



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

FRANCIANNE GOMES ANDRADE

**ALTERAÇÕES MOLECULARES EM GRUPOS ESPECIAIS DE
LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

RIO DE JANEIRO
2018



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

FRANCIANNE GOMES ANDRADE

**ALTERAÇÕES MOLECULARES EM GRUPOS ESPECIAIS DE
LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS**

Tese de doutorado apresentada ao Instituto
Nacional de Câncer como parte dos requisitos para
obtenção do título de doutor em Oncologia

Orientador^a: Prof^a. Dr^a. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

RIO DE JANEIRO
2018

Bibliotecária Responsável: Nanci Simão da Rocha – CRB7/ 4235

A553a Andrade, Francianne Gomes

Alterações moleculares em grupos especiais de leucemias mielóides agudas pediátricas/ Francianne Gomes Andrade . – Rio de Janeiro, 2018.
xix, 187f.; il.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro, 2018

Orientadora: Maria do Socorro Pombo de Oliveira

1. Leucemia Mielóide Aguda. 2. Leucemia Promielocítica. 3. Genética 4. Genoma.
I. Oliveira, Maria do Socorro Pombo de (Orient.). II. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD: 616.99419



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

FRANCIANNE GOMES ANDRADE

**ALTERAÇÕES MOLECULARES EM GRUPOS ESPECIAIS DE
LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS**

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Ilana Zalberg Renault (INCA)
Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo (UFPE)
Prof^a. Dr^a. Mariana Lima Boroni (INCA)
Prof^a. Dr^a. Etel Rodrigues Pereira Gimba (INCA)
Prof^a. Dr^a. Teresa de Souza Fernandez (INCA)
Prof^a. Dr^a. Luciana Pizzatti Barboza (UFRJ)

RIO DE JANEIRO
2018

AGRADECIMENTOS

Reconhecer todo o auxílio e contribuição que tive para a realização desse trabalho não seriam suficientes para expressar o prazer que tive em desenvolvê-lo e o quanto sou feliz por apresentá-lo. Espero que todos que se envolveram, direta ou indiretamente, se sintam parte dele. Alguns nomes precisam ficar registrados: Daniela Palheiro, Tállita Meciany, Luciana Gutiyama, Danielle Tavares Vianna, Ilana Zalcborg, Carolina Furtado e Mariana Boroni. Sem dúvidas, o resultado não seria o mesmo sem essas pessoas e se não tivesse sido desenvolvido no Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva, com toda sua estrutura e corpo docente. Da mesma forma, o reconhecimento pelo Ministério da Saúde e pelas agências de fomento da importância desse trabalho nos ajudaram a dar mais alguns passos na cura das leucemias pediátricas.

Não foi por acaso que escolhi o Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico. Ali eu encontrei uma forma de alcançar meus objetivos pessoais e dar minha contribuição para a ciência. Todas as pessoas com quem dividi o laboratório ao longo dos anos foram muito importantes. TODAS me ensinaram muito: aprendi o que eu quero e o que eu não quero. Aprendi a importância do trabalho em equipe e a reconhecer que pequenas atitudes fazem a diferença. A dedicação que o corpo técnico do laboratório tem com as amostras faz com que cada uma delas não seja apenas um material biológico, mas um paciente que precisa de nós.

Existem dias que não nos sentimos preparados para uma grande responsabilidade. Mas existem pessoas que estão dispostas a trabalhar para que o objetivo final seja alcançado. Filipe Vicente dos Santos Bueno, Gisele Brisson, Eugênia Terra Granado, Elda Pereira Noronha e Luísa Vieira Codeço Marques foram essenciais ao aceitar dividir o trabalho comigo e contribuir com muito conhecimento. O Filipe foi um pouco além: aceitou minha coorientação e me mostrou que a melhor forma de ensinar é aprender.

"Grandes palavras são necessárias para expressar grandes ideias." Eu teria palavras suficientes para expressar o quanto Ingrid Sardou Cezar fez por esse trabalho, mas jamais terei palavras para expressar o quanto fez na minha vida. Nos dias em que eu não me sentia preparada, a alegria que a presença dela trazia me faziam sentir o contrário. Espero encontrar uma forma de demonstrar meu reconhecimento por tudo que ela fez.

Aplicar os resultados dessa tese na vida das pessoas é a maior gratificação que eu poderia alcançar. É uma honra ter os médicos do Grupo Brasileiro Colaborativo para Estudo de Leucemias Agudas confiando no nosso trabalho e aplicando o conhecimento na vida dos pacientes. Honra maior é ter a Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira como orientadora. Sua carreira e seu amor pelas crianças são inspiradores. Poucos têm a sorte de conhecer pessoas que fizeram história. Eu sou uma delas: a que conheceu alguém que mudou a oncologia pediátrica no Brasil e a que vai fazer história. Esse é só o começo.

Mãe, o esforço que você fez para minha formação valeu a pena.

“Alice: - This is impossible.
The Mad Hatter: - Only if you believe it is.”
Alice in Wonderland

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

Alterações moleculares em grupos especiais de leucemias mieloides agudas pediátricas

RESUMO
TESE DE DOUTORADO
FRANCIANNE GOMES ANDRADE

Introdução. Os eventos genéticos mais frequentes associados com o desenvolvimento das leucemias mieloides agudas pediátricas (LMA-p) incluem as alterações tipo I (nos genes *FLT3*, *KIT*, *NRAS*, *KRAS* e *PTPN11*) e tipo II (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11*, *PML-RARα* e rearranjos do *KMT2A* [*KMT2A-r*]). Entretanto, alterações genéticas raras (<5% dos casos), representadas pelas fusões gênicas *DEK-NUP214*, *MYST3-CREBBP*, *RBM15-MKL1*, *CBFA2T3-GLIS2* e os rearranjos do gene *NUP98* (*NUP98-r*), demandam investigação em série de casos para caracterização da frequência e associação clínica dessas anormalidades. Nossos objetivos foram caracterizar as LMA-p de acordo com as alterações moleculares e testar as associações de risco com a sobrevida global; descrever o perfil genômico do subtipo *PML-RARα* e as variantes germinativas possivelmente envolvidas na leucemogênese. **Material e métodos.** Foi analisada uma coorte de 788 casos de LMA-p (*de novo*) com idade <19 anos (2000-2017). As regiões gênicas *hotspots* de mutações em genes da via de sinalização MAPK (*FLT3*, *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11* e *KIT*) foram analisadas por PCR/sequenciamento de Sanger. As fusões gênicas associadas à LMA (*KMT2A-r*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11*, *PML-RARα*, *NUP98-r*, *CBFA2T3-GLIS2*, *MYST3-CREBBP* e *RBM15-MKL1*) foram identificadas por RT-PCR/FISH. As análises estatísticas foram realizadas com os testes de qui-quadrado, exato de Fisher e Mann-Whitney U. As probabilidades de sobrevida global (pSG) em 5 anos foram comparadas usando o teste de log-rank e curvas de Kaplan-Meier. Os pacientes foram tratados segundo as diretrizes do protocolo BFM-AML2004, não incluídos em estudos clínicos. Foi realizado o sequenciamento do exoma nas amostras de DNA de um paciente com *PML-RARα* e de seu irmão gemelar sem doença. **Resultados.** As alterações tipo I e II foram identificadas em 55% e 46,4% dos casos, respectivamente. A frequência das mutações tipo I foi maior nas faixas etárias superiores (12,6% nos casos com idade ≤2 anos, 39,5% nos casos entre 2-10 anos e 47,9% nos casos ≥11 anos de idade). *CBFβ-MYH11* conferiu maior pSG que os casos sem essa alteração (71,5±10,9% e 30,9±3,5%, respectivamente). Por outro lado, casos apresentando mutações em *PTPN11* apresentaram pSG mais baixa que os casos sem essas mutações (13,0±8,4% e 33,7±4,2%, respectivamente). *NUP98-r* foram identificados em 2,8% da coorte e nenhum dos casos analisados apresentou *DEK-NUP214*. Entre os pacientes com idade ≤2 anos, as alterações *MYST3-CREBBP*, *RBM15-MKL1*, *NUP98-r* e *CBFA2T3-GLIS2* foram identificadas em 1,7%, 1,1%, 3,9% e 0,6%, respectivamente. Na análise pareada dos exomas da amostra tumoral do paciente com *PML-RARα* e a amostra do seu irmão sem doença, foram identificadas 5911 variantes, sendo 75,5% representadas por SNVs (variações de nucleotídeo único). Vinte por cento das variantes apresentaram impacto deletério para a proteína. Na análise sítio-dirigida para 116 genes associados a predisposição genética ou a etiopatogênese das LMAs, 46 genes apresentaram variantes nas amostras sequenciadas. **Conclusões.** A caracterização dos subgrupos genéticos de LMA contribui para a identificação de marcadores moleculares de valor preditivo de sobrevida. Uma análise exploratória do sequenciamento do exoma precisa ser realizada para a identificação de eventos leucemogênicos.



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

Molecular alterations in rare subsets of pediatric acute myeloid leukemia

**ABSTRACT
TESE DE DOUTORADO
FRANCIANNE GOMES ANDRADE**

Background. The common genetic events associated with pediatric acute myeloid leukemia (p-AML) comprise of type I (in *FLT3*, *KIT*, *NRAS*, *KRAS*, and *PTPN11* genes) and type II alterations (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11*, *PML-RARα*, and *KMT2A* rearrangements [*KMT2A-r*]). However, exploring rare molecular abnormalities (<5%), defined by the fusion genes *DEK-NUP214*, *MYST3-CREBBP*, *RBM15-MKL1*, *CBFA2T3-GLIS2* and *NUP98* rearrangements (*NUP98-r*), in large cohorts, allows an understanding of specific clinical and molecular characteristics. Our aims were to characterize the molecular genetics of p-AML and to investigate the association between type I and II mutations with the probability of overall survival (pOS) in p-AML cases; to describe the genomics of *PML-RARα*, and identify the germline variants associated with leukemogenesis. **Patients and methods.** We analyzed a cohort of 788 cases of p-AML (*de novo*) <19 years-old (2000-2017). Hotspots regions of RAS signaling pathway genes (*FLT3*, *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, and *KIT*) were screened by PCR/Sanger sequencing. p-AML associated fusion genes (*KMT2A-r*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11*, *PML-RARα*, *NUP98-r*, *CBFA2T3-GLIS2*, *MYST3-CREBBP*, and *RBM15-MKL1*) were identified by RT-PCR/FISH. Statistical analyses were performed using chi-square, Fisher's exact and Mann-Whitney U tests. Five-year p-OS were compared using the log-rank test and Kaplan-Meier analysis. Patients were treated according to BFM-AML2004 guidelines, not formally enrolled in treatment protocols. We performed whole exome sequencing in one *PML-RARα* patient with a healthy twin sibling. **Results.** Type I and type II mutations were identified in 55.0% and 46.4% of cases, respectively. Type I mutations were prevalent among older patients (12.6% of patients ≤2 years of age, 39.5% of patients between 2-10 years of age, and 47.9% of patients ≥11 years of age; $p < 0,001$). *CBFβ-MYH11* conferred better pOS than negative cases ($71,5 \pm 10,9\%$ and $30,9 \pm 3,5\%$, respectively). *PTPN11* mutations conferred worse pOS than wild-type ($13,0 \pm 8,4\%$ and $33,7 \pm 4,2\%$, respectively). *NUP98-r* were observed in 2.8% of p-AML and we have not identified patients with *DEK-NUP214*. Among infants, *MYST3-CREBBP*, *RBM15-MKL1*, *NUP98-r*, and *CBFA2T3-GLIS2* were identified in 1.7%, 1.1%, 3.9%, and 0.6%, respectively. In our pairwise exome analysis, we found 5911 variants; 75.5% were SNVs (single nucleotide variants). Twenty percent of the variants presented deleterious impact predicted in the protein. We investigated 116 genes associated with genetic predisposition and AML pathogenesis and identified 46 genes with variants. **Conclusions.** The characterization of genetic subgroups in p-AML allows classifying the disease according to molecular abnormalities with predictive value to the outcome. We need to deeply explore the whole exome sequencing to find the genetic variants associated with leukemogenesis.

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | ix |
| ÍNDICE | x |
| LISTA DE TABELAS | xii |
| LISTA DE FIGURAS | xiv |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xvi |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. EPIDEMIOLOGIA DAS LEUCEMIAS AGUDAS..... | 1 |
| 1.2. A GENÉTICA DAS LEUCEMIAS AGUDAS..... | 3 |
| 1.3. A CLASSIFICAÇÃO DAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS..... | 8 |
| 1.3.1. Fatores prognósticos estabelecidos na classificação da Organização Mundial da Saúde..... | 14 |
| 1.4. PATOGÊNESE DAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS..... | 17 |
| 1.5. AS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS E SUA SINGULARIDADE..... | 20 |
| 1.5.1. Leucemia promielocítica aguda..... | 24 |
| 1.5.2. Mecanismos de leucemogênese das leucemias mieloides agudas pediátricas..... | 28 |
| 1.6. ALTERAÇÕES GENÉTICAS RARAS NAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS..... | 34 |
| 1.7. A ORIGEM DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS FUNDADORAS NAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDA PEDIÁTRICAS..... | 40 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 44 |
| 3. OBJETIVOS | 45 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 46 |
| 4.1. DESENHO DO ESTUDO..... | 46 |
| 4.2. CASUÍSTICA..... | 47 |
| 4.2.1. Ética em pesquisa..... | 48 |
| 4.2.2. Tratamento..... | 48 |
| 4.3. METODOLOGIA..... | 49 |
| 4.3.1. Algoritmo de testes para a caracterização molecular das leucemias mieloides agudas pediátricas..... | 49 |
| 4.3.2. Purificação do RNA e síntese do DNA complementar..... | 50 |
| 4.3.3. Purificação de DNA..... | 51 |
| 4.3.4. Hibridização in situ por fluorescência..... | 51 |
| 4.3.5. Identificação das alterações diretoras representadas pelas fusões gênicas..... | 52 |
| 4.3.6. Identificação de mutações pontuais nos genes da via RAS-MAPK..... | 58 |
| 4.3.6.1. Sequenciamento de Sanger..... | 62 |
| 4.3.7. Sequenciamento do exoma..... | 63 |
| 4.3.7.1. Análises de bioinformática..... | 65 |
| 4.3.8. Análises estatísticas..... | 66 |
| 5. RESULTADOS | 68 |
| 5.1. ANÁLISE DESCRITIVA DOS CASOS..... | 68 |
| 5.2. ALTERAÇÕES MOLECULARES FREQUENTES NAS LMAS PEDIÁTRICAS DE NOVO..... | 73 |
| 5.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE AS MUTAÇÕES TIPO I E TIPO II..... | 80 |

| | |
|--|-----|
| 5.4. SOBREVIDA GLOBAL DOS CASOS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA PEDIÁTRICA DE NOVO EXCLUINDO OS CASOS DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA | 85 |
| 5.5. SOBREVIDA GLOBAL DOS CASOS DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA..... | 89 |
| 5.6. ALTERAÇÕES MOLECULARES RARAS NAS LMAs PEDIÁTRICAS..... | 91 |
| 5.7. CARACTERIZAÇÃO DA COORTE DE LMA INFANTIL (≤ 2 ANOS DE IDADE)..... | 95 |
| 5.8. A GENÔMICA DA LPA PEDIÁTRICA | 100 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 109 |
| 6.1. A COORTE GERAL DE LMA PEDIÁTRICA..... | 109 |
| 6.2. A LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA | 123 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 129 |
| 8. REFERÊNCIAS | 130 |
| 9. ANEXOS..... | 157 |
| 9.1. ANEXO A. Ficha de encaminhamento dos pacientes | 157 |
| 9.2. ANEXO B. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer | 158 |
| 9.3. ANEXO C. Sondas utilizadas para a identificação das alterações citogenético-moleculares | 160 |
| 9.4. ANEXO D. Protocolo para realização da técnica de hibridização in situ por fluorescência (FISH) | 161 |
| 9.5. ANEXO E. Tabela utilizada para a construção do circos plot..... | 162 |
| 9.6. ANEXO F. Genes associados a predisposição genética ou a etiopatogênese das neoplasias mieloides avaliados na análise sítio-dirigida | 163 |
| 9.7. ANEXO G. Nomenclatura dos aminoácidos..... | 166 |
| 9.8. ANEXO H. Grupo Colaborativo para Estudo das Leucemias Pediátricas .. | 167 |
| 9.9. Publicações..... | 169 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1.1 Classificação da Organização Mundial da Saúde para as Leucemias Mieloides Agudas, 2001-2016..... | 12 |
| Tabela 1.2. Comparação entre as anormalidades genéticas nas LMAs pediátricas (<18 anos de idade) e do adulto (18-60 anos de idade)..... | 22 |
| Tabela 4.1. Iniciadores e condições das reações de PCR utilizados para a identificação de mutações pontuais nos genes da via RAS-MAPK..... | 61 |
| Tabela 5.1. Características demográficas e laboratoriais dos casos de LMA pediátrica de acordo com o período de diagnóstico, Brasil, 2000-2017..... | 73 |
| Tabela 5.2. Distribuição das alterações tipo I/II de acordo com as características demográficas e laboratoriais dos casos de LMA pediátrica, Brasil, 2000-2017..... | 75 |
| Tabela 5.3. Frequência das alterações moleculares dos casos de LMA de acordo com as características demográficas e laboratoriais, Brasil, 2000-2017..... | 80 |
| Tabela 5.4. Associação entre a presença de qualquer mutação tipo I e as mutações tipo II..... | 81 |
| Tabela 5.5. Associação entre as mutações tipo I e tipo II..... | 83 |
| Tabela 5.6. Associação entre as mutações em <i>FLT3</i> e as características demográficas e laboratoriais dos casos de leucemia promielocítica aguda..... | 84 |
| Tabela 5.7. Frequência alélica das mutações <i>FLT3</i> ITD entre casos de leucemia promielocítica aguda..... | 85 |
| Tabela 5.8. Análise univariada para a probabilidade de sobrevida global dos casos de LMA pediátrica <i>de novo</i> , Brasil, 2000-2017..... | 87 |
| Tabela 5.9. Sobrevida global dos casos de LMA pediátrica <i>de novo</i> no modelo de regressão Cox, Brasil, 2000-2017..... | 89 |
| Tabela 5.10. Análise univariada para a probabilidade de sobrevida global dos casos de LPA, Brasil, 2002-2017..... | 91 |
| Tabela 5.11. Características demográficas e subtipos de classificação das LMAs de acordo com a idade, Brasil, 2000-2016..... | 97 |
| Tabela 5.12. Análise univariada da probabilidade de sobrevida global dos casos de LMA com idade ≤ 2 anos, Brasil, 2000-2017..... | 99 |
| Tabela 5.13. Número de variantes identificadas no sequenciamento do exoma do paciente com LPA e seu irmão sem doença..... | 102 |

