células metafásicas em microscopia óptica. Um caso foi considerado anormal quando mais de três células apresentaram a mesma anomalia cromossômica. A documentação dos cariótipos foi realizada no computador por um programa analisador de imagem (Ikaros - MetaSystems), utilizando-se para isso, uma câmera CCD acoplada ao microscópio Olympus BX51. Os cariótipos foram identificados e classificados de acordo com os sistemas internacionais para nomenclatura de citogenética humana de 2016 (MCGOWAN-JORDAN *et al.*, 2016).

3.5. Estudo por citogenética molecular

3.5.1. Técnicas de FISH e M-FISH

Para investigação de rearranjos moleculares, pela técnica FISH, foram utilizadas sondas comerciais de sequência homóloga de DNA para *locus* específicos (LSI) IGH, EGR1, 5p15, AML1-ETO *dual color*, *dual fusion*, CBF β -MYH11 *dual color*, *break-apart*, PML-RAR α *dual color*, *dual fusion*, MLL-MLLT3 *dual color*, *dual fusion*, e *dual color*, MLL *break-apart* para o gene *KMT2A* (Vysis®/Abbott®), sondas *whole chromosome painting* (WCP), *partial chromosome painting* (PCP), subteloméricas (Subtel), centroméricas (CEP), e sondas confeccionadas a partir de cromossomos artificiais de bactérias (BAC) específicas para aberrações e/ou translocações complexas não recorrentes. Além disso, nos casos em que foi detectada a presença de cromossomos marcadores ou de rearranjos crípticos, foram utilizados diferentes conjuntos de sondas para a técnica do M-FISH, que consiste na utilização simultânea de pelo menos três diferentes ligantes ou fluorocromos para a marcação específica de DNA. A técnica de FISH foi aplicada no restante do material das culturas, mantidas em fixador, sob refrigeração. Depois de preparadas, as lâminas foram mantidas por dois dias à temperatura ambiente, pré-tratadas por imersão em 2XSSC, pH 7,0 a 37°C por 30 minutos e desidratadas em série de etanol 75%, 85% e 100%, por dois minutos em cada álcool. Para a hibridização, 10 μ l desta mistura (7 μ l de tampão de hibridação; 2 μ l de água; 1 μ l de sonda) foram colocadas sobre as lâminas e cobertas com lamínulas de vidro de 25x25mm, sendo mantidas aquecidas em placa térmica a 43°C por dois minutos. A seguir, as lamínulas foram imediatamente vedadas com borracha selante e incubadas em câmara úmida (50% formamida/2XSSC) a 37°C por 12-16 horas. Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas em três banhos de 50% de formamida/2XSSC pH 7,0 por 10 minutos cada, seguido da imersão em 2XSSC, pH 7,0 por 10 minutos e por último em 2XSSC 0,1% NP-40 (Vysis®) ou IGEPAL (Sigma®) por 5 minutos, a 45°C. Para a análise, foi utilizada a contra coloração com DAPI II. A análise pelo FISH 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 do programa analisador de imagem (Isis - MetaSystems).

3.5.2. Técnica de MCB

Para refinar os cariótipos, investigando os rearranjos crípticos e a confirmação da presença de cariótipos complexos, a técnica de MCB foi aplicada a partir de sondas caseiras, que foram 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, como descrito previamente (LÜDECKE *et al.*, 1989; SENGER *et al.*, 1990). 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 (Fig. 3.1 A-B) (LIEHR & CLAUSSEN, 2002; LIEHR *et al.*, 2002; WEISE *et al.*, 2008).

O DNA isolado é então amplificado pela técnica DOP-PCR (TELENIUS *et al.*, 1992). A reação de PCR original é feita em um volume de 50µl da amostra inicial. Desta amostra, um volume de 0.5µl é re-amplificado e um volume de 50µl é obtido no final. Depois, esse processo é repetido e então é feita a marcação das sondas com 5 diferentes fluorocromos: *SpectrumOrange*, *Rhodamine 110*, *TexasRed*, *Cyanine 5* e *Cyanine 5.5* (Fig. 3.1 C). Essa marcação também é feita pela técnica de DOP-PCR. Com isso, de 2 a 10 bibliotecas de sondas são criadas para cada cromossomo. Quando sobrepostas, essas sondas criam um padrão de pseudo-cores para cada um dos 24 cromossomos humanos (Fig. 3.1 A). 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. 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.

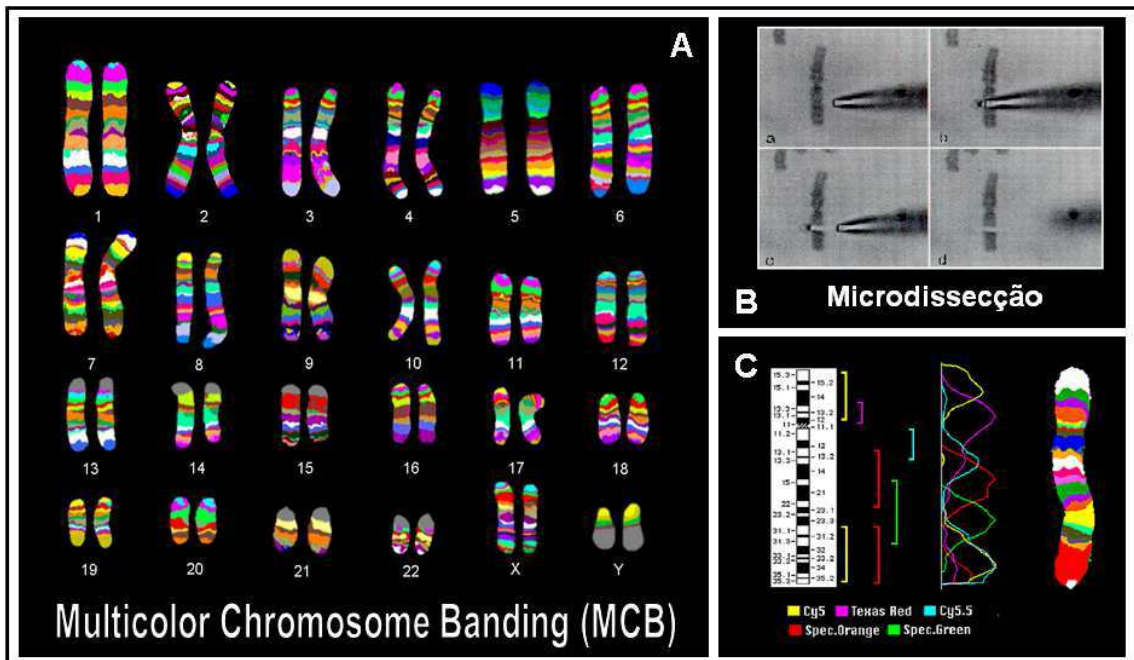


Figura 3.1. *Multicolor Chromosome Banding.* **A)** Padrão de bandeamento cromossômico multicolorido utilizando as sondas de MCB para os 24 pares de cromossomos humanos; **B)** Processo de microdissecção cromossômica utilizado na preparação das sondas de MCB; **C)** Esquema ilustrativo do padrão de pseudo-cores criado pela sobreposição de fragmentos cromossômicos marcados pelos 5 fluorocromos, identificados no rodapé da figura.

4. Resultados

4.1. Pacientes e local de estudo

Amostras de medula óssea e/ou sangue periférico de 146 pacientes pediátricos diagnosticados com LMA, foram encaminhadas para o Laboratório de Citogenética (Divisão de Laboratórios Especializados do CEMO - INCA). Dentre estas amostras, 13 (8,9%) não apresentaram mitose. Das 133 amostras com mitose, 11 (8,2%) apresentaram cariótipos normais, portanto, o percentual de anormalidades cromossômicas encontrado nos pacientes deste estudo foi de 91,8%. As amostras que foram citogeneticamente diagnosticadas como cariótipos complexos ou cariótipos inconclusivos, foram então selecionadas para uma refinação pela caracterização molecular. A citogenética molecular, através da técnica de FISH, foi realizada no Laboratório de Citogenética do CEMO – INCA, enquanto que as análises por PCP, WCP, M-FISH e MCB foram feitas no Laboratório de Citogenética Molecular do Instituto de Genética Humana da Universidade de Jena, na Alemanha, como parte da colaboração e projeto de intercâmbio (CAPES – PROBRAL/DAAD – projeto # 419/14). Das 133 amostras que apresentaram mitose e foram refinadas, 22 (16,5%) foram caracterizadas como cariótipos complexos.

Dentre os pacientes deste estudo, não houve predominância de sexo, uma vez que observamos uma proporção de 1:1, sendo 11 pacientes meninos e 11 meninas, com uma mediana de idade de 7 anos (min. 6 meses e máx. 16 anos). A mediana da contagem de leucócitos foi de 16.950 (min. 2.000 e máx. 692.000), e a mediana da contagem de plaquetas foi de 73.500 (min. 11.000 e máx. 318.000). Foi observada uma taxa de óbito de 41%. A Tabela 4.1, a seguir, apresenta os dados clínicos e demográficos dos pacientes referidos neste estudo.

Tabela 4.1. Dados demográficos e clínicos dos pacientes diagnosticados com LMA apresentando cariótipos complexos – Sexo, idade ao diagnóstico, leucócitos, plaquetas e evolução clínica

Paciente	Subtipo morfológico	Sexo	Idade ao diagnóstico	Contagem de leucócitos ao diagnóstico	Contagem de plaquetas ao diagnóstico	Protocolo de Tratamento	Status após primeira indução	Recaída	TMO	Status clínico atual	Alterações citogenéticas por grupos prognósticos
1	M1	M	8 anos	4.600	90.000	AML-BMF-2004	Remissão completa	Recaída medular isolada, durante a manutenção, 1 ano após atingir remissão	Não realizou	Óbito	del(9q)
2	M4	M	5 anos	68.900	11.000	AML-BMF-2004	Remissão completa	Não apresentou	Não realizou	Vivo	inv(16)
3	M5	F	13 anos	6.400	318.000	Ausência de informações	Ausência de informações	Ausência de informações	Ausência de informações	Óbito	t(5;19) t(7;13)
4	M4/M5	M	10 meses	53.800	27.000	AML-BMF-1998	Remissão completa após 2ª indução	Recaída medular isolada, após tto, 2 anos após atingir remissão	Não realizou	Óbito	t(1;11)
5	M4/M5	M	6 anos	18.000	26.000	AML-BMF-2004	Remissão completa após 2ª indução	Recaída medular isolada, após tto, 3 anos e 9 meses após atingir remissão. Atingiu 2ª remissão	TMO aparentado / TMO aparentado	Óbito	t(8;21;22)
6	M4	F	1 a e 2 meses	140.000	19.000	Ausência de informações	Ausência de informações	Ausência de informações	Ausência de informações	Óbito	inv(16) del(16q)
7	M3	M	10 anos	2.930	11.000	AML-BMF-2004	Remissão completa	Não apresentou	Não realizou	Vivo	t(15;17)
8	M5	M	1 ano e 6 meses	6.900	208.000	Ensaio clínico AML02	Remissão completa após 2ª indução	Não apresentou	Não realizou	Vivo	t(10;11)
9	M1/M2	F	9 anos	5.400	51.000	Ausência de informações	Ausência de informações	Ausência de informações	Ausência de informações	Óbito	t(16;21)
10	M1/M2	F	13 anos	22.000	96.000	AML-BMF-2004	Falha de indução. Remissão completa após 3º bloco de QT	Não apresentou	Não realizou	Óbito	t(8;13;21)
11	M2	M	7 anos	15.900	201.000	AML-BMF-2004	Remissão completa	Não apresentou	Não realizou	Vivo	t(8;21)
12	M2	M	5 anos	20.700	83.000	AML-BMF-2004	Remissão completa	Não apresentou	Não realizou	Vivo	t(8;17;21)
13	M1	M	10 anos	67.500	275.000	AML-BMF-2012	Falha de indução. Remissão completa após 3º bloco de QT	Não apresentou	TMO não aparentado	Vivo	del(5q)

14	M4	F	12 anos	225.200	17.000	AML-BMF-2004	Remissão completa	Recaída medular isolada, durante a manutenção, 1 ano e 2 meses após atingir remissão	Não realizou	Óbito	t(6;11)
15	M1	F	3 anos	692.000	124.000	Não realizou	-	-	Não realizou	Óbito	t(3;7) del(7q)
16	M4/M5	F	6 meses	144.000	229.000	Ausência de informações	Ausência de informações	Ausência de informações	Ausência de informações	Viva	t(10;11;14)
17	M4	F	7 anos	14.300	38.000	AML-BMF-2012	Remissão completa	Não apresentou	Não realizou	Viva	inv(16)
18	M2	F	16 anos	7.110	169.000	AML-BMF-2004	Remissão completa após 2ª indução	Não apresentou	TMO não aparentado	Viva	+8 +21
19	M5	F	7 meses	22.500	64.000	AML-BMF-2004	Remissão completa	Não apresentou	TMO não aparentado	Viva	t(9;11)
20	M3	M	14 anos	2.000	31.000	AML-BMF-2004	Remissão completa	Não apresentou	Não realizou	Vivo	t(15;17)
21	M5	M	7 anos	2.500	182.000	AML-BMF-2012	Remissão completa após 2ª indução	Não apresentou	Não realizou	Vivo	t(11;16;19)
22	M2	F	9 anos	12.000	36.000	AML-BMF-2012	Falha de indução. Remissão completa após 4º bloco de QT	Não apresentou	Não realizou	Viva	t(8;19;21)

M – sexo masculino, F – sexo feminino, M1-M5 – Subtipos morfológicos FAB da LMA, AML-BMF – *Acute myeloid leukemia*-Berlim-Frankfurt-Münster, QT – quimioterapia, tto – tratamento, TMO – transplante de medula óssea.

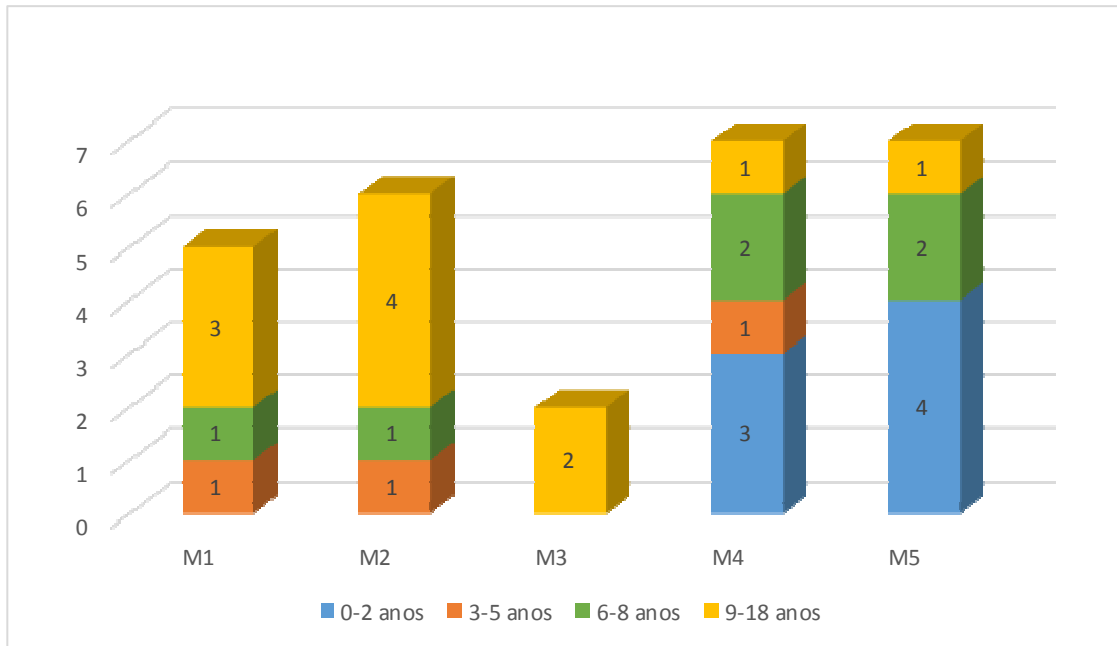


Figura 4.1. Subtipos FAB associados às diferentes faixas etárias observadas no presente estudo. M1, M2, M3, M4, M5 – Subtipos morfológicos FAB da LMA.

4.2. Cromossomos, anormalidades e subtipos morfológicos

A figura 4.1 apresenta os subtipos FAB associados às diferentes faixas etárias dos pacientes deste estudo. Pacientes classificados com os subtipos FAB M6 e M7 não apresentaram CCs.

Exceto pelo cromossomo 4, todos os cromossomos autossomos do cariótipo humano estiveram envolvidos nas anormalidades apresentadas neste estudo. Com relação aos cromossomos sexuais, 3 casos apresentaram monossomia do cromossomo Y, enquanto que um caso apresentou monossomia do cromossomo X, e um outro uma trissomia do X. O cromossomo mais envolvido nas anormalidades deste estudo foi o 21, presente em 9/22 casos, sendo 6 destes com rearranjo do gene *RUNX1*, seguido pelo cromossomo 11, presente em 7/22 casos, sendo 6 destes com *r-KMT2A*, e pelo cromossomo 8, também presente em 7/22 casos (Fig. 4.2). Os subtipos FAB da LMA mais prevalentes foram o M4 e o M5, associados a 7 casos cada um (Fig. 4.3). A figura 4.4 demonstra as alterações – consideradas como marcadores independentes mais significativos para a LMA – associadas às diferentes faixas etárias observadas neste estudo.

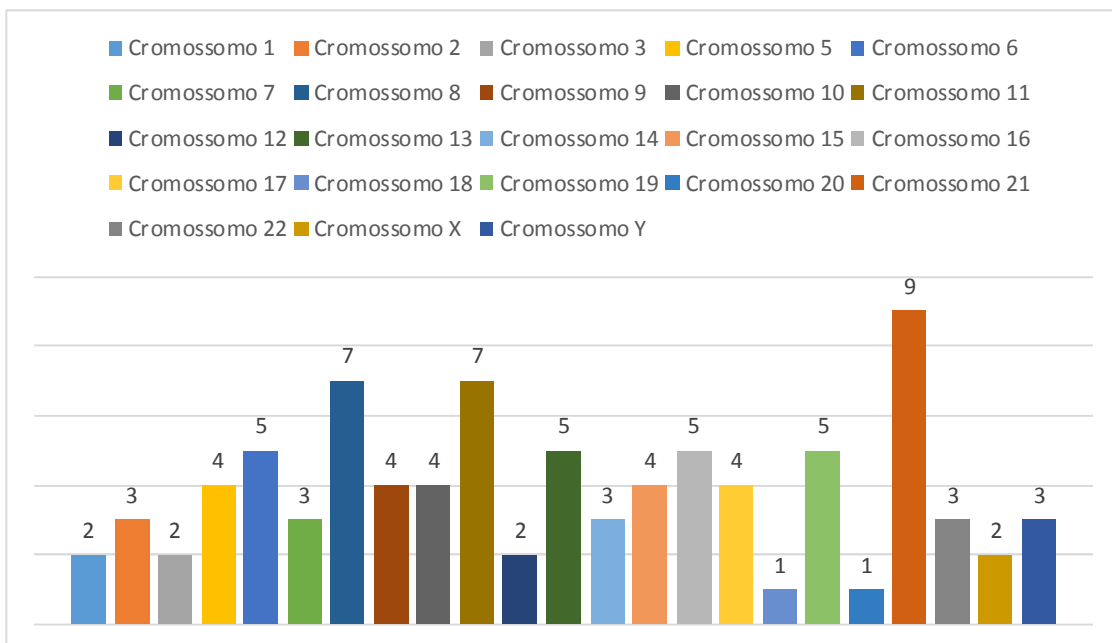


Figura 4.2. Prevalência dos cromossomos envolvidos nas anormalidades observadas neste estudo. X e Y – cromossomos sexuais.

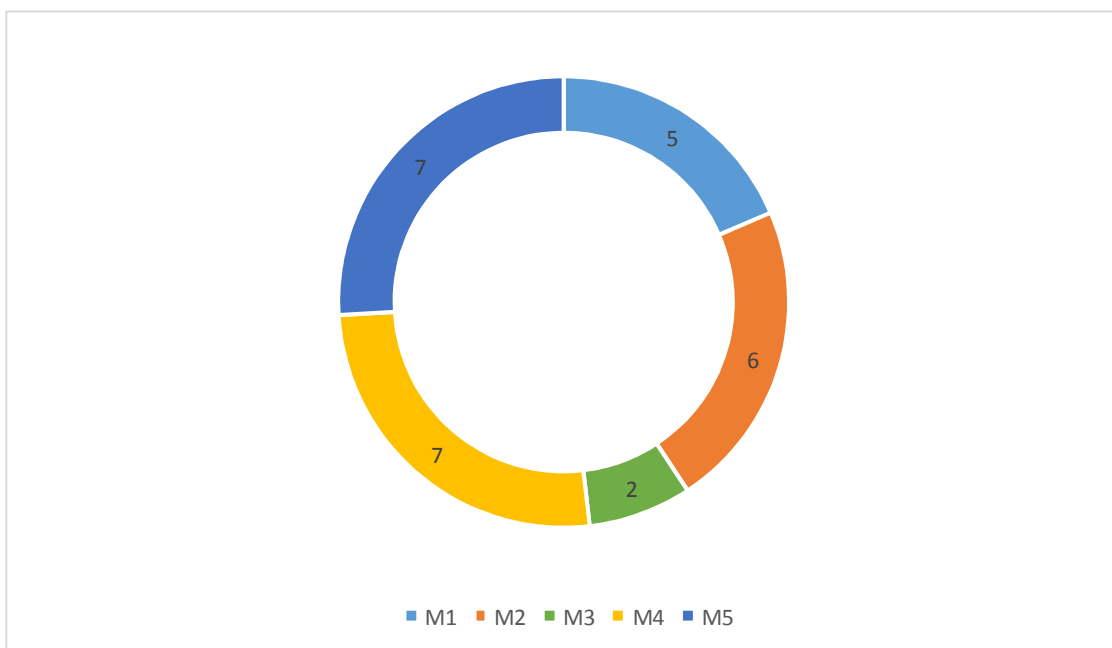


Figura 4.3. Prevalência dos subtipos FAB presentes neste estudo. M1, M2, M3, M4, M5 – Subtipos morfológicos FAB.

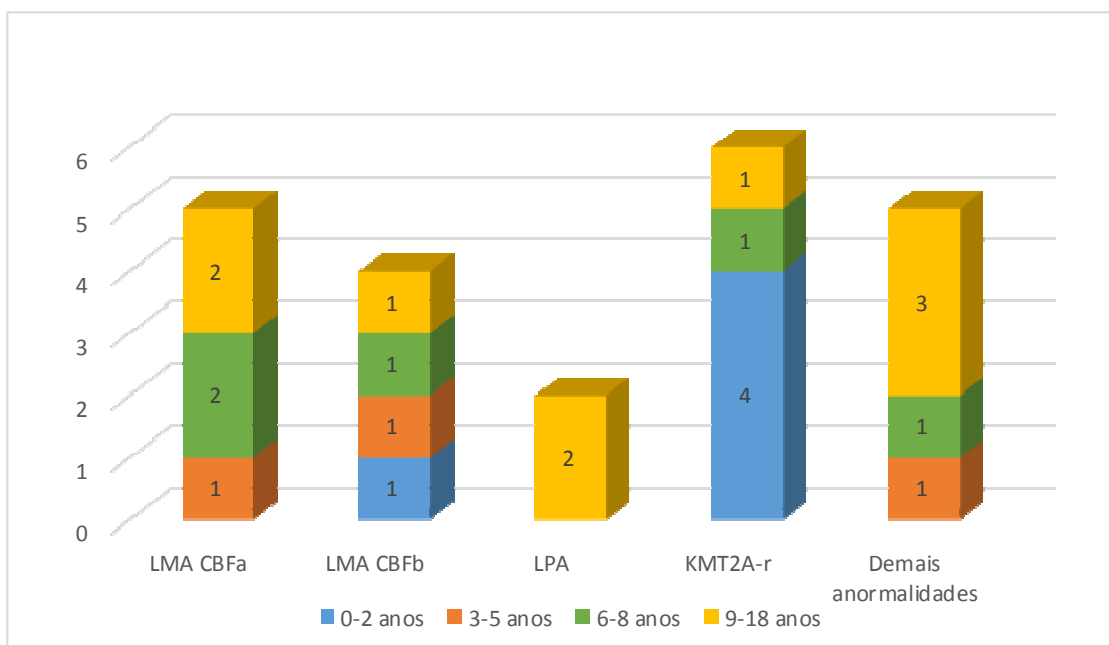


Figura 4.4. Alterações associadas às diferentes faixas etárias observadas no presente estudo.

4.3. Casos com anormalidades associadas a LMA CBF

4.3.1. Envolvimento dos cromossomos 8, 21 e 22

No momento do diagnóstico, o paciente 5 apresentou o cariótipo complexo: 45,X,-Y,del(8)(q22),add(22)(q22),add(22)(q22) em 22 metáfases analisadas (Fig. 4.5 A), apontando três cromossomos marcadores. A aplicação da técnica de FISH através da sonda para centrômero (CEP) Y (Vysis®/Abbott®), confirmou a perda do cromossomo Y (Fig. 4.5 B). A técnica de M-FISH confirmou a identidade de cada cromossomo anormal. (Fig. 4.5 C). O cariótipo final foi caracterizado através da técnica de MCB, aplicada aos cromossomos 1 e 22, e FISH complementar com a aplicação de um conjunto de sondas LSI e de sondas WCP para os cromossomos 8, 21 e 22: 45,X,-Y,t(8;22;21)(q22;q13.3; q22.12),der(22)t(1;22)(q23;q13.3) (Fig. 4.5 D-G). Na recaída, o paciente apresentou o cariótipo: 45,X,-Y,del(6)(q21),t(8;22;21)(q22;q13;q22),der(22)t(1;22)(q23;q13), em 23 metáfases analisadas.

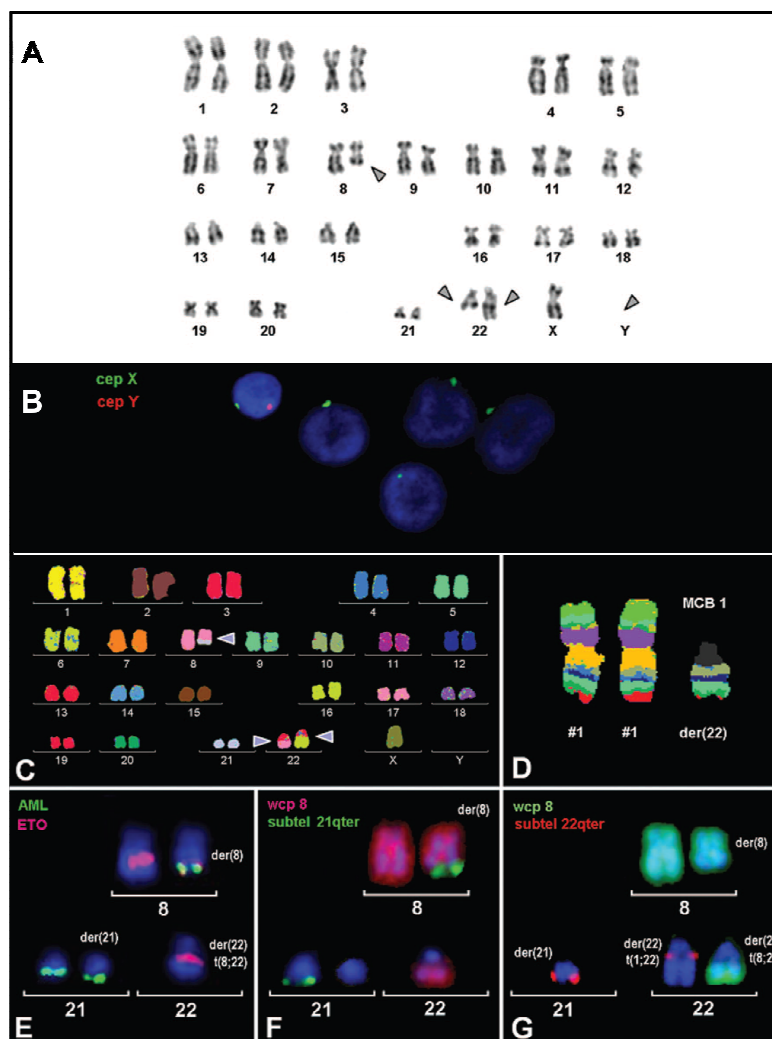


Figura 4.5. Caracterização citogenético-molecular do Paciente 5, em: **A)** Cariótipo por bandeamento G. As setas, em cinza, demonstram as regiões cromossômicas envolvidas no rearranjo, bem como a perda do cromossomo Y. **B)** Ensaio de FISH em núcleos interfásicos confirmando a monossomia do Y. **C)** Ensaio de M-FISH. As setas em cinza indicam os rearranjos cromossômicos. **D)** Ensaio de MCB demonstrando a $t(1;22)(q23;q13.3)$. **E-G)** Exame de FISH com sondas WCP e sondas subtelo méricas, confirmando a origem e destino de cada cromossomo envolvido neste rearranjo. # – número, der – derivativo, t – translocação, Subtel – sonda subtelo mérica, wcp – sonda WCP, qter – região terminal do braço cromossômico longo, MCB – *Multicolor Chromosome Banding*.

4.3.2. Envolvimento dos cromossomos 8, 13 e 21

A análise por banda G da amostra da paciente 10, revelou o cariótipo $46,X,-X,del(8q22),+der(13q3?)$ em 23 metáfases analisadas (Fig. 4.6 A), caracterizando um cariótipo complexo. A análise por FISH, com a sonda LSI AML1-ETO *dual color, dual fusion* (Vysis®/Abbott®), confirmou a fusão *RUNX1-RUNX1T1* no cromossomo 8 derivativo e revelou um sinal do *RUNX1T1* no cromossomo 13 derivativo (Fig. 4.6 B1). Complementarmente, com uma sonda subtelo mérica para a região terminal do cromossomo 13 (*Kreatech®*) foi possível observar o sinal da região 13qter no cromossomo 21 derivativo (Fig. 4.6 B2). Para definir este rearranjo complexo, foram conduzidos estudos por MCB, além da aplicação de sondas WCP, para os

cromossomos 8, 13 e 21, caracterizando o cariótipo final como: 46,X,-X,t(8;13;21)(q22;q33;q22) (Fig. 4.6 C) (Anexo II).

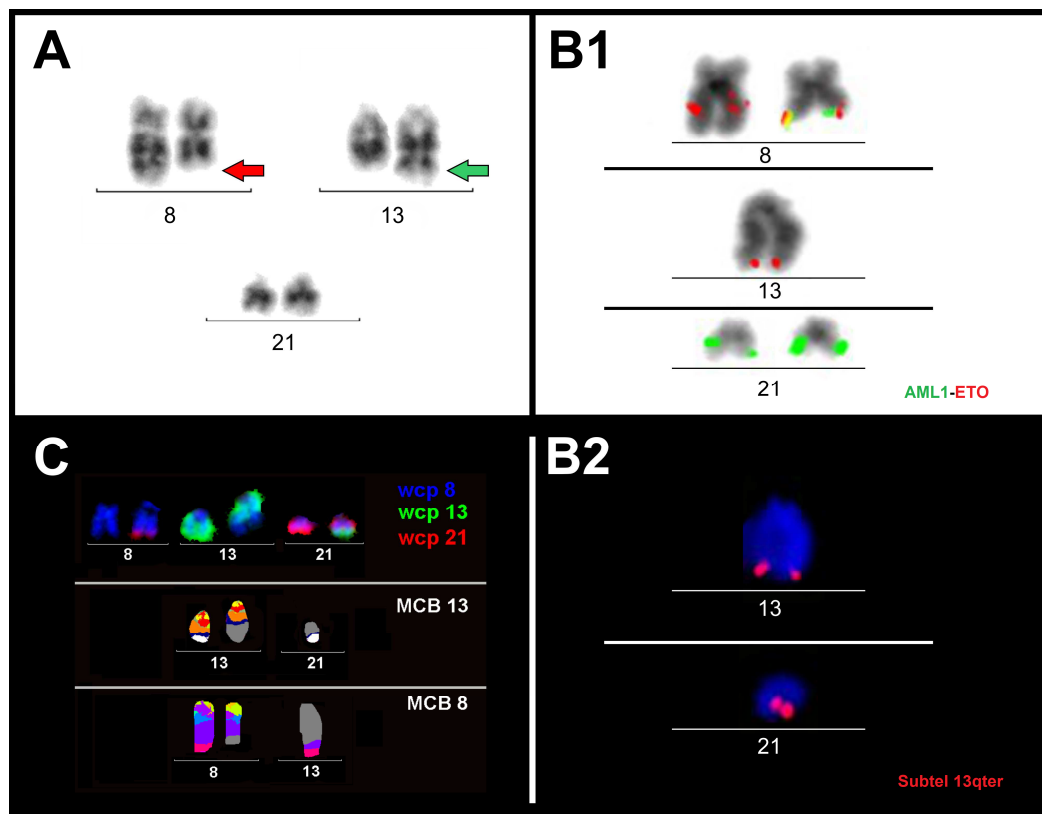


Figura 4.6. Caracterização citogenético-molecular da Paciente 10, em: **A)** Cariótipo parcial por bandeamento G. A seta em vermelho, indica perda de parte de material cromossômico no cromossomo 8, e a seta verde indica material cromossômico adicional no cromossomo 13. **B1)** Exame de FISH com a sonda AML1-ETO demonstrando o envolvimento dos cromossomos 8, 13 e 21 no rearranjo. **B2)** Exame de FISH utilizando uma sonda subtelomérica para o cromossomo 13, revelando que parte deste cromossomo foi crípticamente translocada para o cromossomo 21. **C)** Ensaios de MCB e FISH com sondas WCP indicando a origem e o destino de cada material cromossômico dos cromossomos envolvidos neste rearranjo. MCB – Multicolor Chromosome Banding, WCP – Whole Chromosome Painting.

4.3.3. Envolvimento dos cromossomos 8, 17 e 21

O estudo por banda G do paciente 12, mostrou o cariótipo complexo 46,X,-Y,del(8q22),+der(17q?24) em 22 metáfases analisadas (Fig. 4.7 A). A aplicação da técnica de FISH com a sonda LSI AML1-ETO *dual color, dual fusion* (Vysis®/Abbott®) pôde confirmar a fusão *RUNX1-RUNX1T1* no cromossomo 8 derivativo, e revelou um sinal do gene *RUNX1T1* no cromossomo 17 derivativo (Fig. 4.7 B). Para precisar os pontos de quebra, foi então utilizada a técnica de MCB e sondas de WCP específicas para os cromossomos 8, 17 e 21. O cariótipo final foi caracterizado como: 45,X,-Y,t(8;17;21)(q22;q21;q22) (Fig. 4.7 C).