Tabela 5.14. Genes investigados na análise sítio-dirigida que apresentaram variantes entre as amostras do paciente com LPA (tumoral e remissão) e do irmão sem doença106

Tabela 5.15. Alterações nos genes relacionados às malignidades mieloides e a etiopatogênese das LMAs.....107

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1. Arquitetura clonal e seleção subclonal das mutações nas leucemias agudas..... | 6 |
| Figura 1.2. Translocação recíproca balanceada..... | 7 |
| Figura 1.3. Evolução das classificações das LMAs pediátricas..... | 10 |
| Figura 1.4. Modelo proposto para a leucemogênese..... | 19 |
| Figura 1.5. Prevalência de alterações moleculares específicas em LMA de acordo com a idade..... | 23 |
| Figura 1.6. Patogênese da leucemia promielocítica aguda (LPA) e resposta ao ácido <i>all-trans-retinoico</i> (ATRA)..... | 27 |
| Figura 1.7. A enzima topoisomerase II e seu papel genotóxico..... | 29 |
| Figura 1.8. Mecanismos de origem das translocações..... | 32 |
| Figura 1.9. Via de sinalização RAS-MAPK..... | 39 |
| Figura 1.10. Linha do tempo com as principais fusões gênicas da LMA pediátrica de acordo com a idade..... | 40 |
| Figura 4.1. Desenho do estudo..... | 46 |
| Figura 4.2. Testes realizados para a identificação das fusões gênicas e mutações pontuais nos casos de LMA pediátrica..... | 48 |
| Figura 4.3. Gel de agarose 1% para visualização do DNA genômico (alto peso molecular) extraído do cartão de filtro..... | 51 |
| Figura 4.4. Padrão de sondas de dupla fusão utilizadas no FISH para a identificação de fusões gênicas..... | 53 |
| Figura 4.5. Padrão de sondas do FISH para a identificação de quebras no gene alvo..... | 54 |
| Figura 4.9. Gel de agarose 1,5% para detecção das mutações pontuais no gene <i>FLT3</i> | 59 |
| Figura 4.10. Representação esquemática das etapas do fluxo de trabalho de preparação das amostras de DNA para o sequenciamento do exoma..... | 64 |
| Figura 4.11. Representação esquemática das etapas que precedem o sequenciamento do exoma..... | 65 |
| Figura 5.1. Total de casos de LMA que foram encaminhados para o laboratório do Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricos, INCA, no período de 2000-2017..... | 69 |

| | |
|--|-----|
| Figura 5.2. Histograma de distribuição dos casos de acordo com a idade e mapa brasileiro com o número de casos de LMA de cada região geográfica..... | 71 |
| Figura 5.3. Frequência dos subtipos genéticos e morfológicos/imunofenotípicos de LMA..... | 77 |
| Figura 5.4. Distribuição das mutações tipo II de acordo com a idade..... | 78 |
| Figura 5.5. Distribuição das mutações tipo I de acordo com a idade..... | 79 |
| Figura 5.6. Distribuição das alterações tipo II (<i>FLT3</i> , <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>KIT</i> , <i>PTPN11</i>) entre os subtipos genéticos de LMA definidos pelas alterações tipo I (<i>RUNX1-RUNX1T1</i> , <i>CBFβ-MYH11</i> , rearranjos do <i>KMT2A</i> e <i>PML-RARα</i>) | 82 |
| Figura 5.7. Sobrevida global dos casos de LMA pediátrica <i>de novo</i> | 88 |
| Figura 5.8. Sobrevida global dos casos de LPA diagnosticados após o ano de 2002..... | 90 |
| Figura 5.9. Gel de agarose a 1,5% para visualização dos transcritos de fusão <i>NUP98-NSD1</i> , <i>RBM15-MKL1</i> e <i>CBFA2T3-GLIS2</i> | 92 |
| Figura 5.10. Sequências de fusão entre os genes <i>NUP98</i> e <i>NSD1</i> dos transcritos identificados na reação de RT-PCR em três pacientes distintos..... | 93 |
| Figura 5.11. Sequências dos transcritos <i>RBM15-MKL1</i> e <i>CBFA2T3-GLIS2</i> identificados na reação de RT-PCR..... | 94 |
| Figura 5.12. Distribuição dos casos de LMA com idade ≤ 2 anos de acordo com os subtipos genéticos e de classificação morfológica..... | 98 |
| Figura 5.13. Análise de sobrevida dos casos de LMA ≤ 2 anos de idade..... | 100 |
| Figura 5.14. Variantes geradas após seleção progressiva nos filtros de análise..... | 101 |
| Figura 5.15. Percentual das variantes discordantes entre a amostra tumoral e a amostra de remissão de acordo com as consequências na região codificante dos genes..... | 103 |
| Figura 5.16. Distribuição das variantes nos cromossomos 19, 11 e 6 identificadas na análise pareada entre a amostra tumoral e a amostra do irmão sem doença..... | 104 |
| Figura 5.17. Percentual das variantes discordantes entre a amostra tumoral e a amostra do irmão sem doença de acordo com as consequências relacionadas ao gene..... | 105 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------------------|---|
| <i>ABL1</i> | <i>C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase</i> |
| <i>ADD3</i> | <i>Adducin 3</i> |
| <i>AF6</i> | <i>ALL1-fused gene from chromosome 6 protein</i> |
| <i>AF9</i> | <i>ALL1-fused gene from chromosome 9 protein</i> |
| <i>AF10</i> | <i>ALL1-fused gene from chromosome 10 protein</i> |
| <i>ANKRD26</i> | <i>Ankyrin repeat domain 26</i> |
| Asp835 | Resíduo de ácido aspártico no códon 835 |
| ATRA | Ácido <i>all-trans</i> -retinoico |
| BCR | <i>Breakpoint cluster region</i> |
| BFB | <i>Breakage–fusion–bridge</i> |
| BFM | Berlin-Frankfurt-Münster |
| <i>BRCA1</i> | <i>BRCA1, DNA repair associated</i> |
| CBF | <i>Core binding factor</i> |
| <i>CBFA2T3</i> | <i>CBFA2/RUNX1 translocation partner 3</i> |
| <i>CBFβ</i> | <i>Core-binding factor, beta subunit</i> |
| CD | Cluster de diferenciação |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementar |
| <i>CEBPA</i> | <i>CCAAT enhancer binding protein alpha</i> |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| CN | Cariótipo normal |
| CTH | Célula tronco hematopoética |
| dATP | Desoxiadenosina trifosfato |
| dCTP | Desoxicitidina trifosfato |
| <i>DDX10</i> | <i>DEAD-box helicase 10</i> |
| <i>DDX41</i> | <i>DEAD-box helicase 41</i> |
| <i>DEK</i> | <i>DEK proto-oncogene</i> |
| DEPC | Dietil pirocarbonato |
| dGTP | Desoxiguanosina trifosfato |
| DIT | Duplicações in tandem |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| <i>DNMT3</i> | <i>DNA methyltransferase 3</i> |

| | |
|---------------|--|
| dNTP | Desoxirribonucleotídeo fosfatado |
| DRM | Doença residual mínima |
| DSB | <i>Double-strand breaks</i> |
| DTK | Domínio tirosina-quinase |
| dTTP | Desoxitimidina trifosfato |
| D835 | Resíduo de ácido aspártico no códon 835 |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| <i>ELL</i> | <i>Elongation factor for RNA polymerase II</i> |
| <i>ENL</i> | <i>MLLT1, super elongation complex subunit</i> |
| ETP | <i>Early T cell precursor</i> |
| <i>ETV6</i> | <i>ETS variant 6</i> |
| FAB | Franco-Américo-Britânico |
| <i>FANC</i> | Grupo de complementação da anemia de Fanconi |
| <i>FLT3</i> | <i>Fms related tyrosine kinase 3</i> |
| FISH | Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência |
| GAPDH | Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase |
| <i>GATA2</i> | <i>GATA binding protein 2</i> |
| GATK | <i>Genome Analysis Toolkit</i> |
| GDP | Guanosina difosfato |
| <i>GLIS2</i> | <i>GLIS family zinc finger 2</i> |
| GM-CSF | Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos |
| GRB2 | <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> |
| GTP | Guanosina trifosfato |
| <i>HHEX</i> | <i>Hematopoietically expressed homeobox</i> |
| HLA-DR | Human leukocyte antigen |
| <i>HLXB9</i> | <i>Motor neuron and pancreas homeobox 1</i> |
| <i>HOX</i> | <i>Homeobox</i> |
| <i>HOXA9</i> | <i>Homeobox A9</i> |
| <i>HOXC11</i> | <i>Homeobox C11</i> |
| <i>HOXD13</i> | <i>Homeobox D13</i> |
| <i>HRAS</i> | <i>HRAS proto-oncogene</i> |
| IC | Intervalo de confiança |
| IC-APL | <i>International Consortium on Acute Promyelocytic Leukaemia</i> |
| <i>IDH</i> | <i>Isocitrate dehydrogenase</i> |
| IL-3 | Interleucina 3 |

| | |
|-------------------|---|
| INDEL | Inserções e deleções |
| JAK | <i>Janus kinase</i> |
| JARID1A | <i>Lysine (K)-specific demethylase 5A</i> |
| Kb | Kilobases |
| KCl | Cloreto de potássio |
| KIT | <i>KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase</i> |
| KMT2A | <i>Lysine methyltransferase 2A</i> |
| KMT2A-r | Rearranjos envolvendo o gene <i>KMT2A</i> |
| KRAS | <i>KRAS proto-oncogene</i> |
| LAFM | Leucemia aguda de fenótipo misto |
| LEDGF | <i>PC4 and SFRS1 interacting protein 1</i> |
| LDI-PCR | PCR invertido de longa distância |
| LLA | Leucemia linfoblástica aguda |
| LMA | Leucemia mieloide aguda |
| LMA-t | LMAs relacionadas à terapia |
| LMMJ | Leucemia mielomonocítica juvenil |
| LPA | Leucemia promielocítica aguda |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> |
| MAL | <i>mal, T cell differentiation protein</i> |
| M-CSF | Fator estimulador de colônias de macrófagos |
| MECOM | <i>MDS1 and EVI1 complex locus</i> |
| MgCl ₂ | Cloreto de magnésio |
| MgSO ₄ | Sulfato de magnésio |
| MO | Medula óssea |
| MKL1 | <i>Megakaryoblastic leukemia</i> |
| MLLT1 | <i>Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 1</i> |
| MLLT3 | <i>Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 3</i> |
| MLLT4 | <i>Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 4</i> |
| MPO | Mieloperoxidase |
| MYH11 | <i>Myosin heavy chain 11</i> |
| M4Eo | Leucemia mieloide aguda M4 eosinofílica |
| NF1 | Neurofibromin 1 |
| NGS | <i>Next-generation sequencing</i> |
| NHEJ | Junção de extremidades não homólogas |
| NPM | Nucleofosmina |

| | |
|-------------------------------|--|
| <i>NPM1</i> | Nucleofosmina 1 |
| <i>NRAS</i> | <i>NRAS proto-oncogene</i> |
| <i>NSD1</i> | <i>Nuclear receptor binding SET domain protein 1</i> |
| <i>NSD3</i> | <i>Nuclear receptor binding SET domain protein 3</i> |
| <i>NUP98</i> | Nucleoporina 98 |
| <i>NUP214</i> | Nucleoporina 214 |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| <i>OTT</i> | <i>RNA binding motif protein 15</i> |
| Pb | Pares de bases |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| <i>PHF23</i> | <i>PHD finger protein 23</i> |
| PI3K | <i>Phosphatidylinositide 3-kinase</i> |
| <i>PLZF</i> | <i>Promyelocytic leukemia zinc finger</i> |
| <i>PML</i> | <i>Promyelocytic leukemia</i> |
| Polyphen2 | <i>Polymorphism Phenotyping v2</i> |
| pSG | Probabilidade de sobrevida global |
| PTD | Duplicação parcial em <i>tandem</i> |
| <i>PTPN11</i> | <i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11</i> |
| <i>RARα</i> | <i>Retinoic acid receptor alpha</i> |
| RAS | Rat sarcoma viral oncogene homolog |
| <i>RBM15</i> | <i>RNA binding motif protein 15</i> |
| RC | Remissão completa |
| RFLP | <i>Restriction fragment length polymorphism</i> |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| Rpm | Rotações por minuto |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| RR | Razão de risco |
| RT-PCR | Transcrição reversa seguida por PCR |
| RTK | Receptor tirosina-quinase |
| <i>RUNX1</i> | <i>Runt related transcription factor 1</i> |
| <i>RUNX1T1</i> | <i>Runt-related transcription factor 1; translocated to, 1</i> |
| RXR | Retinoid X receptor |
| SEER | <i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i> |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SG | Sobrevida global |

| | |
|------------|---|
| SHC | Domínio de homologia Src 2 |
| SHP-2 | Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 |
| SIFT | <i>Sorting Intolerant From Tolerant</i> |
| SKF | Quinase da família Src |
| SLD | Sobrevida livre de doença |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SNV | Variantes de nucleotídeo único |
| SOS1 | SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1 |
| SP | Sangue periférico |
| STAT | <i>Signal transducer and activator of transcription</i> |
| TCTH | Transplante de células tronco hematopoéticas |
| <i>TET</i> | <i>Ten-Eleven Translocation</i> |
| Topo-II | Topoisomerase II |
| VEP | <i>Variant Effect Predictor</i> |
| WES | <i>Whole exome sequencing</i> |
| WGS | <i>Whole genome sequencing</i> |
| XRCC4 | <i>X-ray repair cross complementing 4</i> |
| XRCC5 | <i>X-ray repair cross complementing 5</i> |
| XRCC6 | <i>X-ray repair cross complementing 6</i> |

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPIDEMIOLOGIA DAS LEUCEMIAS AGUDAS

Entre os tipos de câncer infanto juvenil (entre 0 e 19 anos de idade) em todo o mundo, a leucemia é o mais comum na maioria das populações, correspondendo a de 25% a 35% dos casos (CAMARGO *et al.*, 2010; KAATSCH, 2010; LINABERY; ROSS, 2007). Existe um padrão de distribuição notável das leucemias agudas de acordo com as regiões geográficas no mundo. As maiores taxas de incidência, para a faixa etária de 0 a 19 anos, foram descritas em regiões da Itália, Espanha, Argentina e Estados Unidos, com 70-110 casos por milhão. As menores taxas foram encontradas nos registros de câncer africanos, na Índia e na China, com menos de 20 casos por milhão. Variações entre as taxas de incidência são observadas também entre as regiões geográficas brasileiras. Taxas maiores que 50 casos por milhão são encontradas em Manaus, Curitiba e Florianópolis. Por outro lado, os registros de câncer de base populacional de Palmas, Roraima, Natal, Salvador e Poços de Caldas revelam taxas que não ultrapassam 30 casos por milhão (INCA, 2016). No Brasil, é marcante a diferença entre as taxas de incidência dos principais subtipos de leucemia aguda quando ajustadas por idade (REIS *et al.*, 2010). Essas variações demográficas são as evidências iniciais para o entendimento da etiologia da doença e para o estabelecimento de possíveis estratégias de prevenção e tratamento.

Um dos subtipos de leucemia aguda, a leucemia mieloide aguda (LMA), que se desenvolve a partir de uma célula tronco hematopoética (CTH) ou célula progenitora mieloide, representa 18-24% dos casos de leucemia aguda pediátrica (<19 anos de idade) diagnosticados no mundo, com taxas variadas no Brasil, sendo uma doença que afeta, principalmente, os idosos (≥ 60 anos de idade) (LINABERY; ROSS, 2007); (REIS *et al.*, 2010); (DORES *et al.*, 2011). Um pico de incidência discreto para a LMA é observado no primeiro ano de vida e diminui progressivamente até os quatro anos de idade, permanecendo relativamente constante durante os outros anos da infância, na adolescência e na fase adulta, quando aumenta gradativamente. Nas pessoas com idade ≥ 75 anos, a LMA apresenta uma taxa de incidência de 208,9 por milhão (DORES *et al.*, 2011). As LMAs que predominam no primeiro ano de vida destacam-se pelo curto período de

latência, características imuno-citogenéticas distintas das demais e na maioria dos casos, estão associadas a um prognóstico desfavorável (CREUTZIG *et al.*, 2011, 2012; PUI *et al.*, 2000; ROSS, 2008).

Grandes avanços no tratamento das LMAs pediátricas vêm sendo alcançados ao longo dos últimos anos. Informações do registro de dados epidemiológicos dos Estados Unidos (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*, SEER) demonstram diferenças nas taxas de sobrevida dos pacientes pediátricos com LMA evoluindo de <20% em 1970 para 31% em 1980, 42% em 1990 e 55% em 2008 (www.seer.cancer.gov/popdata). Essas melhoras são atribuídas à intensificação na quimioterapia, transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH), melhoras nos cuidados de suporte, refinamentos na classificação de risco e detecção de doença residual mínima para a avaliação da resposta ao tratamento (RUBNITZ; INABA, 2012). Apesar desses avanços, grande parte dos pacientes ainda apresenta prognóstico sombrio.

1.2. A GENÉTICA DAS LEUCEMIAS AGUDAS

Na última década, o estudo dos mecanismos genéticos envolvidos no desenvolvimento das neoplasias malignas foi acompanhado pelos avanços tecnológicos, permitindo o entendimento de que a patogênese do câncer está enraizada nas alterações genéticas herdadas e em mutações somáticas adquiridas. A transformação celular acontece como um mecanismo clonal, a partir de modificações em uma única célula. A identificação das mutações presentes em todas as células alteradas possibilita a reconstrução do genótipo da célula fundadora (STRATTON, 2011) e desvendar a biologia tumoral possibilita a implantação de estratégias terapêuticas, atingindo todos os níveis de prevenção.

As leucemias agudas são neoplasias do sistema hematopoético que comprometem as linhagens celulares, uma vez que a partir de uma alteração genética em uma célula progenitora, ocorrerá uma supressão da hematopoese normal pelo comprometimento da multiplicação e diferenciação das linhagens normais (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

O sistema hematopoético é composto por CTH, que originam duas linhagens principais de células maduras - linfóide (abrangendo as células B, T e *natural killer*) e mieloide (incluindo as células granulocíticas, eritroides e megacarioblásticas) - em eventos precoces que acontecem de maneira hierárquica, altamente regulada e que foram, inicialmente, postulados como mutuamente exclusivos (AKASHI *et al.*, 2000; KONDO; WEISSMAN; AKASHI, 1997). Estudos mais recentes indicam que esses acontecimentos podem ser flexíveis e que os progenitores mais precoces podem apresentar destinos variáveis, como por exemplo, progenitores linfóides muito imaturos são capazes de gerar determinadas células mielóides. Esse roteiro de diferenciação é um modelo dos componentes moleculares que controlam a hematopoese e são alvo de alterações, servindo como base para a origem das malignidades hematológicas, bem como para a identificação de marcadores de diagnóstico e de testes terapêuticos (revisado em DOULATOV *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de uma célula hematopoética maligna, assim como dos demais subtipos celulares, é coordenado pelo acúmulo de lesões genômicas múltiplas, independentes e/ou complementares. Essas alterações acontecem como eventos randômicos em células precursoras normais, até que essas células adquiram mutações fundadoras com vantagens proliferativas subsequentes (HANAHAN; WEINBERG, 2011a). Alguns subtipos celulares, entretanto, podem

apresentar um número de alterações maior ou menor que a média, refletindo o envolvimento de agentes mutagênicos durante a patogênese da neoplasia. Em um dos extremos dessa observação, estão os tumores pediátricos e as leucemias agudas, que se apresentam com um baixo número de alterações em relação às demais neoplasias. Células sanguíneas precursoras apresentam a capacidade de crescimento “*blasto-like*”, ou seja, crescem com as mesmas características de autorenovação e diferenciação de uma célula imatura, atributo que pode ser a razão pela qual as leucemias parecem necessitar menos alterações genéticas para se desenvolverem que os tumores sólidos (HANAHAN; WEINBERG, 2011a; VOGELSTEIN *et al.*, 2013).

Os clones leucêmicos evoluem a partir de uma interação seletivamente vantajosa das chamadas alterações genéticas diretoras (*drivers*) e de lesões denominadas passageiras (*passengers*). As mutações diretoras são aquelas que ocorrem com frequência mais elevada do que poderia ser esperado pela taxa normal de mutações observadas em diferentes neoplasias, estando, particularmente, envolvidas nos processos celulares relevantes para a oncogênese. Acredita-se que essas são as lesões iniciadoras do processo patogênico. As lesões passageiras não apresentam efeito direto na vantagem de crescimento seletiva da célula que sofreu essa alteração, mas podem se apresentar contexto-dependente, como nos casos em que as mutações são, funcionalmente, relevantes para a resposta terapêutica e resistência (revisado em GREAVES; MALEY, 2012). A distinção dessas diferentes classes de mutações é baseada na frequência que elas ocorrem em um gene particular em um ou mais tumores, associada a proporção de mutações que, seletivamente, contribuem para a vantagem de crescimento e de sobrevivência das células neoplásicas.

O genoma do câncer em cada paciente apresenta um perfil único, mas com a combinação de alterações decisivas para a evolução da doença, o que permite o agrupamento dos pacientes de acordo com a mutação diretora presente.

O modelo clássico de evolução tumoral, demonstrado por estudos de leucemias concordantes em gêmeos idênticos (GREAVES *et al.*, 2003), sugere que uma célula neoplásica pode dar origem a diversos subclones através da aquisição de mutações de forma concomitante e sucessiva e que levam a dominância de um subclone determinado (Figura 1.1). Subclones intermediários podem apresentar potencial de crescimento limitado, se tornando raros. Esse modelo, conhecido como *branching evolution*, descreve clones com perfis fenotípicos e mutacionais distintos

que podem ser segregados de acordo com o microambiente, apresentando implicações clínicas importantes para o diagnóstico e prognóstico, uma vez que o tratamento pode provocar uma pressão seletiva naquele clone minoritário, propiciando sua expansão e recidiva da doença (revisado em GREAVES; MALEY, 2012).

Os avanços nas tecnologias de larga escala como o sequenciamento de segunda geração (NGS) revolucionaram a forma de estudar o genoma do câncer e iniciaram a era genômica, culminando com o sequenciamento global do genoma (*whole genome sequencing*, WGS) e o sequenciamento global do exoma (*whole exome sequencing*, WES). Essas abordagens cobrem a maior parte da informação genética tumoral incluindo, além de mutações pontuais, alterações estruturais como deleções, duplicações e junções cromossômicas, transformando, rapidamente, o panorama genômico com uma metodologia de alto rendimento para um grande número de pacientes e com um resultado em curto período de tempo (TARLOCK; MESHINCHI, 2015).

Esforços recentes vem sendo direcionados para o desenvolvimento de iniciativas de estudo do genoma das LMAs pediátricas com o auxílio de metodologias de NSG (DOWNING *et al.*, 2012). Dados gerados por esses estudos são disponibilizados para a comunidade científica e contribuem para o esclarecimento das bases moleculares da LMA pediátrica, como as alterações responsáveis pela patogênese e a evolução clonal do diagnóstico à recaída. Assim, a capacidade de alocar pacientes em terapias, relativamente, individualizadas, vêm se tornando uma realidade com o auxílio dessas tecnologias.

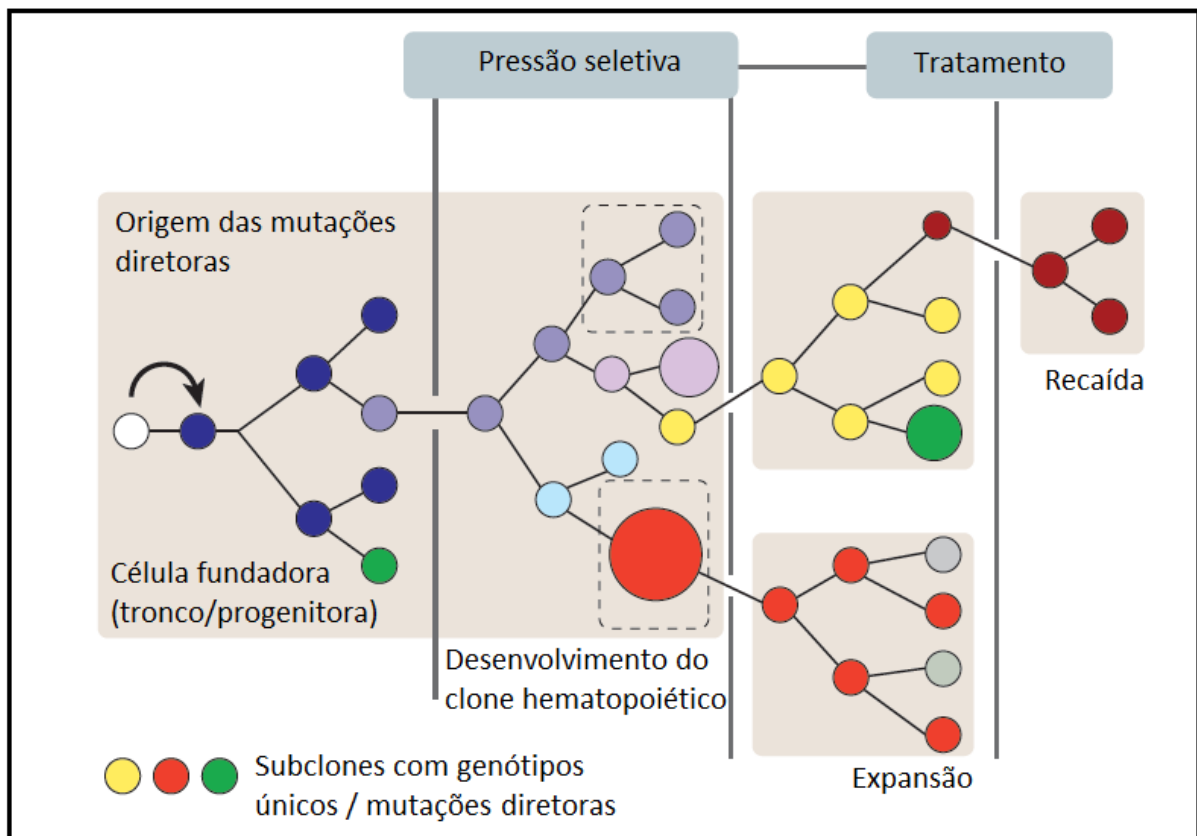


Figura 1.1. Arquitetura clonal e seleção subclonal das mutações nas leucemias agudas. A pressão seletiva permite que alguns subclones que sofreram mutações proliferem ao passo que outros permaneçam dormentes ou sejam eliminados. Nas leucemias agudas, essa evolução pode acontecer em um período menor que nos tumores sólidos e os subclones podem estar sujeitos a menores restrições. As linhas verticais representam a pressão seletiva e os círculos coloridos, um subclone geneticamente diferente (modificado de GREAVES; MALEY, 2012).

Translocações cromossômicas, deleções e ampliações gênicas somáticas são condições que podem levar ao comprometimento da função de genes essenciais para a hematopoese, com os pontos de quebra ocorrendo, frequentemente, em sítios frágeis suscetíveis ao dano. Nas leucemias agudas, as translocações cromossômicas recorrentes são seletivamente associadas a subtipos biologicamente distintos e são, em geral, translocações recíprocas e estáveis, refletindo um único evento, que ocorre precocemente, e não um evento subjacente à instabilidade genômica (revisado em GREAVES; WIEMELS, 2003). Apesar de alguns tumores pediátricos compartilharem essas características, outros tumores apresentam cariótipos diversificados entre os clones, com deleções e translocações cromossômicas não balanceadas, indicativas da instabilidade cromossômica (LENGAUER, 2001). Os rearranjos estruturais que, em geral, levam à fusão de dois genes por sua justaposição (Figura 1.2), apresentam potencial maligno por resultar

em um oncogene híbrido, inativar um gene supressor tumoral através do afastamento da sua região promotora ou pelo reposicionamento de uma região acentuadora da transcrição (*enhancer*), que passa a desregular dois genes distais não relacionados (NAMBIAR; KARI; RAGHAVAN, 2008). Toda a região codificante de um gene pode ser justaposta a um promotor transcricionalmente ativo ou a um elemento acentuador de outro gene em regiões cromossômicas diferentes, levando a uma expressão anormal do gene translocado. De outra maneira, a translocação pode resultar na formação de um único gene de fusão que, por sua vez, codifica para uma proteína ativa que afeta a fisiologia normal da célula (NAMBIAR; RAGHAVAN, 2011).

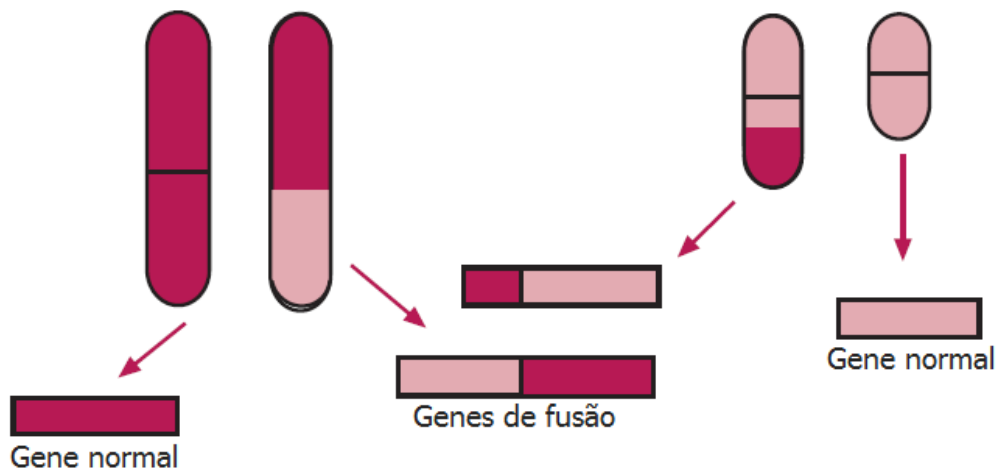


Figura 1.2. Translocação recíproca balanceada. A translocação cromossômica pode originar transcritos de fusão, resultando em um oncogene híbrido, inativação um gene supressor tumoral pelo afastamento da sua região promotora ou pelo reposicionamento de uma região acentuadora da transcrição (*enhancer*), que passa a desregular dois genes distais não relacionados (DASH; GILLILAND, 2001).

Inversões e translocações cromossômicas que não geram produtos de fusão atuam desestabilizando elementos regulatórios críticos e afetando genes nas proximidades do rearranjo estrutural. Alterações genéticas que podem levar ao câncer como desfecho incluem, ainda, aquelas que levam à expressão aumentada ou diminuída de genes que coordenam a transformação maligna, bem como modificações epigenéticas.

1.3. A CLASSIFICAÇÃO DAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS

A identificação das mutações diretoras nas LMAs, diretamente associadas com a patogênese da doença, permitiu a definição de grupos de risco preditivos de sobrevida, com conseqüente estratificação terapêutica e monitoramento da resposta do paciente ao tratamento aplicado (VARDIMAN *et al.*, 2009). A descoberta de novas características moleculares originou outras perspectivas a respeito dos marcadores de diagnóstico e prognóstico que propiciaram uma melhor compreensão da patogênese dessas doenças.

A caracterização laboratorial das LMAs evoluiu bastante com a incorporação de tecnologias modernas e abordagens multidisciplinares mais avançadas (ARBER *et al.*, 2017). A suspeita de diagnóstico se dá, inicialmente, a partir dos sinais e sintomas resultantes da substituição das células normais na medula óssea (MO) por células neoplásicas e, eventualmente, outros órgãos, com a subsequente inibição da hematopoese normal (TENEN, 2003). Os pacientes, em geral, se apresentam com anemia, sangramentos devido à plaquetopenia e febre devido à neutropenia, às vezes, sem foco infeccioso. Em geral, a presença de células imaturas no sangue periférico (SP) é o primeiro passo para caracterização clínica da leucemia, na grande maioria das vezes com leucocitose. A infiltração leucêmica de tecidos extramedulares pode resultar em hepatomegalia, esplenomegalia, hipertrofia das gengivas e tumores. A infiltração de pele por células blásticas (cloroma) e o comprometimento do sistema nervoso central (SNC) também podem ser observados em LMA. A leucocitose, quando excede 100×10^9 células/L, pode levar a sintomas respiratórios, oculares e sintomas resultantes da infiltração no SNC, requerendo intervenção imediata (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

O diagnóstico da LMA é realizado a partir do quadro clínico descrito acima, bem como pela caracterização morfológica, imunofenotípica e citogenética-molecular dos blastos (células imaturas) leucêmicos. É necessário identificar o estágio de diferenciação mielóide dos blastos e, para isso, é realizada a análise morfológica baseada no fenótipo associado à linhagem (indiferenciado, mielóide, monoblástico, eritroblástico ou megacariobástico). Morfologicamente, esse estágio pode ser definido de acordo com a classificação do grupo Franco-Américo-Britânico (FAB), que estratificou a LMA em oito subtipos (M0 a M7), revelando a porcentagem de blastos indiferenciados, granulados ou atípicos e a presença de estruturas

intracelulares, como bastonetes de Auer e perfil citoquímico distinto entre os subtipos celulares (BENNETT *et al.*, 1991).