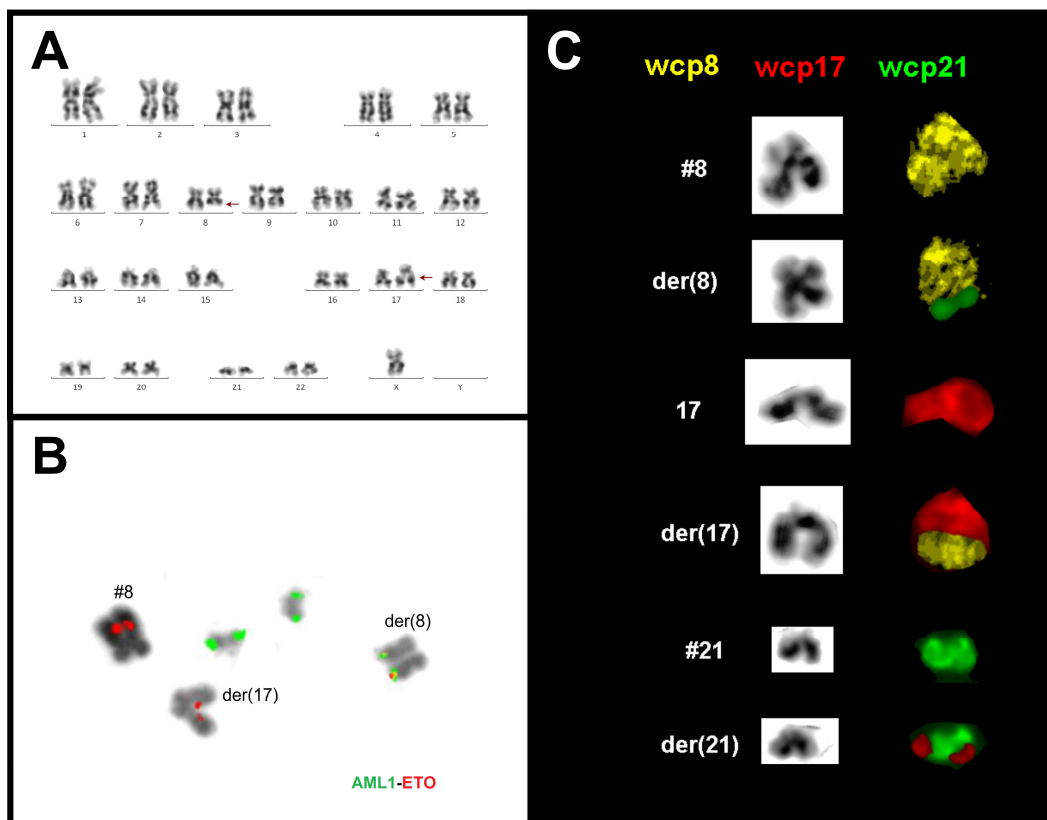


Figura 4.7. Caracterização citogenético-molecular do Paciente 12, em: **A)** Cariótipo por bandeamento G. As setas em vermelho indicam perda de parte do material cromossômico no cromossomo 8, e material cromossômico adicional no cromossomo 17. **B)** Exame de FISH em cariótipo parcial com a aplicação da sonda AML1-ETO, ilustrando a fusão *RUNX1-RUNX1T1* no cromossomo 8 derivativo, e demonstrando parte do gene *RUNX1T1* translocada no cromossomo 17 derivativo. **C)** Ensaio de FISH com sondas WCP para os cromossomos 8, 17 e 21, revelando a origem e o destino de cada material cromossômico envolvido neste rearranjo. der – derivativo, # – número, WCP – *Whole Chromosome Painting*.

4.3.4. Envolvimento dos cromossomos 8, 19 e 21

Através da análise por Bandeamento G, o cariótipo da paciente 22 foi definido como 46,XX,t(8;19)(q22;?p), em 23 metáfases analisadas (Fig. 4.8 A). A análise de FISH, com a sonda LSI AML1-ETO *dual color, dual fusion* (Vysis®/Abbott®), confirmou uma fusão críptica *RUNX1-RUNX1T1* no cromossomo 8 derivativo, com um sinal do gene *RUNX1T1* no cromossomo 19 derivativo (Fig. 4.8 B). Para esclarecer os pontos de quebra deste rearranjo complexo, realizamos estudos por WCP (Fig. 4.8 C) e MCB, definindo o cariótipo final como: 46,XX, t(8;19;21)(q21.3;q13.43;q22.12).

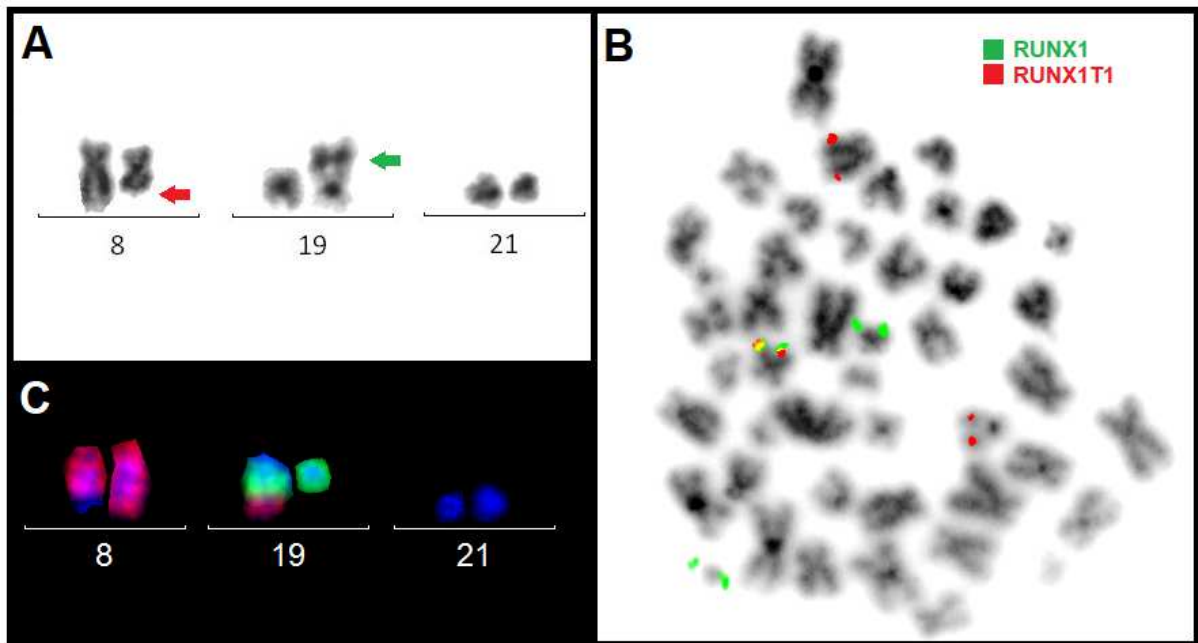


Figura 4.8. Caracterização citogenético-molecular da Paciente 22, em: **A)** Cariótipo parcial por bandeamento G. A seta vermelha, indica a perda de parte de material cromossômico no cromossomo 8, e a seta verde indica ganho de material cromossômico no cromossomo 19. **B)** Ensaio de FISH com a sonda AML1(sinal verde)-ETO(sinal vermelho) demonstrando o envolvimento dos cromossomos 8, 19 e 21 no rearranjo. **C)** Ensaio de FISH com sondas WCP caracterizando o rearranjo. WCP – *Whole Chromosome Painting*.

4.3.5. *t(8;21)* associada a outras anomalias cromossômicas

Pela técnica de banda G, a amostra do paciente 11 apresentou 3 anormalidades adicionais, além da recorrente *t(8;21)*, caracterizando o cariótipo complexo: 45,X,-Y,del(2)(q33),*t(8;21)(q22;q22)*,del(9)(q22), em 13 metáfases das 20 analisadas (Fig. 4.9 A). Neste caso, complementarmente, a aplicação da técnica de FISH com a sonda LSI AML1-ETO *dual color, dual fusion* (Vysis®/Abbott®), confirmou a fusão *RUNX1-RUNX1T1* (Fig. 4.9 B).

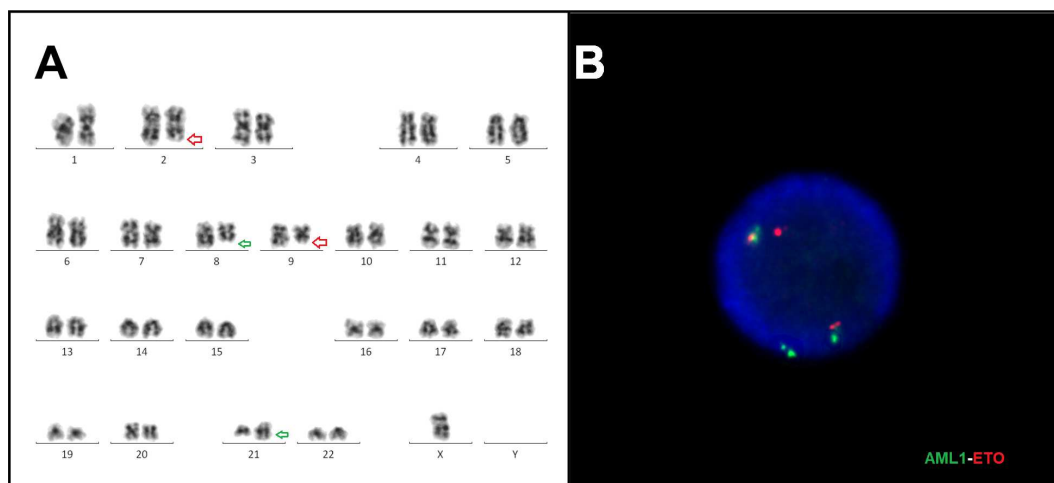


Figura 4.9. Caracterização citogenético-molecular do Paciente 11, em: **A)** Cariótipo por bandeamento G. As setas verdes demonstram a t(8;21), e as setas vermelhas apontam deleções nos cromossomos 2 e 9. **B)** Exame de FISH com aplicação da sonda LSI AML1-ETO *dual color, dual fusion*, indicando a fusão *RUNX1-RUNX1T1*, como representado pela sobreposição dos sinais verde e vermelho.

4.3.6. *inv(16)* associada a alterações numéricas

A análise por bandeamento G do paciente 2 apresentou o cariótipo: 46,XY,inv(16)(p13;q22),+19,-22 em 18 das 22 metáfases analisadas (Fig. 4.10 A), caracterizando-o como um cariótipo complexo. Através da técnica de MCB aplicada nos cromossomos 16, 19 e 22, e utilizando complementarmente sondas WCP para os cromossomos 19 e 22, além de uma sonda centromérica e uma subtelomérica para o cromossomo 22, foi possível identificar a inversão do 16 e o 22 dicêntrico. O cariótipo foi definido como: 46,XY,inv(16)(p13;q22),dic(22)(qter->p10::p10->qter) (Fig. 4.10 B).

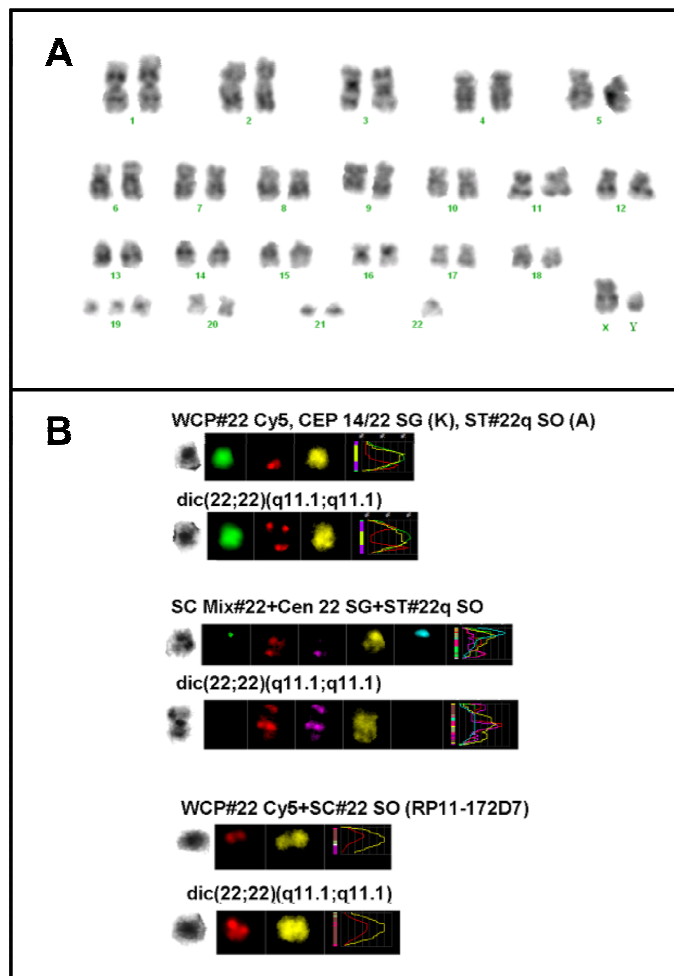


Figura 4.10. Caracterização citogenético-molecular do Paciente 2, em: **A)** Bandeamento G, mostrando a *inv(16)*, +19 e -22. **B)** Exame de FISH com sondas WCP, CEP e Subtel, mostrando o cromossomo 22 dicêntrico. WCP – *Whole Chromosome Painting*, CEP – *Centromeric Probe*, ST – *Subtelomeric Probe*, dic – dicêntrico, q – braço cromossômico longo, # – número.

4.3.7. *inv(16)* associada a alterações estruturais

A paciente 17 apresentou o cariótipo inconclusivo 46,XX,der(7)t(7;?), inv(16)(p13;q22), em 18 das 20 metáfases analisadas através da técnica de bandeamento G (Fig. 4.11 A). A análise de FISH com as sondas CEP7, e da região 7q31, confirmaram uma deleção no braço longo do cromossomo 7 (Fig. 4.11 B). Uma análise de FISH complementar com a sonda LSI *dual color, break-apart* para o gene *CBFB* (Vysis®/Abbott®) mostrou a inversão do cromossomo 16 (Fig. 4.11 C). Com a caracterização através de FISH com sondas WCP para os cromossomos 7 e 13, e de MCB para os cromossomos 3 e 7 (Fig. 4.11 D-E), o cariótipo final foi definido como: 46,XX,der(7)t(7;13)(q22;q31),inv(16)(p13;q22).

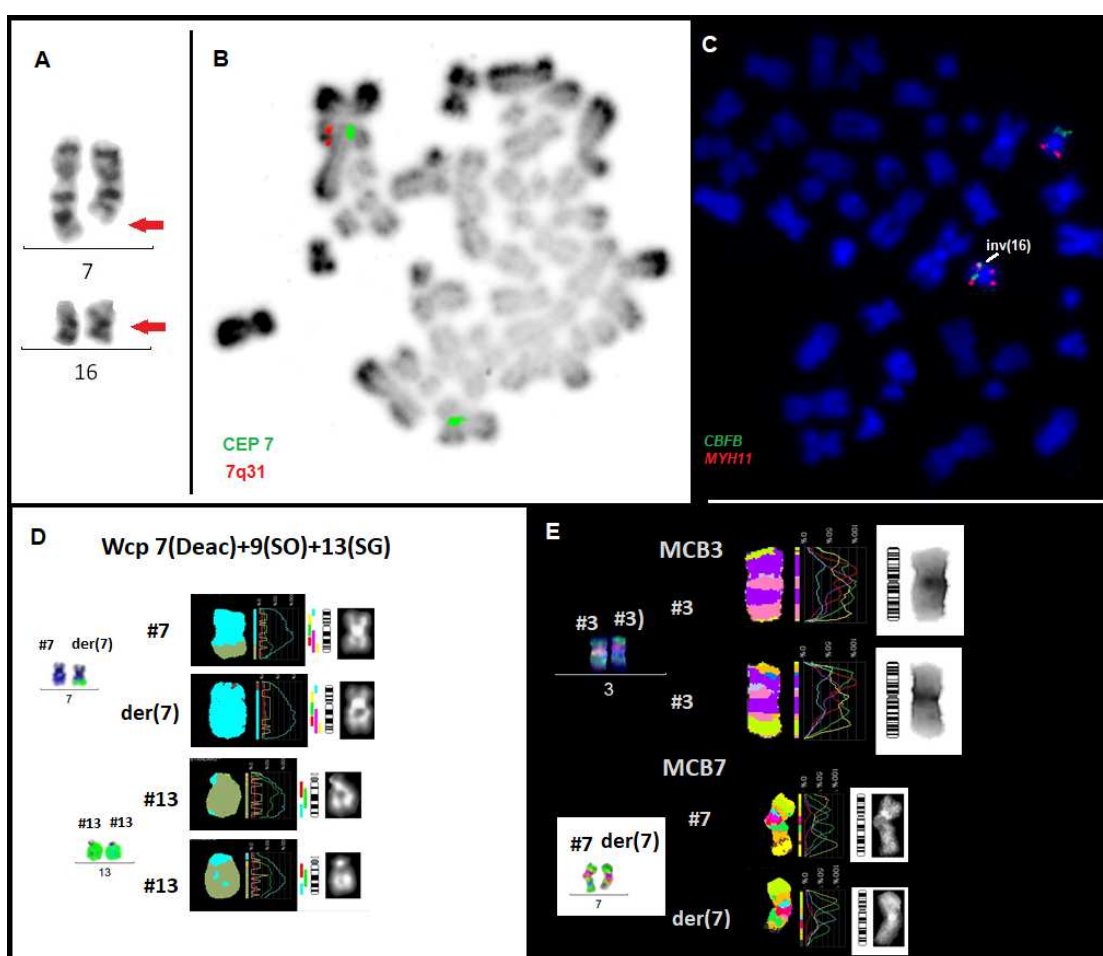


Figura 4.11. Caracterização citogenético-molecular da Paciente 17, em: **A)** Cariótipo parcial por bandeamento G. As setas vermelhas indicam uma deleção no cromossomo 7 e um padrão de bandas alterado no cromossomo 16. **B)** Exame de FISH com a sonda centromérica e da região q31 do cromossomo 7, confirmando uma del(7q). **C)** Exame de FISH com a sonda LSI *dual color, break-apart* para o gene *CBFB* ilustrando a inversão do cromossomo 16. **D)** Exame de FISH com sondas WCP revelando uma translocação entre os cromossomos 7 e 13. **E)** Ensaio de MCB mostrando o cromossomo 7 derivativo e ambos os cromossomos 3 normais. MCB – *Multicolor Chromosome Banding*, WCP – *Whole Chromosome Painting*, CEP – *Centromeric Probe*, ST – *Subtelomeric Probe*, der – cromossomo derivativo, q – braço cromossômico longo.

4.3.8. del(16)

A análise por bandeamento G da amostra da paciente 6, apresentou o cariótipo inconclusivo 46,XX,del(16)(q2?), em 8 das 20 metáfases analisadas (Fig. 4.12 A). Através do experimento por FISH, utilizando a sonda LSI *dual color, break-apart* para o gene *CBFβ* (Vysis®/Abbott®), foi revelada a perda de um dos sinais, mostrando uma deleção em uma das cópias do gene *CBFβ* (Fig. 4.12 B). A técnica de MCB foi aplicada para ambos os cromossomos 16, demonstrando uma deleção no braço longo de um dos cromossomos 16 e uma inversão em seu homólogo. O cariótipo final foi definido como: 46,XX,inv(16)(p13;q22),del(16)(q22) (Fig. 4.12 B-C).

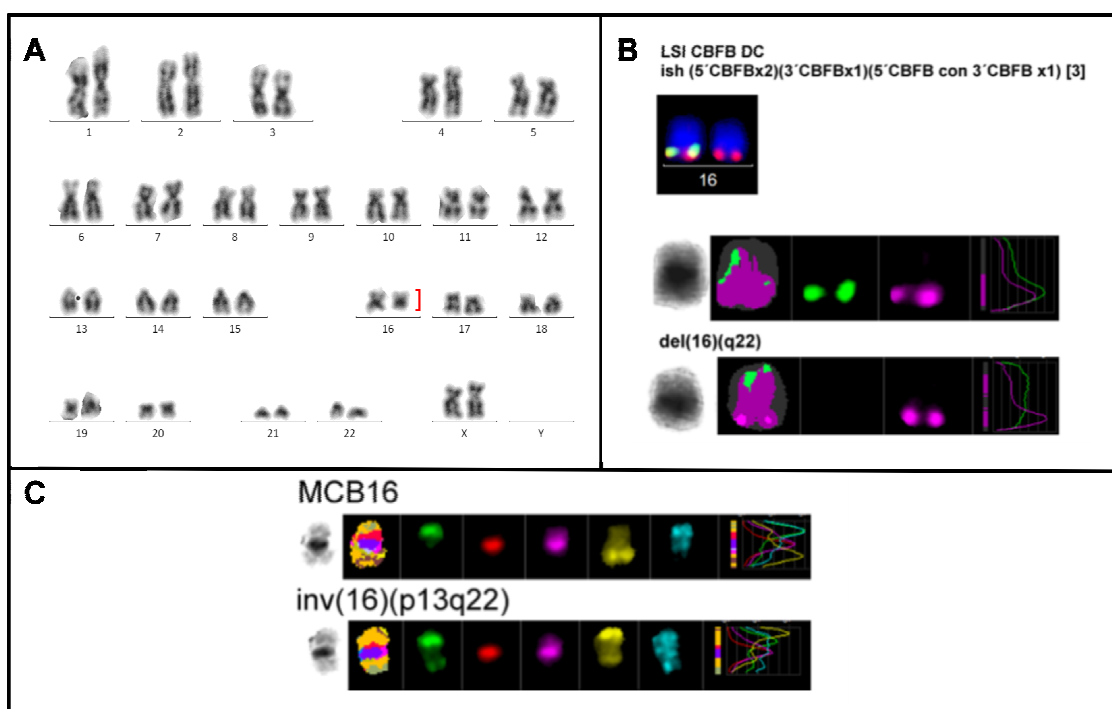


Figura 4.12. Caracterização citogenético-molecular da Paciente 6, em: **A)** Cariótipo por bandeamento G. O colchete em vermelho indica um cromossomo 16 menor. **B)** Ensaio de FISH com a sonda LSI *dual color, break-apart* para o gene *CBFβ*, e com sondas PCP para o cromossomo 16, ilustrando a perda de parte de uma das cópias do gene *CBFβ*. **C)** Ensaio de MCB demonstrando a *inv(16)(p13;q22)*. LSI – lócus específico, MCB – *Multicolor Chromosome Banding*, der – derivativo, p – braço cromossômico curto, q – braço cromossômico longo, *inv* – inversão.

4.3.9. t(16;21)

A paciente 9 apresentou um cariótipo inconclusivo na análise por bandeamento G: 47,XX,der(2)t(2;?)(q2?;?),t(3;13)(q13;p11),add(5)(q35),t(16;21)(p11;q22), em 14 das 20 metáfases analisadas (Fig. 4.13 A). A análise por FISH através da aplicação da sonda LSI *AML1-ETO dual color, dual fusion* (Vysis®/Abbott®) revelou que havia material adicional no cromossomo 21 (Fig. 4.13 B). Complementarmente, com a utilização da sonda LSI *dual color, break-apart* para o gene *CBFβ* (Vysis®/Abbott®), foi possível descartar o envolvimento do gene *CBFβ*

no rearranjo (Fig. 4.13 C). Através da abordagem por M-FISH, MCB, e FISH complementar utilizando sondas WCP para os cromossomos 2, 5, 3, 13, 16 e 21, foi possível caracterizar o cariótipo final como: 46,XX,der(2)t(2;3)(q2?;?),t(3;13)(q13;p11),der(5)t(3;5)(?;q35),t(16;21)(p11;q22) (Fig. 4.13 D).

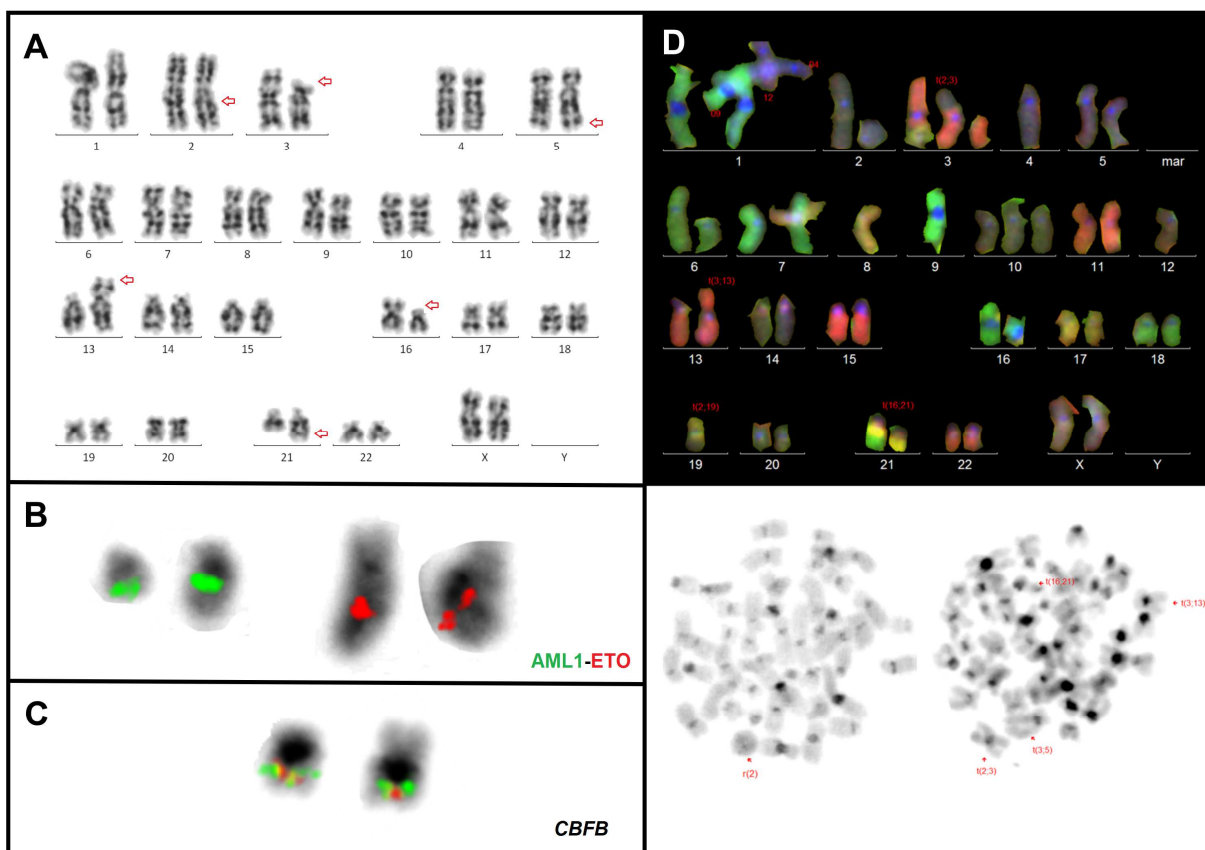


Figura 4.13. Caracterização citogenético-molecular da Paciente 9, em: **A)** Cariótipo por bandeamento G. As setas vermelhas mostram as anormalidades presentes no cariótipo 47,XX,der(2)t(2;?) (q2?;?),t(3;13)(q13;p11),add(5)(q35),t(16;21)(p11;q22). **B)** Exame de FISH com a sonda AML1-ETO mostrando material adicional no cromossomo 21. **C)** Exame de FISH com a sonda para o gene *CBFβ* revelando que este gene não estava rearranjado. **D)** Ensaio de M-FISH, com seu respectivo contraste, revelando cada anormalidade no cariótipo. t – translocação.

4.4. Casos com anormalidades associadas a LPA

4.4.1. t(15;17) associada a inv(6)

O estudo por banda G, da amostra do paciente 7, possibilitou a caracterização do cariótipo complexo: 46,XY,-6,t(15;17)(q22;q21),+mar, em 21 das 23 metafases analisadas (Fig. 4.14 A). A análise por FISH confirmou a fusão gênica *PML/RARα* (Fig. 4.14 B). A aplicação das técnicas de MCB, e FISH com sondas confeccionadas a partir de BACs para o cromossomo 6, revelaram que o

cromossomo marcador era um cromossomo 6 derivativo, que apresentava duas aberrações cromossômicas. O cariótipo final foi caracterizado como:

46,XY,t(15;17)(q22;q21),inv(6)(p24;q15) [10] / 46,XY,t(15;17)(q22;q21),der(6)(6p21.3>6q16.1) [4] (Fig. 4.14 C-E).

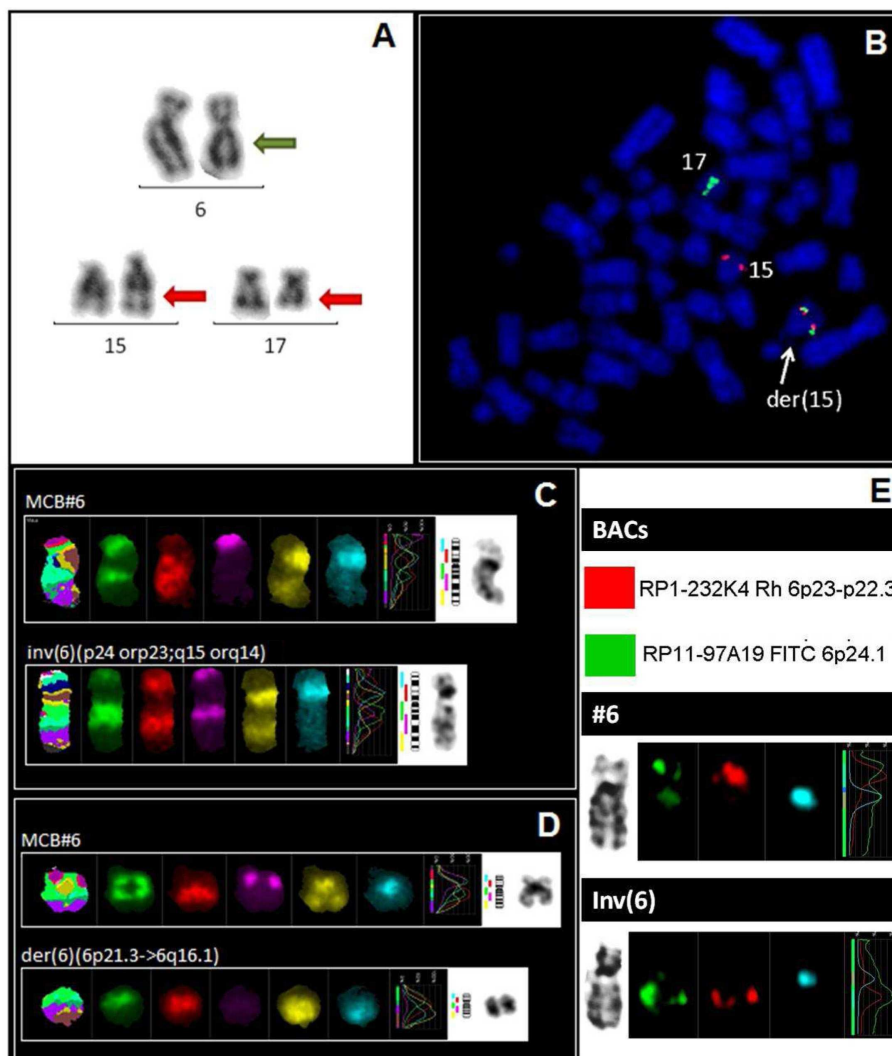


Figura 4.14. Caracterização citogenético-molecular do Paciente 7, em: **A)** Cariótipo parcial por bandeamento G. A seta verde mostra um cromossomo 6 anormal, e as setas vermelhas indicam a t(15;17). **B)** Exame de FISH confirmando a fusão *PML-RAR α* . **C)** Ensaio de MCB mostrando uma inversão no cromossomo 6. **D)** Ensaio de MCB para o cromossomo 6 homólogo, mostrando uma deleção e uma inversão. **E)** Ensaio de FISH com BACs demonstrando a inversão no cromossomo 6. # – número, der – derivativo, inv – inversão, del – deleção, p – braço cromossômico curto, q – braço cromossômico longo, MCB – *Multicolor Chromosome Banding*.

4.4.2. t(15;17) associada a three-way t(6;9;10)

Na análise por banda G, o cariótipo do paciente 20 foi determinado como 45,XY,-6,der(?4),del(10)(q?),t(15;17), em 20 metáfases analisadas (Fig. 4.15 A). A análise por FISH com a sonda LSI *PML-RAR α* , *dual color, dual fusion* (Vysis®/Abbott®), confirmou a fusão gênica *PML-RAR α* (Fig. 4.15 B). Através da

aplicação de FISH com sondas WCP, foi possível excluir o envolvimento do cromossomo 4 nas anormalidades deste caso, relevar uma monossomia do cromossomo 5, e o envolvimento dos cromossomos 6 e 10 (Fig. 4.15 C). Com a técnica de MCB foi possível identificar uma translocação do tipo *three-way* envolvendo os cromossomos 6, 9 e 10, além de um cromossomo dicêntrico críptico dic(6;9) (Fig. 4.15 D). O cariótipo final foi definido como: 45,XY,-5,dic(6;9) t(6;9;10)(9pter->q12::6p25-24->q23.3::9q13-q34.1::10q25.1>qter),der(10)t(6;9;10) (10pter->q24.3::9q34.2->qter),t(15;17)(q22;q21).

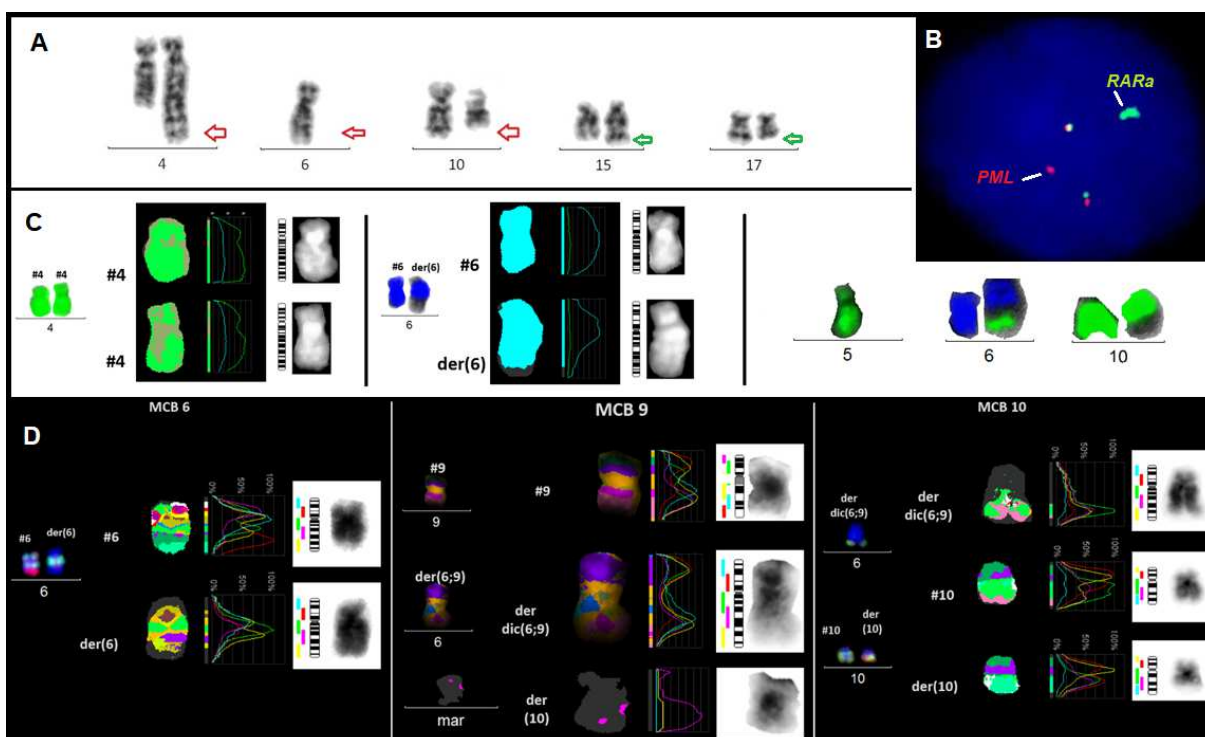


Figura 4.15. Caracterização citogenético-molecular do Paciente 20, em: **A)** Cariótipo parcial por bandeamento G. As setas verdes mostram a t(15;17) e as setas vermelhas indicam uma adição de material cromossômico no 4, monossomia do 6 e uma deleção no braço longo do 10. **B)** Exame de FISH confirmando a fusão *PML-RARα*. **C)** Ensaio de FISH com sondas WCP para os cromossomos 4, 5, 6 e 10. **D)** Ensaio de MCB para os cromossomos 6, 9 e 10. # – número, der – derivativo, dic – dicêntrico, mar – cromossomo marcador, MCB – *Multicolor Chromosome Banding*.