A classificação FAB foi a primeira a ser amplamente aceita pelos grupos cooperativos e foi, inicialmente, baseada nas características morfológicas dos blastos em esfregaço de MO corado com Wright-Giemsa e marcadores citoquímicos (BENNETT *et al.*, 1976). Com a introdução de ensaios imunofenotípicos, especialmente através da citometria de fluxo, a classificação FAB foi modificada para incorporar os marcadores celulares na definição do subtipo leucêmico, sendo, particularmente, fundamental para a classificação da LMA imatura (M0) e com diferenciação megacarioblástica (M7), além de distinguir das leucemias linfoblásticas agudas (LLA).

Considerando a relevância das alterações citogenéticas e moleculares no curso clínico do paciente e suas diferenças na resposta ao tratamento, a OMS propôs uma classificação para as LMAs que incluísse as características genéticas como principal critério para a categorização da doença, inter-relacionando as informações morfológicas e citoquímicas (estabelecidas pelo grupo FAB), às imunofenotípicas e às citogenético-moleculares como melhor estratégia para estratificação de risco preditivo de sobrevida. Em 2001, a terceira edição da classificação da OMS foi publicada e introduziu os marcadores imunofenotípicos e citogenéticos no diagnóstico das LMA. A quarta edição, publicada em 2008, incorporou novos subgrupos citogenéticos, alguns deles como categorias provisórias que vêm sendo amplamente utilizadas em estudos clínico-epidemiológicos e em protocolos terapêuticos modernos (Figura 1.3; (VARDIMAN; HARRIS; BRUNNING, 2002); (VARDIMAN *et al.*, 2009). Desde então, novos subtipos genéticos relevantes vêm mudando o cenário terapêutico das LMAs.

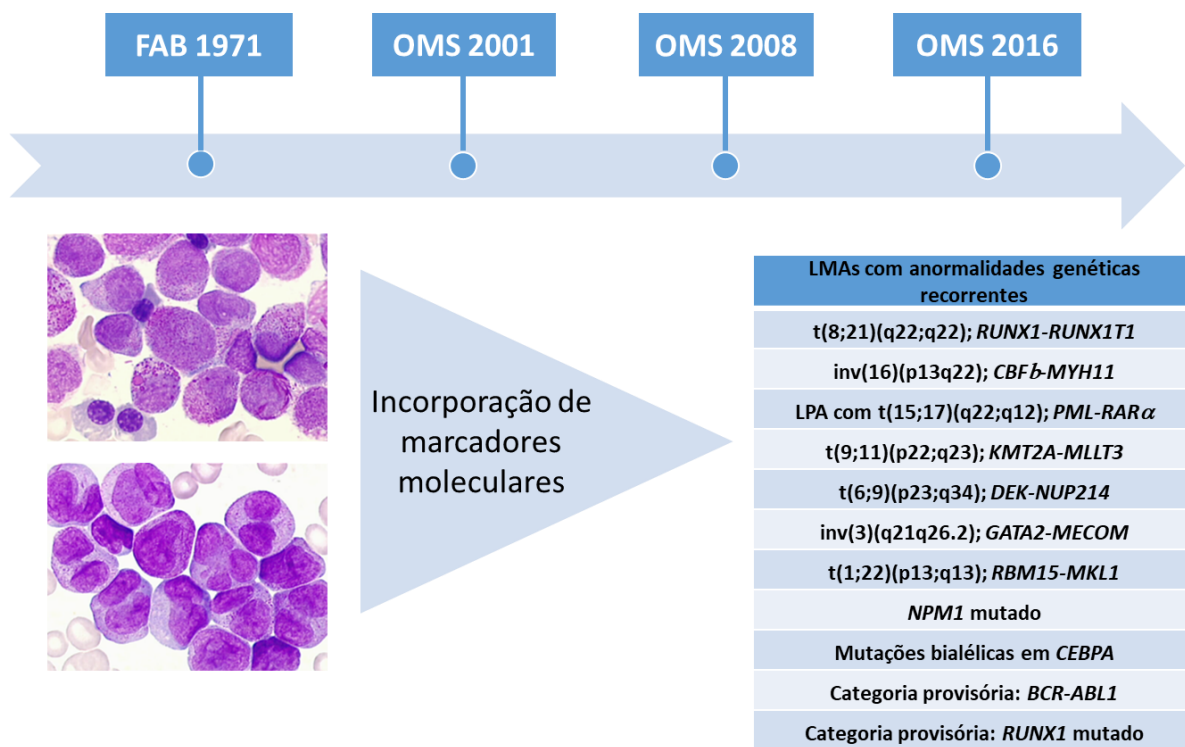


Figura 1.3. Evolução das classificações das LMAs pediátricas. A classificação FAB, estabelecida em 1971, classificou as LMAs de acordo com suas características morfológicas e ainda apresenta importância para a definição do subtipo de leucemia promielocítica aguda, representada nas imagens. As classificações da OMS incorporaram marcadores moleculares que estabelecem categorias de risco preditivos de sobrevida. FAB, Franco-Américo-Britânico; LMA, leucemia mieloide aguda; OMS, Organização Mundial da Saúde. Imagens gentilmente cedidas pela professora Marie Thérèse Daniel do Hospital Saint-Louis, Paris, França, 2004.

A classificação da OMS, revisada em 2016, vem sendo fundamental na definição de novas categorias para as leucemias agudas, combinando as características morfológicas, imunofenotípicas e genéticas até então descobertas, fornecendo marcadores relevantes para o prognóstico. As alterações genômicas podem ser detectadas por ensaios direcionados, através das técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) e na transcrição reversa seguida por PCR (RT-PCR), hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) ou por painéis gênicos abrangentes usando tecnologias de NGS (ARBER *et al.*, 2017). As principais mudanças ao longo das três últimas classificações da OMS, que uniformizaram e refinaram o diagnóstico das LMAs estão representadas na Tabela 1.1.

Apesar de a grande maioria dos casos de neoplasias mieloides apresentarem origem esporádica, vem aumentando o reconhecimento de que determinados grupos de pacientes (5-10%) apresentam padrão de mutações de origem hereditária, que predispõem o desenvolvimento das LMAs. A identificação de alterações genéticas

associadas à LMA entre os membros de uma mesma família auxilia o diagnóstico e a suspeita clínica de uma doença com características genéticas herdadas (NICKELS *et al.*, 2013). O maior reconhecimento da importância desse subgrupo de doenças foram as mudanças incorporadas na classificação da OMS de 2016, com a adição de uma seção de neoplasias mieloides com predisposição genética (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Classificação da Organização Mundial da Saúde para as Leucemias Mieloides Agudas, 2001-2016

| Classificação das LMAs | | |
|---|---|---|
| OMS 2001 | OMS 2008 | OMS 2016 |
| LMAs com anormalidades genéticas recorrentes | | |
| LMA com t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> | LMA com t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> | LMA com t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> |
| LMA com inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22); <i>CBFβ-MYH11</i> | LMA com inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22); <i>CBFβ-MYH11</i> | LMA com inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22); <i>CBFβ-MYH11</i> |
| LPA com t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARα</i> e variantes | LPA com t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARα</i> | LPA com <i>PML-RARα</i> |
| LMA com anormalidades 11q23 (<i>KMT2A</i>) | LMA com t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i> | LMA com t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i> |
| | LMA com t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> | LMA com t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> |
| | LMA com inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2-MECOM</i> | LMA com inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2-MECOM</i> |
| | LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i> | LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i> |
| | Categoria provisória: LMA com <i>NPM1</i> mutado | LMA com <i>NPM1</i> mutado |
| | Categoria provisória: LMA com <i>CEBPA</i> mutado | LMA com mutações bialélicas em <i>CEBPA</i> |
| | | Categoria provisória: LMA com <i>BCR-ABL1</i> |
| | | Categoria provisória: LMA com <i>RUNX1</i> mutado |
| LMAs com displasia multilineagem | | |
| LMA e síndrome mielodiplásica relacionadas à terapia | | |
| LMA não especificadas | | |
| LMA minimamente diferenciada | LMA minimamente diferenciada | LMA minimamente diferenciada |
| LMA sem maturação | LMA sem maturação | LMA sem maturação |
| LMA com maturação | LMA com maturação | LMA com maturação |
| Leucemia mielomonocítica aguda | Leucemia mielomonocítica aguda | Leucemia mielomonocítica aguda |

Tabela 1.1. Continuação

| | | |
|---|---|---|
| Leucemia aguda monocítica/monoblástica | Leucemia aguda monocítica/monoblástica | Leucemia aguda monocítica/monoblástica |
| Leucemia aguda eritroide | Leucemia aguda eritroide | Leucemia aguda eritroide |
| Leucemia megacarioblástica aguda | Leucemia megacarioblástica aguda | Leucemia megacarioblástica aguda |
| Leucemia basofílica aguda | Leucemia basofílica aguda | Leucemia basofílica aguda |
| Panmielose aguda com mielofibrose | Panmielose aguda com mielofibrose | Panmielose aguda com mielofibrose |
| Sarcoma mieloide | Sarcoma mieloide | Sarcoma mieloide |
| | Proliferações mieloides relacionadas à SD | Proliferações mieloides relacionadas à SD |
| Leucemias agudas de linhagem ambígua | | |
| | Leucemia aguda indiferenciada | Leucemia aguda indiferenciada |
| | LAFM com t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> | LAFM com t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> |
| | LAFM com t(v;11q23); rearranjos do <i>KMT2A</i> | LAFM com t(v;11q23); rearranjos do <i>KMT2A</i> |
| | LAFM B-mieloide | LAFM B-mieloide |
| | LAFM T-mieloide | LAFM T-mieloide |
| Neoplasias mieloides com predisposição germinativa | | |
| | | LMA com mutações em <i>CEBPA</i> |
| | | Neoplasias mieloides com mutações em <i>DDX41</i> |
| | | Neoplasias mieloides com mutações em <i>RUNX1</i> |
| | | Neoplasias mieloides com mutações em <i>ETV6</i> |
| | | Neoplasias mieloides com mutações em <i>ANKRD26</i> |
| | | Neoplasias mieloides com mutações em <i>GATA2</i> |

LAFM, leucemia aguda de fenótipo misto; LMA, leucemia mieloide aguda; LPA, leucemia promielocítica aguda; OMS, Organização Mundial da Saúde; SD, síndrome de Down.

1.3.1. Fatores prognósticos estabelecidos na classificação da Organização Mundial da Saúde

A LMA pediátrica representa um grupo de leucemias heterogêneo apesar da sua origem mieloide comum. A grande variedade de alterações moleculares observadas na LMA reflete essa heterogeneidade, tanto do ponto de vista fenotípico quanto genético. As características genéticas são importantes determinantes do prognóstico e são usados para a estratificação de risco nos estudos clínicos (ABRAHAMSSON *et al.*, 2011).

Entre as anormalidades cromossômicas mais frequentes na LMA pediátrica, destacam-se quatro subgrupos:

- a translocação entre os cromossomos 8q22 e 21q22 [representada como t(8;21)(q22;q22)];
- a inversão do cromossomo 16, nas regiões 13.1 do braço longo e 22 do braço curto [inv(16)(p13.1q22)];
- a t(15;17)(q22;q21);
- os rearranjos envolvendo o gene *KMT2A* (*KMT2A-r*).

A t(8;21)(q22;q22)/*RUNX1-RUNX1T1* e a inv(16)(p13.1q22)/*CBFβ-MYH11* comprometem, respectivamente, as subunidades *RUNX1* e *CBFβ* do complexo de transcrição heterodimérico de ligação ao núcleo (*core binding factor*, CBF) e, por isso, definem as chamadas LMAs-CBF, associadas a prognóstico favorável. A t(15;17)(q22;q21), que gera a fusão gênica *PML-RARα*, também associada ao prognóstico favorável, é encontrada, exclusivamente, no subtipo leucemia promielocítica aguda (LPA) (revisado em CREUTZIG *et al.*, 2012).

A afinidade de ligação da subunidade *RUNX1* por regiões promotoras no DNA é aumentada por sua associação com *CBFβ*, o qual não interage diretamente com o DNA, mas protege o complexo da proteólise (PASCHKA, 2008). O complexo CBF recruta diversas proteínas que atuam na ligação de regiões promotoras regulando a expressão de genes importantes para a diferenciação hematopoética normal. Entre eles, incluem-se a interleucina 3 (IL-3), o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e o receptor do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), além de genes importantes para a maturação de células T e B (DASH; GILLILAND, 2001). Além disso, CBF recruta cofatores com atividade de

histona deacetilases, relaxando a dupla fita de DNA e permitindo o acesso da maquinaria de transcrição (KITABAYASHI, 1998).

Os *KMT2A-r*, na região 11q23, podem ser observados em LMA e em LLA e, por isso, definem o subtipo leucemia aguda de fenótipo misto (LAFM), abrangendo uma variedade de rearranjos do *KMT2A*. Mais de 70 parceiros de fusão já foram identificados nessas alterações sendo que, em LMA, os principais genes envolvidos são *AF9 (MLLT3)*, *AF10 (MLLT10)*, *ELL* e *AF6 (MLLT4)* (MEYER *et al.*, 2017). Alterações em *KMT2A* parecem apresentar maior potencial leucemogênico que aquelas em *RUNX1* e *CBFβ*. O *KMT2A* codifica uma proteína com atividade de histona metiltransferase e funciona como ativador transcricional, regulando a expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário e a hematopoese (TAKEDA, 2006).

É importante a identificação do gene fusionado ao *KMT2A*, uma vez que o parceiro envolvido no rearranjo leva às variações na sobrevida nesse grupo de pacientes (BALGOBIND *et al.*, 2009). Da mesma maneira, experimentos *in vivo* indicam que o potencial leucemogênico da translocação cromossômica envolvendo o *KMT2A* depende do parceiro (BARABÉ *et al.*, 2007), fato que pode auxiliar no entendimento das diferenças observadas na sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) dos pacientes com determinadas alterações (BALGOBIND *et al.*, 2009; CREUTZIG *et al.*, 2012).

Juntos, esses quatro subtipos genéticos correspondem a 50% dos casos de LMA pediátrica, uma frequência muito maior que a observada em adultos, apesar de, em ambos os casos, apresentarem morfologia, expressão gênica e resposta ao tratamento semelhantes (BETTS *et al.*, 2007; GRIMWADE, 2001; HARRISON *et al.*, 2010; NEUHOFF *et al.*, 2010).

A OMS categoriza, ainda, as alterações t(1;22)(p13;q13), que gera a fusão gênica *RBM15-MKL1*, predominante na LMA do lactente (≤ 2 anos de idade) com diferenciação megacarioblástica (TORRES *et al.*, 2011), a inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); envolvendo os genes *GATA2* e *MECOM* e a t(6;9)(p23;q34);*DEK-NUP214* (Tabela 1.1; (VARDIMAN, 2010). As três primeiras translocações cromossômicas citadas definem grupos de risco prognóstico adverso (NEUHOFF *et al.*, 2010).

As LAFM T/mieloide compreendem um subtipo raro de leucemia aguda que apresenta muitas similaridades com o subtipo mais indiferenciado de LLA de células T, chamado LLA de células precursoras T precoces (*early T cell precursor*, ETP).

Esses, são dois subtipos intimamente relacionados apresentando em comum características morfológicas, imunofenóticas e a ausência de um marcador genético que define esse subtipo particular (BÉNÉ; PORWIT, 2012; COUSTAN-SMITH *et al.*, 2009; WEINBERG; ARBER, 2010). Apesar de as LAFM T/mieloide apresentarem marcadores moleculares comuns entre os demais subtipos de LMA, alguns estudos demonstram que esses pacientes, quando incluídos nos protocolos terapêuticos de LLA, apresentam maiores taxas de sobrevida do que quando tratados como LMA (MATUTES *et al.*, 2011; MEJSTRIKOVA *et al.*, 2010).

Desde sua terceira edição, a classificação da OMS para as neoplasias mieloides vem ressaltando a importância de lesões genéticas múltiplas que cooperam para o estabelecimento da leucemogênese e influenciam as características clínicas e morfológicas da doença (VARDIMAN, 2002), incluindo não apenas os rearranjos cromossômicos detectados microscopicamente, mas também as mutações genômicas submicroscópicas associadas a mutações diretoras (KELLY; GILLILAND, 2002). As translocações são eventos iniciadores das leucemias agudas, mas para o estabelecimento do fenótipo leucêmico mutações secundárias são necessárias (NIEBUHR *et al.*, 2008).

A classificação FAB pode ser concluída rapidamente após análise morfológica de MO e SP, direcionando a identificação dos marcadores citogenético-moleculares que definem as LMAs conforme os grupos de risco preditivos de sobrevida. Entre as translocações cromossômicas mais frequentes em crianças que geram fusões gênicas, a alteração *RUNX1-RUN1T1* está associada aos subtipos morfológicos M1/M2 e a fusão gênica *CBF β -MYH11* é descrita como associada ao subtipo M4 e M4 eosinofílica (M4Eo) (NEUHOFF *et al.*, 2010); a fusão *PML-RAR α* é exclusiva do subtipo M3 (revisado em CREUTZIG *et al.*, 2012); e os *KMT2A-r* estão associados, principalmente, aos subtipos mielomonocíticos (M4 e M5), podendo também ser encontrados nas leucemias indiferenciadas (BIONDI *et al.*, 2000). Sendo assim, a classificação FAB ainda é importante para direcionar as análises moleculares para a condução de um diagnóstico integrado mais rápido para a tomada de decisão terapêutica.

1.4. PATOGÊNESE DAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS

As translocações cromossômicas geram a recombinação ilegítima ou justaposição de genes normalmente separados e, em geral, envolvem dois fatores de transcrição. Como resultado, pode ocorrer a formação de uma proteína híbrida com propriedades oncogênicas (ROWLEY, 1998). Apesar de associações específicas dessas fusões gênicas com as LMAs, estudos *in vitro* demonstraram que as proteínas de fusão são insuficientes *per se* para induzir um fenótipo leucêmico completo (CASTILLA *et al.*, 1996, 1999; CORRAL *et al.*, 1993; DOBSON, 1999; HE *et al.*, 1997; HIGUCHI *et al.*, 2002; YUAN *et al.*, 2001). A expressão das proteínas de fusão parece alterar o crescimento e a diferenciação das CTH gerando uma população de células pré-leucêmicas suscetível à aquisição de mutações cooperativas para induzir o desenvolvimento da LMA (DOWNING; SHANNON, 2002). O número e o tipo de mutações cooperativas variam significativamente entre os diferentes subtipos das LMAs (BALGOBIND *et al.*, 2011).

A partir de evidências experimentais e epidemiológicas, Dash e Gilliland sugeriram um modelo de cooperação entre pelo menos duas classes de mutações nas LMAs (DASH; GILLILAND, 2001). No modelo inicialmente proposto para a leucemogênese, chamado de “2 eventos”, uma classe de mutações (classe I) confere vantagem proliferativa e de sobrevivência às células com a alteração e, uma segunda classe de mutações (classe II) atua, primariamente, interferido na diferenciação hematopoética e na subsequente apoptose celular. Entre as mutações de classe I, estão mutações que ativam genes da via de sinalização RAS-proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK), que é a principal classe de genes alterada na LMA pediátrica, incluindo *RAS*, *FLT3*, *PTPN11* e *KIT*. No grupo de mutações de classe II, estão as fusões gênicas *RUNX1-RUNX1T1*, *CBF β -MYH11* e *PML-RAR α* , entre outras, que são o primeiro evento necessário para a leucemogênese. As LMAs, que são caracterizadas pela proliferação/sobrevivência celular aumentadas e parada na diferenciação hematopoética, seriam, portanto, consequência da presença de ambas as classes de mutações (DASH; GILLILAND, 2001).

O modelo dos “2 eventos” não é mais aceito, uma vez que mutações recorrentes em outras classes de genes vêm sendo descritas. As mutações de classe III, que afetam genes de regulação epigenética, e outras classes, como

mutações que afetam genes do spliceossoma (*SF3B1*, *U2AF35*, *SRSF2*, *ZRSR2*, *SF3A1*, *PRPF40B*), os moduladores da transcrição e tradução (*EVI1*, *RUNX1*, *GATA2*, *UTF1*, *SOX2/8*, *PHF6*, *CEBPA*, *WT1*, *TP53*), do complexo de coesinas (*STAG2*, *RAD21*, *SMC1A*, *SMC3*) e os reguladores da cromatina (*ASXL1/2*, *EZH2*, *PRC1/2*, *PhoRC*, *PR-DUB*, *BCOR*), estão associadas com a patogênese da LMA do adulto, sendo muito raras nas LMAs pediátricas (FARRAR *et al.*, 2016; LEY *et al.*, 2010; LIANG *et al.*, 2013; SCHUBACK; ARCECI; MESHINCHI, 2013). A Figura 1.4 representa o desenvolvimento da LMA como resultado de alterações genéticas adquiridas de acordo com a funcionalidade do gene, que se acumulam de modo progressivo em uma única célula transformada (GODLEY, 2012).

Estudos de caracterização das alterações genéticas em LMA, ao revelar o espectro de mutações somáticas que origina a doença, direcionaram a atenção para a evolução molecular e para sua arquitetura clonal. CTH normais que apresentam mutações diretoras de leucemia adquirem uma vantagem competitiva de sobrevivência e, com o passar do tempo, apresentam expansão clonal, fato que pode ser um aspecto normal de envelhecimento do sistema hematopoético (JAISWAL *et al.*, 2014; XIE *et al.*, 2014).

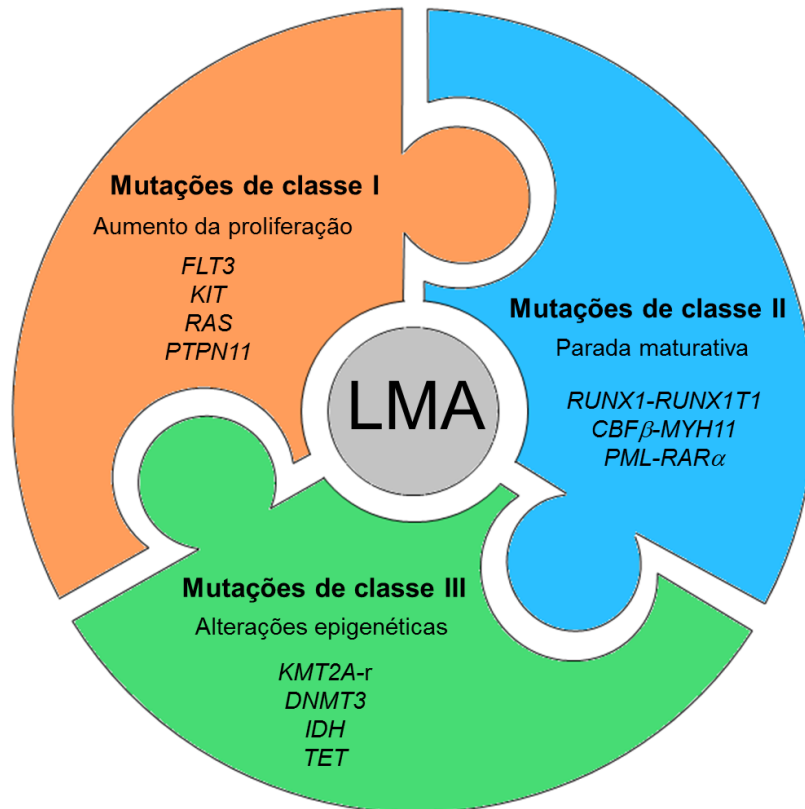


Figura 1.4. Modelo proposto para a leucemogênese. No mínimo, três classes de anormalidades genéticas são necessárias para o desenvolvimento da LMA: mutações de classe I ou alterações em genes que conferem vantagem proliferativa ou de sobrevivência celular ao progenitor hematopoético (por ex., nos genes *KIT*, *FLT3*, *PTPN11*, *RAS* e a fusão gênica *BCR-ABL1*); mutações de classe II, representadas por alterações cromossômicas recorrentes (por ex., as fusões gênicas *CBF β -MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RAR α* , entre outras) que bloqueiam a diferenciação mantendo a autorrenovação do clone leucêmico; e mutações de classe III, que afetam genes reguladores epigenéticos, como *DNMT3*, *IDH* e *TET*, além dos rearranjos do *KMT2A*, inicialmente definido como classe II (modificado de GILLILAND; GRIFFIN, 2002).

1.5. AS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS E SUA SINGULARIDADE

Existem evidências científicas de que a LMA pediátrica é uma doença distinta da LMA do adulto em alguns aspectos (CHAUDHURY *et al.*, 2015; CREUTZIG *et al.*, 2008, 2012, 2016; RADTKE *et al.*, 2009; TARLOCK; MESHINCHI, 2015). Esse conceito é substanciado por dados que demonstram prevalências diferentes de alterações citogenéticas e mutações em genes “condutores” na LMA entre crianças e adolescentes, adultos jovens e idosos, além das taxas de incidência e de sobrevida amplamente variadas. É importante ressaltar que algumas alterações genéticas são exclusivas das crianças, refletindo, portanto, uma história natural diferente. Ao contrário das LMAs em adultos, nas quais mutações em reguladores epigenéticos (como *DNMT3*, *IDH* e *TET*) são frequentes, alterações nesse conjunto de genes nos casos pediátricos, além de raras, parecem ser mutualmente exclusivas e ocorrem com outras mutações não relacionadas à regulação epigenética (HUETHER *et al.*, 2014). Além disso, nas LMAs pediátricas, as alterações genéticas de classificação de risco terapêutico são representadas, em quase 90% dos casos, por fusões e rearranjos gênicos, diferente dos casos de LMA do adulto, em que as principais alterações genéticas são representadas por mutações pontuais.

A LMA pediátrica, aqui referida de maneira abrangente como os casos <19 anos de idade, incluindo crianças, adolescentes e adultos jovens, é caracterizada por alta frequência de anormalidades citogenéticas (>90%), enquanto entre os casos adultos predominam o grupo citogeneticamente normal (cariótipo normal, CN) e defeitos moleculares nos genes reguladores epigenéticos (revisado em CREUTZIG *et al.*, 2012).

A importância prognóstica das anormalidades citogenéticas recorrentes é bem estabelecida para a estratificação dos pacientes em grupos de risco favorável, intermediário e adverso, com novas estratégias sendo consideradas para estratificar modalidades terapêuticas, evitando exposição desnecessária a pacientes de baixo risco e incluindo terapia intensiva, quando necessária, naqueles de risco adverso (RADHI; MESHINCHI; GAMIS, 2010). A idade é um dos fatores prognósticos independentes bem delineado, assim como a contagem de leucócitos ao diagnóstico, a presença das anormalidades citogenéticas/moleculares,

mielodisplasia prévia e resposta precoce ao tratamento (revisado em CHAUDHURY *et al.*, 2015).

A classificação da OMS é aplicada para todos os casos de LMA, sem distinção entre as idades. Além disso, contém a maioria, mas não todas, as alterações citogenéticas específicas dos pacientes pediátricos. A diferença na prevalência e prognóstico entre as LMAs pediátricas e do adulto estão sumarizadas na Tabela 1.2. Grupos colaborativos divulgam, periodicamente, recomendações para diagnóstico e padronização dos protocolos de tratamento, com práticas gerais e para estudos clínicos. As recomendações de manejo dos pacientes adultos são estabelecidas de acordo com a classificação da European LeukemiaNet (DOHNER *et al.*, 2009). Para o grupo pediátrico, as recomendações são definidas pelo grupo europeu Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) (CREUTZIG *et al.*, 2012).

Tabela 1.2. Comparação entre as anormalidades genéticas nas LMAs pediátricas (<18 anos de idade) e do adulto (18-60 anos de idade)

| | LMA do adulto (18-60 anos) | | LMA pediátrica (<18 anos) | |
|---|----------------------------|------------------------|---------------------------|-----------------|
| | Frequência (%) | Prognóstico | Frequência (%) | Prognóstico |
| Cariótipo anormal | 55 | Variável | 70-80% | Variável |
| LMA com anormalidades genéticas recorrentes (classificação OMS) | | | | |
| t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> | 8 | Favorável | 12-14 | Favorável |
| t(16;16)(p13;q22); <i>CBFβ-MYH11</i> | 5 | Favorável | 8 | Favorável |
| t(15;17)(q22;q21); <i>PML-RARα</i> | 5-10 | Favorável | 6-10 | Favorável |
| t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i> | 2 | Intermediária | 7 | Favorável |
| t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> | 1 | Adversa | <2 | Adversa |
| t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2-MECOM</i> | 1 | Adversa | <1 | Adversa |
| t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i> | <1 | Desconhecida | LMA-M7 ^a | Intermediária |
| LMA com <i>NPM1</i> mutado | 35 (53 em CN) | Favorável ^b | 5-10 | Favorável |
| LMA com <i>CEBPA</i> mutado | 10 em CN | Favorável | 5 (14 em CN) | Favorável |
| LMA com anormalidades genéticas recorrentes (não incluídas na classificação OMS) | | | | |
| t(7;12)(q36;p13)/t(7;12)(q32;p13) | Ausente | - | Lactentes ^c | Adversa |
| t(5;11)(q35;p15.5); <i>NUP98-NSD1</i> | Ausente | - | 3,8 | Adversa |
| Mutações gênicas | | | | |
| <i>NRAS</i> | 10 | Sem significado | 20 | Controverso |
| <i>KIT</i> | 3-5 | Variável | 3 | Desconhecido |
| <i>PTPN11</i> | Ausente | - | 5-21 ^e | Desconhecido |
| <i>FLT3</i> ^d | 20-40 | Adversa | 10 | Variável |
| <i>IDH</i> | 16 | Variável | Raras | Sem significado |
| <i>DNMT3</i> | 20 | Desconhecido | Raras | Desconhecido |

^a Alteração encontrada, exclusivamente, no subtipo LMA-M7 (megacarioblástico). ^b Prognóstico favorável nos casos que apresentam *FLT3* selvagem. ^c Alteração encontrada em cerca de 50% dos casos de LMA em lactentes. ^d *FLT3* com alterações do tipo duplicação interna *in tandem* (DIT). ^e Alteração descrita para LMA em lactentes. CN, cariótipo normal; LMA, leucemia mieloide aguda; OMS, Organização Mundial da Saúde. Modificado de CREUTZIG *et al.*, 2012.

Nas crianças de até 2 anos de idade, destacam-se o curto período de latência, características imuno-citogenéticas distintas e, na maioria dos casos, associação com um prognóstico desfavorável (BIONDI *et al.*, 2000; CREUTZIG *et al.*, 2008; NEUHOFF *et al.*, 2010). Clinicamente, a doença se apresenta com características de hepatoesplenomegalia e envolvimento de órgãos extra medulares. Além disso, está associada a uma alta incidência dos subtipos morfológicos FAB M4/M5 e M7 e características de risco intermediário e alto, fatos que estão correlacionados à alta frequência de *KMT2A-r* (BIONDI *et al.*, 2000; CREUTZIG *et*

al., 2012, 2016). A doença de risco favorável é mais frequente em crianças com idade entre 1 e 10 anos comparada aos adolescentes, o que contribui para maiores taxas de sobrevida. A distribuição de frequência das principais alterações citogenético-moleculares das LMAs em relação à idade pode ser observada na Figura 1.5.

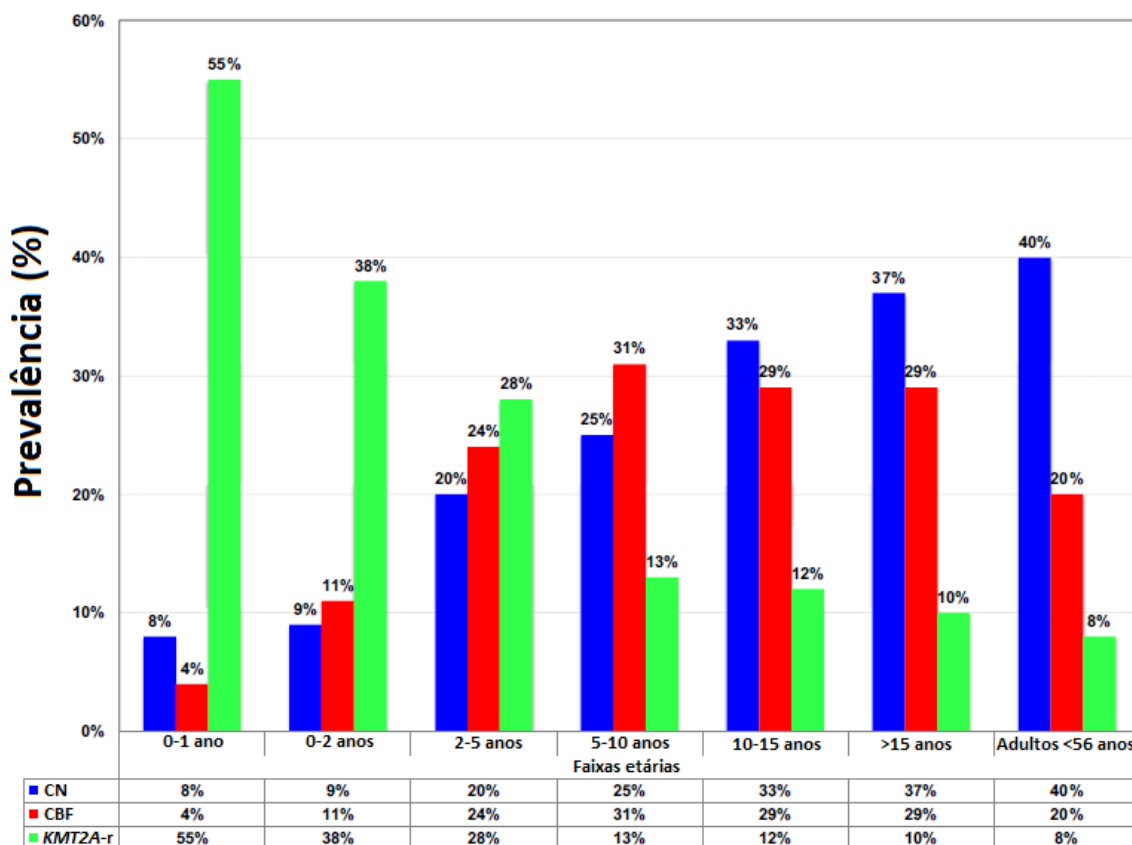


Figura 1.5. Prevalência de alterações moleculares específicas em LMA de acordo com a idade. CBF, LMA com alterações no complexo do fator de ligação ao núcleo (CBF), que incluem as LMA com as alterações *RUNX1-RUNX1T1* e *CBFβ-MYH11*; CN, cariótipo normal; *KMT2A-r*, rearranjos do *KMT2A* (TARLOCK; MESHINCHI, 2015).