4.5. Casos com anormalidades envolvendo a região 11q23/r-KMT2A

4.5.1. r-KMT2A na t(6;11)

A paciente 14, na análise por banda G, apresentou em seu cariótipo o envolvimento das translocações t(6;11) e t(6;12), em 20 metáfases. Exames por FISH confirmaram r-KMT2A tanto em núcleos interfásicos quanto em metáfases (Fig. 4.16 A-B). Com a caracterização feita pela combinação das técnicas de FISH com

sondas WCP e MCB, para os cromossomos 6, 11 e 12 (Fig. 4.16 C-D), foi possível definir o cariótipo: 46,XX,der(6)t(6;11)(q27;q23),der(6)t(6;12)(p22;q23),der(11)t(6;11)(q27;q23),der(12)t(6;12)(p22;q23).

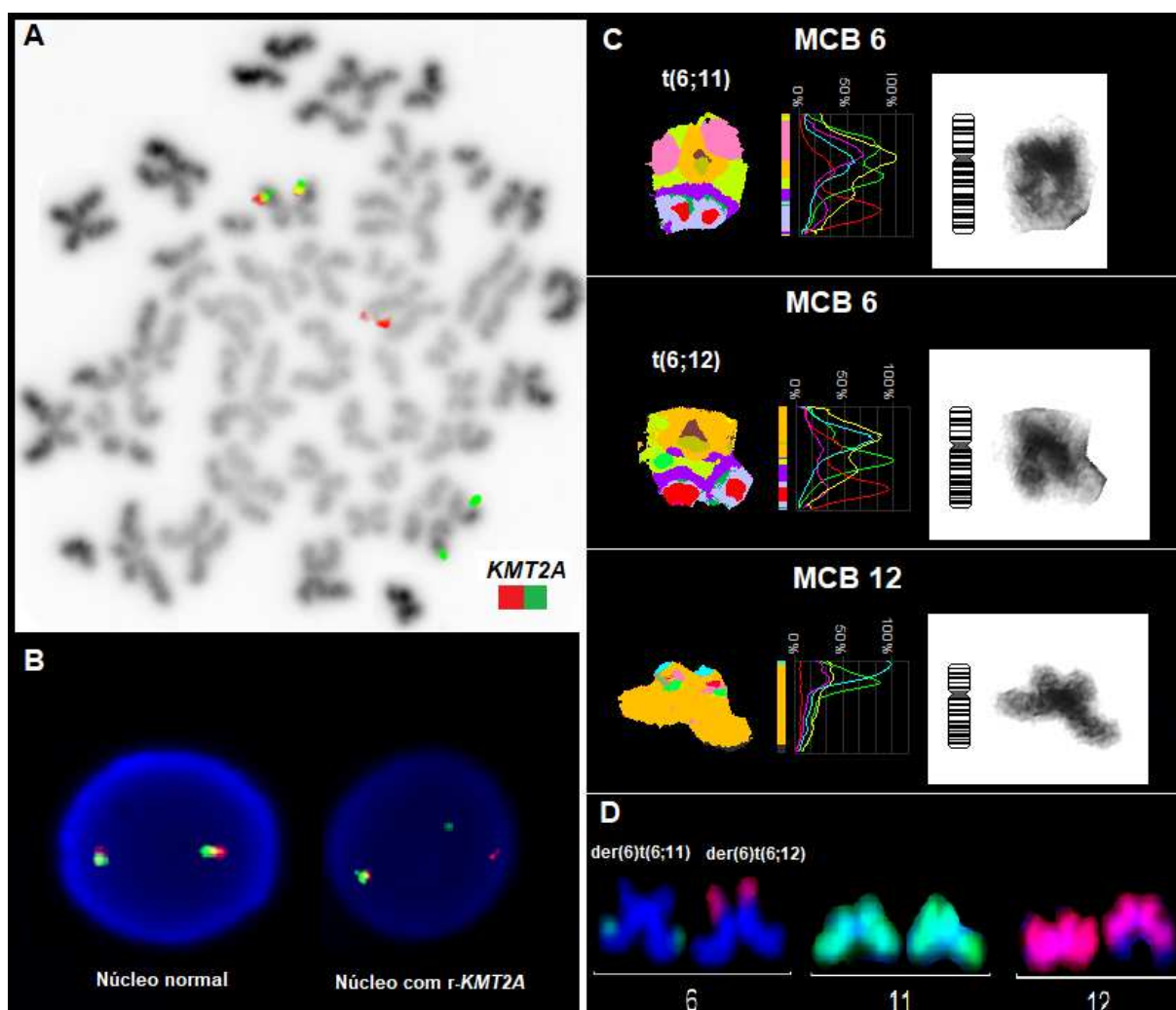


Figura 4.16. Caracterização citogenético-molecular da Paciente 14, em: **A)** Exame de FISH em metáfase com a sonda MLL *break-apart*, confirmando o r-KMT2A. **B)** Ensaio de FISH em núcleos interfásicos apresentando um núcleo normal (esquerda) e outro com r-KMT2A (direita). **C)** Ensaio de MCB para os cromossomos 6 e 12 confirmando as translocações t(6;11) e t(6;12). **D)** Ensaio de FISH com sondas WCP para os cromossomos 6, 11 e 12 revelando a origem e destino dos materiais cromossômicos rearranjados. MCB – *Multicolor Chromosome Banding*, der – cromossomo derivativo, t – translocação.

4.5.2. r-KMT2A na t(9;11)

No momento do diagnóstico, a técnica de banda G revelou um cariótipo hiperdiplóide com 53 cromossomos, em 15 das 17 metáfases analisadas, para a paciente 19. No ensaio por FISH, foram observados três sinais de fusão entre os genes *KMT2A* e *MLLT3* (Fig. 4.17 A). A combinação feita na análise citogenética molecular através das técnicas de *Multiplex-FISH* (Fig. 4.17 B), PCP para a região 9q (Fig. 4.17 C), e a abordagem por MCB (Fig. 4.17 D), definiu o cariótipo:

53,XX,+X,+6,t(9;11)(p21.3;q23.3),+der(9)t(9;11)(p21.3;q23.3),dup(13)(q31q34),+14,+19,+21,+22. Complementarmente, com uma sonda LSI para o gene *GAS6*, região 13q34, foi confirmada uma duplicação da banda 13q34, e foram revelados dois sinais do gene *GAS6* no cromossomo 13 derivativo (Fig. 4.17 E) (Anexo III).

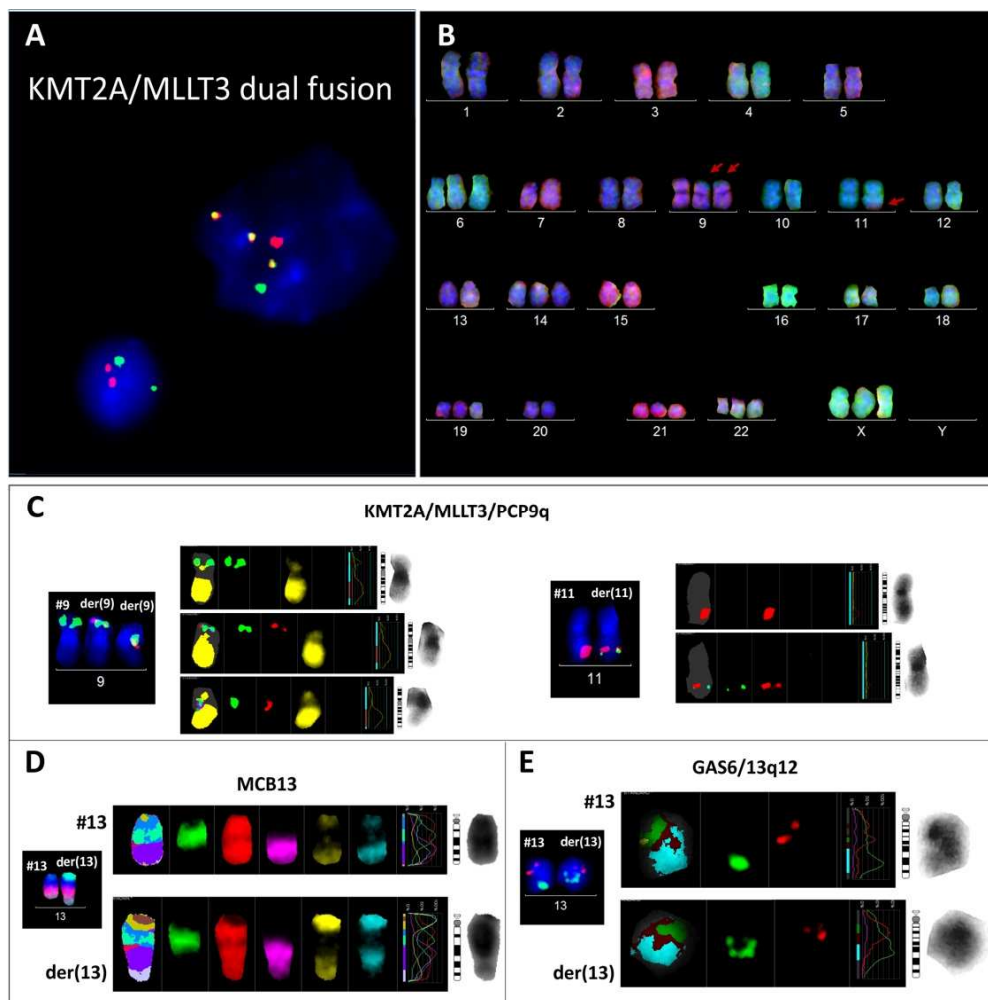


Figura 4.17. Caracterização citogenético-molecular da Paciente 19, em: **A)** Exame de FISH com uma sonda comercial KMT2A-MLLT3 *dual color, dual fusion*, mostrando sinais normais do gene *KMT2A* (vermelho) e *MLLT3* (verde), além de três sinais de fusão (amarelo). **B)** Ensaio de *Multiplex-FISH* revelando trissomias clonais dos cromossomos 6, 9, 14, 19, 21, 22 e X, além da presença de anormalidades estruturais em duas cópias do cromossomo 9 e em um cromossomo 11, setas vermelhas. **C)** Análise por FISH dos cromossomos 9 e 11, com a combinação de sondas PCP 9q (amarelo) e LSI KMT2A-MLLT3 *dual color, dual fusion*, mostrando sinais normais de *KMT2A* (vermelho), *MLLT3* (verde), além de uma cópia extra da fusão *KMT2A-MLLT3* (vermelho/verde). **D)** Ensaio de MCB para o cromossomo 13 revelando uma duplicação da região 13q31-q34. **E)** Análise por FISH para o gene *GAS6* (sinal verde) com uma sonda controle subcentromérica 13q12 (sinal vermelho). A análise mostra duas cópias do *GAS6*, presentes no der(13). # – número, MCB – *Multicolor Chromosome Banding*, PCP – *Partial Chromosome Painting*, der – cromossomo derivativo, q – braço cromossômico longo.

4.5.3. *r-KMT2A* na *t(10;11)*

Através do bandeamento G, a amostra do paciente 8 revelou o cariótipo: 46,XY,del(10)(p12) (Fig. 4.18 A) em 18 das 20 metáfases analisadas. A aplicação da

técnica de FISH, com a sonda LSI *dual color, break-apart* para o gene *KMT2A* (Vysis®/Abbott®), demonstrou a inserção de um material cromossômico desconhecido na região do gene *KMT2A* (Fig. 4.18 B). Em outro ensaio por FISH, foi observada a inserção de um material da região 10p, na região 11q23 (Fig. 4.18 C); confirmando a $t(10;11)(p12;q23)$ (Fig. 4.18 D). Adicionalmente, com a abordagem feita pela técnica de MCB, foi demonstrada uma inversão pericêntrica no cromossomo derivativo 10 (Fig. 4.18 E). O cariótipo final foi caracterizado como: $46,XY,der(10)(11qter \rightarrow 11q23.3::10q11.2 \rightarrow 10p12::10q11.2 \rightarrow 10qter),der(11)(11pter \rightarrow 11q23.3::10p12 \rightarrow 10p12::11q23.3 \rightarrow 11q23.3::10p12 \rightarrow 10pter)$.

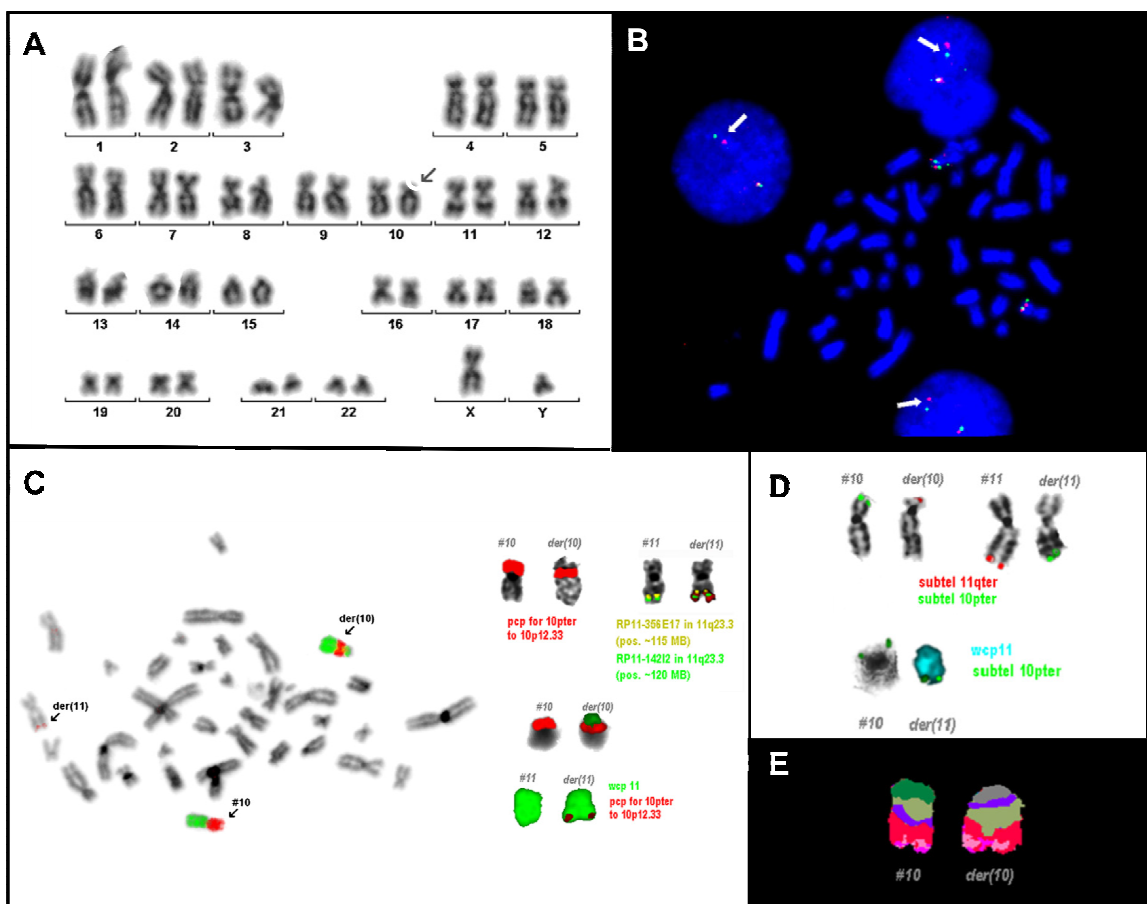


Figura 4.18. Caracterização citogenético-molecular do Paciente 8, em: **A)** Carótipo por bandejamento G, mostrando uma deleção no cromossomo 10 (seta). **B)** Exame de FISH em núcleos interfásicos, com a aplicação da sonda MLL *break-apart*, mostrando uma pequena inserção entre os sinais (verde e vermelho) do gene *KMT2A*. **C)** Ensaio de FISH, em metáfases, com sondas WCP e PCP, mostrando a inserção de um material cromossômico da região 10p, na região 11q23. **D)** Ensaio de FISH com sondas subtel. para os cromossomos 10 e 11, e sonda WCP para o cromossomo 11, revelando a $t(10;11)(p12;q23)$. **E)** Ensaio de MCB mostrando uma inversão pericêntrica no cromossomo 10 derivativo. # – número, der – derivativo, p – braço cromossômico curto, q – braço cromossômico longo, ter – região cromossômica terminal, Subtel – sonda subtelomérica, PCP – *Partial Chromosome Painting*, WCP – *Whole Chromosome Painting*.

4.5.4. Envolvimento dos cromossomos 1, 8 e 11

A análise citogenética por bandeamento G apresentou uma translocação complexa $t(1;8;11)(q21;p21;q23)$, em 25 das 30 metáfases analisadas, no caso 4 (Fig. 4.19 A). A aplicação da técnica de FISH com a utilização da sonda LSI MLL *dual color, break-apart* para o gene *KMT2A* (Vysis®/Abbott®), mostrou um sinal sobreposto verde e vermelho no cromossomo 11 normal, e no braço longo do cromossomo 11 derivativo, os sinais estavam separados com material cromossômico extra entre eles (Fig. 4.19 B). A análise por MCB revelou o cariótipo: $46,XY,der(1)t(1;8)(q21;p21),der(8)t(1;8)(q31;p21),der(11)ins(11;1)(q23;q21q31)$ (Fig. 4.19 C). Na recaída, o paciente apresentou o cariótipo: $46,XY,t(11;19)(q23;p13)$ em 23 metáfases analisadas.

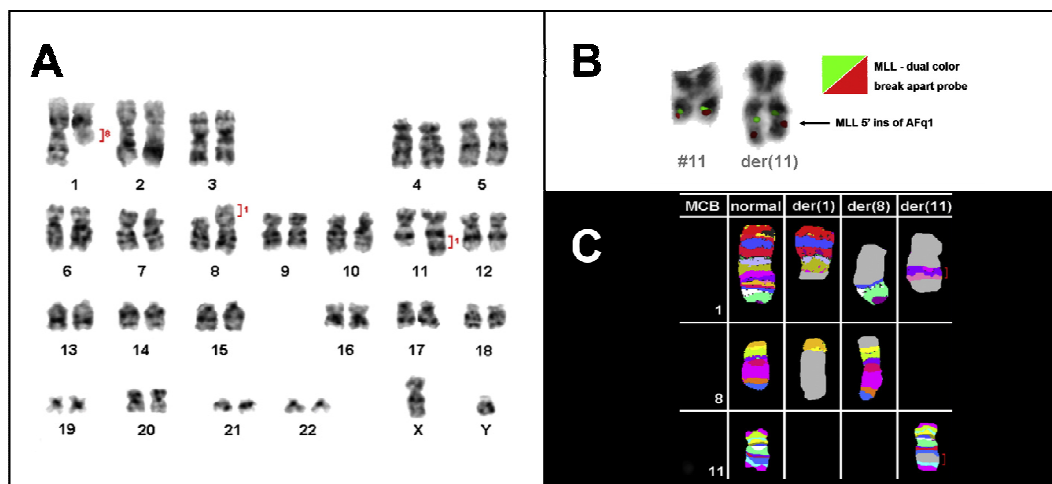


Figura 4.19. Caracterização citogenético-molecular do Paciente 4, em: **A)** Cariótipo por bandeamento G. Os colchetes em vermelho demonstram as regiões cromossômicas envolvidas no rearranjo. **B)** Exame de FISH com a sonda LSI MLL *dual color, break-apart*, para o gene *KMT2A*, demonstrando um padrão diferente de sinais para o cromossomo 11 normal e para o 11 derivativo. **C)** Painel de MCB para os cromossomos 1, 8 e 11. der – derivativo, # – número, MCB – *Multicolor Chromosome Banding*.

4.5.5. Envolvimento dos cromossomos 10, 11 e 14

O estudo por bandeamento G da paciente 16 apresentou o cariótipo complexo $44,X,-X,-7,+8,-20$, em 23 metáfases (Fig. 4.20 A). Esta amostra foi então selecionada para a caracterização molecular. Através da abordagem feita com sondas de MCB para os cromossomos 10, 11 e 14, foi possível identificar uma translocação do tipo *three-way* envolvendo estes cromossomos, além de uma inversão no 14 (Fig. 4.20 B). O cariótipo final foi então definido como: $46,XX,der(10)t(10;11)(10pter->10p12.31::11q23.3->11q23.3::10p12.31->10q11.23::14q24.2->14qter),der(11)t(11;14)(10qter->10q11.23::11p15.3->11q23.3::10p12.31->10p12.31::11q23.3->11qter),der(14)t(10;14)(q11.23;q24.2),inv(14)(q32;q11)$.

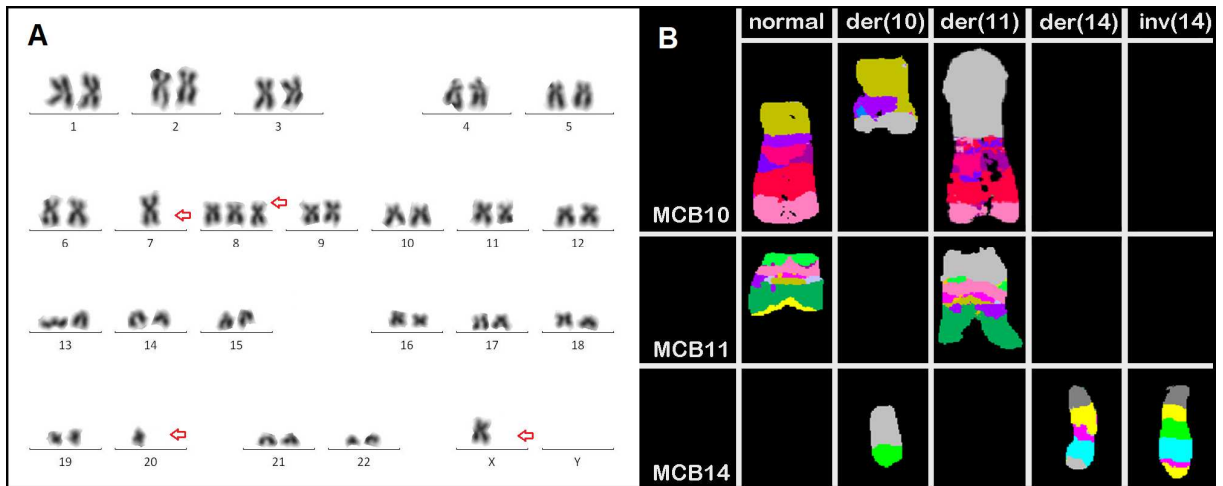


Figura 4.20. Caracterização citogenético-molecular da Paciente 16, em: **A)** Cariótipo por bandeamento G. As setas vermelhas apontam a trissomia do cromossomo 8 e as monossomias do 7, 20 e X. **B)** Paineis de MCB dos cromossomos 10, 11 e 14. der – cromossomo derivativo, inv – inversão, MCB – *Multicolor Chromosome Banding*.

4.5.6. Envolvimento dos cromossomos 11, 16 e 19

No bandeamento G, o paciente 21 apresentou o cariótipo inconclusivo: 48,XY,del(11q?),t(11;19),?inv(16), em 21 das 23 metafases analisadas (Fig. 4.21 A). Um ensaio de FISH com a sonda *MLL break-apart* (Vysis®/Abbott®) confirmou o envolvimento do cromossomo 11, mostrando o r-*KMT2A* (Fig. 4.21 B). A abordagem citogenético-molecular, feita pela combinação de FISH com sondas WCP e MCB para os cromossomos 11, 16 e 19, revelou uma translocação do tipo *three-way* entre estes cromossomos, além de um isocromossomo iso(19)(16;19) (Fig. 4.21 C). O cariótipo final foi caracterizado como: 47,XY,t(11;16;19)(q23.3;p11.2;p13.3),+der(19)(16pter->16p11.2::19p13.3->19q11::19q11->19p13.3::16p11.2->16pter) (Anexo V).

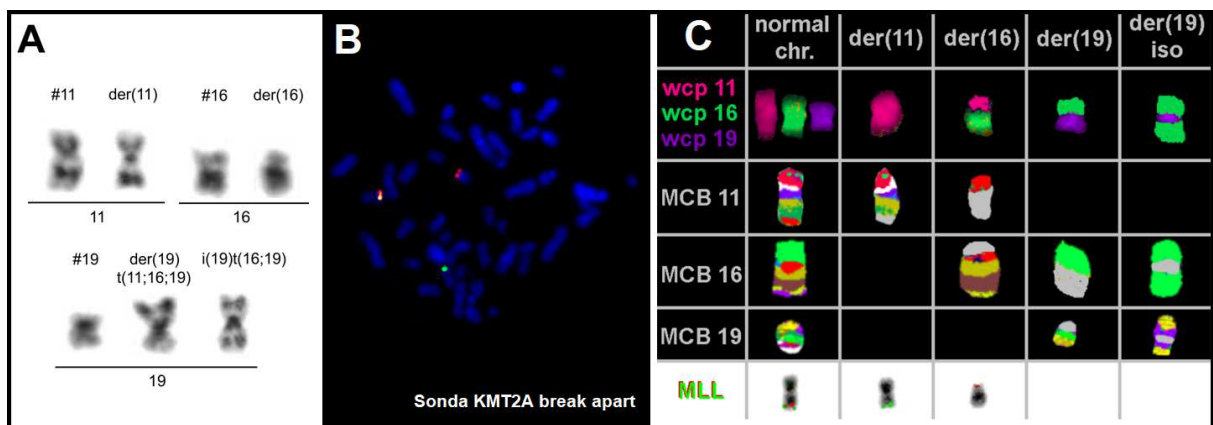


Figura 4.21. Caracterização citogenético-molecular do Paciente 21, em: **A)** Cariótipo parcial por bandeamento G, apresentando um rearranjo complexo entre os cromossomos derivativos 11, 16, 19, e um isocromossomo 19. **B)** Exame de FISH com a sonda *MLL break-apart* mostrando o r-*KMT2A*. **C)** Paineis de FISH (*MLL*), WCP e MCB para os cromossomos 11, 16 e 19, revelando a translocação t(11;16;19) e o i(19). mar – cromossomo marcador, MCB – *Multicolor Chromosome Banding*, # – número, der – cromossomo derivativo, t – translocação, i – isocromossomo.

4.6. Envolvimento do cromossomo 11 sem *r-KMT2A*

O caso 1, por bandeamento G, demonstrou em 11 das 20 metáfases analisadas o cariótipo inconclusivo 46,XY,del(9)(q31),t(?X;?11)(p22;q22) (Fig. 4.22 A). Os estudos citogenéticos moleculares realizados através da técnica de MCB, para os cromossomos 9 e 11, possibilitaram a caracterização do cariótipo, que foi definido como: 46,XY,del(9)(q12;q31),del(11)(q13 or q14) (Fig. 4.22 B).

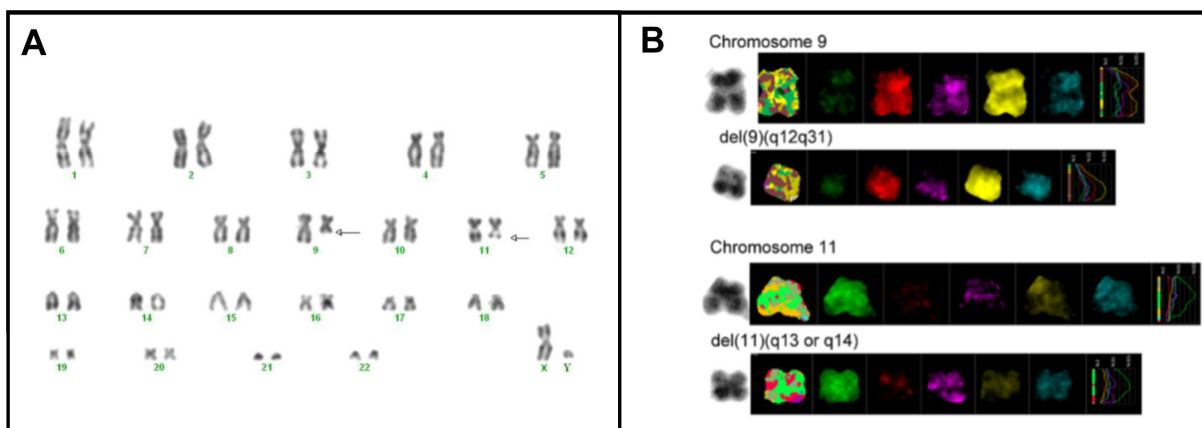


Figura 4.22. Caracterização citogenético-molecular do Paciente 1, em: **A)** Cariótipo por bandeamento G. As setas demonstram perda de parte de material nos cromossomos 9 e 11. **B)** Ensaio de MCB para os cromossomos 9 e 11, revelando as anormalidades del(9)(q12q31) e del(11)(q13orq14). del – deleção, q – braço cromossômico longo.

4.7. Envolvimento dos cromossomos 5 e/ou 7

4.7.1. *del(5q)*

O estudo por bandeamento G do caso 13 revelou o cariótipo complexo e inconclusivo 46,XY,der(2)?t(2;15),del(5),der(14)?add(14)(q23), em 15 de 20 metáfases analisadas (Fig. 4.23 A-C). A aplicação do FISH com as sondas LSI *EGR1* (sinal vermelho) / D5S23 (5q31), e D5S721 (sinal verde) (5p15) (Vysis®/Abbott®), mostrou uma deleção heterozigótica do *EGR1* (Fig. 4.23 D). Um ensaio de FISH complementar, com a sonda LSI IGH (Vysis®/Abbott®), sugeriu que houve uma translocação entre os cromossomos 2 e 14 (Fig. 4.23 E). Através da aplicação de sondas WCP para os cromossomos 2, 14 e 15, foram observadas as translocações t(2;14) e t(2;15) (Fig. 4.23 F). A técnica de MCB caracterizou o rearranjo complexo entre os cromossomos 2, 14 e 15 (Fig. 4.23 G). O cariótipo final foi caracterizado como: 46,XY,t(2;14)(q23.1;q32.2),t(2;15)(p22.3;q21.1),del(5)(q22->qter).

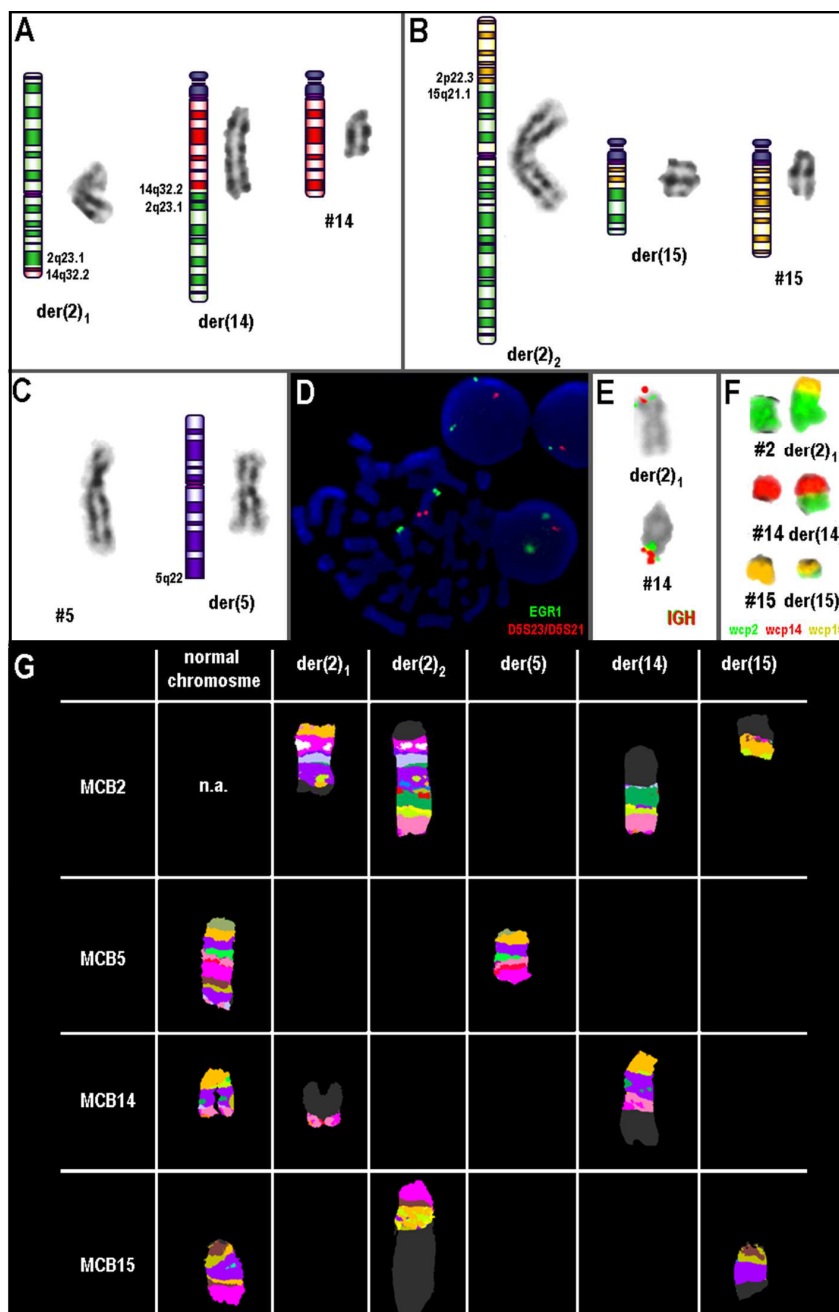


Figura 4.23. Caracterização citogenético-molecular do Paciente 13, em: **A-C)** Cariótipo parcial por bandeamento G e ideogramas, mostrando as t(2;14), t(2;15), e del(5)(q22). **D)** Exame de FISH em metáfase e núcleos interfásicos, com as sondas LSI 5p15 / 5q31 (EGR1), mostrando uma deleção na região 5q31 (sinal vermelho). **E)** Ensaio de FISH em cariótipo parcial com a sonda LSI IGH, revelando a t(2;14). **F)** Ensaio de FISH com WCP para cromossomo 2 (verde), 14 (vermelho) e 15 (amarelo) mostrando a translocação entre os cromossomos 2, 14 e 15. **G)** Painel de MCB para os cromossomos 2, 5, 14 e 15. p – braço cromossômico curto, q – braço cromossômico longo, der – cromossomo derivativo, # – número, MCB – *Multicolor Chromosome Banding*.