Em adultos, o TCTH na primeira remissão completa (RC) é recomendado entre os casos que apresentam anormalidades citogenéticas de alto risco (DOHNER *et al.*, 2009), que incluem a monossomia dos cromossomos 5 e 7, alterações em 5q, *inv(3)(q21q26.2)* ou *t(3;3)(q21;q26.2)*, *t(6;9)(p23;q34)/DEK-NUP214*, *t(9;22)(q34;q11.2)/BCR-ABL1* e cariótipo complexo (definido como 3, 4, ou 5 anormalidades não relacionadas em uma mesma célula) (GRIMWADE *et al.*, 2010). Apesar dessas mesmas alterações conferirem risco adverso nos casos pediátricos, o mesmo desfecho não é suficientemente desfavorável para justificar o TCTH, uma

vez que essa sobrevida pode estar associada apenas a alguns grupos específicos (HARRISON *et al.*, 2010; NEUHOFF *et al.*, 2010).

Alterações genéticas de alto risco que ocorrem, quase exclusivamente, nos casos pediátricos incluem as translocações crípticas t(5;11)(q35;p15.5)/NUP98-NSD1, a inv(16)(p13.3q24.3)/CBFA2T3-GLIS2 e a t(8;16)(p11;p13)/MYST3-CREBBP, objetos desse estudo.

1.5.1. Leucemia promielocítica aguda

A leucemia promielocítica aguda (LPA) é um exemplo bem-sucedido de uma medicina precisa, com estratégias terapêuticas alvo-específicas capazes de levar a altas taxas de resposta e cura (RAVANDI; STONE, 2017). A LPA tem se mostrado com frequências superiores nas crianças e adultos jovens em países da América Latina, com uma variação geográfica global aparente que desperta curiosidade investigativa (ZHANG *et al.*, 2015). Sendo uma doença muito rara na infância, corresponde a 5-7% do total de casos de LMA nos Estados Unidos e países da Europa do norte e central, enquanto em pacientes pediátricos com descendência latina/hispânica, a LPA corresponde a 20% das LMAs (DOUER *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2015). Entretanto, em ambos os grupos, o número de casos de LPA em adultos é muito maior que sua ocorrência em crianças. A mediana de idade de diagnóstico da LPA pediátrica é de 9-12 anos, sendo o diagnóstico na idade <1 ano muito mais raro (revisado em TESTI; LOCOCO, 2014).

A LPA é um subtipo de LMA único por apresentar características biológicas peculiares e, clinicamente, propensão por desenvolver coagulação intravascular disseminada. Historicamente, é descrita por apresentar rápido curso fatal e alta incidência de morte precoce causada por hemorragia (HILLESTAD, 1957). Em LPA, existe uma parada na maturação de progenitores hematopoéticos no estágio promielocítico (Figura 1.6). A descrição das características citogenéticas e dos eventos moleculares que levam à parada maturativa (DE THÉ *et al.*, 1990), foi o passo inicial para o entendimento da biologia das LPAs e dos mecanismos de ação dos agentes terapêuticos como o ácido *all-trans-retinoico* (ATRA) e do trióxido de arsênico, drogas que se mostraram efetivas (empiricamente) no controle da doença e de suas manifestações agressivas (HUANG *et al.*, 1988; SHEN *et al.*, 1997). Por sua eficácia e seu potencial de induzir a remissão completa, o ATRA foi incorporado

na fase de indução dos regimes terapêuticos, resultando em melhoras significativas nas taxas de SG e SLD (SANZ *et al.*, 2008).

Geneticamente, a LPA é caracterizada pela translocação cromossômica t(15;17)(q22;q11), que resulta na fusão gênica *PML-RAR α* e em uma proteína quimérica (DE THÉ *et al.*, 1990), a partir de dois transcritos de fusão. Um deles é regulado pelo promotor de *PML* e codifica uma proteína contendo a maioria dos domínios funcionais de *RAR α* , incluindo o domínio de ligação ao DNA. A maior parte do gene *PML* é incorporada na fusão gênica. O transcrito recíproco menor *RAR α -PML* também é expresso em pacientes com LPA. A relação causal entre a fusão *PML-RAR α* e a origem da LPA é baseada não só em observações clínico-epidemiológicas de que o rearranjo está sempre associado à LPA, mas também ao fato de que essa fusão causa uma síndrome com fenótipo semelhante à LPA em modelos murinos (BROWN *et al.*, 1997).

PML participa da organização de domínios nucleares, chamados corpos nucleares de *PML*, que regulam as modificações pós traducionais de alvos com propriedades supressoras de crescimento, particularmente, pela ativação de p53 (revisado em THÉ, 2017). O gene *RAR α* codifica uma proteína que atua como repressor da transcrição de genes importantes para a mielopoese (ALCALAY *et al.*, 1991). Em concentrações fisiológicas do ligante de *RAR α* , ocorre liberação do complexo repressor e ativação da transcrição (GERMAIN *et al.*, 2006).

A proteína *PML-RAR α* reduz a especificidade de ligação ao DNA e não permite a ligação ao ATRA (GRIGNANI *et al.*, 1998), recrutando corepressores nucleares que inibem a transativação de genes-alvo de *RAR α* via deacetilação de histonas, impedindo o acesso e a ligação da maquinaria de transcrição, conseqüentemente, impedindo a expressão de genes necessários para a diferenciação hematopoética (GRIGNANI *et al.*, 1998). Essa repressão transcricional é consequência de mudanças epigenéticas induzidas pela proteína quimérica *PML-RAR α* , que promove, ainda, a desestabilização dos corpos nucleares de *PML* e a conseqüente inibição da via de sinalização de p53, contribuindo para a autorrenovação dos primielócitos (Figura 1.6A). A reversão desse efeito se dá com a adição de ATRA em concentrações supra fisiológicas, que induz um programa de diferenciação de promielócitos em neutrófilos diferenciados terminais, seguido por apoptose. A nível molecular, ATRA sobrepõe a atividade inibitória dominante de *PML-RAR α* , se ligando ao domínio *RAR α* da proteína de fusão e liberando o

complexo corepressor nuclear, permitindo a expressão de genes silenciados necessários para a diferenciação de promielócitos em neutrófilos maduros (Figura 1.6B) (THÉ, 2017).

Existem outras translocações variantes envolvendo *RAR α* e associadas ao fenótipo de LPA. Nesses casos, o ponto de quebra em *RAR α* se mantém, mas outros genes estão envolvidos na translocação, como o gene *NPM* e o *PLZF*, nas translocações t(5;17)(q32;q12) e t(11;17)(q23;q21), respectivamente. Entretanto, pacientes apresentando a translocação t(11;17)(q23;q21) não respondem ao tratamento com ATRA, apesar das similaridades com o fenótipo clínico de LPA. Essa observação pode ser explicada, em parte, pelo fato de que *PLZF* é capaz de recrutar o complexo nuclear corepressor e a proteína *PLZF/RAR α* não é afetada pelo ATRA, levando a um bloqueio persistente na expressão gênica e na diferenciação hematopoética (GRIGNANI *et al.*, 1998; MUINDI *et al.*, 1992).

1.5.2. Mecanismos de leucemogênese das leucemias mieloides agudas pediátricas

A compreensão dos mecanismos de formação das fusões gênicas pôde ser obtida a partir do estudo das LMAs associadas à onco-terapia (LMA-t). As LMAs-t, correspondem a ~15% dos casos de LMA, ocorrem após tratamento para malignidades hematológicas e não hematológicas com drogas alquilantes e/ou inibidores de topoisomerase e, em geral, apresentam prognóstico pior que as LMAs *de novo*. A incidência dessas leucemias tem aumentado ao longo dos anos em consequência de regimes quimioterápicos intensivos adotados para o tratamento de um câncer primário (KERN *et al.*, 2004; MAURITZSON *et al.*, 2002).

As anormalidades citogenéticas específicas podem ser relacionadas aos efeitos citotóxicos das substâncias utilizadas no tratamento da doença primária. Nas LMAs-t, a natureza do agente causador apresenta uma influência importante sobre a biologia, momento de aparecimento do fenótipo leucêmico e prognóstico. A identificação da enzima topoisomerase II (topo-II) como um alvo de drogas, como epipodofilotoxinas e antraciclinas, representa um dos grandes avanços da farmacologia anticâncer. Entretanto, uma complicação potencial das drogas que têm como alvo essa enzima, é o desenvolvimento das leucemias secundárias à terapia (NITISS, 2009).

A topo-II é uma proteína dimérica que atua durante o processo de replicação, se ligando ao DNA e alterando sua topologia. A topo-II alivia a tensão de enovelamento helicoidal gerada pelo próprio mecanismo de replicação, através da clivagem reversível de uma dupla hélice e o religamento de ambas as fitas. Cada monômero permanece ligado de maneira covalente às extremidades da quebra na dupla fita (DSB) do DNA através da ligação com o grupamento fosfato, clivando uma ligação fosfodiéster na cadeia de DNA (ALBERTS *et al.*, 2006). Portanto, a enzima gera, temporariamente, uma DSB e realiza, em seguida, a religação das regiões terminais quebradas. A DSB é um estágio intermediário de curta duração, mas agentes inibidores da topo-II inibem a etapa de religação, acumulando o complexo composto pela DSB na qual a enzima permanece ligada ao DNA (revisado em GILLILAND; JORDAN; FELIX, 2003; RAFFINI *et al.*, 2002). As quebras são citotóxicas e, por isso, a finalidade do uso de inibidores da topo-II. Mas essa inibição também leva a efeitos genotóxicos, incluindo a formação de translocações

cromossômicas inespecíficas que podem desaparecer, mas podem, ainda, adquirir estabilidade e levar à leucemogênese (Figura 1.7).

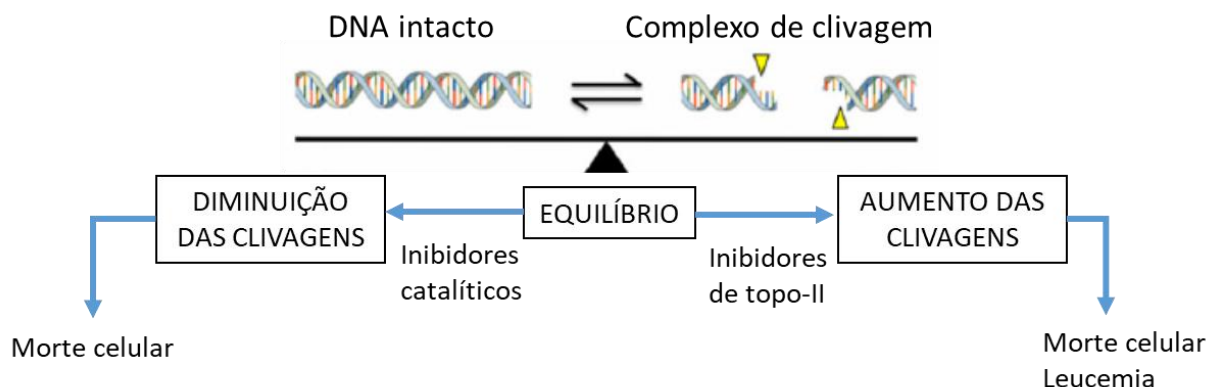


Figura 1.7. A enzima topoisomerase II e seu papel genotóxico. O equilíbrio entre a clivagem mediada pela enzima topoisomerase II (necessária para funções fisiológicas) e a ligação é crítico para a sobrevivência da célula. Se o nível de clivagem no DNA mediada pela topoisomerase II diminui em consequência da diminuição de sua atividade catalítica, a enzima perde sua atividade de diminuir o estresse replicativo, levando à morte celular como resultado da falha mitótica. Por outro lado, se os níveis de clivagem se tornam muito elevados, as quebras na dupla fita do DNA podem ser reparadas de maneira errônea, levando a translocações cromossômicas ou outras aberrações genômicas. Se essas alterações sobrecarregam o processo de divisão celular, podem levar à morte celular, o que é o objetivo de diversas drogas anticâncer, ou a translocações cromossômicas que se tornam estáveis e se mantêm nas divisões celulares, promovendo a leucemogênese. Modificado de PENDLETON *et al.*, 2014.

As DSB são pré-requisitos para a origem das translocações cromossômicas. Uma vez que todo o genoma é replicado durante a divisão celular, qualquer região genômica se torna um sítio potencial para a formação de DSB associadas à replicação. Apesar disso, o dano ao DNA associado à replicação não é completamente randômico. Existem regiões do genoma, chamadas de sítios frágeis comuns, que são mais propensas a quebras durante o estresse replicativo. Essas regiões são relativamente estáveis nas células normais, mas, nas células tumorais, acumulam quebras e anormalidades cromossômicas (ARLT *et al.*, 2006). Agentes que atuam sobre a topo-II induzem leucemias agudas com translocações balanceadas que, geralmente, se evidenciam em três anos e envolvem os genes *KMT2A*, *RUNX1*, *PML* e *RAR α* (JOANNIDES; GRIMWADE, 2010). As translocações envolvendo o gene *KMT2A* são as mais frequentes em LMA-t, caracterizando uma leucemia com curto período de latência (revisado em GILLILAND; JORDAN; FELIX, 2003).

O estado transcricional é outro fator que influencia a frequência da translocação, uma vez que a maioria das translocações envolvem regiões codificantes e os genes transcritos são mais sujeitos a translocações do que genes silenciados (BUNTING; NUSSENZWEIG, 2013). Ainda assim, para que a translocação ocorra, os genes envolvidos devem estar na mesma vizinhança nuclear para possibilitar sua interação e a junção das extremidades das duas fitas de DNA. Nesse contexto, os processos que aproximam esses genes ou facilitam sua interação aumentam o risco para que a translocação aconteça entre eles. Genomas interfásicos estão organizados no espaço nuclear de maneira não randômica e a distância entre os genes parece afetar a ocorrência da translocação, o que explica o porquê de algumas delas acontecerem tão comumente em malignidades específicas (MEABURN; MISTELI; SOUTOGLOU, 2007; MISTELI, 2010). Além disso, é provável que haja uma seleção da translocação com base em seu potencial de manter a sobrevivência e a proliferação da célula neoplásica (BUNTING; NUSSENZWEIG, 2013).

Os compostos que atuam sobre a atividade catalítica da topo-II podem ser separados em duas categorias. A primeira inclui drogas como as antraciclinas (por exemplo, daunorubicina), que diminuem a atividade da enzima por atuarem como inibidores catalíticos. Drogas da segunda categoria incluem, por exemplo, etoposídeo e mitoxantrona, que aumentam os níveis do complexo de clivagem topo-II/DNA, conseqüentemente, inibindo a replicação e a transcrição, direcionando a célula para apoptose (NITISS, 2009). Uma variedade de compostos que acontecem naturalmente e incluem a curcumina, digitoxina, flavonoides da dieta e constituintes do chá verde, inibem a topo-II ou induzem a formação do complexo topo-II/DNA em estudos *in vitro* (LOPEZ-LAZARO *et al.*, 2011; LÓPEZ-LÁZARO; WILLMORE; AUSTIN, 2010). Sugere-se que esses compostos, incluídos na dieta materna, contribuem para as translocações *in utero* envolvendo o *KMT2A* observadas na leucemia de lactentes (DOORN-KHOSROVANI *et al.*, 2007; ROSS, 2000), uma vez que os *KMT2A-r*, nesses casos, compartilham características moleculares em comum com as LMAs-t.

A análise detalhada dos pontos de quebra (posição no cromossomo derivativo onde dois segmentos de cromossomos heterólogos são fusionados) e os aspectos da biologia da topo-II podem esclarecer como essas translocações são formadas.