4.7.2. t(3;7)

Ao diagnóstico clínico da paciente 15, o bandeamento G definiu o cariótipo inconclusivo 46,XX,del(7)(?q31), em 50 metáfases (Fig. 4.24 A). Um ensaio de FISH com sondas Subtel7q e WCP7 confirmou uma perda de material cromossômico no 7 (Fig. 4.24 B), e sugeriu que uma porção cromossômica de origem desconhecida

estava presente neste mesmo cromossomo derivativo. A técnica de M-FISH revelou uma duplicação no cromossomo 3 e a translocação críptica entre os cromossomos 3 e 7 (Fig. 4.24 C). A técnica de MCB foi aplicada, refinando a alteração cromossômica críptica e complexa entre os cromossomos 3 e 7 (Fig. 4.24 D). O cariótipo final foi 46,XX,der(3)t(3;7)(q26;q21.1~21.2),del(7)(q21.1~21.2) (Anexo IV).

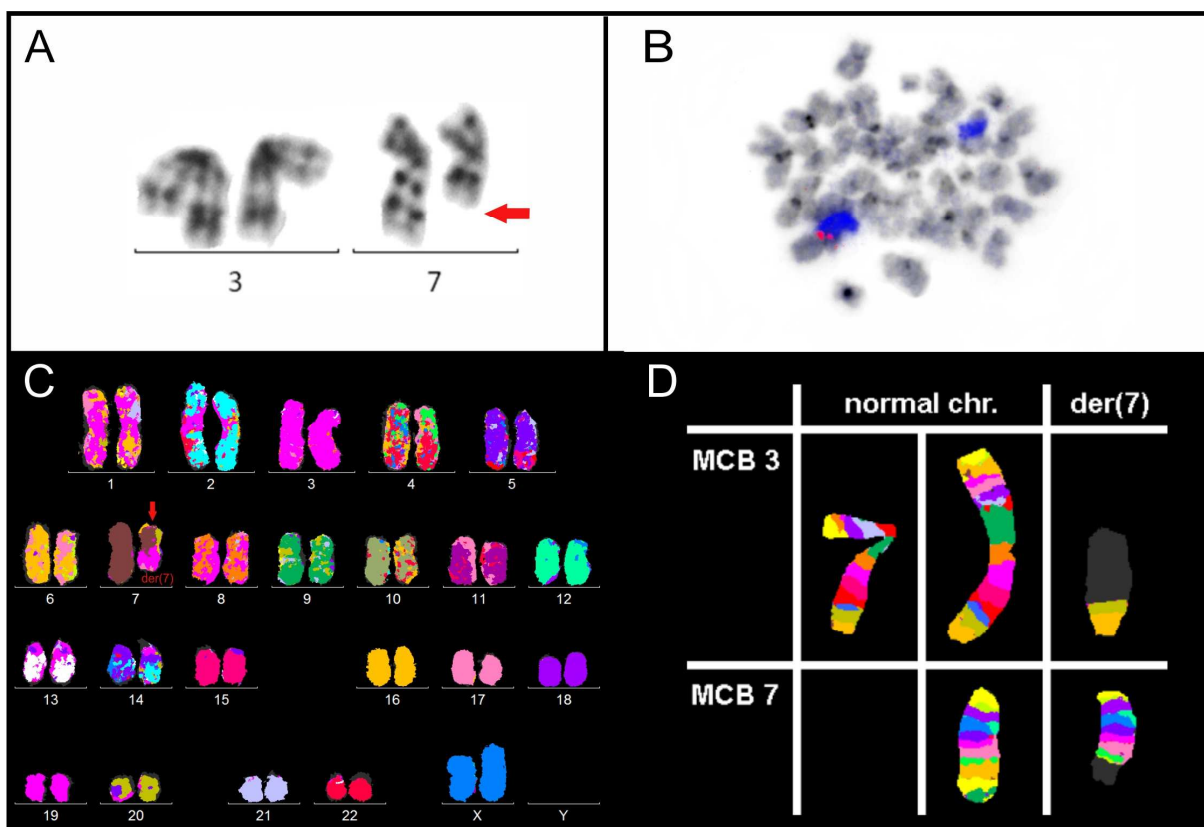


Figura 4.24. Caracterização citogenético-molecular da Paciente 15, em: **A)** Cariótipo parcial por bandeamento G. A seta vermelha mostra uma deleção no braço longo do cromossomo 7. **B)** Exame de FISH com sondas Subtel7q (sinal vermelho) e WCP7 (azul), mostrando perda de material cromossômico no 7 derivativo. **C)** Cariótipo por M-FISH mostrando a translocação t(3;7). A seta vermelha aponta o der(7). **D)** Painel de MCB para os cromossomos 3 e 7, mostrando o der(7) com material translocado do cromossomo 3. MCB – *Multicolor Chromosome Banding*, der – cromossomo derivativo.

4.7.3. t(5;19) e t(7;13)

A análise por bandeamento G da paciente 3 apresentou o cariótipo complexo e inconclusivo 44,XX,?der(4),-5,-7,-10,?dic(13),-15,+2 mar, em 18 das 20 metáfases analisadas (Fig. 4.25 A). A técnica de FISH, com a sonda subtelomérica 7q, revelou uma deleção na região 7q (Fig. 4.25 B). Adicionalmente, foram realizados estudos por M-FISH e MCB para os cromossomos 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 17, 18, 19, 20 e 21. O cariótipo final foi caracterizado como: 45,XX,der(5)t(5;19)(q13.3;q12),t(6;18;17)(q24.3;q21;q23.2),der(7)t(7;13)(p11.2;q12),der(10)(7qter->7q11.23::12q22->12q21.2

::10p14->10q21::12q12->12qter),der(12)(::p13->q12::),-15,del(19)(q12),der(20)
t(20;21)(p11.2;q11.2), der(21)t(12;21)(q22;q22) (Fig. 4.25 C-D).

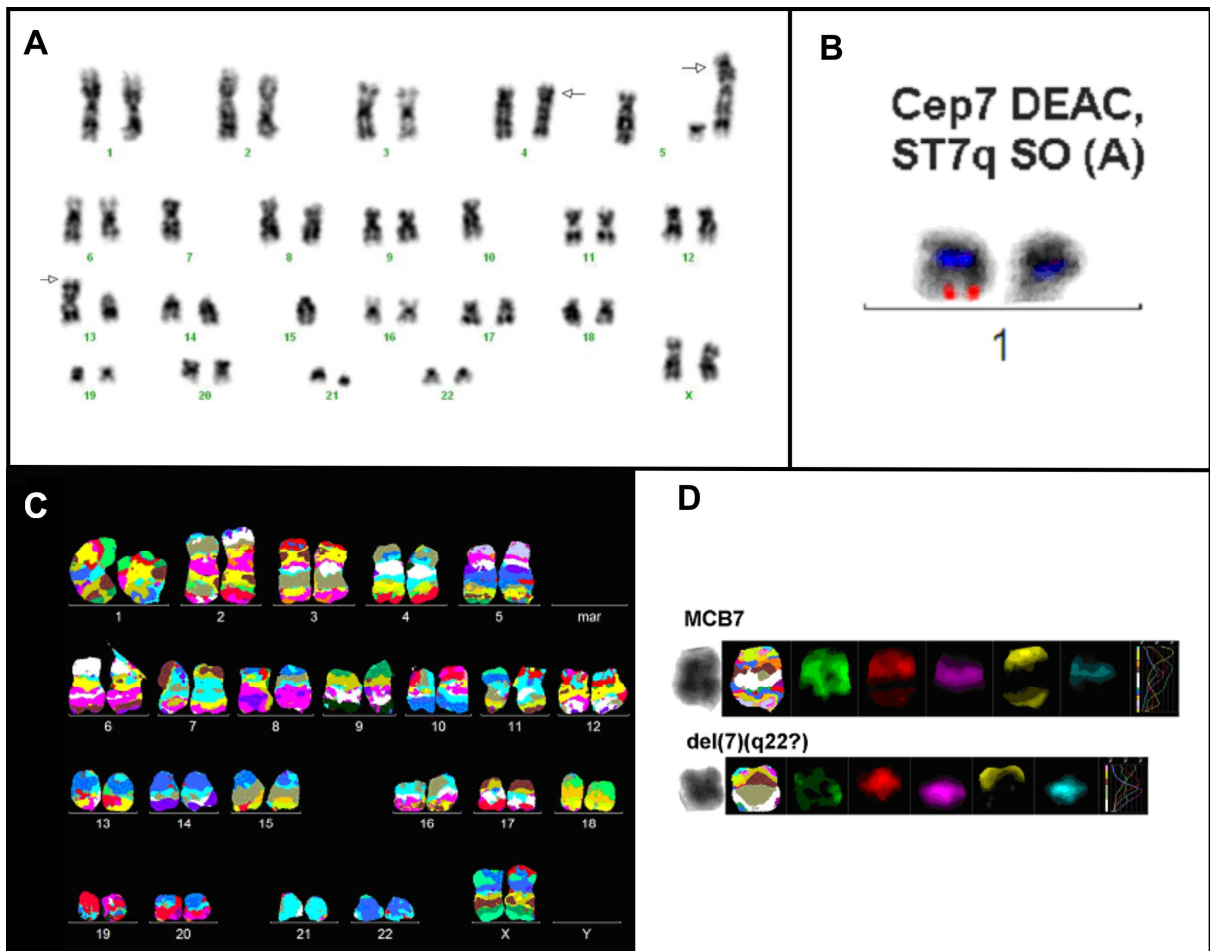


Figura 4.25. Caracterização citogenético-molecular da Paciente 3, em: **A)** Cariótipo por bandeamento G. Foi detectada a monossomia dos cromossomos 5, 7, 10 e 15. As setas indicam material cromossômico adicional nos cromossomos 4, 5 e 13. **B)** Exame de FISH com sondas CEP e subtel. para o cromossomo 7, mostrando a perda do sinal correspondente à região 7qter. **C)** Ensaio de mMCB, revelando a identidade e padrão de bandas de cada cromossomo no cariótipo. **D)** Ensaio de MCB para o cromossomo 7, caracterizando o ponto de quebra envolvido na deleção. CEP – sonda centromérica, ST – sonda subtelomérica, del – deleção, q – braço cromossômico longo, ter – região cromossômica terminal, mMCB e MCB – *Multicolor Chromosome Banding*.

4.8. Trissomias e outras anormalidades adicionais

O cariótipo da paciente 18 foi definido pelo bandeamento G como 49,XX,+8,+13,+21, em 20 metáfases analisadas. Entretanto, devido a uma pobre morfologia cromossômica, o material foi referido para caracterização citogenética molecular. Após a abordagem feita através da técnica de FISH utilizando sondas de WCP para os cromossomos 8, 13, 17, 19, 21 e 22 (Fig. 4.26), o cariótipo final foi redefinido como 49,XX,+8,+19,+21.

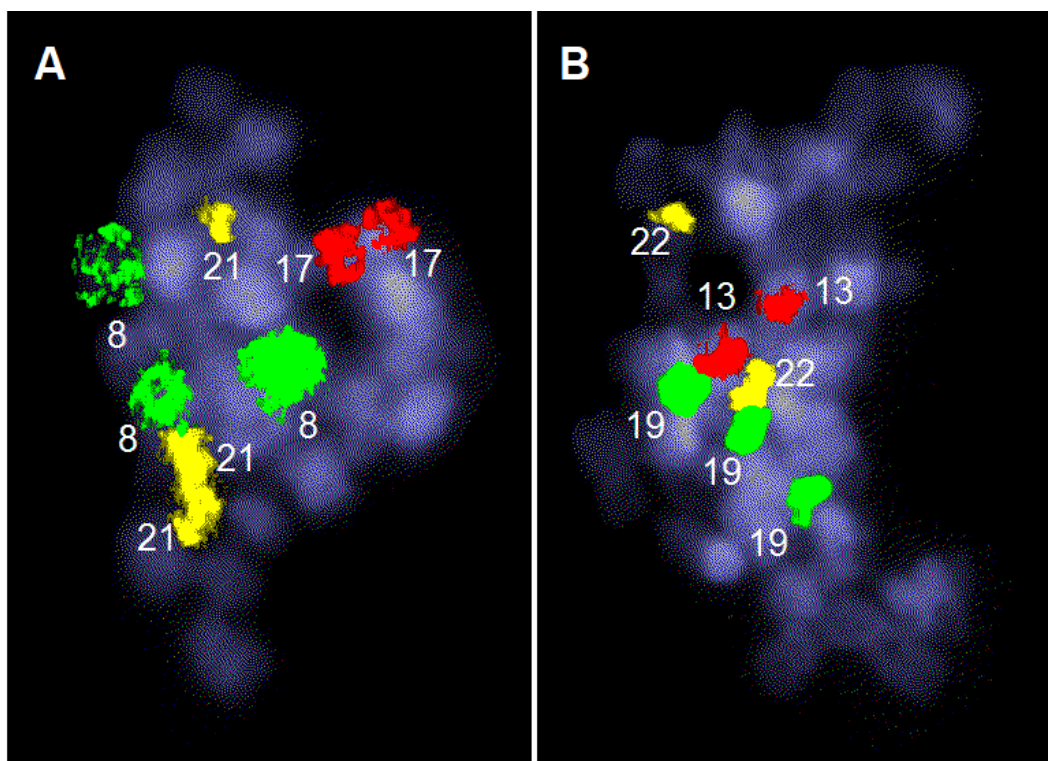


Figura 4.26. Caracterização citogenético-molecular da Paciente 18, em **A)** Ensaio de FISH com sondas WCP para os cromossomos 8 (verde), 17 (vermelho) e 21 (amarelo), mostrando trissomias dos cromossomos 8 e 21 **B)** Ensaio de FISH com sondas WCP para os cromossomos 13 (vermelho), 19 (verde) e 22 (amarelo) mostrando uma trissomia do cromossomo 19. WCP – *Whole chromosome painting*.

A tabela abaixo apresenta os subtipo morfológicos, e os dados citomoleculares dos pacientes pediátricos com LMA apresentando cariótipos complexos.

Tabela 4.2. Pacientes diagnosticados com LMA apresentando cariótipos complexos – Bandeamento G, FISH e MCB

Paciente	Subtipo morfológico	Bandeamento G	FISH	WCP/PCP/M-FISH/MCB
1	M1	46,XY,del(9)(q31),t(?X;?11)(p22;q22) [11] / 46,XY [9]	NR	46,XY,del(9)(q12;q31),del(11)(q13 or q14) [4] / 46,XY,del(9)(q12;q31) [2] / 46,XY [7]
2	M4	46,XY,inv(16)(p13q22),+19,-22 [18] / 46,XY [4]	NR	46,XY,inv(16)(p13;q22),dic(22)(qter->p10::p10->qter) [6]
3	M5	44,XX,?der(4),-5,-7,-10,?dic(13),-15,+2 mar [18]	NR	45,XX,der(5)t(5;19)(q13.3;q12),t(6;18;17)(q24.3;q21;q23.2),der(7)t(7;13)(p11.2;q12),der(10)(7qter->7q11.23::12q22->12q21.2::10p14->10q21::12q12->12qter),der(12)(:p13->q12::), -15,del(19)(q12),der(20)t(20;21)(p11.2;q11.2),der(21)t(12;21)(q22;q22) [8]
4	M4/M5	46,XY,t(1;11;8)(q21;p21;q23) [25]	r-KM2TA	46,XY,der(1)t(1;8)(q21;p21),der(8)t(1;8)(q31;p21),der(11)ins(11;1)(q23;q21q31) [6]
5	M4/M5	45,X,-Y,del(8)(q22),add(22)(q22),add(22)(q22) [22]	RUNX1-RUNX1T1	45,X,-Y,t(8;22;21)(q21.3;q13.3;q22.12),der(22)t(1;22)(q23;q13.3) [5]
6	M4	46,XX,del(16)(q2?) [8] / 46,XX [14]	NR	46,XX,inv(16)(p13;q22),del(16)(q22) [14]
7	M3	46,XY,-6,t(15;17)(q22;q21),+mar [21]	PML-RAR α	46,XY,t(15;17)(q22;q21),inv(6)(p24;q15) [10]
8	M5	46,XY,del(10)(p12) [18] / 46,XY [2]	r-KM2TA	46,XY,der(10)(11qter->11q23.3::10q11.2->10p12::10q11.2->10qter),der(11)(11pter->11q23.3::10p12->10p12::11q23.3->11q23.3::10p12->10pter) [6]
9	M1/M2	47,XX,der(2)t(2;?)(q2?;?),t(3;13)(q13;p11),add(5)(q35),t(16;21)(p11;q22) [14]	RUNX1-RUNX1T1 / CBF β	46,XX,der(2),t(2;3)(q2?;?),t(3;13)(q13;p11),der(5)t(3;5)(?;q35),t(16;21)(p11;q22) [7]
10	M1/M2	45,X,-X,del(8q22),+der(13q3?) [23]	RUNX1-RUNX1T1	45,X,-X,t(8;13;21)(q22;q33;q22) [6]
11	M2	45,X,-Y,del(2)(q33),t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22) [13]	RUNX1-RUNX1T1	NR
12	M2	46,X-Y,del(8q22),+der(17q?24) [22]	RUNX1-RUNX1T1	45,X-Y,t(8;17;21)(q22;q21;q22) [5]
13	M1	46,XY,der(2)?t(2;15),del(5),der(14)?add(14)(q23) [16]	del EGR1	46,XY,t(2;14)(q23.1;q32.2),t(2;15)(p22.3;q21.1),del(5)(q22->qter) [7]
14	M4	46,XX,t(6;11)(q27;q23),t(6;12)(p22;q23) [20]	r-KM2TA	46,XX,der(6)t(6;11)(q27;q23),der(6)t(6;12)(p22;q23),der(11)t(6;11)(q27;q23),der(12)t(6;12)(p22;q23) [8]
15	M1	46,XX,del(7)(?q31) [50]	del(7q)	46,XX,der(3)t(3;7)(q26;q21.1~21.2),del(7)(q21.1~21.2) [6]

16	M4/M5	44,X,-X,-7,+8,-20 [23]	r-KM2TA	46,XX,der(10)t(10;11)(10pter->10p12.31::11q23.3->11q23.3::10p12.31->10q11.23::14q24.2->14qter),der(11)t(11;14)(10qter->10q11.23::11p15.3->11q23.3::10p12.31->10p12.31::11q23.3->11qter),der(14)t(10;14)(q11.23;q24.2),inv(14)(q32;q11) [4]
17	M4	46,XX,der(7)t(7;?),inv(16)(p13;q22) [18]	del(7q31)	46,XX,der(7)t(7;13)(q22;q31),inv(16)(p13;q22) [7]
18	M2	49,XX,+8,+13,+17 [28]	NR	49,XX,+8,+19,+21 [10]
19	M5	53,XX,del(11q?),+mar [15]	r-KM2TA	53,XX,+X,+6,t(9;11)(p21.3;q23.3),+der(9)t(9;11)(p21.3;q23.3),?dup(13)(q31q34),+14,+19,+21,+22 [4]/46,XX [16]
20	M3	45,XY,-6,der(?4),del(10)(q?),t(15;17) [20]	PML-RAR α	45,XY,-5,dic(6;9)t(6;9;10)(9pter->q12::6p25-24->q23.3::9q13-q34.1::10q25.1->qter),der(10)t(6;9;10)(10pter->q24.3::9q34.2->qter),t(15;17)(q22;q21) [6]
21	M5	48,XY,del(11q?),t(11;19),?inv(16) [21]	r-KM2TA	47,XY,t(11;16;19)(q23.3;p11.2;p13.3),+der(19)(16pter->16p11.2::19p13.3->19q11::19q11->19p13.3::16p11.2->16pter) [8]
22	M2	46,XX,t(8;19)(q22;p) [23]	RUNX1-RUNX1T1	46,XX,t(8;19;21)(q21.3;q13.43;q22.12) [8]

M1, M2, M3, M4, M5 – Subtipos morfológicos FAB da LMA, NR – não realizado, c - constitucional, del - deleção, der - cromossomo derivativo, dic - dicêntrico, ter – região cromossômica terminal, dup - duplicação, inv – inversão cromossômica, mar - cromossomo marcador, p - braço curto do cromossomo, q - braço longo do cromossomo, Subtel - região subtelomérica, t - translocação, (-) - sinal negativo: perda de material genético, (+) - sinal positivo: ganho de material genético, () - parênteses: delimita os cromossomos alterados e os pontos de quebra, [N^o] - n^o entre []: representa o número de células com determinada alteração, (,) - vírgula: separa n^o 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, (/) - barra inclinada: separa os clones de um cariótipo, (?) - interrogação: identificação questionável de cromossomo ou estrutura cromossômica, X e Y - Cromossomos sexuais, (:) - dois pontos: quebra, (::) - dois pontos duplos: Quebra e união, -> - de – à.

5. Discussão

A Leucemia Mielóide Aguda representa um grupo clínico e geneticamente heterogêneo de malignidades hematológicas. A LMA é uma doença rara na infância, correspondendo a 5% de todos os tipos de cânceres pediátricos, e a 20% das leucemias agudas nesta faixa etária. A análise citogenética revela anormalidades cromossômicas clonais em cerca de 80% das crianças com LMA e, portanto, é considerada uma das mais poderosas ferramentas investigativas, propiciando conhecimentos notáveis quanto à heterogeneidade da população celular e, conseqüentemente, levando a uma melhor compreensão dos rearranjos cromossômicos e dos mecanismos subjacentes à leucemogênese. As informações obtidas através desta caracterização, e sua associação com os dados clínicos, vêm sendo importantes para o diagnóstico, prognóstico e estratificação de risco dos pacientes acometidos por esta doença (RADHI; MESHINCHI; GAMIS, 2010; KASPERS & REINHARDT, 2011; DAS & TAN, 2013).

Como referido previamente, uma ou mais anomalias cromossômicas, indicativas de prognóstico adverso, podem estar envolvidas em deleções, inserções e/ou rearranjos crípticos em CCs. Neste contexto, a sensibilidade alcançada pela técnica de bandeamento G não permite a detecção de determinadas aberrações, e nem a origem de cromossomos marcadores. Portanto, para superar estas limitações, foram desenvolvidas técnicas de citogenética molecular, tais como FISH, M-FISH e MCB, de modo a contribuir para uma melhor definição do perfil cariotípico, da heterogeneidade molecular, e revelar novos genes e fusões gênicas potencialmente envolvidos nas neoplasias hematológicas malignas (MRÓZEK, 2008; DAS & TAN, 2013). Os nossos resultados, com a combinação das técnicas de citogenética (banda G, FISH, M-FISH e MCB), revelaram anomalias crípticas e novas variantes de anormalidades já conhecidas, superando as limitações da caracterização pelo bandeamento G.

Com relação à prevalência de CCs, em nosso estudo consecutivo de pacientes pediátricos com LMA, que até o momento apresenta 146 pacientes no total, sendo 133 com mitose, 22 crianças (16,5%) foram caracterizadas como CCs.

Grimwade e colaboradores (2001), assim como Byrd e colaboradores (2002), em estudos multicêntricos, avaliando amostras de 1.065 e 1.213 pacientes, em períodos de 10 e 8 anos, respectivamente, detectaram a prevalência de 10% de CCs em adultos com LMA, observando um pior prognóstico nestes pacientes. Mais

recentemente, Creutzig e colaboradores (2018), também em um estudo multicêntrico, analisando uma amostra de 1.192 pacientes pediátricos com LMA, em um período de 14 anos, observaram aproximadamente o mesmo percentual de CCs em sua amostra, sendo estes também relacionados a um risco desfavorável (GRIMWADE, 2001; BYRD, 2002; CREUTZIG *et al.*, 2018). Vale ressaltar que estes estudos investigaram os cariótipos dos pacientes por bandeamento G.

Deste modo, a prevalência de CCs na LMA pediátrica, detectada neste trabalho, propõe um estudo continuado em uma série maior de crianças com LMA, para definir a real prevalência de CCs nesta população no Brasil. Além disso, os achados neste trabalho poderão contribuir com a investigação do real valor prognóstico destas aberrações, e com a biologia desta rara entidade, proporcionando uma estratificação de risco mais adequada para os pacientes.

Em relação aos dados demográficos, não houve predominância de sexo entre os pacientes, uma vez que observamos uma proporção de 1:1 (11 meninos e 11 meninas). A mediana de idade foi de 7 anos, variando de 6 meses a 16 anos. Em uma ampla revisão sobre a citogenética da LMA pediátrica, a taxa mais alta de CCs foi observada em crianças com menos de 3 anos de idade (MANOLA, 2009). Em nosso estudo, a maior taxa de CCs foi vista no grupo de pacientes pediátricos mais velhos (9-18 anos). A literatura mostra que a idade é um fator prognóstico importante e independente de outros fatores de risco, relacionando o aumento da idade a uma pior evolução clínica para o paciente (RAZZOUK *et al.*, 2006; CREUTZIG *et al.*, 2018). Neste sentido, observamos que 6/22 (27%) dos pacientes deste estudo, que foram a óbito e/ou foram maus respondedores à terapia de indução, apresentaram idade igual ou superior a 9 anos ao diagnóstico. Os dados demográficos dos pacientes de nosso estudo estão detalhados na Tabela 4.1.

Neste trabalho, foi possível acompanhar a evolução clínica de 18/22 crianças com LMA e CCs; em 4 pacientes, houve perda de seguimento. Até o momento, 13 pacientes (59%) estão vivos, em remissão, e 9 pacientes (41%) foram a óbito.

Dos casos com acompanhamento da evolução clínica, 16 foram tratados no INCA seguindo variações do protocolo BFM, 1 paciente experienciou o ensaio clínico AML02, e outra paciente foi a óbito antes de iniciar o tratamento quimioterápico. O status de remissão completa foi alcançado na primeira indução em 9/18 crianças, e outras 8 apresentaram falha em primeira indução. Destas, 5 crianças atingiram remissão completa após segunda indução e os 3 pacientes restantes só atingiram remissão na fase de consolidação. Em um outro caso, não foi possível iniciar o

tratamento, pois, devido a um grande número de blastos, a paciente 15 foi submetida a terapia citorrredutora com hidroxiureia, mas não resistiu. A criança foi a óbito 48 horas após a admissão, como resultado de uma hemorragia cerebral, provavelmente causada por leucostase.

A recaída da doença foi observada em 4 pacientes, dentre estes, 2 pacientes apresentaram recaída pós término de tratamento quimioterápico. Os outros 2 pacientes recaíram durante o período de tratamento, na fase de manutenção, mesmo após atingirem remissão completa na primeira indução. Todos os pacientes que recaíram evoluíram a óbito. O tratamento com TMO foi realizado em 4 pacientes, dos quais, 3 responderam bem ao tratamento.

Estes dados corroboram com trabalhos apresentados por diferentes grupos de pesquisadores, que têm demonstrado a presença de CCs como um fator de mau prognóstico, o qual pode influenciar negativamente na evolução clínica do paciente. Pacientes com LMA e CCs, podem apresentar resistência ao tratamento inicial e recaída prematura da doença (BETTS *et al.*, 2007; MARCHESI *et al.*, 2011). Também é importante ressaltar que dos 9 pacientes que foram a óbito, 6 apresentaram mais do que três anormalidades cariotípicas, dentre os quais, 3 pacientes recaíram e 1 somente atingiu remissão na fase de consolidação. Neste contexto, o *Medical Research Council* reporta que são maiores os riscos, incluindo o de mortalidade, para os pacientes com um maior grau de complexidade no cariótipo (OROZCO & APPELBAUM, 2012).

Quanto às características clínicas, a mediana da contagem de plaquetas, dentre todos os 22 pacientes, foi de 73.000, variando de 11.000 até 318.000, sendo 14/22 (63%) com <100.000 plaquetas. As crianças com LMA geralmente apresentam sinais e sintomas de diminuição do número de plaquetas, e os dados da contagem plaquetária observados aqui também corroboram com a literatura, que descreve que a maioria dos pacientes pediátricos com LMA apresentam uma contagem de plaquetas <100.000 ao diagnóstico (ARCECI & ALPENC, 2009).

A mediana da contagem de leucócitos foi de 16.950, com valores entre 2.000 e impressionantes 692.000. Nós observamos 4/22 pacientes que apresentaram contagem acima de 100.000 leucócitos. Destes, 3 foram a óbito, sendo que a paciente 14 (225.200 leucócitos) apresentou recaída durante o tratamento, e a paciente 15 (692.000 leucócitos) foi a óbito 48 horas após a admissão. Assim como a idade, a contagem leucocitária é inversamente relacionada à evolução clínica do paciente. Uma alta contagem leucocitária na admissão é considerada como um fator

prognóstico independente para um desfecho clínico ruim na LMA, tanto em adultos quanto em crianças (ARCECI & ALPENC, 2009; DE JONGE *et al.*, 2011). Os dados clínicos dos pacientes de nosso estudo estão detalhados na Tabela 4.1.

Atualmente, mesmo com o advento da classificação da OMS, a classificação FAB – que leva em consideração critérios morfológicos, principalmente quanto ao grau de maturação celular – ainda é importante na prática clínica para a estratificação de risco, e para o tratamento da LMA pediátrica (HEEREMA-MCKENNEY & ARBER, 2009). Neste contexto, em nosso trabalho, observamos que há uma relação inversamente proporcional entre a idade do paciente e o grau de maturação celular/subtipo FAB. Na Figura 4.1, pode-se observar que os pacientes mais velhos (9-18 anos) tiveram uma tendência para os subtipos FAB M1 e M2, enquanto que os pacientes mais novos (0-2 anos), apresentaram uma tendência para o subtipo FAB M5. Estes dados estão de acordo com a literatura que mostra que os subtipos FAB M1 e M2 – que correspondem aos subgrupos da classificação da OMS com leucemia mielóide aguda sem maturação e com maturação, respectivamente – são mais comuns em crianças mais velhas. Por outro lado, o subtipo FAB M5, leucemia monocítica aguda, é mais frequente em crianças mais novas (ARCECI & ALPENC, 2009).

No que diz respeito à relação entre as diferentes faixas etárias e os principais grupos prognósticos de alterações citogenéticas, nos pacientes do presente estudo, em geral, foi possível observar uma distribuição homogênea (Fig. 4.4). Entretanto, como exceção, destaca-se a associação dos lactentes (0-2 anos), com *r-KMT2A*. Neste grupo de pacientes, 4/5 (80%) apresentaram este rearranjo. É descrita uma maior frequência de *r-KMT2A* em pacientes com LMA <2 anos. Além disto, esta frequência diminui de acordo com o avanço da idade. Rearranjos do gene *KMT2A* apresentam uma prevalência de 43-58% em crianças <12 meses, 39% em crianças com 13-24 meses e 8-9% em crianças >24 meses (MRÓZEK; HEEREMA; BLOOMFIELD, 2004; MUNTEAN, 2013).

Com relação a prevalência de cromossomos e alterações citogenéticas numéricas, a presença de 3 anormalidades cromossômicas é necessária para caracterizar um cariótipo como complexo (MRÓZEK, 2008). Entretanto, neste estudo a maioria dos pacientes (14/22) (63%) apresentou um número maior, com uma mediana de 4 aberrações, sendo que em um dos casos foram observadas 18 anormalidades. Estes dados estão de acordo com a literatura que mostra, em diferentes e amplas séries de estudos em CCs na LMA, um número de aberrações

cariotípicas maior do que o mínimo estabelecido para o diagnóstico citogenético de CC (MRÓZEK, 2008).

Em relação às anormalidades cromossômicas numéricas, o número cromossômico modal foi diplóide, entretanto, 9/22 pacientes apresentaram aneuploidia. Destes, 3 pacientes apresentaram cariótipos hiperdiplóides e 6 foram hipodiplóides. O padrão de ploidia observado neste estudo pode estar relacionado ao fato de que, de acordo com a literatura, em CCs na LMA, perdas de cromossomos inteiros são mais frequentes do que ganhos de cromossomos inteiros (MRÓZEK, 2008; BRAOUDAKI & TZORTZATOU-STATHOPOULOU, 2012).

Com relação à prevalência cromossômica individual nos CCs, o cromossomo 21 foi o mais envolvido nas anormalidades caracterizadas neste estudo. Este cromossomo foi detectado em 9/22 casos (Fig. 4.2). A trissomia do cromossomo 21, que apresenta uma frequência de 5% em meio aos CCs, é a segunda mais comum depois da trissomia do cromossomo 8, estando ambas as anormalidades relacionadas a um prognóstico intermediário/desfavorável na LMA (RAIMONDI, 1993; MANOLA, 2009; MARCHESI *et al.*, 2011). Neste sentido, a literatura tem levantado a hipótese de que o fenômeno do aumento do número de cromossomos detectados em um cariótipo pode ser originado a partir de: (a) ganho de cromossomos adicionais, de modo simultâneo, em uma única divisão celular anormal; (b) ganho de cromossomos, individualmente, *step by step* ou de modo sequencial; (c) um cariótipo tetraplóide com posterior perda de cromossomos. Alternativamente, ainda é proposto que os cromossomos adicionais podem resultar da seleção de células submetidas à não-disjunção de um homólogo, contendo uma mutação específica que pode fornecer à célula uma vantagem proliferativa, a partir de uma única mutação ou evento carcinogênico, que pode levar ao estado hiperdiplóide como um evento secundário (ONODERA *et al.*, 1992). Em nossa amostra, 2/22 casos foram caracterizados apresentando os cromossomos 8 e 21 envolvidos em anormalidades numéricas, a paciente 19 com trissomia do cromossomo 21, e a paciente 18 com trissomias dos cromossomos 8 e 21 (Figs. 4.17 e 4.26).

Com relação às alterações citogenéticas estruturais, o envolvimento dos cromossomos 5 e 7 em translocações, e/ou -5/del(5q), -7/del(7q) – que correspondem a 1-2,5% e 2-7% das LMAs pediátricas, respectivamente – é estratificado como risco desfavorável e é frequentemente observado no contexto de um cariótipo complexo. Normalmente os pacientes com estas aberrações

apresentam alta contagem leucocitária e resposta ruim à terapia (HARRISON *et al.*, 2010; JOHNSTON *et al.*, 2013).

Neste grupo apresentamos inicialmente a paciente 3, na qual detectamos um cariótipo complexo através do bandeamento G. Foi observado o envolvimento dos cromossomos 5 e 7, além do 10, 13, 15, e dois cromossomos marcadores. No entanto, a aplicação da técnica de MCB revelou um rearranjo citogeneticamente balanceado, altamente complexo, demonstrando adicionalmente o envolvimento dos cromossomos 6, 12, 16, 17, 18, 19, 20 e 21 (Fig. 4.25). Portanto, a técnica de MCB foi importante para elucidar e detectar a participação de cromossomos adicionais neste cariótipo. Neste contexto, a literatura tem demonstrado que quanto maior o número de anormalidades envolvidas em um CC, pior pode ser a evolução clínica do paciente (OROZCO & APPELBAUM, 2012). Contudo, para maiores afirmações, se faz necessário um estudo utilizando técnicas de citogenética molecular, com um maior número de pacientes que apresentem este tipo de cariótipo.