Para os genes *KMT2A*, *RUNX1*, *PML* e *RAR α* , muitos pontos de quebra nas LMAs *de novo* e nas LMAs-t foram determinados a nível de pares de bases. Essa

observação demonstrou que, enquanto nas LMAs-t, os pontos de quebra se localizam em regiões agrupadas e previamente descritas, chamadas de *breakpoint cluster regions* (BCRs), sua distribuição pode ser distorcida se comparada às regiões dos pontos de quebra nas LMAs *de novo*. Esse dado é, particularmente, notável para o *KMT2A* (MEYER *et al.*, 2013). Os pontos de quebra cromossômicos do *KMT2A* nas leucemias se localizam em uma BCR de 8Kb, sendo que as quebras do gene nas LMAs-t e nas leucemias de lactentes se concentram em uma região telomérica de 1Kb e os pontos de quebra dos casos *de novo* predominam na parte centromérica dessa região (MEYER *et al.*, 2017). Dois mecanismos podem explicar essa sensibilidade diferenciada. O primeiro está relacionado diretamente à clivagem mediada pela topo-II e o segundo, à fragmentação apoptótica precoce mediada por DNase ativada por caspase (revisado em COWELL; AUSTIN, 2012).

A presença de sequências de microhomologia entre os genes fusionados sugere que o dano ao DNA mediado pela topo-II possa ser reparado pelo padrão de junção de extremidades não homólogas (NHEJ), pelos mecanismos de replicação induzidos pela DSB e pelos ciclos de quebra-fusão-ponte (*breakage–fusion–bridge*, BFB) (BUNTING; NUSSENZWEIG, 2013). Os mecanismos de replicação são propostos como causadores de translocações por mudar a extensão da fita molde de DNA para outra sequência homóloga durante a replicação, resultando em uma sequência não homóloga que será copiada na nova fita de DNA (Figura 1.8; (SMITH; LLORENTE; SYMINGTON, 2007).

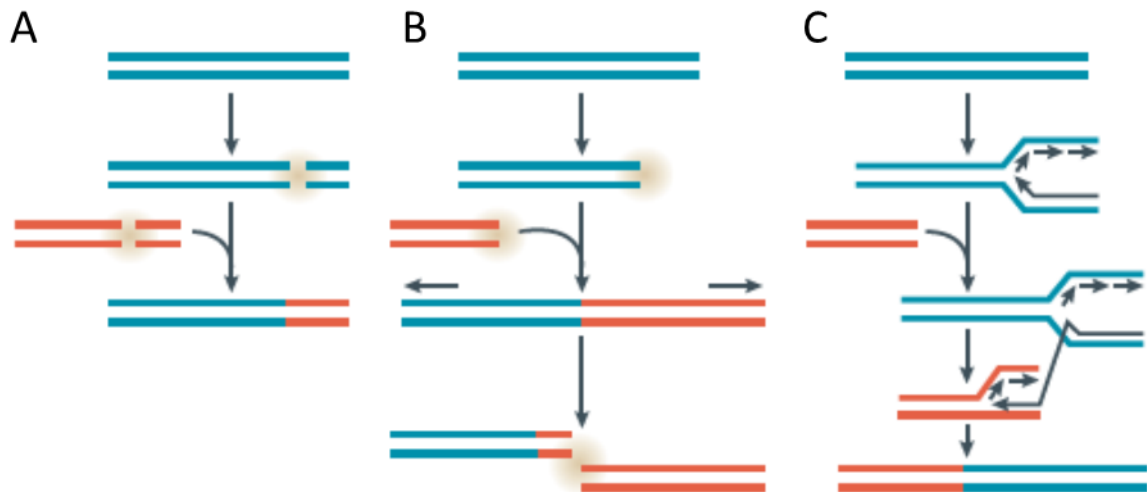


Figura 1.8. Mecanismos de origem das translocações. A. As translocações cromossômicas recíprocas e balanceadas se formam como consequência da fusão de quebras na dupla fita do DNA que acontecem na mesma célula. Seguindo essa quebra, uma via de sinalização é ativada, levando à ligação de fatores da via de reparo de junção de extremidades não homólogas. Os fragmentos vermelho e azul representam diferentes cromossomos que podem ser, incorretamente, ligados pelas vias endógenas de reparo. B. Os telômeros desprotegidos geram resposta como quebras na dupla fita do DNA que, potencialmente, leva a fusão dos telômeros e fusões entre as extremidades dos cromossomos. Durante a anáfase, os cromossomos dicêntricos são separados, originando translocações ou quebras na dupla fita. Os cromossomos quebrados agem como substratos para novos ciclos de fusões e quebras, originando as translocações complexas. C. Hipoteticamente, as translocações podem se iniciar a partir de um mecanismo baseado na replicação, no qual há mudança do sítio da maquinaria de replicação em um cromossomo diferente com algum grau de homologia entre o cromossomo inicial. A extensão da forquilha de replicação (setas no fragmento azul) em um cromossomo diferente (setas no fragmento vermelho) pode levar a origem de uma fita de DNA com sequências dos dois cromossomos (BUNTING; NUSSENZWEIG, 2013).

O processo chamado BFB é iniciado a partir de uma quebra na dupla fita de DNA na região telomérica que, conseqüentemente, fica desprotegida. Assim, as cromátides irmãs que apresentam DSB sofrem uma fusão nas porções distais, formando um cromossomo dicêntrico com duas cópias de genes homólogos entre os dois centrômeros. Durante a anáfase, os cromossomos dicêntricos podem ter seus centrômeros tracionados para pólos opostos da célula, podendo formar um cromossomo com duas ou mais cópias de um ou mais genes, e outro com deleções. As cromátides com cópias múltiplas de genes podem fundir novamente durante a intérfase, formando um novo cromossomo dicêntrico com aumento no número de cópias daquele gene, o qual é replicado na próxima divisão celular formando um

novo ciclo de BFB. Esse mecanismo está associado com a origem das ampliações gênicas e translocações complexas (Figura 1.8) (BUNTING; NUSSENZWEIG, 2013).

As translocações, em particular aquelas que geram fusões gênicas, são consequência de DSB e da junção da dupla do DNA em diferentes sítios de cromossomos não homólogos. Nesses casos, o reparo se dá pelas vias endógenas de NHEJ. Nas células de mamíferos, a via de NHEJ melhor caracterizada é conhecida como clássica e se inicia através da ligação de um heterodímero, composto pelas proteínas Ku70 (também conhecida como XRCC6) e Ku80 (também conhecida como XRCC5), nas extremidades da fita de DNA quebrada (LIEBER, 2009). Outras moléculas são recrutadas para a região, como a XRCC4 e a DNA ligase 4, para unir as fitas de DNA. Mutações em *BRCA1* e em genes do grupo de complementação da anemia de Fanconi (*FANC*), necessários para a recombinação homóloga, predispõem os indivíduos afetados ao câncer por comprometerem o reparo ao DNA. Juntos, esses resultados sugerem que quando as vias de reparo não são eficientes, a NHEJ pode acelerar o acúmulo de mutações que levam à neoplasia (BUNTING; NUSSENZWEIG, 2013).

1.6. ALTERAÇÕES GENÉTICAS RARAS NAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS

Além das translocações $t(6;9)(p23;q34)/DEK-NUP214$ e $t(5;11)(q35;p15.5)/NUP98-NSD1$, mencionadas na atual classificação da OMS para neoplasias mieloides (ARBER *et al.*, 2016), existem outras anormalidades que não estão incluídas nessa classificação, mas sua identificação é recomendada por grupos especialistas internacionais (COENEN *et al.*, 2013; CREUTZIG *et al.*, 2012; MASETTI *et al.*, 2013) e merecem especial atenção não só por permitir melhor caracterização dos pacientes, mas também por definirem grupos de risco prognóstico. São elas a $t(1;22)(p13;q13)/RBM15-MKL1$, a $inv(16)(p13.3q24.3)/CBFA2T3-GLIS2$, associadas principalmente, com as leucemias megacarioblásticas agudas da infância, e a $t(8;16)(p11;p13)/MYST3-CREBBP$, associada aos casos que apresentam eritrofagocitose ao diagnóstico morfológico (HAFERLACH *et al.*, 2009; MASETTI *et al.*, 2013).

As translocações envolvendo o gene da nucleoporina 98 (*NUP98*), que codifica um componente do complexo do poro nuclear, localizado na região cromossômica 11q15, foram descritas em diversos tipos de malignidades hematopoéticas, sendo mais comumente associadas às LMAs. Nesses casos, os rearranjos do *NUP98* (*NUP98-r*) estão relacionadas ao tratamento prévio com agentes quimioterápicos contendo inibidores da topo-II (ROMANA *et al.*, 2006), um mecanismo semelhantes ao associado aos *KMT2A-r*. Outra similaridade entre essas duas alterações é a relação com a ativação dos grupos de genes da família *HOX* (HOLLINK *et al.*, 2011; ROOIJ *et al.*, 2013). Os *NUP98-r* estão associados com alterações em duas vias oncogênicas: mutações de ativação em *FLT3* e mutações em fatores de transcrição críticos para a diferenciação hematopoética (*CEBPA*, *GATA1*, *RUNX1* e *WT1*) (FARRAR *et al.*, 2016).

As fusões envolvendo *NUP98* definem um subtipo de LMA, biologicamente particular e cada fusão desempenha um papel funcional independente (BISIO *et al.*, 2016). Mais de 20 genes diferentes já foram descritos em fusões com *NUP98*, sendo os mais frequentes *NSD1*, *HOXC11*, *PHF23*, *HOXA9*, *JARID1A*, *HOXD13*, *LEDGF*, *DDX10*, *HHEX*, *ADD3*, *NSD3* e *LOC348801*. Na maioria dos casos, os pontos de quebra ocorrem nos íntrons 11-13 do gene, mantendo sua região N-terminal (revisado em TAKEDA; YASEEN, 2014).

O gene *NUP214*, também considerado um gene promíscuo, como o *KMT2A*, foi a primeira nucleoporina associada com a patogênese de malignidades hematológicas, e participa da maquinaria de transporte entre núcleo e citoplasma, desempenhando papel em processos celulares importantes, como a mitose e a transcrição gênica. Seu principal parceiro de fusão em LMA é representado pelo gene *DEK*, que atua no remodelamento da cromatina (CAPELSON; DOUCET; HETZER, 2010; CHATEL; FAHRENKROG, 2012). Em LMA, a fusão *DEK-NUP214* define um subtipo com basofilia, altos índices de recaída e alta incidência de mutações em *FLT3* (SANDAHL *et al.*, 2014). Em estudos experimentais em murinos, a fusão *DEK-NUP214* demonstrou ser de baixo potencial de transformação maligna e necessita um longo período de latência para a leucemogênese. Essa característica pode ser justificada pelo fato de que o potencial leucemogênico de *DEK-NUP214* está restrito a uma subpopulação pequena de CTH (OANCEA *et al.*, 2010).

O achado de que *DEK-NUP214* apresenta efeito iniciador da leucemia a partir de células muito imaturas, sugere que essa fusão seria, mais provavelmente, um primeiro evento do que um evento secundário da leucemogênese, mas a real contribuição de *DEK-NUP214* para a origem da LMA ainda não está completamente elucidada (OANCEA *et al.*, 2010).

A leucemia megacarioblástica aguda (LMA-M7 da classificação FAB) é um subtipo raro de LMA diagnosticado em sua maior parte em pacientes com síndrome de Down, associado a mutações somáticas no fator de transcrição *GATA1* (ALFORD *et al.*, 2011; MOURA *et al.*, 2015). Entre os casos não síndrômicos, AMKL representa 10% dos casos de LMA pediátrica e está relacionada a um prognóstico adverso (SCHWEITZER *et al.*, 2015). A alteração t(1;22)(p13;q13), que resulta na fusão quimérica *RBM15-MKL1* (também conhecida como *OTT-MAL*) está restrita aos pacientes lactentes (<12 meses de idade) com LMA-M7. *RBM15* reconhece motivos de RNA e compõe o complexo de spliceossoma (ZHOU *et al.*, 2002) e seu parceiro *MKL1*, codifica uma proteína que é ativadora da transcrição em uma via independente de RAS-MAPK (CEN *et al.*, 2003).

A partir de análises do sequenciamento do transcriptoma, a translocação críptica inv(16)(p13.3q24.3)/*CBFA2T3-GLIS2* foi identificada em 30% dos casos de AMKL pediátrica, aumentando a capacidade proliferativa em ensaios de unidades formadoras de colônias e associada com prognóstico adverso (GRUBER *et al.*, 2012). O gene quimérico *CBFA2T3-GLIS2* induz altos níveis de expressão do domínio de ligação ao DNA de *GLIS2* em células hematopoéticas, em conjunto com

a desregulação do alelo normal de *CBFA2T3*, cujo produto mantém as CTH normais quiescentes (CHYLA *et al.*, 2008).

As proteínas envolvidas na translocação t(8;16)(p11;p13)/*MYST3-CREBBP* apresentam atividade histona acetiltransferase e participam da regulação do ciclo celular (CAMÓS *et al.*, 2006; GERVAIS *et al.*, 2008). *MYST3* é necessário para auto-renovação das CTH através da regulação da expressão de *KIT*, *MPL* e *HOXA9* (KATSUMOTO *et al.*, 2006). *CREBBP* acetila proteínas histonas e não histonas, incluindo p53 (GU; ROEDER, 1997) e GATA-1 (BOYES *et al.*, 1998), ativando a transcrição de fatores essenciais para a hematopoese, como RUNX1, RAR α e PU.1. A proteína de fusão MYST3-CREBBP altera a transcrição dependente de RUNX1 e inibe a diferenciação de células mieloides, desregulando a hematopoese e, conseqüentemente, contribuindo para a leucemogênese (KITABAYASHI, 2001).

Em 2009, Haferlach *et al.* caracterizaram a t(8;16)(p11;p13) como um subgrupo distinto raro em pacientes adultos com LMA (13/6124; 0,2% dos casos), com prognóstico adverso, além de apresentar eritrofagocitose na morfologia e imunofenótipo característico (HAFERLACH *et al.*, 2009). O grupo descreveu que os pacientes adultos com a t(8;16)(p11;p13) compartilham algumas características clínicas e biológicas com os casos de LMA com *KMT2A-r*, como a associação com os subtipos FAB M4/M5 e LMA-t e similaridades nos perfis de expressão gênica, como superexpressão de *HOXA* (HAFERLACH *et al.*, 2009). Entre os pacientes pediátricos, a maior frequência de casos com essa alteração apresenta idade ≤ 2 anos. Alguns estudos sugerem a ocorrência de remissão espontânea, ao passo que outros demonstram prognóstico adverso (CLASSEN *et al.*, 2005; COENEN *et al.*, 2013; DINULOS *et al.*, 1997; STARK *et al.*, 2004; WONG *et al.*, 2008).

1.7. ALTERAÇÕES GENÉTICAS ADICIONAIS ÀS FUSÕES GÊNICAS NAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS

Mutações somáticas em genes que regulam a hematopoese são frequentes em pacientes pediátricos com LMA, e a presença dessas mutações tem sido associada com o desfecho clínico (revisado em CREUTZIG *et al.*, 2012), como aquelas que acontecem na via RAS-MAPK, incluindo os receptores de membrana e os efetores da via (Figura 1.9; FARRAR *et al.*, 2016).

O gene *FLT3* está localizado na região 13q12 e codifica um receptor tirosina-quinase (RTK) classe III. Essa família de receptores de membrana contém domínios extracelulares tipo imunoglobulina, um domínio transmembrana, um domínio justamembrana e dois domínios tirosina-quinase (DTK) intracelulares. O *FLT3* é expresso em células hematopoéticas imaturas e, junto com o seu ligante, é importante para o desenvolvimento normal das CTH e o sistema imune (revisado em GILLILAND; GRIFFIN, 2002). As principais alterações em *FLT3* são do tipo duplicações em *tandem* (DITs) no domínio justamembrana e mutações pontuais ou pequenas deleções/inserções afetando os códons 835 no resíduo de ácido aspártico (Asp835 ou D835) ou 836 no resíduo de isoleucina (Ile836 ou I836) no DTK (NAKAO *et al.*, 1996; YAMAMOTO *et al.*, 2001). As DITs são formadas quando um fragmento da sequência codificante do domínio justamembrana é duplicado e inserido numa orientação direta, variando entre 3 a ≥ 400 pb, e o ordem de leitura do transcrito em geral é preservada (SCHNITTGER *et al.*, 2002).

O gene *KIT* codifica a proteína KIT (ou CD117 com peso molecular de 145kDa), que é um receptor de citocinas expresso na superfície da CTH. KIT é um RTK classe III, como *FLT3* e, quando estimulado, leva à ativação de vias de sinalização associadas à divisão celular, diferenciação, adesão, secreção, sobrevivência e reorganização do citoesqueleto, como a via PI3K, JAK/STAT e RAS-MAPK (LIU *et al.*, 2007; WANDZIOCH *et al.*, 2004). A ativação de KIT dependente de ligante leva a rápida ativação de quinases da família Src (SKF), responsáveis pela sobrevivência, quimiotaxia, adesão, proliferação e migração celular (LENNARTSSON *et al.*, 2004). Mutações em *KIT* são, em geral, pouco frequentes nas LMAs, ocorrendo em 6-9% dos casos (BALGOBIND *et al.*, 2011; ZAKER; MOHAMMADZADEH; MOHAMMADI, 2010) mas, são prevalentes nos casos de LMA com alterações no complexo de transcrição CBF (28-40% dos casos). As mutações mais frequentes envolvem a substituição do resíduo de ácido aspártico na posição

816, códon 17 (BALGOBIND *et al.*, 2011; KELLY; GILLILAND, 2002), e levam à ativação constitutiva do receptor (TURNER *et al.*, 1995). Mutações de deleções e inserções no éxon 8 também são frequentes e afetam os domínios imunoglobulina, se manifestando como hiperativação do receptor na presença do ligante (KOHL *et al.*, 2005).