O paciente 13 apresentou pela banda G uma deleção da 5q31, uma possível translocação t(2;15), e adição de material no cromossomo 14. O MCB, com a ajuda de BACs, foi importante para caracterizar precisamente os pontos de quebra, especialmente a del(5)(q22->ter), e a interação entre os cromossomos 2, 14 e 15. Ensaio de FISH com sondas LSI e WCP revelaram uma deleção heterozigótica do gene *EGR1*, além da t(2;14) e da t(2;15) (Fig. 4.23). Johnston e colaboradores (2013) reportaram que pacientes com CCs e del(5q), >3 anormalidades citogenéticas, apresentaram uma evolução clínica pior (JOHNSTON *et al.*, 2013). Nesta grande região perdida no cromossomo 5, a literatura inclui os genes *APC*, *CTNNA1*, *DIAPH1*, *EGR1*, *GLRA1*, *NPM1*, *RPS14*, e o *UBE2D2*, cuja perda da expressão pode levar a defeitos na hematopoese em camundongos, e no desenvolvimento celular, inclusive relacionados à progressão para a LMA (EISENMANN *et al.*, 2009). O ponto de quebra detectado em nosso caso, del(5)(q22->ter), foi um pouco acima do ponto reportado na literatura, deste modo, abrangendo os genes putativos supracitados. A descrição deste caso, através das abordagens (cito)moleculares, foi importante para somar conhecimento à biologia da del(5q) na LMA da infância, o que pode auxiliar futuramente a uma estratificação de risco mais precisa para estes pacientes (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2015).

Um importante achado em nosso estudo foi observado na paciente 15. Em seu diagnóstico citogenético inicial havia apenas uma del(7). De acordo com Haferlach e colaboradores (2012), a del(7) está comumente associada a anomalias

crípticas (HAFERLACH *et al.*, 2012). Deste modo, a aplicação do M-FISH foi fundamental para revelar, além da del(7q), uma duplicação no cromossomo 3, e uma translocação críptica envolvendo os cromossomos 3 e 7. O MCB, com a técnica de aCGH, foram determinantes para definir precisamente os pontos de quebra envolvidos no rearranjo (Fig. 4.24). Anormalidades cromossômicas na região 3q26 (loci do gene *MECOM*), já foram reportadas por apresentarem impacto prognóstico na LMA. Além disto, no rearranjo cromossômico t(3;7)(q26;q21), o *MECOM* - um oncogene dominante que quando mutado altera a diferenciação, proliferação, transformação celular, e cuja superexpressão é associada a um mau prognóstico - é justaposto ao *CDK6* - um oncogene que é reportado mutado e desregulado em diversos neoplasmas hematológicos malignos. Rearranjos do *MECOM* estão comumente crípticos em CCs, o que os torna de difícil detecção pelo bandeamento G. Neste sentido, alguns pesquisadores sugeriram que a justaposição de promotores ao *MECOM*, através de translocações cromossômicas, poderia induzir sua superexpressão. Outros ainda sugeriram que a 7q-, resultando na perda reguladores transcricionais, poderia aumentar ainda mais a superexpressão do *MECOM* (STORLAZZI *et al.*, 2004; HAFERLACH *et al.*, 2012; DE BRAEKELEER *et al.*, 2015). Este achado em nosso estudo é um exemplo da importância da citogenética molecular na seleção de casos para futuras investigações de mecanismos de regulação genômica e transcriptômica, buscando alvos do *MECOM* como perspectivas para novas abordagens terapêuticas. Os achados citogenético-moleculares, e o relato da evolução clínica deste caso fazem parte de um manuscrito publicado (CAPELA DE MATOS *et al.*, 2018) (Anexo IV).

Rearranjos do gene *KMT2A* são mais comuns em crianças do que em adultos, e na LMA estão relacionados entre os riscos intermediário e adverso. Devido a sua diversidade de efeitos biológicos, implicações clínicas, e ampla heterogeneidade de apresentação, os r-*KMT2A* permanecem sendo de grande interesse de estudo na literatura. No entanto, anormalidades de difícil detecção como a t(6;11), t(9;11), e rearranjos crípticos, podem ser difíceis de detectar utilizando somente a citogenética por bandeamento G (VAN LIMBERGEN *et al.*, 2002; MARSCHALEK, 2015). Neste estudo, 6/22 (27%) pacientes apresentaram r-*KMT2A*.

A análise por banda G do paciente 4, mostrou inicialmente uma translocação complexa envolvendo os cromossomos 1, 8 e 11. A técnica de FISH foi fundamental, revelando material cromossômico adicional no cromossomo 11 derivativo, e

elucidando a diferença de uma translocação para uma inserção cromossômica. Com a aplicação do MCB foi revelado que haviam na verdade três anormalidades cromossômicas crípticas distintas (Fig. 4.19). A translocação $t(1;11)(q21;q23)$, que leva à fusão gênica *KMT2A-MLLT11*, é recorrente na LMA, porém, ainda não há um consenso na literatura sobre seu impacto prognóstico (BALGOBIND *et al.*, 2009). Nosso grupo foi o primeiro a descrever esta translocação, do tipo inserção, entre os cromossomos 1 e 11 (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2010). Em nosso presente estudo, atualizamos os dados clínicos do paciente em questão. Este recaiu da doença 2 anos após atingir remissão, apresentando uma anormalidade citogenética diferente da inicial. Na recaída, detectamos a $t(11;19)(q23;p13)$. Esta é a translocação mais comum na LMA secundária, descrita na literatura como uma leucemia relacionada ao tratamento, e está associada a um prognóstico desfavorável (HURET, 1998). Após a recaída, o paciente foi a óbito.

O paciente 8, no bandeamento G, mostrava apenas uma deleção no braço longo do cromossomo 10. Com o emprego de FISH, foi possível observar uma inserção críptica na região 11q23 (loci do gene *KMT2A*), vista somente pela análise em núcleos interfásicos (Fig. 4.18). Este caso é um bom exemplo de que a análise (cito)molecular, tanto de metáfases como de núcleos interfásicos, deve ser considerada para o diagnóstico citogenético final do paciente. Estes achados foram publicados por nosso grupo (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2012). A $t(10;11)(p12;q23)$, que resulta na fusão gênica *KMT2A-MLLT10*, é rara na LMA da infância, e é descrita na literatura como um indicador de mau prognóstico (BALGOBIND *et al.*, 2009). Portanto, a detecção de uma inserção subcariotípica através da combinação das técnicas de FISH e MCB, foi crucial para a clínica, revelando importantes informações prognósticas.

Em relação ao paciente 14, o FISH foi fundamental para confirmar o *r-KMT2A*. Porém, somente com a combinação de sondas WCP, BACs, e o MCB, foi possível determinar o envolvimento dos cromossomos 11, 12, e de ambos os homólogos do 6, caracterizando as translocações $t(6;11)$ e $t(6;12)$, bem como precisamente os seus respectivos pontos de quebra (Fig. 4.16). Neste caso, o emprego do MCB foi fundamental, pois, a $t(6;11)(q27;q23)/KMT2A-MLLT4$, é uma anormalidade sutil e está associada a um mau prognóstico (MARTINEAU *et al.*, 1998). Neste sentido, novamente foi possível contribuir com a clínica, fornecendo uma importante informação prognóstica. Além disto, com o emprego do MCB, o nosso grupo pôde

descrever a translocação t(6;12)(p22;q23), não reportada anteriormente na literatura (NEY-GARCIA *et al.*, 2016).

Outro achado importante e raro na LMA dos lactentes foi a detecção de uma hiperdiploidia associada a um r-*KMT2A*. O bandeamento G revelou na amostra da paciente 19 um cariótipo hiperdiploide com 53 cromossomos, além de anormalidades estruturais inconclusivas. O FISH revelou três sinais de fusão *KMT2A-MLLT3*. O M-FISH foi essencial neste caso para precisar as trissomias dos cromossomos X, 6, 14, 19, 21 e 22, além de mostrar a origem dos 3 sinais de fusão *KMT2A-MLLT3*. Com esta técnica, ainda foi revelada uma trissomia do cromossomo 9, produzindo uma duplicação da fusão reversa *MLLT3-KMT2A*. Com a aplicação de sondas PCP e o MCB, foi possível caracterizar a t(9;11), uma duplicação no cromossomo 13(q31q34), e definir os pontos de quebra (Fig. 4.17). Embora a t(9;11)(p22;q23)/*KMT2A-MLLT3* seja a mais comum em crianças <12 meses, ela é de difícil caracterização pela banda G. Além disto, a literatura ainda é controversa quanto às suas implicações prognósticas. Por exemplo, embora alguns autores a relacionem a um bom prognóstico, Lo Nigro e colaboradores (2003) enfatizam que a t(9;11) pode apresentar um prognóstico desfavorável no evento de anormalidades cromossômicas adicionais no cariótipo (RUBNITZ *et al.*, 2002; LO NIGRO *et al.*, 2003). Neste contexto, através do MCB e FISH LSI, foi possível detectar uma dup(13)(q31q34), *locus* do gene *GAS6*, e descrever pela primeira vez na literatura, uma duplicação deste gene em um bebê com LMA. O *GAS6* é o ligante do receptor de tirosina quinase *AXL*; assim, sua superexpressão está relacionada a um pior prognóstico devido à ativação do *AXL* (VARNUM *et al.*, 1995; WHITMAN *et al.*, 2014). Embora, maiores estudos sejam necessários para determinar as implicações da desregulação do *GAS6* na LMA pediátrica. Neste caso, os nossos achados sugerem que estudos citogenético-moleculares são cruciais para a caracterização de CCs no que diz respeito ao planejamento da abordagem terapêutica, principalmente em casos raros, como a hiperdiploidia na LMA da infância (1%). Estes achados fazem parte de um manuscrito publicado na literatura (CAPELA DE MATOS *et al.*, 2017) (Anexo III).

No caso da paciente 16, o bandeamento G apresentou monossomias dos cromossomos X, 7 e 20, além de trissomia do 8. Porém, com a caracterização molecular através do emprego de sondas de MCB, foi revelado que havia uma translocação do tipo *three-way* envolvendo os cromossomos 10, 11 e 14, além de uma inversão no 14 (Fig. 4.20). Na literatura, alguns grupos sugerem que o ponto de

quebra dentro do gene *KMT2A* tem uma relação importante com a evolução clínica de crianças com leucemia. Outros sugeriram que pacientes pediátricos com anormalidades adicionais, incluindo translocações *three-way*, apresentam um prognóstico pior do que pacientes com rearranjos cromossômicos simples (VON NEUHOFF *et al.*, 2010; EMERENCIANO *et al.*, 2013). Estes relatos reafirmam a importância do rastreamento feito através da combinação de técnicas (cito)moleculares em casos de crianças com *r-KMT2A*.

Neste estudo também foi possível documentar um novo rearranjo cromossômico complexo, associado a uma nova translocação *three-way*, envolvendo o gene *KMT2A*. A análise por banda G do paciente 21 apresentou um cariótipo com 47 cromossomos, envolvimento da região 11q23, e os cromossomos derivativos 16 e 19, além de um cromossomo marcador. A citogenética molecular, através da aplicação de FISH LSI e sondas WCP, revelou um rearranjo complexo entre os cromossomos 11, 16, 19, e adicionalmente, um cromossomo 19 derivativo com a $t(16;19)$. O MCB, com o emprego do aCGH, definiu os pontos de quebra. O sequenciamento, feito através de PCR invertido de longa distância, pôde revelar as fusões *KMT2A-MLLT1* e *MLLT1-16p11.2* (Fig. 4.21). No evento de *r-KMT2A* com a região 19p13, a literatura apresenta dois genes parceiros. (a) $t(11;19)(q23;p13.3)/KMT2A-MLLT1$, que corresponde a <1% da LMA pediátrica com *r-KMT2A*. Esta é principalmente encontrada em bebês, e está associada a um desfecho clínico ruim. (b) *KMT2A-ELL*, cuja frequência ainda não foi estabelecida (MANOLA, 2009; MEYER *et al.*, 2017). Embora os genes *ELL* e *MLLT1* não possuam homologies de sequência, ambos são coadjuvantes como componentes de fator de alongamento do complexo SEC, que são necessários para aumentar a taxa catalítica de transcrição da RNA polimerase II. Foi sugerido que fusões de membros do complexo SEC com o *KMT2A*, podem mudar SEC para alvos de *KMT2A* envolvidos em doenças hematopoiéticas, ao invés de promover a iniciação da transcrição normal, por exemplo, a expressão de genes *HOX*. Além disso, estudos prévios das fusões *KMT2A-MLLT1* e *KMT2A-ELL*, em modelos murinos, resultaram similarmente na imortalização de células progenitoras hematopoiéticas (LUO *et al.*, 2001; DASER & RABBITTS, 2004; MOHAN; LIN; GUEST, 2010). Portanto, a descrição deste achado contribui com a biologia das fusões *KMT2A-MLLT1* e *KMT2A-ELL*. Além disto, as abordagens citogenômicas e moleculares foram importantes para a caracterização deste novo cariótipo complexo com uma variante *r-KMT2A three-way* $t(11;16;19)$, um isocromossomo $der(19)t(16;19)$, e quatro cópias do gene *ELL*, presentes neste

genoma aberrante. Estes dados estão documentados em um manuscrito aceito para publicação na revista científica *Cytogenetic and Genome Research* (Anexo V).

Em nosso estudo, caracterizamos apenas um caso com envolvimento do cromossomo 11 sem *r-KMT2A*. O cariótipo do paciente 1 apresentou uma $del(11)(q13q14)$, porém a $del(9q)$ foi a anormalidade primária (Fig. 4.22). Em 2/22 casos, foram detectadas deleções no cromossomo 9, envolvendo pontos de quebra diferentes. No caso 11, esta anomalia estava associada à translocação recorrente $t(8;21)$ (Fig. 4.9). A $del(9q)$ é uma anormalidade cromossômica recorrente na LMA da infância e, de acordo com a literatura, apresenta um desfecho clínico ruim. Além disso, embora a $t(8;21)(q22;q22)$ esteja relacionada a uma boa resposta clínica, a presença da $del(9q)$ associada a esta translocação é reportada como um evento não aleatório de prognóstico desfavorável (MANOLA, 2009; BRAOUDAKI & TZORTZATOU-STATHOPOULOU, 2012). Nestes casos, o MCB foi importante para a definição dos respectivos pontos de quebra. Porém, estudos posteriores com um maior número de pacientes, serão necessários para avaliar melhor o impacto prognóstico dos genes compreendidos nestes pontos de quebra.

Outros grupos prognósticos importantes na LMA são aqueles pertencentes ao grupo das leucemias CBF. A $t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1T1$ é uma das anormalidades mais frequentes na LMA da infância (7-16%), e é relacionada a um bom prognóstico (MANOLA, 2009). Entretanto, em raras ocasiões, ocorre o envolvimento de um cromossomo adicional nesta translocação, podendo conferir uma evolução clínica ruim para o paciente, de modo que o valor prognóstico da fusão $RUNX1-RUNX1T1$ vem sendo discutido na literatura (BAE *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2011; CREUTZIG *et al.*, 2013).

No presente estudo, a translocação recíproca $t(8;21)$ foi observada em 5/22 casos (23%) (pacientes 5, 10, 11, 12 e 22), dentre os quais, quatro (pacientes 5, 10, 12 e 22) apresentaram um terceiro cromossomo envolvido no rearranjo, caracterizando translocações do tipo *three-way*. Aproximadamente 3-4% dos casos de LMA com $t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1$ ocorrem no contexto de rearranjos complexos (BAE *et al.*, 2010). Este trabalho descreve pela primeira vez duas novas variantes $t(8;V;21)$, discutidas a seguir.

Através do bandeamento G, a paciente 10 apresentou monossomia de X, $del(8q)$ e um cromossomo 13 derivativo. A análise por FISH mais uma vez se provou eficiente, demonstrando uma variante da fusão $RUNX1-RUNX1T1$. Uma parte do gene $RUNX1$ (21q22) estava translocado no cromossomo 8, porém, o gene

RUNX1T1 (8q22), que, por se tratar de uma translocação recíproca, deveria estar translocado com o 21, translocou com o cromossomo 13. Com uma sonda de FISH subtel, pôde-se observar que havia parte da região terminal do cromossomo 13 crípticamente translocado com o cromossomo 21. Com a aplicação de sondas WCP e MCB para os cromossomos 8, 13 e 21, foi possível revelar a translocação *three-way*, e definir os pontos de quebra (Fig. 4.6). Os achados clínicos, citogenéticos e moleculares deste caso fazem parte de um manuscrito publicado (CAPELA DE MATOS *et al.*, 2015) (Anexo II). Com a descrição deste caso, nossos resultados sugerem que as técnicas de citogenética molecular (FISH, M-FISH e MCB) devem ser referidas como ferramentas complementares para o monitoramento de crianças com LMA.

Pelo bandeamento G, o cariótipo do paciente 5 mostrou monossomia do cromossomo Y, além de del(8q22) e um 22 derivativo. A técnica de M-FISH confirmou a identidade de cada cromossomo, e revelou rearranjos entre os cromossomos 1, 8, 21 e 22. Com a aplicação de sondas WCP, MCB e FISH complementar, foi possível revelar uma translocação desbalanceada entre os cromossomos 1 e 22, além de apresentar pela primeira vez na literatura o envolvimento do 22 como o terceiro cromossomo em uma variante t(8;V;21) (Fig. 4.5). A caracterização desta nova variante *three-way* faz parte de um manuscrito publicado por nosso grupo (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2011). No presente estudo, atualizamos os dados de evolução clínica do paciente, que recaiu da doença 3 anos e 9 meses após a remissão, mesmo realizando TMO aparentado. Na recaída, o paciente apresentou, adicionalmente à t(8;22;21), uma deleção na região 6(q21). Anormalidades envolvendo o cromossomo 6 estão relacionadas a um mau prognóstico (MANOLA, 2009), no entanto, não se sabe se esta anormalidade foi adquirida devido ao tratamento quimioterápico ou se foi proveniente de um clone que não pôde ser detectado no primeiro diagnóstico. O paciente realizou o protocolo de tratamento para recaída e novamente atingiu remissão. Ele realizou um segundo TMO aparentado, porém, foi a óbito.

Através da banda G, o cariótipo da paciente 22 apresentou uma t(8;19). O FISH foi importante para revelar a fusão *RUNX1-RUNX1T1*, e ainda mostrar um sinal do gene *RUNX1T1* no cromossomo 19 derivativo. Através da aplicação do FISH com sondas WCP e MCB, pudemos precisar a caracterização da variante *three-way* t(8;19;21)(q21.3;q13.43;q22.12), ainda não reportada na literatura (dados não publicados) (Fig. 4.8).

O paciente 12 apresentou um cariótipo com monossomia do Y, uma del(8q) e um 17 derivativo. A análise por FISH revelou que o gene *RUNX1* estava translocado com o cromossomo 8, porém, parte do gene *RUNX1T1* foi observado no cromossomo 17. Com a aplicação de WCP para os cromossomos 8, 17 e 21 foi possível observar uma porção do cromossomo 17 crípticamente translocada com o 21 derivativo, o que foi fundamental na caracterização deste caso (Fig. 4.7). A translocação t(8;17;21) é a mais frequente entre as variantes *three-way* t(8;V;21) (GALLEGO *et al.*, 1994; UDAYAKUMAR *et al.*, 2008). Entretanto, diferentemente dos casos reportados nos trabalhos supracitados, com a abordagem feita pelas técnicas de citogenética molecular, nosso grupo pôde definir precisamente os pontos de quebra nesta anormalidade, o que será de grande importância para futuros estudos, buscando genes putativos.

Com relação ao mecanismo deste tipo de translocação, Downing e colaboradores (1993) e Tanaka e colaboradores (2012), descreveram que existem pelo menos duas etapas para a formação desta variante complexa (DOWNING *et al.*, 1993; TANAKA *et al.*, 2012). Uma região do braço longo do cromossomo 21(q22) (abrangendo o gene *RUNX1*) transloca para o braço longo do cromossomo 8, enquanto que a região 8q22 (abrangendo o gene *RUNX1T1*) transloca para um terceiro cromossomo. Interessantemente, em nossos 4 casos, as t(8;V;21) demonstraram o mesmo comportamento biológico no rearranjo que os outros casos reportados na literatura (UDAYAKUMAR *et al.*, 2008). Porém, diferentemente dos casos previamente relatados, os cariótipos caracterizados em nosso estudo foram crípticos, reafirmando a importância de um diagnóstico acurado da fusão *RUNX1-RUNX1T1*.

Em relação às anormalidades no cromossomo 16, foi possível caracterizar o seu envolvimento e comportamento em 4/22 casos. O paciente 2 apresentou inicialmente trissomia do 19 e monossomia do 22, além de uma inversão do cromossomo 16, na análise por bandeamento G. A inv(16) é reportada em 6-12% da LMA pediátrica, conferindo um bom prognóstico (MANOLA, 2009). A aplicação do MCB foi determinante, confirmando a inversão do cromossomo 16, e mostrando que a anormalidade adicional na verdade se tratava de um cromossomo 22 dicêntrico (Fig. 4.10). O cromossomo 22 tem sido frequentemente reportado como uma anormalidade secundária à inv(16), sem implicações prognósticas (XU *et al.*, 2008).

A paciente 6, através da banda G, demonstrou um cariótipo inconclusivo, com uma deleção no braço longo do cromossomo 16. A combinação das técnicas de

FISH e MCB elucidou que havia uma inversão em um dos cromossomos 16, além da deleção da região 16q22 (loci do gene *CBFβ*), em seu homólogo. Embora a inv(16) seja relacionada a um prognóstico favorável, sua associação à del(16q) ainda não foi estabelecida na literatura, devido a sua baixa incidência. Além disso, é importante ressaltar que os casos que apresentam inv(16) e t(16;16) são de difícil detecção/distinção pelo bandeamento G, podendo ser confundidos com a del(16q), ou ainda com outras alterações crípticas em CCs (VARDIMAN; HARRIS; BRUNNING, 2002; SILVA *et al.*, 2008). Este fato justifica a necessidade da aplicação das técnicas de citogenética molecular na caracterização da fusão *CBFβ-MYH11*.

A paciente 17 apresentou pela banda G uma translocação do cromossomo 7, além da inv(16). Os ensaios de FISH com sondas CEP e LSI foram importantes para elucidar a deleção no braço longo do cromossomo 7, e a inversão do cromossomo 16. Através da abordagem feita por FISH com sondas WCP e MCB para os cromossomos 7 e 13, foi revelada a t(7;13)(q22;q31) (Fig. 4.11). A literatura apresenta anormalidades na região 7q como anomalias recorrentes associadas à inv(16), entretanto, não estabelece conclusões sobre o seu impacto prognóstico (MARTINEZ-CLIMENT, 1997).

No cariótipo da paciente 9, a banda G apresentou quatro anormalidades estruturais, além da rara translocação t(16;21)(p11;q22). Porém, as anomalias cromossômicas envolvidas neste rearranjo críptico e citogeneticamente desbalanceado somente puderam ser caracterizadas através da abordagem feita com M-FISH e MCB (Fig. 4.13). A literatura tem demonstrado que pacientes pediátricos com a t(16;21) apresentam um prognóstico desfavorável, apesar de que dada a sua raridade, seu real impacto prognóstico ainda não foi estabelecido (BETTS *et al.*, 2007). Neste sentido, mais uma vez, a citogenética molecular foi fundamental não somente para a refinação do cariótipo, mas também para a estratificação de risco do paciente.

A LPA é normalmente relacionada a um bom prognóstico, entretanto, cerca de 10% dos pacientes tendem a recair, o que desperta o interesse de diferentes grupos de estudo na literatura sobre anomalias (crípticas) adicionais relacionadas à doença. Embora a marca genética da LPA seja a fusão *PML-RARα*, gerada a partir da t(15;17)(q24;q21), é comum observar outras anormalidades cromossômicas, com impacto clínico ainda não estabelecido, associadas a esta neoplasia (LO-COCO & SANZ, 2011).

Pelo bandeamento G, o cariótipo do paciente 20 apresentou, além da t(15;17), monossomia do cromossomo 6, deleção no 10 e um cromossomo 4 derivativo. O FISH foi importante para confirmar a fusão *PML-RAR α* . Além disso, o ensaio por FISH com sondas WCP foi essencial para descartar o envolvimento de um cromossomo 4 anormal, e confirmar as presenças dos cromossomos 6 e 10 no rearranjo, além da monossomia do 5. Através da aplicação da técnica de MCB, foi possível identificar uma translocação do tipo *three-way* e um cromossomo dicêntrico, ambas as anormalidades envolvendo o cromossomo 6 (Fig. 4.15).

Neste contexto, outro achado importante dentre os casos de LPA com CCs, foi que um mesmo cromossomo esteve envolvido em duas anormalidades distintas ao mesmo tempo, del(6) e inv(6); esta descoberta foi detectada no caso 7. A caracterização feita pela combinação das técnicas de FISH, com a utilização de BACs, e MCB, revelou duas anormalidades crípticas em um mesmo cromossomo (Fig. 4.14). Anomalias citogenéticas secundárias ocorrem em cerca de 30% dos casos com LPA, e aberrações envolvendo a região 6p são observadas preferencialmente em conjunto com outros eventos cromossômicos. Porém, poucos casos foram reportados com anormalidades no cromossomo 6, e que também envolvam a t(15;17) (NAKASE *et al.*, 2000; ZHANG & ZHU, 2012). Embora as anormalidades envolvendo o cromossomo 6 venham sendo associadas a uma evolução clínica desfavorável, ainda não foi determinado seu impacto prognóstico, o que reforça a importância de uma detalhada caracterização citogenética nestes casos. Estes achados fazem parte de um manuscrito publicado na literatura (MATOS *et al.*, 2013).

Em suma, este trabalho foi importante para discutir pela primeira vez a prevalência dos CCs na LMA da infância no Brasil. Além disto, nossos resultados demonstraram a eficiência da combinação de técnicas de citogenética molecular (FISH, M-FISH e MCB) na caracterização de cariótipos complexos, além de contribuir com novos achados para a literatura, através da detecção de anomalias subcariotípicas raras, e novas variantes complexas, que apresentaram impacto prognóstico na leucemia mielóide aguda da infância.

6. Conclusões

- A combinação das quatro técnicas (Bandeamento G, FISH, M-FISH e MCB) demonstrou eficácia na caracterização de cariótipos complexos/inconclusivos, bem como de suas anormalidades crípticas, na LMA da infância;
- A prevalência de casos que apresentam cariótipos complexos encontrada em nossa amostra total de LMA pediátrica foi de 16,5%, uma prevalência maior do que a apresentada para esta entidade, até o momento, na literatura;
- Em nosso estudo, a maior taxa de CCs foi observada no grupo de pacientes pediátricos mais velhos 9/22 (41%), diferente da literatura que apresenta a maior taxa em pacientes < 3 anos;
- 63% dos pacientes deste estudo tiveram > 3 anormalidades no cariótipo, com uma mediana de 4 aberrações, e o cromossomo 21 foi o mais envolvido nestas anormalidades 9/22 (41%);
- 80% dos lactentes com LMA e CCs apresentaram *r-KMT2A*;
- A caracterização das anormalidades citogenéticas, e as abordagens citogenético-moleculares feitas através das técnicas de FISH, M-FISH e MCB, tiveram importância para o diagnóstico clínico, revelando importantes informações prognósticas, auxiliando na estratificação de risco, e no planejamento de abordagens terapêuticas para os pacientes deste estudo;
- A combinação das técnicas de citogenética foi importante na pré-seleção de casos para posteriores investigações genômicas e transcriptômicas da leucemogênese pediátrica, pois, puderam revelar alterações genéticas, colaborando com a caracterização de fusões gênicas novas;
- Com a caracterização de novas alterações citogenômicas, foi possível contribuir para um melhor entendimento do papel dos cariótipos complexos na LMA pediátrica, através de novos dados publicados na literatura mundial.

7. Referências

ABDUL-HAMID, G. Classification of Acute Leukemia. *In*: ANTICA, M. **Acute Leukemia - The Scientist's Perspective and Challenge**. 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/acute-leukemia-the-scientist-s-perspective-and-challenge/classification-of-acute-leukemia>>. Acesso em: Dez. 2018.

AL-ACHKAR, W. *et al.* A *de novo* acute myeloid leukemia (AML-M4) case with a complex karyotype and yet unreported breakpoints. **Molecular Cytogenetics**, v. 6(18), p. 1-5, 2013.

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 191-234.

ARBER, D. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127(20), p. 2391-2405, 2016.

ARCECI, R; APLENC, R. Acute Myelogenous Leukemia in Children. *In*: GREER, J.P. *et al.* **Wintrobe's Clinical Hematology**. 12. ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2009. p. 1919-1932.

ARCECI, R; MESHINCHI, S. Biology of Acute Myeloid Leukemia. *In*: REAMAN, G.H.; SMITH, F.O. **Childhood leukemia – A Practical Handbook**. Springer, 2011. p 63-74.

Atlas of Hematological Cytology. Disponível em:

<<http://www.leukemia-cell.org/atlas>>. Acesso em: Dez. 2018.

BACHER, U. *et al.* Further correlations of morphology according to FAB and WHO classification to cytogenetics in de novo acute myeloid leukemia: a study on 2,235 patients. **Ann. Hematol.**, v. 84, p. 785-791, 2005.

BAE, S. *et al.* Acute myeloid leukemia (AML-M2) associated with variant t(8; 21): report of three cases. **Cancer Genet Cytogenet.**, v. 199, p. 31–37, 2010.

BALGOBIND, B. *et al.* Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. **Blood**, v. 114(12), p. 2489–2496, 2009.

BETTS, D. *et al.* The prognostic significance of cytogenetic aberrations in childhood acute myeloid leukaemia. A study of the Swiss Paediatric Oncology Group (SPOG). **European Journal of Haematology**, v. 78, p. 468-76, 2007.

BENNETT, J. *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. **Br. J. Hematol.**, v. 33, p. 451-458, 1976.

BENNETT, J. *et al.* Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. **Ann Intern Med.**, v. 103, p.620-625a, 1985.

BENNETT, J. *et al.* Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML MO). **Brj Haematol.**, v. 78, p. 325-9, 1991.

BINT, S; DAVIES, A; OGILVIE, C. Multicolor banding remains an important adjunct to array CGH and conventional karyotyping. **Molecular Cytogenetics**, v. 6(55), p.1-9, 2013.

BISHOP, R. *Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance.* **Bioscience Horizons**, v. 3(1), p. 85-95, 2010.

BLOOMFIELD, C; FOON, K; LEVINE, E. Leukemias. *In: CANELLOS et al. Medical Oncology* 2nd, McGraw-Hill, Inc. 1993. p. 459-501.

BOCHTLER, T. *et al. Clonal Heterogeneity As Detected by Metaphase Karyotyping is an Indicator of Poor Prognosis in Acute Myeloid Leukemia.* **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, p. 1-10, 2013.

BOCHTLER, T. *et al. Marker chromosomes can arise from chromothripsis and predict adverse prognosis in acute myeloid leukemia.* **Blood**, v. 129(10), p. 1333-1342, 2017.

BRAOUDAKI, M; TZORTZATOU-STATHOPOULOU, F. *Clinical Cytogenetics in Pediatric Acute Leukemia: An Update.* **Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia**, v. 12(4), p. 230-7, 2012.

BYRD, J. *Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461): Presented in part at the 43rd annual meeting of the American Society of Hematology, Orlando, FL, December 10, 2001, and published in abstract form.59.* **Blood**, v. 100, p. 4325-4336, 2002.

CAPELA DE MATOS, R. *et al. 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 Haematologica**, v.134, p. 243–245, 2015.

CAPELA DE MATOS, R. *et al.* *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.* **Cytogenet Genome Res**, online, p. 1-5, 2017.

CAPELA DE MATOS, R. *et al.* *Molecular approaches identify a cryptic MECOM rearrangement in a child with a rapidly progressive myeloid neoplasm.* **Cancer Genetics**, v. 221, p. 25–30, 2018.

CREUTZIG, U. *et al.* *Randomized trial comparing liposomal daunorubicin with idarubicin as induction for pediatric acute myeloid leukemia: results from Study AML-BFM 2004.* **Blood**, v. 122, p. 37–43, 2013.

CREUTZIG, U. *et al.* *Acute myelogenous leukemia in adolescents and young adults.* **Pediatr Blood Cancer**. v. 65, e27089, 2018.

CUCUIANU, A. *Dominant and opportunistic leukemic clones: Proposal for a pathogenesis-oriented classification in acute myeloid leukemia.* **Med Hypotheses.**, v. 65, p.107-113, 2005.

CUNEO, A. *et al.* *Incidence and significance of cryptic chromosome aberrations detected by fluorescence in situ hybridization in acute myeloid leukemia with normal karyotype.* **Leukemia**, v. 16, p. 1745-1751, 2002.

DAS, K; TAN, P. *Molecular cytogenetics: recent developments and applications in cancer.* **Clin Genet.**, v. 84, p. 315–325, 2013.

DASER, A; RABBITS, T. *Extending the repertoire of the mixed-lineage leukemia gene MLL in leukemogenesis.* **Genes Dev**, v. 18(9), p. 965-974, 2004.

DE BRAEKELEER, M. *et al.* *3q26/EVI1 rearrangements in myeloid hemopathies: a cytogenetic review.* **Future Oncol.**, v. 11(11), p. 1675–1686, 2015.

DE FIGUEIREDO, A. *et al.* *A new cryptic ins(11;1)(q23;q21q31) detected in a t(1;8;11)(q21;p21;q23) in a baby with acute myeloid leukemia FAB AML-M5.* **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 45, p. 197–198, 2010.

DE FIGUEIREDO, A. *et al.* *A complex karyotype masked a cryptic variant t(8;21)(q22;q22) in a child with acute myeloid leukemia.* **Leukemia & Lymphoma**, v. 52(8), p. 1593–1596, 2011.

DE FIGUEIREDO, A. *et al.* *A rare cryptic and complex rearrangement leading to MLLMLLT10 gene fusion masked by del(10)(p12) in a child with acute monoblastic leukemia (AML-M5).* **Leukemia Research**, v. 36, p. e74– e77, 2012.

DE FIGUEIREDO, A. *et al.* *Molecular cytogenetic studies characterizing a novel complex karyotype with an uncommon 5q22 deletion in childhood acute myeloid leukemia.* **Molecular Cytogenetics**, v. 8:62, p. 1-5, 2015.

DE JONGE, H. *et al.* *Prognostic impact of white blood cell count in intermediate risk acute myeloid leukemia: relevance of mutated NPM1 and FLT3-ITD.* **Haematologica**, v. 96(9), p. 1310-1317, 2011.

DE ROOIJ, J; ZWAAN, C; HEUVEL-EIBRINK, M. *Pediatric AML: From Biology to Clinical Management.* **J. Clin. Med**, v. 4, p. 127-149, 2015.

DÖHNER, H. *et al.* *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet.* **Blood**, v. 115, p. 453-474, 2010.

DOWNING, J. *et al.* An AML1/ETO fusion transcript is consistently detected by RNA-based polymerase chain reaction in acute myelogenous leukemia containing the (8;21)(q22;q22) translocation. **Blood**, v. 81, p. 2860-2865, 1993.

EISENMANN, K. *et al.* 5q- myelodysplastic syndromes: chromosome 5q genes direct a tumor-suppression network sensing actin dynamics. **Oncogene**, v.28, p. 3429–41, 2009.

EMANUEL, B; SAITTA, S. *From microscopes to microarrays: dissecting recurrent chromosomal rearrangements.* **Nature Review Genetic**, v. 8, p. 869-83, 2007.

EMERENCIANO, M. *et al.* The Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukaemia. The distribution of MLL breakpoints correlates with outcome in infant acute leukaemia. *Brit J Haematol.*, v. 161, p. 224e236, 2013.

ESTEY, E; DÖHNER, H. *Acute myeloid leukemia.* **Lancet**, v. 368, p. 1894–907, 2006.

GALLEGO, M. *et al.* Variant t(8;21) rearrangements in acute myeloblastic leukemia of childhood. **Cancer Genet Cytogenet.**, v. 75, p. 139-144, 1994.

GAMERDINGER, U. *et al.* Cryptic chromosomal aberrations leading to an AML1/ETO rearrangement are frequently caused by small insertions. **Genes Chromosome Cancer**, v. 36, p. 261-272, 2003.

GILLILAND, D; JORDAN, C; FELIX, C. *The Molecular Basis of Leukemia.* **American Society of Hematology**, p. 80-97, 2004.

GOODWIN, S; MCPHERSON, J; MCCOMBIE, W. *Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies*. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, p. 333–351, 2016.

GREGAN J. *et al. Merotelic kinetochore attachment: causes and effects*. **Trends Cell Biol**, v. 21(6), p. 374–381, 2011.

GREISMAN, H; HOFFMAN, N; HI, H. *Rapid High-Resolution Mapping of Balanced Chromosomal Rearrangements on Tiling CGH Arrays*. **JMD**, v. 13(6), p.621-33, 2011.

GRIMWADE, D. *The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial*. *Blood*, v.98, p. 1312-1320, 2001.

HAFERLACH, C. *et al. Three novel cytogenetically cryptic EVI1 rearrangements associated with increased EVI1 expression and poor prognosis identified in 27 acute myeloid leukemia cases*. **Genes Chromosomes Cancer.**, v. 51, p. 1079–1085, 2012.

HARRIS N. *et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting—Airlie House, Virginia, November 1997*. **J Clin Oncol.**, v. 17, p. 3835–49, 1999.

HARRISON, C. *et al. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom medical research council treatment trials AML 10 and 12*. **J Clin Oncol.**, v. 28(16), p. 2674–81, 2010.

HASLE, H. *et al.* *Monosomy 7 and deletion 7q in children and adolescents with acute myeloid leukemia: an international retrospective study.* **Blood**, v. 109(11), p. 4641-7, 2007.

HEAD, D. Classification and Differentiation of the Acute Leukemias. *In*: GREER, J.P. *et al.* **Wintrobe's Clinical Hematology**. 12nd, Lippincott Williams & Wilkins, 2009. p. 1808-1018.

HEEREMA-MCKENNEY, A; ARBER, D. *Acute myeloid leukemia.* **Hematol Oncol Clin N Am.**, v. 23, p.633-54, 2009.

HOLLAND, A; CLEVELAND, D. *Mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements in cancer and developmental diseases.* **Nat Med**, v. 18(11), p. 1630–1638, 2012.

HURET, J. *t(11;19)(q23;p13.3).* **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol**. 1998. Disponível em: < <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t1119ENLID1071.html>>. Acesso em Jan. 2019.

INCA. Leucemia. Disponível em:

<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia>>. Acesso em: Dez. 2018.

INCA. Leucemia Aguda. Disponível em:

<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/subtipos+>>>. Acesso em: Dez. 2018.

INCA. Epidemiologia dos tumores da criança e do adolescente. Disponível em:

<<https://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: Dez. 2018.

JÁCOMO, R; DE FIGUEIREDO-PONTES, L; REGO, E. Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 54(1), p. 82-9, 2008.

JOHNSTON, D. *et al.* Outcome of Pediatric patients with with acute myeloid leukemia (AML) and -5/5q- abnormalities from five pediatric AML treatment protocols: a report from the Children's Oncology Group. **Pediatr Blood Cancer.**, v. 60, p. 2073–78, 2013.

KASPERS, G; REINHARDT, D. Acute myeloid leukaemia. *In*: STEVENS, M; CARON, H; BIONDI, A. **Cancer in Children: Clinical Management.** 6th, Oxford, 2011. p. 174-188.

KEARNEY, L. *Molecular Cytogenetics.* **Best Pract & Res Clin Haematol.**, v. 14, p.645-668, 2001.

KIM, H. *et al.* Acute myeloid leukemia with a RUNX1-RUNX1T1 t(1;21;8) (q21;q22;q22) novel variant: a case report and review of the literature. **Acta Hematol.**, v. 125, p. 237-241, 2011.

KLAUS, M. *et al.* Cytogenetic profile in de novo acute myeloid leukemia with FAB subtypes M0, M1 and M2: a study based on 652 cases fluorescence in situ hybridization. **Cancer Genet Cytogenet.**, v. 155, p. 47-56, 2004.

KRIVTSOV, A. *et al.* Transformation from committed progenitor to leukemia stem cells. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1176, p. 144–149, 2009.

KUNDU, M; LIU, P. Function of inv(16) fusion gene CBFβ-MYH11. **Cur. Opin. Hematol.**, v. 8, p. 201-205, 2001.

LIEHR, T; CLAUSSEN, U. *Multicolor FISH approaches for the characterization of human chromosomes in clinical genetics and tumor cytogenetics*. **Curr Genomics**, v. 3, p. 213-35, 2002.

LIEHR, T. *et al. Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes*. **Int. J Mol. Med.**, v. 9, p.335-339, 2002.

LO-COCO, F; AMMATUNA, E. *The Biology of Acute Promyelocytic Leucemia and its impact on diagnosis and treatment*. **American Society of Hematology**, v. 514, p. 516-161, 2006.

LO-COCO, F; SANZ, M. *Whole-genome sequencing and acute promyelocytic leukemia*. **JAMA**. v. 306, p. 610–611, 2011.

LO NIGRO, L. *et al. Prognostic impact of t(9;11) in childhood acute myeloid leukemia (AML)*. **Leukemia**, v. 17, p. 636, 2003.

LÜDECKE, H. *et al. Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification*. **Nature**, v. 338, p. 348-350, 1989.

LUO, R. *et al. The elongation domain of ELL is dispensable but its ELL-associated factor 1 interaction domain is essential for MLL-ELL–induced leukemogenesis*. **Mol Cell Biol.**, v. 21, p. 5678–5687, 2001.

MANOLA, K. *Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia*. **European Journal of Haematology**, v. 83, p. 391-405, 2009.

MARCHESI, F. *et al.* *Cytogenetic abnormalities in adult non-promyelocytic acute myeloid leukemia: A concise review.* **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 80, p. 331–346, 2011.

MARGULIES, M. *et al.* *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors.* **Nature**, v. 437, p. 376–380, 2005.

MARQUES-SALLES, T. *et al.* *A new chromosomal three-way rearrangement involving MLL masked by a t(9;19)(p11;p13) in an infant with acute myeloid leukemia.* **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 189, p.59-62, 2009.

MARSCHALEK, R. *MLL Leukemia and Future Treatment Strategies.* **Arch. Pharm. Chem. Life Sci.**, v. 348, p. 221–228, 2015.

MARTINEAU, M. *et al.* *The t(6;11)(q27;q23) translocation in acute leukemia: a laboratory and clinical study of 30 cases. EU concerted action 11q23 Workshop participants.* **Leukemia**, v. 12, p. 788–91, 1998.

MARTINEZ-CLIMENT, J. *Molecular cytogenetics of childhood hematological malignancies.* **Leukemia**, v. 11, p.1999–2021, 1997.

MATOS, R. *et al.* *An Unusual Cytogenetic Rearrangement Originating from Two Different Abnormalities in Chromosome 6 in a Child with Acute Promyelocytic Leukemia.* **Acta Haematol.**, v. 130(1), p.23-6, 2013.

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

MEYER, C. *et al.* *The MLL recombinome of acute leukemias in 2017.* **Leukemia**, v. 32, p. 273–284, 2017.

MOHAN, M; LIN, C; GUEST, E. *Licensed to elongate: a molecular mechanism for MLL-based leukaemogenesis.* **Nat Rev Cancer.**, v. 10, p. 721-728, 2010.

MRÓZEK, K. *et al.* *Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia.* **Semin Oncol**, v. 24, p.17, 1997.

MRÓZEK, K. *et al.* *Spectral karyotyping in patients with acute myeloid leukemia and a complex karyotype shows hidden aberrations, including recurrent overrepresentation of 21q, 11q and 22q.* **Genes Chromosomes Cancer**, v. 34, p. 137-153, 2002.

MRÓZEK, K; HEEREMA, N; BLOOMFIELD, C. *Cytogenetics in acute leukemia.* **Blood Reviews**, v. 18, p. 115-134, 2004.

MRÓZEK, K. *Acute Myeloid Leukemia with a Complex Karyotype.* **Semin Oncol.** v. 35(4), p. 365-77, 2008.

MUNTEAN, A. *Mechanisms of mixed-lineage leukemia.* **Int J Hematol Oncol.** v. 2(3), p. 207-217, 2013.

NAKASE, K. *et al.* *Acute promyelocytic leukemia with del(6)(p23).* **Leuk Res.**, v. 24, p. 79–81, 2000.

NEY-GARCIA, D. *et al.* *A case of childhood T cell acute lymphoblastic leukemia with a complex t(9;9) and homozygous deletion of CDKN2A gene associated with a*

Philadelphia-positive minor subclone. Blood Cells, Molecules, and Diseases, p. 1-3, 2012.

NEY-GARCIA, D. *et al. Molecular characterization of KMT2A fusion partner genes in 13 cases of pediatric leukemia with complex or cryptic karyotypes. Hematological Oncology*, p. 1-9, 2016.

NOWELL, P; HUNGERFORD, D. *A minute chromosome in human granulocytic leukemia. Science*, v. 132, p. 1497, 1960.

ONODERA N. *et al. Formation of a hyperdiploid karyotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood*, v. 80, p. 203-8, 1992.

OROZCO, F; APPELBAUM, J. *Unfavorable, Complex, and Monosomal Karyotypes: The Most Challenging Forms of Acute Myeloid Leukemia. Cancer net. Oncology*, p. 1-10, 2012.

PELOQUIN, G; CHEN, Y; FATHI, A. *The evolving landscape in the therapy of acute myeloid leukemia. Protein and Cell*, p. 1-12, 2013.

PUI, C-H. *et al. Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. Journal of Clinical Oncology*, v. 29(5), p. 551-65, 2011.

RADHI, M; MESHINCHI, S; GAMIS A. *Prognostic Factors in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. Curr Hematol Malig Rep.*, v. 5, p. 200–206, 2010.

RAIMONDI, S. *Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia.* **Blood**, v. 81, p. 2237-51, 1993.

RAIMONDI, S. *et al. Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative Pediatric Oncology Group Study – POG 8821.* **Blood**, v. 94, p. 3707-3716, 1999.

RAZZOUK, B. *et al. Impact of age on outcome of pediatric acute myeloid leukemia: a report from 2 institutions.* **Cancer**, v. 106(11), p. 2495-502, 2006.

REGO, E; FALCÃO, R. *Leucemia Mielóide Aguda Diagnóstico: Morfologia, Imunofenótipo e Citogenética.* **Série Monografia Escola Brasileira de Hematologia**, v. 9, p.54-65, 2002.

ROSS, J. *et al. Genetics and the Epidemiology of Leukemia in Children. In: REAMAN, G.H.; SMITH, F.O. Childhood leukemia – A Practical Handbook.* Springer, 2011. p 3-21.

ROWLEY, J. *The critical role of chromosome translocations in human leukemias.* **Ann. Ver. Genet.**, v. 32, p. 495-519, 1999.

RUBNITZ, J. *et al. Favorable impact of the t(9;11) in childhood acute myeloid leukemia.* **J Clin Oncol.**, v. 20, p. 2302-9, 2002.

RUND, D; BEN-YEHUDA, D. *Therapy-related leukemia and myelodysplasia: evolving concepts of pathogenesis and treatment.* **Hematol.**, v. 9, p.179-87, 2004.

SANDLER, D; ROSS, J. *Epidemiology of acute leukemia in children and adults. Seminars in Oncology*, v. 24 (1), p. 3-16, 1997.

SCHOCH, C. *et al. Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients. British Journal of Haematology*, v. 112, p. 118-26, 2001.

SCHRÖCK, E. *et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. Science*, v. 273, p. 494-497, 1996.

SENGER, G. *et al. Microdissection of banded human chromosomes. Hum Genet.*, v. 84, p. 507-11, 1990.

SILVA, M. *et al. Banding and molecular cytogenetic studies detected a CFBF-MYH11 fusion gene that appeared as abnormal chromosomes 1 and 16 in a baby with acute myeloid leukemia FAB M4-Eo. Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 182, p. 56-60, 2008.

SOBOPE. Disponível em:

<www.sobope.org.br/>. Acesso em: Dez. 2018.

SPEICHER, M; BALLARD, S; WARD, D. *Karyotyping human chromosomes by combinatorial multicolor FISH. Nat Genet.*, v. 2, p. 368-375, 1996.

STORLAZZI, C. *et al. A novel chromosomal translocation t(3;7)(q26;q21) in myeloid leukemia resulting in overexpression of EVI1. Ann Hematol.*, v. 83(2), p. 78–83, 2004.

TANAKA, K. *et al.* Complex 8;21 chromosome translocations formed by two step mechanism and simple 8;21 chromosome translocation without AML1 gene involvement in acute myelocytic leukemia. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 5(3), p. 2240-52, 2012.

TELENIUS, H. *et al.* Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. **Genomics**, v. 13, p.718-25, 1992.

UDAYAKUMAR, A. *et al.* Complex $t(8;13;21)(q22;q14;q22)$ - A Novel Variant of $t(8;21)$ in a Patient with Acute Myeloid Leukemia (AMLeM2). **Archives of Medical Research**, v. 39, p. 252-256, 2008.

VALCÁRCEL, D. *et al.* Complex, Not Monosomal, Karyotype Is the Cytogenetic Marker of Poorest Prognosis in Patients With Primary Myelodysplastic Syndrome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31(7), p. 916-22, 2013.

VAN LIMBERGEN, H. *et al.* Molecular cytogenetic analysis of 10;11 rearrangements in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 16, p.344-51, 2002.

VAN PROOIJEN-KNEGT, A. *et al.* In situ hybridization of DNA sequences in human metaphase chromosomes visualized by indirect fluorescent immunocytochemical procedure. **Exp. Cell Res.**, v. 141, p. 397-407, 1982.

VARNUM, B. *et al.* Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. **Nature**, v. 373, p. 623–626, 1995.

VARDIMAN, J; HARRIS, N; BRUNNING, R. **The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms.** **Blood**, v. 100(7), p. 2292-302, 2002.

VON NEUHOFF, C. *et al.* Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98. **J Clin Oncol.**, v. 28(16), p. 2682–9, 2010.

XU, W. *et al.* Trisomy 22 as the sole abnormality is an important marker for the diagnosis of acute myeloid leukemia with inversion 16. **Oncologie**, v. 31, p. 440–4, 2008.

WEISE, A. *et al.* Molecular Definition of high-resolution Multicolor Banding Probes: First within the human DNA sequence anchored FISH banding probe set. **J Hist & Cytoch.**, v. 56, p 487-93, 2008.

WHITMAN, S. *et al.* GAS6 expression identifies high-risk adult AML patients: potential implications for therapy. **Leukemia**, v. 28, p. 1252–1258, 2014.

YAMAMOTO, Y. *et al.* Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. **Blood**, v. 97, p. 2434-2439, 2001.

ZHANG, L; ZHU, X. Epidemiology, diagnosis and treatment of acute promyelocytic leukemia in children: the experience in China. **Mediterr J Hematol Infect Dis.**, v. 4(1), p. e2012012, 2012.

ZECH, L. Investigation of metaphase chromosomes with DNA-binding. **Exp Cell Res**, v. 58, p. 463, 1969.

Anexos

Anexo I - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do INCA



Memo 100/08-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 19 de março de 2008

A(o); Dr(a). Maria Luiza Macedo Silva
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP nº 088/07 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)
Título do Projeto: "Estudo cromossômico consecutivo multicêntrico da Leucemia Mielóide Aguda da Infância"

Prezado Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer após re-análise aprovou o Protocolo intitulado: **Estudo cromossômico consecutivo multicêntrico da Leucemia Mielóide Aguda da Infância**, bem como seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (versão 3)** em 19 de março de 2008.

Ressaltamos que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o pesquisador responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu protocolo que estão previstos para as seguintes datas: setembro/2008 e março/2009.

Estamos encaminhando a documentação pertinente para a CONEP com vistas à análise.

Atenciosamente

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

C/c – Dra. Eliana Abdelhay – Chefe do Serviço de Atividades Laboratoriais – CEMO

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

Roberto R. Capela de Matos^{a,c} Amanda F. De Figueiredo^{a,c} Thomas Liehr^d
Eyad Alhourani^d Mariana T. De Souza^{a,c} Renata Binato^b Raul C. Ribeiro^e
Maria Luiza Macedo Silva^{a,c}

Departments of ^aCytogenetics and ^bStem Cells, Bone Marrow Transplantation Unit, and ^cPost Graduation Program in Oncology, National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil; ^dJena University Hospital, Friedrich Schiller University Institute of Human Genetics, Jena, Germany; ^eDepartment of Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tenn., USA

© Free Author Copy - for personal use only

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Written permission to distribute the PDF will be granted against payment of a permission fee, which is based on the number of accesses required. Please contact permission@karger.com

The translocation t(8;21)(q22;q22)/RUNX1/RUNX1T1 is one of the most common translocations in pediatric acute myeloid leukemia (AML), accounting for 10–20% of all cases [1]. At the molecular genetic level, the rearrangement is defined by involvement of the RUNX1 (AML1) gene on chromosome 21q22 and the RUNX1T1 (ETO) gene on chromosome 8q22, resulting in the RUNX1/RUNX1T1 (AML1/ETO) fusion gene product [2]. The fusion protein disrupts the core binding factor transcription complex, leading to abnormalities in cell differentiation, proliferation and apoptosis. It is also thought that the fusion product is a driver of myeloid leukemogenesis in this AML subtype [3].

Approximately 3–4% of cases of AML with the t(8;21)(q22;q22) occur in the context of complex rearrangements. Although t(8;21) is associated with a good prognosis, the impact of the complex t(8;21) variants is controversial. Some researchers have reported a favorable outcome for AML patients with complex t(8;21) variants, while others have not confirmed these observations [4];

in these series, almost all of the patients were adults [2, 4, 5]. The clinical relevance and implications of t(8;21) variants in pediatric patients are yet to be determined. These translocations are rare, so there is limited information on their prognostic impact. Thus, to make a contribution to the registry of t(8;21) with complex variants, we present a case that belongs to this rare subgroup. We report on a child with AML harboring a novel three-way cryptic variant t(8;13;21), as revealed by detailed molecular studies.

From May 2007 to March 2014, we analyzed samples from 114 children and adolescents (aged 0–18 years) with AML, 13 (11.4%) of whom harbored the t(8;21)(q22;q22) and were examined by means of GTG banding, fluorescence in situ hybridization (FISH) and RT-PCR. Of these 13 RUNX1/RUNX1T1-positive patients, 3 (2.6%) did not have classic t(8;21) by conventional karyotyping. When FISH assay was performed, it was possible to observe that there was a third chromosome involved, with a RUNX1/RUNX1T1 split signal, thus characterizing

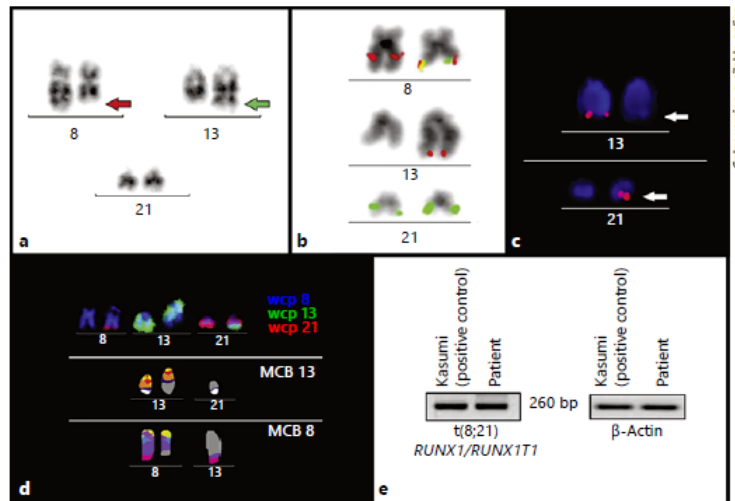
KARGER 125

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/aha

© 2015 S. Karger AG, Basel
0001-5792/15/1344-0243\$39.50/0

Maria Luiza Macedo Silva, PhD
Laboratório de Citogenética (CEMO)
Praça da Cruz Vermelha 23, 6th Floor
Rio de Janeiro, RJ 20230-130 (Brazil)
E-Mail luzamacedo@inca.gov.br

Fig. 1. **a** Partial G-banding karyotype. The red arrow shows a missing portion in chromosome 8, and the green arrow shows a gain of chromosomal material on chromosome 13. **b** FISH with the *AML1/ETO* dual-color, dual-fusion probe, showing the *RUNX1/RUNX1T1* fusion on derivative chromosome 8 and a *RUNX1T1* split signal to chromosome 13. **c** Complementary FISH, with a subtelomeric probe for the 13qter region, revealing that a portion of this region was translocated to chromosome 21. **d** FISH with whole-chromosome painting (wcp) probes and MCB for chromosomes 8, 13 and 21, showing the origin and the breakpoints of each rearrangement. **e** RT-PCR confirmed the presence of the *RUNX1/RUNX1T1* fusion and revealed a PCR product of 260 base pairs (bp).



a masked variant of t(8;21). These 3 cases were then selected to be studied by means of multicolor chromosome banding (MCB). We describe a novel t(8;13;21) in detail.

A 13-year-old girl was admitted with a 5-month history of pallor and upper-airway symptoms associated with persistent fever, otalgia and dysacusia. At admission, she had a white blood cell count of $22 \times 10^9/l$, a platelet count of $96 \times 10^9/l$ and hemoglobin of 6.2 g/dl. A chest X-ray showed consolidation in the lower/upper/left/right lobes, consistent with bacterial pneumonia. Physical examination revealed lymphadenopathy in the cervical and inguinal regions, hepatomegaly (4 cm) and splenomegaly (7 cm). The bone marrow was hypercellular with 64% myeloid blast cells positive for CD45, CD34, CD117, MPO, CD33, CD13, HLA-DR, CD123, CD15 and CD19, i.e. compatible with AML.

GTG banding analysis defined the karyotype as 45,X,-X,del(8)(q22),der(13q3?) in 23 metaphases (fig. 1a). FISH analysis confirmed a cryptic fusion *RUNX1/RUNX1T1* on derivative chromosome 8, with the presence of a *RUNX1T1* split signal on derivative chromosome 13 (fig. 1b). Complementary FISH analysis using a subtelomeric probe for the 13q region, showed a 13qter minor signal on chromosome 21 characterizing a cryptic translocation (fig. 1c). The application of whole-chromosome painting probes for chromosomes 8, 13 and 21 revealed a three-way translocation. To characterize the

breakpoints of this complex rearrangement, MCB studies were applied revealing the karyotype: 45,X,-X,t(8;13;21)(q22;q33;q22) (fig. 1d). RT-PCR for the *RUNX1/RUNX1T1* fusion revealed a product of 260 base pairs (fig. 1e).

The patient was stratified as being at standard risk, and was treated according to the AML-BFM-2004 protocol [6]. She achieved complete remission, but after receiving an intensification block, she developed febrile neutropenia and sepsis. She died of cardiac and respiratory failure 5 months after the initial diagnosis.

There are at least two steps for the formation mechanism of the complex t(8;21), following the formation of standard t(8;21)(q22;q22) and the *RUNX1/RUNX1T1* fusion gene [7]. Material from the distal long arm of chromosome 21q22 translocates to the long arm of chromosome 8, but the end of chromosome 8 translocates to a third chromosome. The remainder of the third chromosome translocates to chromosome 21. The same behavior may have occurred in the translocation in our patient and in 2 others previously reported [7, 8].

The involvement of chromosome 13 in a complex t(8;21) variant has, so far, been reported in 3 patients [7, 8] including ours. In contrast to the other cases, the variant t(8;13;21)(q22;q33;q22) described here presented as a masked karyotype on GTG banding, and additional material was cryptically translocated on derivative chromo-

some 21, thus adding a novel t(8;13;21) variant to the literature.

Although the t(8;21) complex variant accounts for only 0.05–1.1% of cases of childhood AML [2, 4, 5, 9], its frequency was higher (approx. 2.6%) in our cohort, suggesting that, in pediatric AML, a detailed characterization of *RUNX1T1* split signal via a combination of FISH, MCB and RT-PCR approaches may be necessary to uncover such complex variants. In our cohort as well as in the previously described cases [7, 8], the *RUNX1T1* gene (8q22) often splits to the third chromosome involved in the translocation. Thus, the observation that a similar formation mechanism of the complex t(8;21) variant that preferentially involves the same chromosome regions, along with the higher frequency of complex t(8;21) variants (that we observed in our cohort), reinforces the importance of the clarification of such complex cases in order to investigate if the genes in these regions are involved in leukemogenesis.

Furthermore, it is important that cases with complex conventional karyotypes and a *RUNX1/RUNX1T1* split signal involving ≥ 3 chromosomes are analyzed by a com-

bination of molecular assays. This approach can provide further knowledge about the heterogeneity of the *RUNX1/RUNX1T1* fusion gene and a possible association with prognosis. Finally, future studies involving bacterial artificial chromosome probes and next-generation sequencing are required to further pinpoint the breakpoint regions and describe the genes involved in all of the fusions that result from these complex rearrangements [10, 11].

Acknowledgements

The authors thank Daniela Ribeiro Ney Garcia and the hematologist Fabia Neves for their contributions. We are grateful to Sharon Naron for editing the manuscript. This work was supported by the Stefan Morsch Stiftung and the Monika Kutzner Stiftung (Germany), the German CAPES (PROBRAL/DAAD No. 419/14), Fellowships to Moneeb Othman by DAAD and to Eyad Alhourani by KAAD, CNPq (project No. 473878/2011-9) and FAPERJ (project No. E-26/110:868/2013), the Pró-Vita non-profit organization, INCT Para o Controle do Câncer, the American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC), the St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, Tenn., USA) and Center of Excellence Grant, Tenn., USA.

References

- 1 Manola KN: Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2009;83:391–405.
- 2 Huang L, Abruzzo LV, Valbuena JR, Medeiros LJ, Lin P: Acute myeloid leukemia associated with variant t(8;21) detected by conventional cytogenetic and molecular studies. *Am J Clin Pathol* 2006;125:267–272.
- 3 Mangan JK, Speck NA: *RUNX1* mutations in clonal myeloid disorders: from conventional cytogenetics to next generation sequencing, a story 40 years in the making. *Crit Rev Oncol* 2011;16:77–91.
- 4 Bae SY, Kim JS, Ryeu BJ, Lee KN, Lee CK, Kim YK, Lim CS, Cho Y, Choi CW, Ryu SW, Yoon SY: Acute myeloid leukemia (AML-M2) associated with variant t(8;21): report of three cases. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;199:31–37.
- 5 Kim H, Moon HW, Hur M, Yun YM, Lee MH: Acute myeloid leukemia with a *RUNX1-RUNX1T1* t(1;21;8)(q21;q22;q22) novel variant: a case report and review of the literature. *Acta Haematol* 2011;125:237–241.
- 6 Creutzig U, Zimmermann M, Bourquin JP, Dworzak MN, Fleischhack G, Graf N, Klingebiel T, Kremens B, Lehrnbecher T, von Neuhoff C, Ritter J, Sander A, Schrauder A, von Stackelberg A, Stary J, Reinhardt D: Randomized trial comparing liposomal daunorubicin with idarubicin as induction for pediatric acute myeloid leukemia: results from Study AML-BFM 2004. *Blood* 2013;122:37–43.
- 7 Udayakumar AM, Alkindi S, Pathare AV, Raeburn JA: Complex t(8;13;21)(q22;q14;q22) – a novel variant of t(8;21) in a patient with acute myeloid leukemia (AML-M2). *Arch Med Res* 2008;39:252–256.
- 8 Gallego M, Carroll AJ, Gad GS, Pappo A, Head D, Behm F, Ravindranath Y, Raimondi SC: Variant t(8;21) Rearrangements in acute myeloblastic leukemia of childhood. *Cancer Genet Cytogenet* 1994;75:139–144.
- 9 De Figueiredo AF, Liehr T, Bhatt S, Binato R, De Souza MT, Capela de Matos RR, Marques Salles TJ, Jordy FC, Ribeiro RC, Abdelhay E, Silva MLM: A complex karyotype masked a cryptic variant t(8;21)(q22;q22) in a child with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2011;52:1593–1596.
- 10 Weise A, Mrasek K, Fickelscher I, Claussen U, Cheung SW, Cai WW, Liehr T, Kosyakova N: 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.
- 11 Dunham A, Matthews LH, Burton J, Ashurst JL, Howe KL, Ashcroft KJ, Beare DM, Burford DC, Hunt SE, Griffiths-Jones S, Jones MC, Keenan SJ, Oliver K, Scott CE, Ainscough R, Almeida JP, Ambrose KD, Andrews DT, Ashwell RIS, Babbage AK, Bagguley CL, Bailey J, Bannerjee R, Barlow KF, Bates K, Beasley H, Bird CP, Bray-Allen S, Brown AJ, Brown JY, Burrill W, Carder C, Carter NP, Chapman JC, Clamp ME, Clark SY, Clarke G, Clee CM, Clegg SCM, Cobley V, Collins JE, Corby N, Cowille GJ, Deloukas P, Dhami P, Dunham I, Dunn M, Earthrowl ME, Ellington AG, Faulkner L, Frankish AG, Frankland J, French L, Garner P, Garnett J, Gilbert JGR, Gilson CJ, Ghori J, Grafham DV, Gribble SM, Griffiths C, Hall RE, Hammond S, Harley JL, Hart EA, Heath PD, Howden PJ, Huckle EJ, Hunt PJ, Hunt AR, Johnson C, Johnson D, Kay M, Kimberley AM, King A, Laird GK, Langford CJ, Lawlor S, Leongamornlert DA, Lloyd DM, Lloyd C, Loveland JE, Lovell J, Martin S, Mashreghi-Mohammadi M, McLaren SJ, McMurray A, Milne S, Moore MJF, Nickerson T, Palmer SA, Pearce AV, Peck AI, Pelan S, Phillimore B, Porter KM, Rice CM, Searle S, Sehra HK, Showkeen R, Skuce CD, Smith M, Steward CA, Sycamore N, Tester J, Thomas DW, Tracey A, Tromans A, Tubby B, Wall M, Wallis JM, West AP, Whitehead SL, Willey DL, Wilming L, Wray PW, Wright MW, Young L, Coulson A, Durbin R, Hubbard T, Sulston JE, Beck S, Bentley DR, Rogers J, Ross MT: The DNA sequence and analysis of human chromosome 13. *Nature* 2004;428:522–528.

GAS6 Oncogene and Reverse *MLL3-KMT2A* Duplications in an Infant with Acute Myeloid Leukemia and a Novel Complex Hyperdiploid Karyotype: Detailed High-Resolution Molecular Cytogenetic Studies

Roberto R. Capela de Matos^{a,c} Daniela R. Ney Garcia^{a,d} Elaine Cifoni^a
Moneeb A.K. Othman^f Mariana Tavares de Souza^{a,c} Edna K. Carboni^e
Gerson M. Ferreira^b Thomas Liehr^f Raul C. Ribeiro^g Maria Luiza M. Silva^{a,c,d}

Departments of ^aCytogenetics and ^bStem Cells, Bone Marrow Transplantation Unit, and ^cPost-Graduation Program in Oncology, National Cancer Institute (INCA), and ^dClinical Medicine Post-Graduation Program, College of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, and ^ePediatric Oncology Department, Pequeno Príncipe Hospital, Curitiba, Brazil; ^fInstitute of Human Genetics, Jena University Hospital, Jena, Germany; ^gDepartment of Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA

Keywords

Acute myeloid leukemia · Childhood leukemia · Complex karyotype · *GAS6* oncogene · Hyperdiploidy · *MLL3-KMT2A*

Abstract

Pediatric acute myeloid leukemia (AML) is a highly heterogeneous disease, presenting cytogenetic and molecular abnormalities which turned out to be critical prognostic factors. Ploidy changes as gain or loss of individual chromosomes are rare in AML, occurring only in about 1–2% of the affected children. Hyperdiploid karyotypes are exceedingly rare in infants less than 12 months of age. In this age group, structural rearrangements involving the *KMT2A* gene occur in about 58% of the cases. Among them, the translocation *t(9;11)(p22;q23)*, *KMT2A-MLL3*, is the most common ab-

normality accounting for approximately 22% of *KMT2A* rearrangements in infant AML cases. Here, we describe a 7-month-old girl with a history of fever and severe diarrhea, and a physical examination remarkable for pallor and hepatosplenomegaly. A novel complex hyperdiploid karyotype 53,XX,+X,+6,t(9;11)(p21.3;q23.3),+der(9)t(9;11)(p21.3;q23.3),dup(13)(q31q34),+14,+19,+21,+22 was characterized by high-resolution molecular cytogenetic approaches. Fluorescence in situ hybridization, multiplex-FISH, and multicolor chromosome banding were applied, revealing 2 reverse *MLL3-KMT2A* fusions and a duplication of the *GAS6* oncogene. Our work suggests that molecular cytogenetic studies are crucial for the planning of a proper strategy for risk therapy in AML infants with hyperdiploid karyotypes.

© 2017 S. Karger AG, Basel

KARGER

© 2017 S. Karger AG, Basel

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/cgr

Maria Luiza M. Silva, PhD
Laboratório de Citogenética (CEMO)
Praça da Cruz Vermelha 23, 6º Andar
Rio de Janeiro, RJ 20.230-130 (Brazil)
E-Mail luzamacedo@inca.gov.br

Pediatric acute myeloid leukemia (AML) is a highly heterogeneous disease, presenting with specific cytogenetic and molecular abnormalities which have emerged as prognostic indicators [Coenen et al., 2011].

Numerical abnormalities, resulting in ploidy changes as gain or loss of individual chromosomes, are common findings in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL), but are relatively rare in AML. Especially, karyotypes with more than 50 chromosomes are found only in about 1–2% of affected pediatric patients [Sandahl et al., 2014]. Moreover, in AML patients less than 12 months of age, the incidence of hyperdiploid karyotypes is exceedingly rare. Such karyotypes are slightly more frequent in childhood AML-M7 French-American-British (FAB) subtype, and the most commonly detected abnormalities are trisomy of chromosomes 6, 8, 10, 19, and 21 [Braoudaki and Tzortzidou-Stathopoulou, 2012]. To our knowledge, there is only one work in the literature regarding this age group with a large cohort where no case of a hyperdiploid karyotype with more than 50 chromosomes was observed among 172 infants with AML [Lampert et al., 1992]. Thus, so far no prognostication has been established for this age group.

Usually, hyperdiploid AML is characterized by specific chromosomal abnormalities which are associated with an adverse outcome, including -5 , -7 , $del(5q)$, $del(7q)$, and lysine methyltransferase 2A (*KMT2A*) gene rearrangements, and are normally observed in the context of a complex karyotype [Chilton et al., 2014]. Interestingly, karyotypes harboring *KMT2A* gene abnormalities are more frequent in infants less than 12 months of age, including the translocation $t(9;11)(p22;q23)$ as the most common one in this age group. At the molecular level, this translocation is defined by the involvement of the *KMT2A* gene in 11q23 and the *MLLT3* (mixed-lineage leukemia (*trithorax* homolog, *Drosophila*) translocated to 3) gene in 9p22, resulting in the *KMT2A-MLLT3* fusion gene product. This fusion is common among *KMT2A*-positive acute leukemias, corresponding to approximately 3% of the ALL and 22% of infant AML cases. The prognostic implications of $t(9;11)$ are controversial. Some reports suggest that this abnormality has a relatively favorable prognosis, whereas others do not corroborate this impression. According to Lo Nigro et al. [2003], the translocation $t(9;11)$ has an unfavorable prognosis in patients harboring additional abnormalities and/or non-FAB M5.

Growth arrest-specific gene 6 (*GAS6*), an oncogene member of the vitamin K-dependent protein homolog to protein S, is considered a negative regulator of the coagulation pathway. In cytogenetically normal AML, *GAS6*

expression is so far associated with a poor prognosis in adults, due to its association with aggressiveness and chemotherapy resistance [Varnum et al., 1995; Whitman et al., 2014].

Thus, considering the rarity of hyperdiploidy in infants with AML under 1 year of age and the importance of the cytogenetic profile, in this work, we describe a novel complex hyperdiploid karyotype with the involvement of the *KMT2A* gene, harboring 2 reverse *MLLT3-KMT2A* fusions and a duplication of the *GAS6* gene, in an infant with AML FAB-M5a subtype.

Case Report

A 7-month-old girl, admitted to the Hospital Pequeno Príncipe, Curitiba, PR, Brazil, had a 1-week history of fever and severe diarrhea. The infant was irritable but in no distress. Physical examination was remarkable for pallor and hepatosplenomegaly (the liver was 4 cm and the spleen was 2 cm below the costal margins). Laboratory data included hemoglobin level of 7.4 g/dL (age-adjusted range: 13.5–18.0 g/dL), white blood cell count of $22.5 \times 10^9/L$ (age-adjusted range: $4-10 \times 10^9/L$), and platelet count of $64 \times 10^9/L$ ($150-400 \times 10^9/L$). Lactate dehydrogenase was 4,100 U/L (standard: 180–430 U/L). The morphological examination of the bone marrow showed 40% of leukemia monoblastic cells. Flow cytometry revealed a population of leukemia cells expressing CD4, CD15, CD33, CD36, CD45, CD64, protein 7.1 (NG2), and MPO, compatible with acute monoblastic leukemia (AML-M5a). Cerebrum fluid examination was negative for central nervous system leukemia. She was treated according to the AML-BFM-2004 protocol [Creutzig et al., 2013]. The infant, a single daughter, achieved complete remission on day 15 and has been sustaining it for 10 months after unrelated donor allogeneic bone marrow transplantation.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) and cytogenetic analysis were performed at diagnosis. FISH analysis was conducted using the commercially available probe MLL (*KMT2A*)/*MLLT3* dual color, dual fusion (Vysis), according to the manufacturer's instructions.

Results

Three rearranged *KMT2A-MLLT3* fusion signals (Fig. 1A) were noted. G-banding revealed a hyperdiploid karyotype with 53 chromosomes in 15 metaphases analyzed, which included both supernumerary and structural chromosome abnormalities. Two normal metaphases were observed. Molecular cytogenetic analysis by multiplex-FISH (Fig. 1B), partial chromosome painting (Fig. 1C), and multicolor banding (Fig. 1D) approaches, according to Liehr et al. [2013], disclosed the following karyotype: $53,XX,+X,+6,t(9;11)(p21.3;q23.3),+der(9)t(9;11)(p21.3;q23.3),dup(13)(q31q34),+14,+19,+21,+22[6]$.

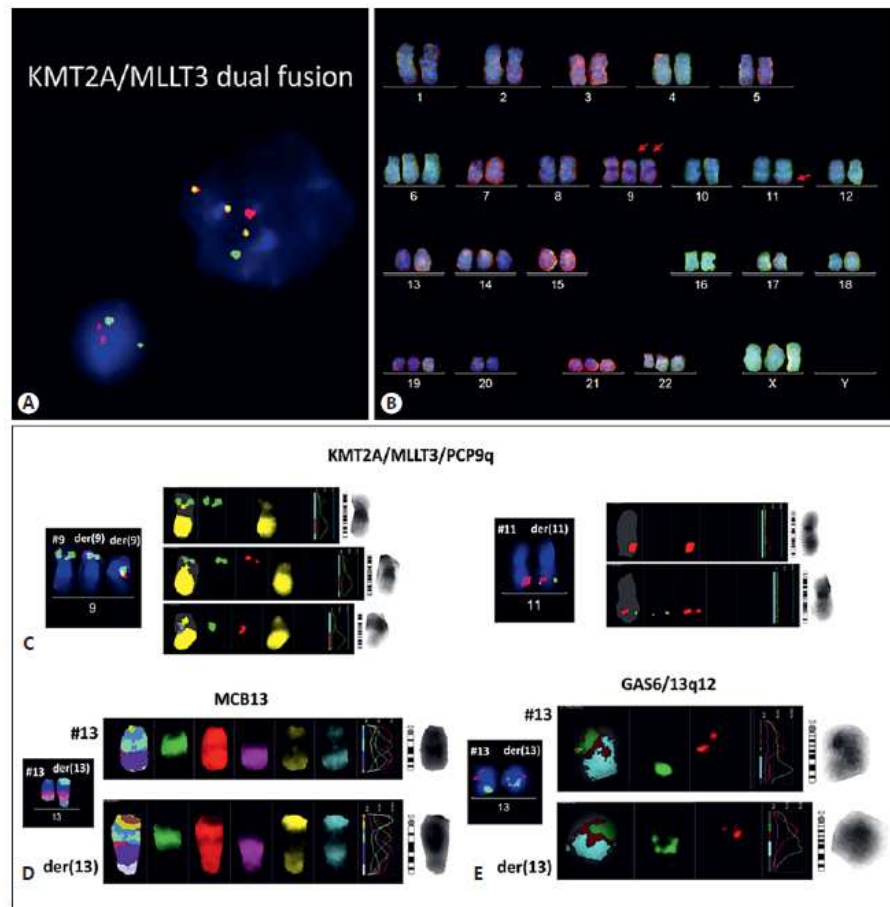


Fig. 1. A Commercial *KMT2A/MLL3* dual color, dual fusion LSI probe showing normal signals of *KMT2A* (red) and *MLL3* (green), and 3 copies of *KMT2A-MLL3* fusion (yellow). **B** Multiplex-FISH revealed clonal trisomies of chromosomes 6, 9, 14, 19, 21, 22, and X, and the presence of structural abnormalities in 2 copies of chromosome 9 and in one chromosome 11 [der(9) and der(11), red arrows]. **C** FISH analysis of chromosomes 9 and 11 with the combination of partial chromosome paint 9q (yellow) and

KMT2A/MLL3 dual color, dual fusion LSI probe showing normal signals of *KMT2A* (red) and *MLL3* (green), and an extra copy of *KMT2A/MLL3* fusion (red/green). **D** Multicolor banding (MCB) analysis of chromosome 13 revealed the duplication of the 13q31q34 region. **E** FISH analysis of the *GAS6* gene (green signal) with the subcentromere control 13q12 (red signal). The analysis shows that 2 copies of *GAS6*, mapped in 13q34, are present in the der(13).

Because the dup(13)(q31q34) involves the region where the *GAS6* gene has been mapped, we used its locus-specific probe to analyze this region. The duplication of band 13q34 was confirmed, and 2 *GAS6* signals were detected on the der(13) (Fig. 1E).

Discussion

The chromosomes involved in the present hyperdiploid karyotype are similar to those previously described in childhood AML [Braoudaki and Tzortatou-Statho-

poulou, 2012; Chilton et al., 2014], except for an abnormal chromosome 13 and trisomy of chromosome 9 producing a cryptic *MLLT3-KMT2A* reverse fusion duplication.

The *KMT2A-MLLT3* fusion produces an in-frame chimeric protein with a transcriptional function that acts within a complex leading to deregulated activation of leukemic target *HOX* genes [Krivtsov and Armstrong, 2007]. Although a reverse fusion *X-KMT2A* is “incompatible,” it is still able to express the *KMT2A* protein, due to the fact that there is a cryptic promoter between intron 11 and exon 12 [Wächter et al., 2014].

The finding of the reverse *MLLT3-KMT2A* fusion duplication is rare, since only 1 other case presenting an extra copy of the translocation t(9;11) was reported in the literature, an AML infant with 47 chromosomes (low hyperdiploidy) [Odero et al., 2001]. Recently, it has been shown that AF4-MLL and a few other reciprocal proteins showed oncogenic effects in vitro and in experiments with murine models [Wächter et al., 2014]; hence, the clinical and oncogenic effects of *MLLT3-KMT2A* gene fusion overexpression still needs to be investigated further. Beyond, an extra copy of a der(9), besides a der(11), corroborates previous findings that the t(9;11) could be an early event in this leukemogenic formation mechanism [De Braekeleer et al., 2010].

The study by Chilton et al. [2014] showed that hyperdiploidy should not be automatically regarded as an adverse cytogenetic risk. Instead, the prognostic value of hyperdiploid karyotypes should be assessed based on the specific aberrations associated with an adverse outcome. Furthermore, Sandahl et al. [2014] also speculated that the outcome is related to specific aberrations. These findings corroborate our study and underscore the importance of hyperdiploid karyotype refinement in infant AML.

In this work, we described for the first time the involvement of the *GAS6* gene in infant AML through gene duplication. *GAS6* is also the ligand for tyrosine kinase receptor *AXL*; thus, its overexpression is related to a worse prognosis due to activation of *AXL*, as well as other members of this receptor’s family such as *TYRO3* and *MERTK*, which together are associated with aggressiveness and chemotherapy resistance [Varnum et al., 1995; Whitman et al., 2014]. This scenario suggests that this duplication could increase the level of *GAS6* expression. Further research needs to be conducted in order to determine the implications of *GAS6* deregulation in pediatric AML.

Conclusion

In conclusion, this case, showing a rare complex hyperdiploid karyotype with duplications of the reverse *MLLT3-KMT2A* fusion and duplication of the *GAS6* oncogene in a child less than 12 months of age, illustrates the heterogeneity of pediatric AML and the importance of molecular cytogenetic tests in selecting cases for further genomic investigations through sequencing approaches. Furthermore, our work suggests that molecular cytogenetic studies are crucial for the characterization of complex karyotypes regarding the planning of proper strategies for risk therapy.

Acknowledgements

The authors acknowledge with gratitude the help of Amanda Faria de Figueiredo. This work was supported by PROBRAL (DAAD No. 419/14), CNPq (project No. 473878/2011-9), and FAPERJ (project No. E-26/110: 868/2013 and E-26/200.50/2016), INCT Para o Controle do Câncer, the St. Jude Children’s Research Hospital (Memphis, TN, USA), and the Center of Excellence Grant, TN, USA. We are, in particular, indebted to the physicians from the many pediatric oncology centers throughout Brazil and from our institution, who supplied us with samples from their patients.

Statement of Ethics

The authors state that the patient’s parents have given their informed written consent. This study was approved by the National Cancer Institute (INCA) ethics committee (Protocol No. 88/07).

Disclosure Statement

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Braoudaki M, Tzortzatou-Stathopoulou F: Clinical cytogenetics in pediatric acute leukemia: an update. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 12:230–237 (2012).
- Chilton L, Hills RK, Harrison CJ, Burnett AK, Grimwade D, Moorman AV: Hyperdiploidy with 49–65 chromosomes represents a heterogeneous cytogenetic subgroup of acute myeloid leukemia with differential outcome. *Leukemia* 28:321–328 (2014).
- Coenen EA, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, et al: Prognostic significance of additional cytogenetic aberrations in 733 de novo pediatric 11q23/MLL-rearranged AML patients: results of an international study. *Blood* 117:7102–7111 (2011).

- Creutzig U, Zimmermann M, Bourquin JP, Dworzak MN, Fleischhack G, et al: Randomized trial comparing liposomal daunorubicin with idarubicin as induction for pediatric acute myeloid leukemia: results from Study AML-BFM 2004. *Blood* 122:37–43 (2013).
- De Braekeleer E, Meyer C, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, et al: Complex and cryptic chromosomal rearrangements involving the *MLL* gene in acute leukemia: a study of 7 patients and review of the literature. *Blood Cells Mol Dis* 44:268–274 (2010).
- Krivtsov AV, Armstrong SA: *MLL* translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 7:823–833 (2007).
- Lampert F, Harbott J, Ritterbach J: Cytogenetic findings in acute leukaemias of infants. *Br J Cancer Suppl* 18:S20–S22 (1992).
- Liehr T, Weise A, Hamid AB, Fan X, Klein E, et al: Multicolor FISH methods in current clinical diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 13:251–255 (2013).
- Lo Nigro L, Bottino D, Panarello C, Morerio C, Mirabile E, et al: Prognostic impact of t(9;11) in childhood acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia* 17:636 (2003).
- Odero MD, Carlson KM, Calasanz MJ, Rowley JD: Further characterization of complex chromosomal rearrangements in myeloid malignancies: spectral karyotyping adds precision in defining abnormalities associated with poor prognosis. *Leukemia* 15:1133–1136 (2001).
- Sandahl JD, Kjeldsen E, Abrahamsson J, Ha SY, Heldrup J, et al: Ploidy and clinical characteristics of childhood acute myeloid leukemia: a NOPHO-AML study. *Genes Chromosomes Cancer* 53:667–675 (2014).
- Varnum BC, Young C, Elliott G, Garcia A, Bartley TD, et al: Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature* 373:623–626 (1995).
- Wächter K, Kowarz E, Marschalek R: Functional characterisation of different *MLL* fusion proteins by using inducible Sleeping Beauty vectors. *Cancer Lett* 352:196–202 (2014).
- Whitman SP, Kohlschmidt J, Maharry K, Volinia S, Mrózek K, et al: *GAS6* expression identifies high-risk adult AML patients: potential implications for therapy. *Leukemia* 28:1252–1258 (2014).



ELSEVIER



CrossMark

Cancer Genetics 221 (2018) 25–30

Cancer
Genetics

Molecular approaches identify a cryptic *MECOM* rearrangement in a child with a rapidly progressive myeloid neoplasm

Roberto R. Capela de Matos ^{a,b}, Moneeb A.K. Othman ^c, Gerson M. Ferreira ^d, Elaine S. Costa ^e, Joana B. Melo ^f, Isabel M. Carreira ^f, Mariana T. de Souza ^{a,b}, Bruno A. Lopes ^{b,g}, Mariana Emerenciano ^{b,g}, Marcelo G.P. Land ^e, Thomas Liehr ^c, Raul C. Ribeiro ^{h,i}, Maria Luiza M. Silva ^{a,b,e,*}

^a Cytogenetics Department, Bone Marrow Transplantation Unit, Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA-RJ), Rio de Janeiro, Brazil; ^b Post-Graduate Program in Oncology, Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA-RJ), Rio de Janeiro, Brazil; ^c Jena University Hospital, Institute of Human Genetics, Jena, Germany; ^d Stem Cells Department, Bone Marrow Transplantation Unit, Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA-RJ), Rio de Janeiro, Brazil; ^e Internal Medicine post-graduation program of Faculty of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil; ^f Laboratory of Cytogenetics and Genomics, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; ^g Pediatric Hematology-Oncology Program, Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA-RJ), Rio de Janeiro, Brazil; ^h Departments of Oncology and Global Medicine, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA; ⁱ Instituto Pelé Pequeno Príncipe, Postgraduate Program in Child Adolescent Health, Curitiba, Paraná, Brazil

Myeloid neoplasms are a heterogeneous group of hematologic disorders with divergent patterns of cell differentiation and proliferation, as well as divergent clinical courses. Rare recurrent genetic abnormalities related to this group of cancers are associated with poor outcomes. One such abnormality is the *MECOM* gene rearrangement that typically occurs in cases with chromosome 7 abnormalities. *MECOM* encodes a transcription factor that plays an essential role in cell proliferation and maintenance and also in epigenetic regulation. Aberrant expression of this gene is associated with reduced survival. Hence, its detailed characterization provides biological and clinical information relevant to the management of pediatric myeloid neoplasms. In this work, we describe a rare karyotype harboring three copies of *MECOM* with overexpression of the gene in a child with a very aggressive myeloid neoplasm. Cytogenetic studies defined the karyotype as 46,XX,der(7)t(3;7)(q26.2;q21.2). Array comparative genomic hybridization (aCGH) revealed a gain of 26.04 Mb in the 3q26.2–3qter region and a loss of 66.6 Mb in the 7q21.2–7qter region. RT-qPCR analysis detected elevated expression of the *MECOM* and *CDK6* genes (458.5-fold and 35.2-fold, respectively). Overall, we show the importance of performing detailed molecular cytogenetic analysis of *MECOM* to enable appropriate management of high-risk pediatric myeloid neoplasms.

Keywords Molecular cytogenetics, myeloid neoplasm, *MECOM* gene, array-CGH, RTqPCR, chromosome 7, cryptic abnormalities
© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Precise diagnosis and the use of therapy adapted to specific genetic changes have resulted in improved outcomes in patients with hematologic disorders. The World Health Organization (WHO) classification of hematologic neoplasms has

Received September 17, 2017; received in revised form December 8, 2017; accepted December 13, 2017.

* Corresponding author.

E-mail address: luizamacedo@inca.gov.br

2210-7762/\$ - see front matter © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.
<https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2017.12.002>

contributed to better stratification of patients in diverse risk categories (1). The expansion of molecular findings in myeloid neoplasms will probably increase the clinical relevance of this information with respect to the diagnosis, classification, and treatment of these tumors.

Myeloid neoplasms are a group of heterogeneous hematologic disorders with divergent patterns of cell differentiation and proliferation, as well as divergent clinical courses (2). Recurrent abnormalities related to this group of cancers, especially those abnormalities involving chromosome 7, are predictors of poor outcomes (1).

Myeloproliferative neoplasms harboring the translocation t(3;7)(q26;q21) are exceedingly rare. In this chromosomal rearrangement, the *MECOM* gene (at the 3q26.2 locus), a dominant oncogene associated with myeloid leukemias, is juxtaposed with the cyclin-dependent kinase 6 (*CDK6*) gene (at the 7q21 locus), an oncogene that is reportedly deregulated and disrupted in many hematologic malignant neoplasms (3,4).

MECOM encodes a transcription factor that plays an essential role in cell proliferation and the maintenance of hematopoietic stem cells and also actively induces epigenetic changes (4,5). The gene is normally expressed at very low levels in healthy individuals; its increased expression is associated with an adverse prognosis for both adult and pediatric myeloproliferative neoplasms (6,7). *MECOM* rearrangements are usually cryptic in the context of a complex karyotype, comprising a vast heterogeneity of chromosomal aberrations. Thus, such rearrangements may be difficult to recognize by conventional cytogenetic techniques. *MECOM* expression is elevated in most patients harboring cryptic *MECOM* rearrangements and is associated with reduced survival rates (4,5). Hence, analyzing *MECOM* gene rearrangement and expression with a combination of molecular and cytogenetic approaches could provide biological and clinical information that is relevant to patients with myeloid neoplasms.

We report the clinical and molecular data for a child with a rapidly progressive and ultimately fatal myeloid neoplasm. Our study revealed a cryptic chromosomal translocation in a rare karyotype that harbored three copies of *MECOM* with overexpression of the gene.

Case report

A 3-year-old girl was admitted to the Pediatric Oncohematology Service of the Hospital Federal da Lagoa, Rio de Janeiro, Brazil, 48 h after receiving initial emergency care at the Adão Pereira Nunes hospital in Rio de Janeiro. At her physical examination, the patient presented with fever, pallor, and a voluminous hepatosplenomegaly (10 cm below the left costal margin). In her peripheral blood, the hemoglobin level was 7.5 g/dl, the hematocrit was 13.8%, the platelet count was $124 \times 10^9/l$, and the white blood cell count was $692 \times 10^9/l$, with blasts accounting for 28% of the cells. The bone marrow contained 23% myeloid blast cells, which had the following immunophenotypes: CD34⁺, CD7⁺, CD45^{dim}, CD117⁺, HLADR⁺, CD13⁺, CD11b⁻, CD16⁻, CD10⁻, IREM2⁻, CD64⁻, CD14⁻, CD35⁻, CD33⁺, CD71⁻, CD105⁻, TdT^{-/+} (50%), CD56⁻, CD19⁻, CD123⁺, CD38⁺, CD15^{-/+} (25%), NG2⁻. The patient's bone marrow showed monocytosis; 28% of the cells were monocytes, with

50% of them being inflammatory monocytes (CD14^{dim}/CD16⁺/IREM2⁺) (Figure 1A). The child was subjected to cytoreductive therapy with hydroxyurea, but she died 48 h after admission as a result of a brain hemorrhage that was probably caused by leukostasis.

Methods

Cytogenetic analysis of the patient's peripheral blood was performed in the Cytogenetics Department of the National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil. The karyotype was classified in accordance with the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 2016 (8). We used commercial probes for subtelomeric 7q (Subtel7q) (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) and whole-chromosome painting for chromosome 7 (WCP7). Homemade multicolor chromosome banding (MCB) probe sets specific for chromosomes 3 and 7 were used as previously described (9).

Flow cytometry with a FACSCanto II system (Becton Dickinson, San José, CA) was used to characterize the immunophenotype in accordance with EuroFlow standardized procedures and panels (10,11).

Array comparative genomic hybridization (aCGH) was performed as follows. First, genomic DNA was extracted using a Puregene DNA Purification Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN). The DNA concentration was determined with a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific), and the DNA quality was checked using agarose gel electrophoresis. DNA samples from two healthy male subjects and two healthy female subjects were used as reference samples. Next, aCGH was performed using a SurePrint G3 Human Genome Microarray (180 K) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). This is an oligonucleotide microarray containing approximately 180,000 60-mer probes with an average probe spacing of 17 kb. Each patient's genomic DNA was cohybridized with a male control DNA (Agilent Technologies). Labeling was performed with the Agilent Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit in accordance with the manufacturers' instructions. After hybridization, the aCGH slide was scanned on an Agilent scanner and processed with Feature Extraction software (v10.7), and the results were analyzed using CytoGenomics software (v2.9.1.3) running ADM-2 as the aberration algorithm (12).

Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). For each sample, 2 µg of RNA was treated with a DNase Amplification Grade I Kit (Invitrogen), and the sample was reverse transcribed into cDNA by using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen). The sequences of the oligonucleotides used are shown in Supplementary Table S1. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to evaluate the expression of wild-type isoforms of *MECOM* (*MECOM.E13.F2* and *MECOM.E14.R1*) and *CDK6* (*CDK6.E3.F1* and *CDK6.E4.R2*). The mRNA expression levels of *MECOM* and *CDK6* were evaluated by quantitative realtime PCR (RT-qPCR). RT-qPCR was performed with SYBR Green Master Mix (Invitrogen) in a Rotor-Gene Q thermocycler (Qiagen, Hilden, Germany). *MECOM* was amplified using the primers *MECOM FW* and *MECOM RV* (13). *CDK6* was amplified using the primers *CDK6 FW* (spanning exons 2 and 3) and *CDK6 RV* (for exon 3). The mRNA levels were normalized to the average Ct of the housekeeping genes *B2M*

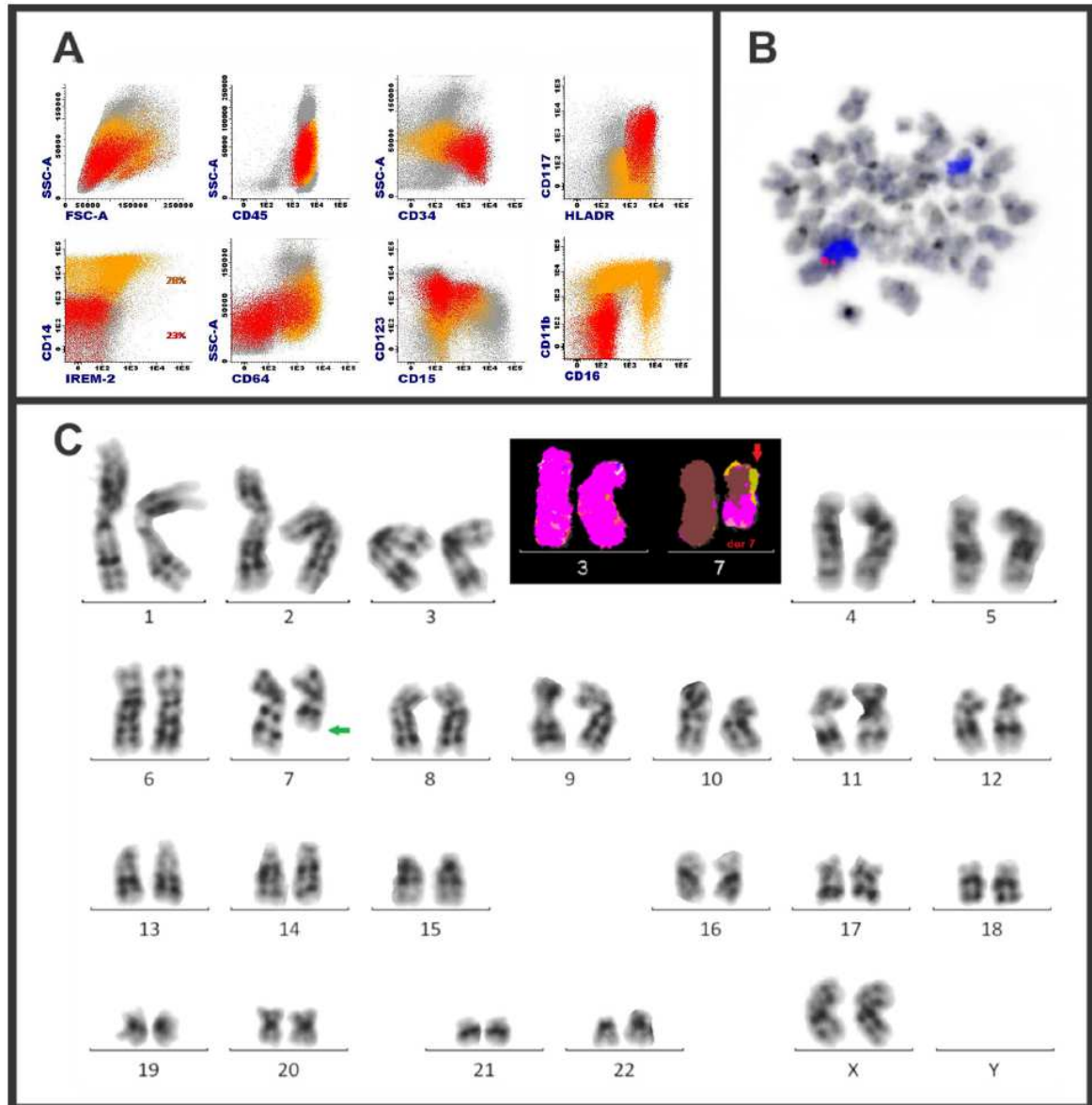


Figure 1 (A) Bone marrow immunophenotype showing 23% blasts (red dots), with FSCint and SSCint, CD45^{lo}, CD34⁺, CD117^{-/-}, HLADR⁺⁺, CD14⁻, IREM2⁻, CD64^{-/-}, CD123^{hi}, CD15^{-/lo}, CD11b⁺, and CD16⁻, and 28% monocytes (orange dots), being 50% inflammatory monocytes presenting CD16⁺ (CD16 vs. CD11b dot plot). (B) Results of FISH with a Subtel7q probe (red signal) and a WCP7 probe (blue signal), showing a loss of chromosomal material on the derivative chromosome 7. (C) G-band karyotype; the green arrow points to the del(?7q31) deletion. Partial M-FISH karyotype showing the cryptic translocation t(3;7) and the partial trisomy 3; the red arrow points to the derivative chromosome 7. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(*B2M* FV and RW) and *GAPDH* (*GAPDH* FW and RV). As a negative control, the mRNA levels in samples from two healthy donors were also evaluated; the average Δ Ct of both was compared with the Δ Ct of the patient, and the fold expression was calculated according to the $\Delta\Delta$ Ct method (14).

Results

At diagnosis, G-banding defined the karyotype as 46,XX,del(7)(q31?) in 50 metaphases (Figure 1C). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with Subtel7q and WCP7

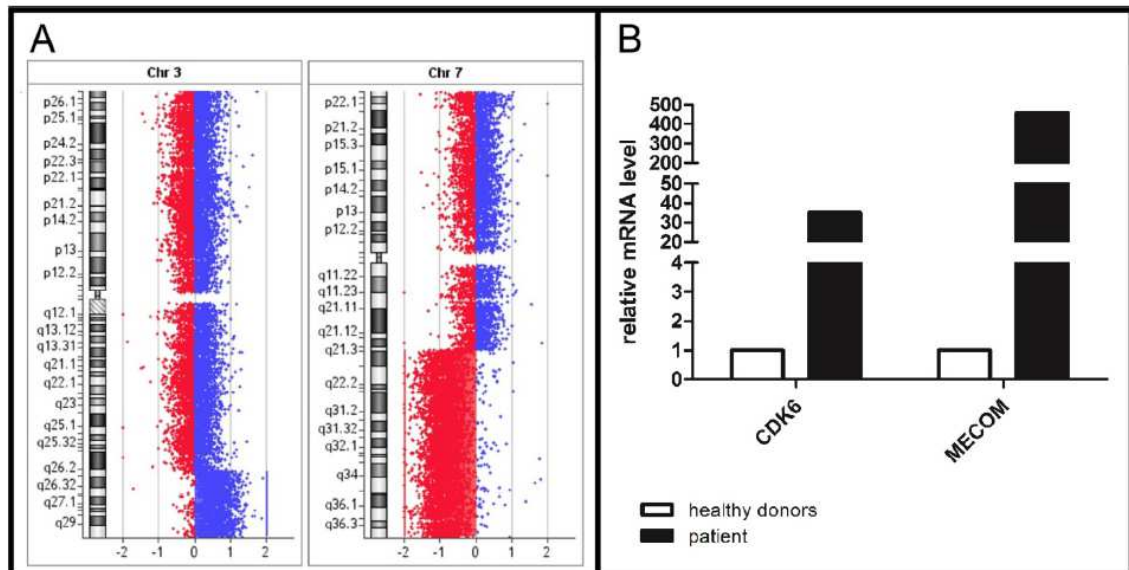


Figure 2 (A) aCGH characterized a gain in the 3q26.2–3qter region and a loss in the 7q21.2–7qter region. (B) Relative levels of *CDK6* and *MECOM* mRNAs. The fold-change was calculated in relation to the average expression levels in two healthy donors.

probes confirmed the loss of chromosomal material on derivative chromosome 7 (Figure 1B) and suggested that a portion of an unknown chromosome was present in this same derivative chromosome. Multiplex-FISH (M-FISH) revealed a duplication on chromosome 3 and a cryptic translocation between chromosomes 3 and 7 (Figure 1C). We then used the MCB technique to refine the complex and cryptic translocation between chromosomes 3 and 7. The karyotype was characterized here as 46,XX,der(7)t(3;7)(q26;q21.1–21.2).

The aCGH analysis revealed two large genomic imbalances: (1) a gain of 26.04 Mb in the 3q26.2–3qter region between positions 168,986,287 and 198,022,430 and (2) a loss of 66.6 Mb in the 7q21.2–7qter region between positions 92,453,443 and 159,138,663 (Figure 2A). These observations were compatible with the FISH results and the locations of the alterations are given according to the Genome Reference Consortium human genome (build 37) (GRCh37)/Human Genome Issue 19 (available from genome.ucsc.edu/html). The final karyotype must now read as 46,XX,der(7)t(3;7)(q26.2;q21.2).arr[GRCh37]3q26.2qter(168986287_198022430)x3,7q21.2qter(92453443_159138633)x1

By using RT-PCR, we confirmed the presence of the wild-type *MECOM* and *CDK6* isoforms. Analysis of *MECOM* transcription levels in the patient's bone marrow revealed significantly increased expression of *MECOM* (458.5-fold) and also increased expression of *CDK6* (35.2-fold) (Figure 2B), as compared to the average expression levels in the two healthy donors.

Discussion

The patient in the presented case had intense monocytosis in both her peripheral blood and bone marrow, splenomegaly,

an absence of Philadelphia chromosome/t(9;22), and an abnormality involving chromosome 7, thus raising a suspicion of a juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) undergoing a blast crisis phase (1,15,16). Therefore, to confirm this suspicion, we performed Sanger sequencing of exons 2 and 3 of the *NRAS* and *KRAS* genes, along with exons 3 and 13 of the *PTPN11* gene; these are hotspots in which the most common mutations that serve as molecular biomarkers for JMML are found (16–18). Our sequencing results showed no mutations in these regions (data not shown), preventing the confirmation of a JMML diagnosis. However, less common mutations in genomic regions not analyzed in our study could be associated with this malignant phenotype.

Interestingly, because of the unbalanced t(3;7)(q26;q21) translocation, the patient also presented with a chromosomal duplication in the 3q26 region and loss of the long arm of chromosome 7. Chromosomal abnormalities in the 3q26 region have been widely reported to have a prognostic impact in acute leukemias, chronic myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and myeloproliferative neoplasms in both adults and children. These abnormalities include inv(3)(q21;q26), t(3;3)(q21;q26), t(3;12)(q26;p13), t(3;21)(q26;q22), and t(2;3)(p15–22;q26), as well as the uncommon t(3;7)(q26;q21) cryptic translocation, which can occasionally be found in the karyotype (3–5).

MECOM disruption impairs cell differentiation, upregulates cell proliferation, and induces cell transformation. Furthermore, its overexpression is associated with poor treatment response and a dismal outcome (4). However, the mechanism by which this abnormality develops remains to be elucidated. From the literature, it appears that more than one mechanism can give rise to *MECOM* overexpression, as this aberration has been observed not only in patients with band

3q26 rearrangements but also in patients with no apparent abnormality in this chromosome region (4,7), prompting some interesting hypotheses.

Some investigators have suggested that the juxtaposition of enhancers or promoters near the *MECOM* gene by chromosomal translocations might induce its overexpression (5). Others have suggested that deletion of chromosome 7q resulting in haploinsufficiency of *MECOM* transcriptional regulators in this chromosomal region might further enhance *MECOM* overexpression. Of interest, the 7q22 region, which is recurrently lost in patients with 3q26 rearrangements, contains the mixed-lineage leukemia 5 (*MLL5/KMT2E*) gene, which plays a critical role in chromatin remodeling and cellular growth regulation and might contribute to leukemogenesis (5,19).

Our findings suggest that the high level of *MECOM* expression observed in this child could have been triggered by the combination of the abovementioned genetic events. Moreover, the extra copy of the 3q26 region might have been sufficient by itself to account for the *MECOM* overexpression.

We also observed a 35-fold increase in the expression of *CDK6*, a gene related to G1 phase progression whose aberrant expression has been related to several hematologic malignant neoplasms (3,20). *MECOM-CDK6* fusions are also associated with *MECOM* overexpression (4), although in our patient, this fusion might also have been responsible for the elevated *CDK6* expression. *CDK6* is normally expressed in the first stage of human monocytic maturation but repressed soon after, whereas our patient presented with an intense monocytosis that could be related to such *CDK6* overexpression. In contrast, *MECOM* is not expressed in normal monocytic maturation (21).

The post-transcriptional expression mechanisms of these genes could be related to disease progression. For example, phosphorylation of *MECOM* by CK2 on Ser538 and Ser858 is essential for its DNA-binding activity (22). In this context, CK2 is a known therapeutic target, and this could be exploited in the treatment of malignant neoplasms related to *MECOM* overexpression (23). *MECOM* also interacts with proteins related to transcription regulation and DNA repair and with members of the WNT, TGF- β , and RAS pathways, among others (22), demonstrating the complexity of its complex regulation mechanism.

In summary, in a child with a rapidly progressive myeloid neoplasm, we have demonstrated a cryptic t(3;7)(q26;q21) translocation harboring a 3q26 region duplication and *MECOM* gene overexpression. This case illustrates the importance of molecular cytogenetic tests in selecting cases for further investigations of genomic, transcriptomic, and post-transcriptional regulation mechanisms. In addition, investigations of targets of *MECOM* and its interaction with other partners could open new perspectives with regard to therapeutic approaches.

Funding

This work was supported by PROBRAL (DAAD no. 419/14), FAPERJ (project nos. E-26/110: 868/2013 and E-26/200.50/2016), INCT Para o Controle do Câncer, St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, Tennessee), and a Center of Excellence Grant, Tennessee.

Acknowledgments

The authors acknowledge with gratitude the help of Cláudia Diniz S. de Atayde, Amanda Faria de Figueiredo, and Daniela R. Ney-Garcia. The authors thank Keith A. Laycock, PhD, ELS, for editing the manuscript and Alice Theophilo T. de Matos for editing the figures. We are indebted to all of the physicians at the many pediatric oncology centers throughout Brazil and at our own institution who supplied us with samples from their patients.

Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found online at doi:10.1016/j.cancer.2017.12.002.

References

- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391–2405.
- Barbui T, Thiele J, Vannucchi AM, et al. Myeloproliferative neoplasms: morphology and clinical practice. *Am J Hematol* 2016;91(4):430–433.
- Storlazzi CT, Anelli L, Albano F, et al. A novel chromosomal translocation t(3;7)(q26;q21) in myeloid leukemia resulting in overexpression of EVI1. *Ann Hematol* 2004;83(2):78–83.
- Haferlach C, Bacher U, Grossmann V, et al. Three novel cytogenetically cryptic EVI1 rearrangements associated with increased EVI1 expression and poor prognosis identified in 27 acute myeloid leukemia cases. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51:1079–1085.
- De Braekeleer M, Le Bris M-J, De Braekeleer E, et al. 3q26/EVI1 rearrangements in myeloid hemopathies: a cytogenetic review. *Future Oncol* 2015;11(11):1675–1686.
- Balgobind BV, Lugthart S, Hollink IH, et al. EVI1 overexpression in distinct subtypes of pediatric acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2010;24:942–949.
- Jancuskova T, Plachy R, Zemankova L, et al. Molecular characterization of the rare translocation t(3;10)(q26;q21) in an acute myeloid leukemia patient. *Mol Cytogenet* 2014;7:47.
- McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M, eds. *ISCN 2016: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel: Karger, 2016.
- 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* 2008;56:487–493.
- Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012;26:1986–2010.
- Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012;26:1908–1975.
- Othman MAK, Rincic M, Melo JB, et al. A novel cryptic three-way translocation t(2;9;18)(p23.2;p21.3;q21.33) with deletion of tumor suppressor genes in 9p21.3 and 13q14 in a T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res Treatment* 2014;2014:357123.
- Weisser M, Kern W, Schoch C, et al. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction based quantification of the combined MDS-EVI1/EVI1 gene in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2006;47(12):2645–2647.

14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25:402–408.
15. Honda Y, Tsuchida M, Zaike Y, et al. Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic leukaemia who developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Paediatric Haematology/Oncology. *Br J Haematol* 2014;165:682–687.
16. Chan JR, Cooper T, Kratz CP, et al. Juvenile myelomonocytic leukemia: a report from the 2nd International JMML Symposium. *Leuk Res* 2009;33(3):355–362.
17. Tyner JW, Erickson H, Deininger MW, et al. High-throughput sequencing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients. *Blood* 2009;113(8):1749–1755.
18. Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, et al. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 2002;70(6):1555–1563.
19. Stein S, Ott GM, Schultze-Strasser S, et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med* 2010;16(2):198–205.
20. Hayette S, Tigaud I, Callet-Bauchu E, et al. In B-cell chronic lymphocytic leukemias, 7q21 translocations lead to overexpression of the CDK6 gene. *Blood* 2003;102(4):1549–1550.
21. Mello FV, Alves LR, Land MGP, et al. Maturation-associated gene expression profiles along normal human bone marrow monoipoiesis. *Br J Haematol* 2017;176(3):464–474.
22. Bard-Chapeau EA, Gunaratne J, Kumar P, et al. EVI1 oncoprotein interacts with a large and complex network of proteins and integrates signals through protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(31):E2885–E2894.
23. Trembley JH, Chen Z, Unger G, et al. Emergence of protein kinase CK2 as a key target in cancer therapy. *Biofactors* 2010;36(3):187–195.

Anexo V - Manuscrito aceito para publicação

A new complex karyotype involving a *KMT2A*-r variant three-way translocation, in a rare clinical presentation of a pediatric patient with acute myeloid leukemia

Roberto R. Capela de Matos ^{a,b}, Daniela R. Ney Garcia ^{a,b,c}, Moneeb A. K. Othman ^d, Gerson Moura Ferreira ^e, Joana B. Melo ^{f,g}, Isabel M. Carreira ^{f,g}, Claus Meyer ^h, Rolf Marschalek ^h, Elaine S. Costa ^c, Marcelo G. P. Land ^c, Thomas Liehr ^d, Raul C. Ribeiro ^{ij}, Maria Luiza Macedo Silva ^{a,b,*}

^a Cytogenetics Department, Bone Marrow Transplantation Unit, Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA-RJ), Rio de Janeiro, Brazil;

^b Post-Graduate Program in Oncology, Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA-RJ), Rio de Janeiro, Brazil;

^c Clinical Medicine Post-Graduation Program, College of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil;

^d Jena University Hospital, Institute of Human Genetics, Jena, Germany;

^e Stem Cells Department, Bone Marrow Transplantation Unit, Unit, Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA-RJ), Rio de Janeiro, Brazil;

^f Cytogenetics and Genomics Laboratory, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal;

^g Center of Investigation on Environment Genetics and Oncobiology, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal;

^h Institute of Pharmaceutical Biology, Diagnostic Center of Acute Leukemia, Goethe-University of Frankfurt, Frankfurt/Main, Germany;

ⁱ Departments of Oncology and Global Pediatric Medicine, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA;

^j Instituto Pelé Pequeno Príncipe, Postgraduate Program in Child Adolescent Health, Curitiba, Paraná, Brazil.

Short title: A new complex *KMT2A*-r variant three-way in a pediatric patient with AML

*** Corresponding author**

Maria Luiza Macedo Silva, Ph.D.

Postal address: Praça da Cruz Vermelha 23, 6° Andar

Laboratório de Citogenética (CEMO)

Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ZIP code: 20.230-130

Email: luizamacedo@inca.gov.br

Phone: +55 (21) 3207-1701

Keywords: Childhood AML, Myeloid Sarcoma, *KMT2A* gene, array CGH, RTq / LDI PCR

1. Abstract

Patients with childhood acute myeloid leukemia with complex karyotypes have a dismal outcome. However, for patients with a *KMT2A* rearrangement (*KMT2A-r*), the prognosis appears to depend on the fusion partner gene rather than the karyotype structure. Thus, a precise characterization of the *KMT2A-r* and the fusion partner genes, especially in CKs, is of interest for managing AML. We describe clinical and molecular features of a child who presented with a large abdominal mass and AML with a new complex karyotype involving chromosomes 11, 16, and 19, leading to a *KMT2A-MLLT1* fusion and two extra copies of the *ELL* gene and, thus, resulting in the concurrent overexpression of *MLLT1* and *ELL*. Molecular cytogenetic studies defined the karyotype as

47,XY,der(11)t(11;16)

(q23.3;p11.2),der(16)t(16;19)(p11.2;p13.3),der(19)t(11;19)(q23.3;p13.3),+der(19)t(16;19)(16pter-

>p11.2::19p13.3->19q11::19p11->19p13.3::16p11.2→16pter). Array comparative genomic hybridization

revealed a gain of 30.5 Mb in the 16p13.3-p11.2 region and a gain of 18.1 Mb in the 19p13.3-p12 region. LDI-

PCR demonstrated the *KMT2A-MLLT1* fusion. Reverse sequence analysis showed that the *MLLT1* gene was

fused to the 16p11.2 region. RT-qPCR quantification revealed that *ELL* and *MLLT1* were overexpressed (4-

and 10-fold, respectively). In summary, this is a pediatric case of AML presenting a novel complex t(11;16;19)

variant, with overexpression of *ELL* and *MLLT1*.

2. Introduction

Cytogenetic abnormalities are common and prognostically relevant in childhood acute myeloid leukemia (AML). Patients with complex karyotypes (CKs), defined as those with multiple chromosomal abnormalities, have a dismal outcome [Mrózec, 2008]. However, the prognosis for leukemias with a *KMT2A* rearrangement (*KMT2A-r*) (representing 18% of childhood leukemias), which may be accompanied by multiple chromosomal changes, appears to depend on the fusion partner gene [Meyer et al., 2017]. Thus, a precise characterization of the *KMT2A-r* and the fusion partner genes, especially in CKs, is of interest for managing AML [Daser and Rabbitts, 2004; Pui et al., 2011; Marschalek 2015; Ney Garcia et al., 2016]. In the context of *KMT2A-r* involving genes in the 19p13 region, two partner genes have been repeatedly identified. *KMT2A* may be fused to *MLLT1* (also called *ENL* [elongation factor for RNA polymerase II]); this fusion is common in *KMT2A-r*-positive infant acute lymphoblastic leukemia but is found in less than 1% of pediatric *KMT2A-r*-positive AML cases [Meyer et al., 2017]. Alternatively, *KMT2A* may fuse with the *ELL* gene (11–19 lysine-rich leukemia gene) in the 19p13.1 chromosomal region. The frequency of the latter fusion has not been established [Meyer et al., 2017]. As a consequence of their fusion with *KMT2A*, *MLLT1* and *ELL* are both overexpressed [Lin et al., 2010; Mohan et al., 2010].

Herein, we describe the clinical and molecular features of a case of AML with a new complex chromosomal abnormality involving chromosomes 11, 16, and 19, leading to a *KMT2A-MLLT1* complex variant fusion gene and two extra copies of the *ELL* gene and, thus, resulting in the concurrent overexpression of *MLLT1* and *ELL*.

3. Materials and Methods

3.1 Case Report

A 7-year-old boy presented to the university hospital, Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira (IPPMG), Rio de Janeiro, Brazil, with a 3-week history of progressive abdominal distention and pain associated with generalized jaundice. On physical examination, his vital signs were within normal limits. The patient presented with adenomegaly and scrotal edema. Diffuse gingival hypertrophy was noted. A large and painful abdominal mass with indistinct borders was palpable in the epigastric and mesogastric regions. Laboratory data included a hemoglobin level of 9.8 g/dL, a white blood cell count of $2.5 \times 10^9/L$ (24% neutrophils and 55% lymphocytes), and a platelet count of $182 \times 10^9/L$. The lactate dehydrogenase level was 4,860 U/L. The total bilirubin level was 7.5 mg/dL, and the direct bilirubin level was 6.4 mg/dL. An abdominal ultrasound scan showed an abdominal mass contiguous with the head of the pancreas and measuring 7.0 cm \times 6.5 cm (Figures 1A and B). A computed tomography (CT) examination confirmed the presence of an abdominal mass compressing the midline structures (Figure 1A). The liver was enlarged, with ill-defined areas of greater echogenicity. Discrete dilation of the intrahepatic bile ducts was noted. The gallbladder was contracted, with thickened walls and hyperechogenic content, without posterior acoustic shadow. The CT examination also detected a significant thickening and parietal infiltration of diffuse intestinal loops, which was most evident on the leaflets, and moderate ascites with intermingled debris. A bone marrow aspirate was hypercellular, and a morphologic examination of the bone marrow contents found 75% leukemia monoblastic cells. Flow cytometry analysis revealed a population of leukemic blast cells that expressed CD33^{+/+++}, CD36^{-/(27%)}, CD45^{low}, CD117^{-/(45%)}, CD64⁺, HLA-DR⁺⁺⁺, CD71^{+/+++}, and cyMPO⁺ and were negative for CD34, CD19, CD10, CD79, CD7, cyCD3, CD3, CD13, CD11b, CD35, nuTdT, CD105, IREM2, CD14, CD56, and CD16, corroborating the diagnosis of acute monoblastic leukemia. The patient was treated in accordance with a high-risk AML-BFM2012 protocol [Reinhardt and Creutzig, 2013]. On day 13 of treatment, an ultrasound examination revealed a reduction in the size of the mass to 2.8 cm \times 2.5 cm. A morphologic evaluation of the bone marrow at the end of induction therapy (on day 21 of chemotherapy) found less than 5% blasts; however, an ultrasound examination raised concern regarding regrowth of the abdominal mass. Accordingly, 15 daily radiotherapy fractions (total, 30 Gy) were delivered to the abdomen. The child experienced morphologic remission on day 27; however, the results of the flow-cytometric examination remained positive (0.5% and 0.3% blast cells). Eleven months after the diagnosis, the bone marrow was negative for minimal residual disease (MRD). The patient remains in continuous

complete remission. Although this patient had a high risk of relapse, a suitable bone marrow donor was not identified.

3.2 Cytogenetic and Molecular Analyses

Cytogenetic analysis was performed on bone marrow in accordance with standard protocols. G-banding and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) experiments using a locus-specific (LSI) *MLL* break-apart probe (Abbott Molecular, Des Plaines, IL), whole-chromosome painting probes (WCPs), partial-chromosome painting probes (PCPs), and multicolor banding probes (MCBs) were performed on metaphase and interphase cell spreads as previously reported. Array-comparative genomic hybridization (aCGH) was performed in accordance with standard procedures. The karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature [Liehr et al., 2002; Othman et al., 2014].

Long-distance inverse polymerase chain reaction (LDI-PCR) assays were used to identify the *KMT2A* partner genes and their corresponding breakpoints. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) analyses were performed to verify the levels of transcript expression of genes putatively involved in the rearrangement. Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) and reverse transcribed into cDNA with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions. We analyzed the transcriptional expression of the genes *ZNF689*, *ELL*, and *MLL1*, with the *ACTB* transcript being used as an endogenous control, by performing RT-qPCR with SYBR Green Master Mix (Invitrogen) in a Rotor-Gene Q thermocycler (Qiagen, Hilden, Germany). As a negative control, the mRNA levels in samples from three healthy donors were evaluated; the average Ct (cycle threshold) of control samples was compared with the Ct of the patient samples, and the fold expression was calculated according to the $\Delta\Delta C_t$ method [Livak and Schmittgen, 2001; Meyer et al., 2013; Meyer et al., 2017].

4. Results

G-banded analysis showed a karyotype with 47 chromosomes, 11q23 region involvement, and the derivative chromosomes der(16) and der(19), along with a marker chromosome (Figure 2A). Molecular cytogenetic analyses with a locus-specific *MLL* break-apart probe and WCP probes for chromosomes 11, 16, and 19 identified a complex karyotype involving chromosomes 11, 16, and 19 and an extra derivative from chromosome 19 that also involved chromosome 16. The MCB analysis for chromosomes 11, 16, and 19 refined the breakpoints, giving a final karyotype of 47,XY,der(11)t(11;16)(q23.3;p11.2),der(16)t(16;19)(p11.2;p13.3),der(19)t(11;19)(q23.3;p13.3),+der(19)t(16;19)(16pter->p11.2::19p13.3->19q11::19p11->19p13.3::16p11.2->16pter) (Figure 2B).

The aCGH analysis (all data are given according to GRCh37) revealed two large genomic imbalances: 1) a gain of 30.5 Mb in the 16p13.3-p11.2 region with a break at position 30,660,848; and 2) a gain of 18.1 Mb in the 19p13.3-p12 region with a break at position 24,378,493. The 19p13.3->19pter region presented no imbalances (Figure 2C-D). These findings were compatible with the FISH results.

We performed LDI-PCR assays for *KMT2A* gene rearrangement. Analysis of the forward primer showed that the *KMT2A* intron11 region was fused to the *MLL1* intron6 region, and there was a sequence insertion of a small sequence from 11q13 region between the fused *KMT2A* and *MLL1*. Reverse sequence analysis showed that the *MLL1* intron6 region was fused to the 16p11.2 region. No reciprocal X-*KMT2A* fusion was found (Figure 2E).

The complexity of this karyotype prompted us to analyze the expression of genes involved in the rearrangements. RT-qPCR quantification of gene transcripts located in the breakpoint 16p11.2/*ZNF689*, previously unreported in AML, and the recurrent breakpoints 19p13.11/*ELL* and 19p13.3/*MLL1* revealed that both *ELL* and *MLL1* were overexpressed (4- and 10-fold, respectively), whereas *ZNF689* expression levels were below control levels (Figure 2F).

5. Discussion / Conclusion

Meyer and co-workers (2007) showed that 50% of patients with the translocation t(11;19)/*KMT2A-MLL1* presented three-way or more complex fusions, suggesting that a peculiar mechanism creates functional *KMT2A* fusions for this condition, at least at the mRNA level [Meyer et al.,

2017]. In addition, in that cohort, 95% of all genomic breakpoint clusters (BpCs) accumulated in a 35-kb region (26-kb intergenic region þ 9kb *MLL1* intron1); in only one case was the BpC within the *MLL1* intron6 region [Meyer et al., 2007].

This hitherto unreported unbalanced karyotype resulted in a large triplication of the region comprising the *ELL* gene, as in the formation of the isochromosome der(19)t(16;19), with four copies of the *ELL* gene being present in this abnormal genome. Therefore, in our patient, the overexpression of *ELL* and *MLL1* was probably associated with different mechanisms.

The high level of *ELL* expression may be directly related to the copy number of the gene, because the data on mRNA quantity and gene copy number are correlated, considering only transcriptional regulation mechanisms. The role of *ELL* in oncogenesis has been demonstrated previously: Overexpression of this elongation factor increased cell proliferation and c-Fos and AP-1 levels, resulting in the transformation of fibroblasts in culture [Kanda et al., 1998].

MLL1 expression was 10-fold greater in the patient's malignant cells than in healthy controls, even though no additional copies of the gene were found. The mechanism that leads to this elevated expression remains to be clarified. It has been suggested that fusions of super elongation complex (SEC) members with *KMT2A* can shift SEC to *KMT2A* targets involved in hematopoietic diseases rather than promoting normal transcription initiation, e.g., the expression of *HOX* genes [Lin et al., 2010; Mohan et al., 2010]. *MLL1* depletion impaired the growth of leukemia cells and delayed the progression of leukemia when immunodeficient mice were transplanted with these cells. The regulation mechanism consists of the binding of *MLL1* to acetylated histone H3 on promoters that are actively transcribed during the leukemia process. In addition, bromodomain and extra-terminal (BET) inhibitors, which block ligation between BET proteins and acetylated histones and transcription factors, might be a therapeutic option for inhibiting *MLL1* ligation to chromatin [Wan et al., 2017].

Although *ELL* and *MLL1* have no sequence homologies [Luo et al., 2001], they exhibit similar functions, with both being coadjutants as elongation-factor components of the SEC complex that are required in order to increase the catalytic rate of RNA polymerase II transcription by suppressing transient pausing of the polymerase at multiple sites along the DNA [Daser and Rabbitts, 2004; Luo et al., 2001]. Moreover, previous studies of *KMT2A-MLL1* and *KMT2A-ELL* fusions in murine models similarly resulted in the immortalization of hematopoietic progenitor cells [Daser and Rabbitts, 2004; Shigematsu et al., 2011].

Another particularity of our case was the clinical presentation with signs and symptoms of a large abdominal mass (myeloid sarcoma). Myeloid sarcoma is more common in children than in adults (accounting for 40% vs. 2%–5% of cancers in these respective populations) and is associated with different subtypes of AML, including megakaryoblastic and monoblastic subtypes. In patients with the *RUNX1-RUNX1T1* gene fusion, orbital myeloid sarcoma is relatively common, whereas patients with the *CBFB-MYH11* fusion have more diverse patterns, including involvement of the central nervous system [Samborska et al., 2016; Yilmaz et al., 2013]. *KMT2A-ELL* fusions have been associated with myeloid sarcomas in infants, being rare in older ages, but with no specific site of disease involvement [Samborska et al., 2016; Panagopoulos et al., 2016; de Rooij et al., 2015]. Because myeloid sarcoma occurs in association with karyotypes that reflect favorable outcomes, it is unlikely to be an independent prognostic indicator. Nevertheless, with the description of this case, we could contribute with the literature, in order to assist future tumor site associations relating this tumor mass to *KMT2A-r*.

In this work, we concluded that the cytogenomic and molecular approaches were important for a detailed characterization of this rare complex karyotype, revealing an aberrant genome, and the involvement of two different mechanisms leading to *ENL* and *ELL* genes overexpression. In summary, we have described a child with AML who presented with a large abdominal myeloid sarcoma and a novel complex karyotype with a three-way *KMT2A-r* variant t(11;16;19), resulting in the overexpression of genes from the super elongation complex, *ELL*, and *MLL1*.

6. Statements

6.1 Acknowledgements

The authors acknowledge with gratitude Mariana Tavares de Souza, MSc, for her contributions to cytogenetics discussions, Dr. Claudia Silva for providing tomography and ultrasonography images, MD. Kelly Monteso for case discussion, Alice Theophilo Teixeira de Matos for editing the figures, and Keith A. Laycock, PhD, ELS, for scientific editing of the manuscript.

6.2 Statement of Ethics

The authors state that the patient's parents have given their informed written consent. This study was approved by the National Cancer Institute (INCA) ethics committee (Protocol No. 88/07).

6.3 Disclosure Statement

The authors declare no conflicts of interest.

6.4 Funding Sources

This work was supported by PROBRAL (DAAD no. 419/14), FAPERJ (project nos. E-26/110: 868/2013 and E-26/200.50/2016), INCT Para o Controle do Câncer, St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, Tennessee), and a Center of Excellence Grant from the State of Tennessee.

6.5 Author Contributions

RRCM, MLMS and RCR participated in the design of the study and in manuscript writing; MGPL and ESC performed the clinical history of the patient; DRNG and MLMS conducted the conventional cytogenetic analyses and performed the FISH; DRNG and MAKO conducted the WCP and MCB analyses; JBM and IMC performed the aCGH studies; GMF performed the RT-qPCR analyses; CM and RM conducted the LDI-PCR experiments; ESC performed the immunophenotyping studies; RRCM and GMF participated in manuscript writing; MLMS, MGPL and RCR revised the manuscript critically for important intellectual content.

7. References

- Daser A, Rabbitts TH. Extending the repertoire of the mixed-lineage leukemia gene MLL in leukemogenesis. *Genes Dev.* 18:965–974 (2004).
- De Rooij JD, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink M. Pediatric AML: from biology to clinical management. *J Clin Med.* 4:127–149 (2015).
- Kanda Y, Mitani K, Kurokawa M, Yamagata T, Yazaki Y, Hirai H. Overexpression of the MEN/ELL protein, an RNA polymerase II elongation factor, results in transformation of Rat1 cells with dependence on the lysine-rich region. *J Biol Chem.* 273(9):5248–5252 (1998).
- Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, et al. Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med.* 9:335–339 (2002).
- Lin C, Smith ER, Takahashi H, Lai KC, Martin-Brown S, Florens L, et al. AFF4, a component of the ELL/P-TEFb elongation complex and a shared subunit of MLL chimeras, can link transcription elongation to leukemia. *Mol Cell.* 37:429–437 (2010).
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods.* 25:402–408 (2001).
- Luo RT, Lavau C, Du C, Simone F, Polak PE, Kawamata S, et al. The elongation domain of ELL is dispensable but its ELL-associated factor 1 interaction domain is essential for MLL-ELL-induced leukemogenesis. *Mol Cell Biol.* 21:5678–5687 (2001).
- Marschalek R. MLL leukemia and future treatment strategies. *Arch Pharm.* 348:221–228 (2015).
- Meyer C, Burmeister T, Strehl S, Schneider B, Hubert D, Zach O, Haas O, et al. Spliced *MLL* fusions: a novel mechanism to generate functional chimeric *MLL-MLL1* transcripts in t(11;19)(q23;p13.3). *Leukemia.* 21:588–590 (2007).
- Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Gröger D, Park TS, Emerenciano M, et al. The *MLL* recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia.* 27:2165–2176 (2013).
- Meyer C, Burmeister T, Gröger D, Tsaour G, Fechina L, Renneville A, et al. The *MLL* recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia.* 32:273–284 (2017).
- Mohan M, Lin C, Guest E. Licensed to elongate: a molecular mechanism for MLL-based leukaemogenesis. *Nat Rev Cancer.* 10:721–728 (2010).
- Mrózek K. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Semin Oncol.* 35:365–377 (2008).
- Ney Garcia DR, de Souza MT, de Figueiredo AF, et al. Molecular characterization of *KMT2A* fusion partner genes in 13 cases of pediatric leukemia with complex or cryptic karyotypes. *Hematol Oncol.* 35:760–768 (2016).
- Othman MA, Rincic M, Melo JB, Carreira IM, Alhourani E, Hunstig F, et al. A novel cryptic three-way translocation t(2;9;18)(p23.2;p21.3;q21.33) with deletion of tumor suppressor genes in 9p21.3 and 13q14 in a T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res Treatment.* 2014:357123 (2014).
- Panagopoulos I, Gorunova L, Kerndrup G, Spetalen S, Tierens A, Osnes LT, et al. Rare *MLL-ELL* fusion transcripts in childhood acute myeloid leukemia-association with young age and myeloid sarcomas? *Exp Hematol Oncol.* 5:8 (2016).
- Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol.* 29:551–565 (2011).

- Reinhardt D, Creutzig U. AML-BFM 2012: der akuten myeloischen Leukämien bei Kindern und Jugendlichen. Version Nr.3,6.28.2013. Hannover, Germany: Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie; 2013.
- Samborska M, Derwich K, Skalska-Sadowska J, Kurzawa P, Wachowiak J. Myeloid sarcoma in children—diagnostic and therapeutic difficulties. *Contemp Oncol (Pozn)*. 20:444–448 (2016).
- Shigematsu S, Fukuda S, Nakayama H, Inoue H, Hiasa Y, Onji M et al. ZNF689 suppresses apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through the down-regulation of Bcl-2 family members. *Exp Cell Res*. 317:1851–1859 (2011).
- Wan L, Wen H, Li Y, Lyu J, Xi Y, Hoshii T, et al. ENL links histone acetylation to oncogenic gene expression in acute myeloid leukaemia. *Nature*. 543:265–269 (2017).
- Yilmaz AF, Saydam G, Sahin F, Baran Y. Granulocytic sarcoma: a systematic review. *Am J Blood Res*. 3:265–270 (2013).

8. Figures and Legends

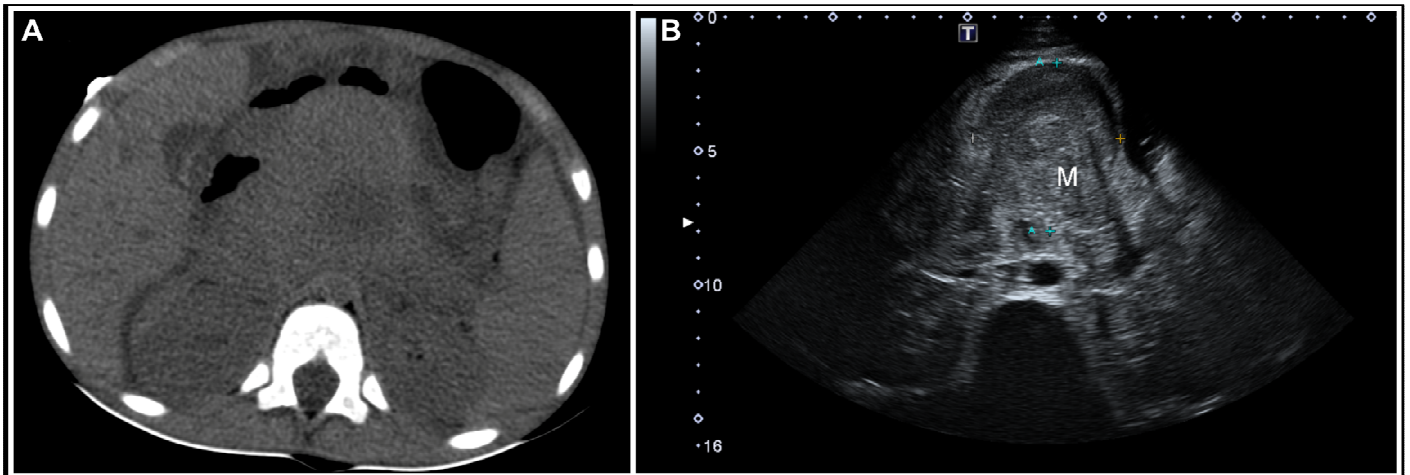


Fig. 1: Clinical diagnostic data of MS and AML. **A)** Transverse focal CT image of the mesogastric region, acquired without contrast and with low ionizing irradiation, showing an expansive solid mass (M) on the midline with sharp margin definition and occupying the superior quadrants of the right mesogastrium. The mass extends through the hepatic hilum and the cleavage plane of the pancreas head. Li: liver; Sp; spleen. **B)** Ultrasonography image showing the extent (A+/+) of a solid mass (M: 7 cm × 6.5 cm) with characteristics compatible with the CT image. RK: right kidney; Ao: aorta; IVC: inferior vena cava.

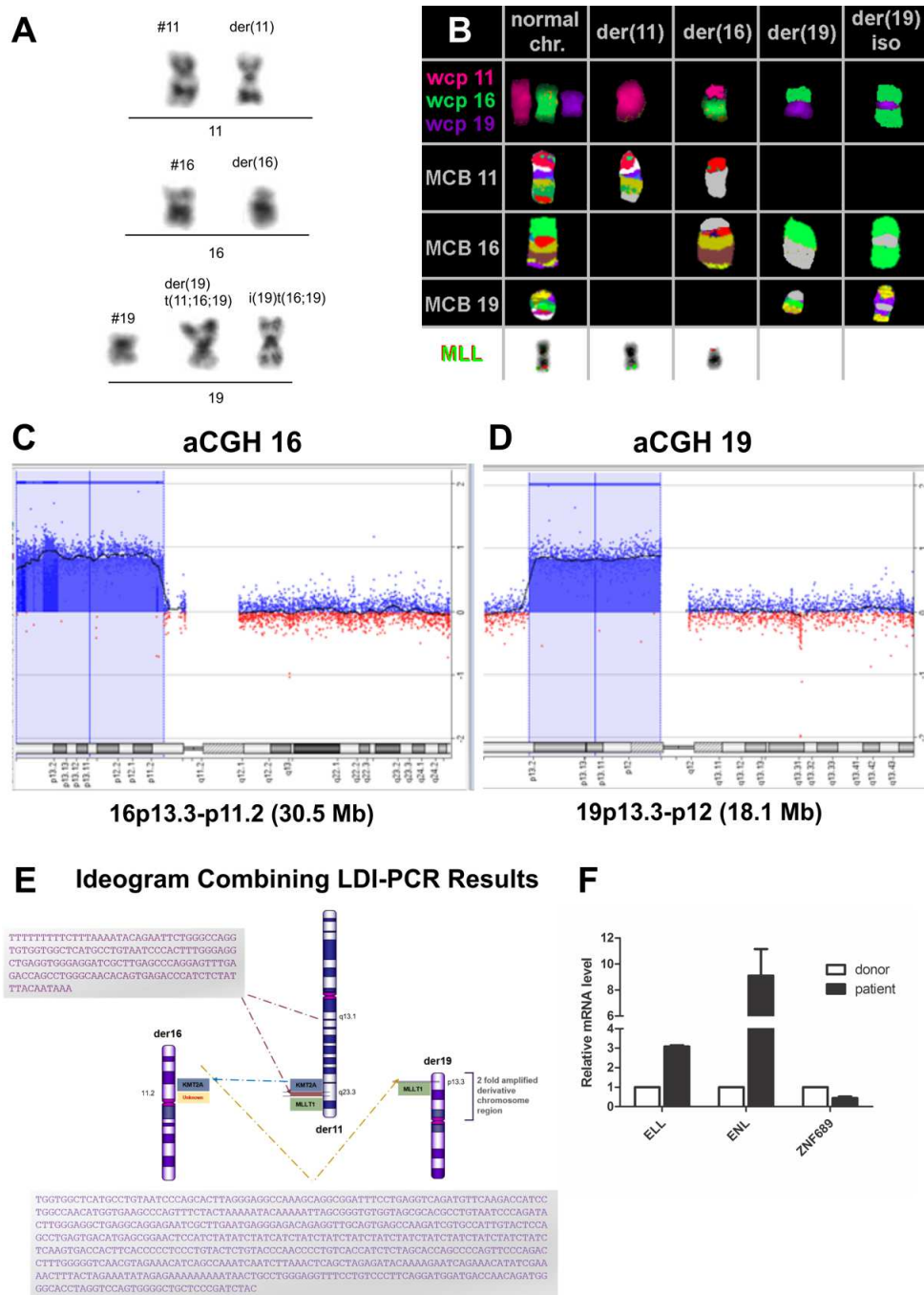


Fig. 2: Results of cytogenetic and molecular studies. **A)** Partial karyotype showing derivatives (der) of chromosomes 11 and 16 and two derivatives of chromosome 19. Normal chromosomes (#) are also shown. **B)** Molecular cytogenetic analysis using whole-chromosome painting for chromosomes 11 (pink), 16 (green), and 19 (purple), showing one normal copy of each chromosome and the chromosomal composition of the derivative chromosomes. The MCB results obtained using probes for chromosomes 11, 16, and 19 determine the breakpoints of all the derivatives; the corresponding nonhybridized regions are depicted in gray. **C-D)** aCGH results. Left: aCGH16 shows a gain of 30.5 Mb in the region of 16p13.3-p11.2, narrowing down the breakpoint to 30,660,848. Right: aCGH19 shows a gain of 18.1 Mb in the region of 19p13.3-p12, mapping this breakpoint to position 24,378,493. **E)** Ideogram representing the final results, combining the results of all experimental approaches, including LDI-PCR. An unidentified (unknown) sequence from the 11q13 chromosome region was present between the fused *KMT2A* intron11 and *MLLT1* intron6. The reverse *MLLT1* (intron6) sequence was fused to the 16p11.2-region sequence. No reciprocal X-*KMT2A* fusion was found. **F)** Relative expression of *ELL*, *ENL* (*MLLT1*), and *ZNF689* in the patient, as compared with the average values for three healthy donors. Data are presented as the mean \pm standard deviation for three independent experiments.