Os genes *RAS* incluem *KRAS* (na região 12p12.1), *NRAS* (1p13.2) e *HRAS* (11p15.5), codificam proteínas com alta afinidade por nucleotídeos contendo guanina, em geral, representados pela guanosina di- ou tri-fosfato (GDP ou GTP, respectivamente), e apresentam capacidade de hidrólise desses nucleotídeos. Essa função encontra-se extremamente reduzida quando ocorre uma mutação em determinadas regiões de, pelo menos, um dos alelos de *RAS* (revisado em MALUMBRES; BARBACID, 2003). Os principais pontos de mutação nos genes *RAS* levam a troca dos aminoácidos glicina no códon 12 (G12) e glicina no códon 13 (G13) (ADJEI, 2001; SCHUBBERT; SHANNON; BOLLAG, 2007).

Por último, mutações em *PTPN11* (Figura 1.9) encontradas, principalmente, nos pacientes com síndrome de Noonan e/ou na leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), são descritas em 5-21% dos casos de LMA pediátrica, mas seu valor prognóstico permanece indefinido. Mutações nos éxons 3 e 8 do gene são identificadas nas leucemias, sendo as que acontecem no éxon 3 as mais frequentes nas LMAs. Essas alterações aumentam a atividade catalítica de SHP-2, codificada por *PTPN11*, por diminuírem a interação entre os domínios inibitórios da proteína, a mantendo em seu estado ativo com consequente perda dos mecanismos de controle de proliferação celular (LOH *et al.*, 2004; TARTAGLIA, 2004).

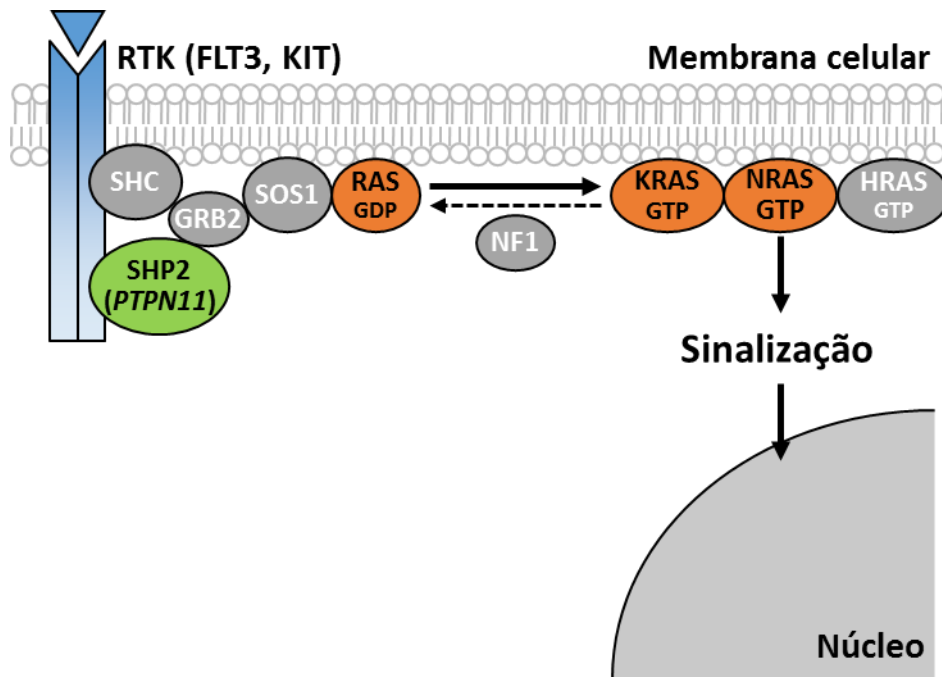


Figura 1.9. Via de sinalização RAS-MAPK. Por meio de um ligante, o receptor tirosina quinase (RTK) se dimeriza e se autofosforila, ativando moléculas adaptadoras [que incluem a proteína que contém o domínio de homologia Src 2 (SHC), a proteína tirosina fosfatase 2 que contém o domínio de homologia Src 2 (SHP2) e a proteína ligada ao receptor para fator de crescimento (GRB2)] e estimulando fatores de troca de nucleotídeos guanósina (como SOS1). SOS1 deixa as proteínas RAS (K-, N-, H-RAS) no seu estado ativo, ligado a GTP (RAS-GTP). RAS-GTP interage com proteínas efetoras, até que a sinalização chegue ao núcleo com interação de componentes celulares para a regulação de genes envolvidos na progressão do ciclo celular, diferenciação, motilidade, apoptose e senescência. O fim da cascata de sinalização se dá pela hidrólise intrínseca de RAS-GTP [acelerada por proteínas ativadoras de GTPases (como NF1)]. GTP, guanósina trifosfato; GDP, guanósina difosfato (modificado de TIDYMAN; RAUEN, 2009).

1.7. A ORIGEM DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS FUNDADORAS NAS LEUCEMIAS MELOIDES AGUDA PEDIÁTRICAS

Com o melhor entendimento dos mecanismos de leucemogênese e o detalhamento das complexas vias celulares que se tornam aberrantes para a transformação neoplásica, fica claro que, apesar de sua origem mieloide comum, a grande diversidade genética das LMAs exige estratégias específicas para alcançar altas taxas de cura a longo prazo. A identificação de alterações somáticas na LMA do adulto revelou vias moleculares que contribuem para a progressão e desenvolvimento da doença, muitas delas, ainda, sem significado prognóstico. Historicamente, o manejo de pacientes pediátricos se baseou em dados de estudos com LMA em adultos, em parte devido ao maior número de casos incluídos em estudos clínicos e o pressuposto de que a biologia da LMA seria similar (FARRAR *et al.*, 2016). Apesar disso, o perfil molecular da LMA nas diferentes faixas etárias discrimina doenças com alterações idade-dependentes (Figura 1.10) (SCHUBACK; ARCECI; MESHINCHI, 2013).

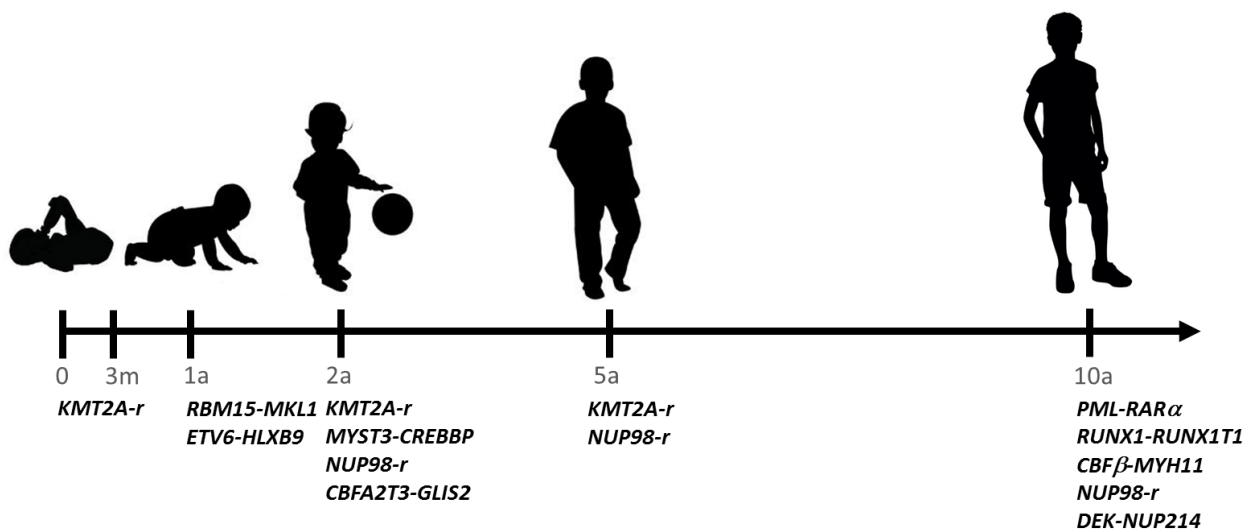


Figura 1.10. Linha do tempo com as principais fusões gênicas da LMA pediátrica de acordo com a idade. A, anos; m, meses.

Estudos observacionais, epidemiológicos e experimentos *in vitro* demonstraram que poucos fatores de risco foram, conclusivamente, determinados para a LMA pediátrica, mas sabe-se que seu desenvolvimento está associado a fatores como radiação ionizante e síndromes genéticas congênitas (síndrome de

Down, neurofibromatose, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, entre outras), que juntos explicam a ocorrência de menos de 10% dos casos (revisado em WIEMELS, 2012).

Os perfis moleculares dos subclones podem ser usados para determinar o momento de origem das alterações somáticas e podem ser associadas ao período de ocorrência desses eventos na história natural da doença. A maioria das alterações genéticas observadas nos primeiros anos de vida dos casos de LMA parece ter se iniciado durante a vida intrauterina, incluindo *KMT2A-r*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBF β -MYH11* e *PML-RAR α* (FORD *et al.*, 1993; GALE *et al.*, 1997; GREAVES; WIEMELS, 2003; HUNGER *et al.*, 1998). Essas evidências se tornaram possíveis através da análise do material genético de crianças com leucemia aguda, disponível nos cartões de filtro com sangue do teste do pezinho realizado em recém-nascidos para detecção de doenças genéticas (MCHALE *et al.*, 2003; WIEMELS *et al.*, 2002). A análise combinada das amostras de diagnóstico e de cartões de filtro de 12 pacientes com LMA e *RUNX1-RUNX1T1* detectou a presença da fusão gênica em 50% das amostras do cartão de filtro, demonstrando que essa alteração estava presente ao nascimento da criança e, portanto, se originaram no período intrauterino durante a hematopoese fetal. Entre esses pacientes, a idade mais avançada de apresentação da doença foi de 12 anos (WIEMELS *et al.*, 2002).

O estudo de leucemias concordantes em gêmeos idênticos também fornece uma oportunidade única para a identificação do momento de origem, da história natural e da genética molecular das leucemias pediátricas em geral (GREAVES *et al.*, 2003), uma vez que essa concordância revela mutações gênicas dominantes e com grande potencial de transformação. A premissa de que gêmeos monozigóticos compartilham, mais provavelmente que gêmeos fraternos, o mesmo ambiente pré e pós-natal, sugere que essas características influenciem o risco subsequente para o desenvolvimento da doença. Eventos pós-natais estocásticos ou influenciados pela exposição ambiental podem ser necessários para a leucemogênese em gêmeos que apresentam discordância da doença e nas demais crianças.

Uma vez que a taxa de concordância entre leucemia em gêmeos é, de fato, mais alta que aquela esperada ao acaso, essa taxa pode estar relacionada a fatores genéticos herdados, compartilhados ou inerentes à susceptibilidade de cada indivíduo (GREAVES *et al.*, 2003). Em 1962, Wolman sugeriu que a doença possa ter se originado em um dos gêmeos no ambiente intrauterino e ter sido transmitida ao segundo gêmeo através de uma circulação conjunta (WOLMAN, 1962). Clarkson

e Boyse sugeriram que essa explicação monoclonal pré-natal poderia ser comprovada pela identificação de anormalidades citogenéticas compartilhadas e não constitutivas das células leucêmicas no par de gêmeos (CLARKSON, 1971). Uma clonalidade comum pode ser demonstrada a partir de marcadores singulares, por exemplo, a partir da descrição das regiões de quebra que ocorrem em regiões intrônicas específicas nos genes envolvidos nas translocações cromossômicas, que podem variar de poucos pares de bases (pb) a mais de 100 kilobases (kb). Essas regiões são únicas em cada paciente e funcionam como um marcador estável e exclusivo do clone leucêmico, bem como um teste preciso nos pares de gêmeos que desenvolveram leucemia (GREAVES *et al.*, 2003).

Determinadas alterações genéticas identificadas revelaram-se insuficientes para levar ao desenvolvimento da leucemia quando avaliadas isoladamente. Além disso, a frequência de lesões clonais pré-malignas é maior que a incidência da doença, indicando que os clones leucêmicos podem apresentar longos períodos de dormência ou serem eliminados. Estudos utilizando sangue de cordão umbilical coletados para transplantes indicaram que essas alterações podem ocorrer em uma taxa de pelo menos 1% na população em geral (MORI *et al.*, 2002). Esses resultados sugerem que uma significativa proporção da população transporta clones pré-leucêmicos e a grande maioria desses clones apresenta proliferação limitada, são deletados e não são, necessariamente, sinônimos do desenvolvimento da doença.

A etapa crítica para a origem da leucemia possivelmente ocorre durante a infância (após o nascimento) e aquela alteração genética iniciadora não resulta em um diagnóstico inevitável de leucemia (WIEMELS, 2012). Portanto, especula-se que o desenvolvimento das leucemias agudas pediátricas possa ser o reflexo de eventos ao acaso e ainda, da interação genético-ambiental que interfere nas vias de proliferação, diferenciação, reparo cromossômico e apoptose das células pré-leucêmicas. Além disso, evidências crescentes sugerem que componentes extrínsecos mediados pelo microambiente medular desempenham papel importante na sobrevivência e na resistência das células-tronco com potencial leucemogênico. Em paralelo a eventos de transformação maligna no sistema hematopoético, o nicho é convertido em um microambiente com sinais dominantes que favorecem a proliferação e o crescimento celular (revisado em KONOPLEVA; JORDAN, 2011) .

A origem precisa das translocações na hierarquia das CTH é difícil de determinar, uma vez que o impacto funcional dessas alterações na expansão clonal

pode ocorrer após seu momento de origem. Os produtos envolvidos na transformação leucêmica são dependentes do contexto celular e apresentam impacto variado na proliferação e diferenciação das células originadas a partir daquela que inicialmente apresentou a alteração (BARR, 1998). A célula alterada deve ser permissiva à expansão do produto da translocação, possibilitando o estabelecimento de uma via de sinalização intracelular capaz de manter a vantagem clonal e não a sua eliminação. A associação evidente entre uma translocação cromossômica com determinadas características leucêmicas parece refletir a especificidade da alteração na seleção clonal (GREAVES; WIEMELS, 2003) e, conseqüentemente, nos subtipos de LMA e no impacto na resposta ao tratamento, como marcadores prognósticos independentes com influência na escolha da terapia (RUBNITZ, 2012).

Apesar disso, em comparação com a LMA do adulto, é difícil especular se a LMA pediátrica segue o mesmo acúmulo gradual de mutações que leva ao início da doença. Além de raras, ainda existem poucas evidências de que a ocorrência de mutações em reguladores epigenéticos ocorrem durante a vida intrauterina. Sabe-se que essas alterações são somáticas e associadas com as leucemias agudas (LIANG *et al.*, 2013). Evidências de que a origem das translocações cromossômicas pode ser intrauterina e adquirida em uma CTH fetal indicam que diferentes mecanismos de patogênese estão associados. Já na LMA do adulto, na qual existe pouca evidência de uma origem fetal, é mais provável que a hematopoese clonal que se origina do acúmulo de mutações somáticas em subclones ao longo da vida do indivíduo apresente maior impacto para a origem da doença (CHAUDHURY *et al.*, 2015).

A descrição da natureza, do momento de origem das translocações cromossômicas e a necessidade de alterações genéticas adicionais apresentam implicações no desenho e interpretação de estudos epidemiológico-moleculares causais. Para as LMAs pediátricas, essas observações ressaltam a importância da exposição *in utero* durante a hematopoese fetal e a exposição pós-natal na etiologia da doença (GREAVES; WIEMELS, 2003) .

2. JUSTIFICATIVA

Ao longo da vida do indivíduo, lesões genéticas são adquiridas como um reflexo de erros nos processos de reparo do DNA ou associados a exposição genotóxica, contribuindo para a vantagem seletiva na proliferação celular (VOGELSTEIN *et al.*, 2013). A exposição continuada aos carcinógenos ambientais induz a origem de lesões adicionais influenciando o risco de desenvolvimento de uma neoplasia diagnosticável e complexa.

Eventos mutagênicos que ocorrem durante a vida intrauterina contribuem para o aparecimento da doença em idade tão precoce. Nesse sentido, nós já demonstramos associações de risco elevadas entre as leucemias de lactentes e a exposição materna durante a gestação a substâncias com ações inibidoras da DNA topo II, como estrógenos, quinolonas, pesticidas e dipirona (revisado em POMBO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2016). Demonstramos também o risco aumentado de desenvolvimento da leucemia em lactentes modulada por interações entre a predisposição herdada em nível genético (polimorfismos), mutações adquiridas (genes K/N-RAS) e exposição a agentes causadores de dano ao DNA (substâncias químicas presentes no cigarro) (ANDRADE *et al.*, 2014).

O foco principal desse trabalho foi investigar as alterações genéticas que participam do desenvolvimento e da diferenciação de células progenitoras mieloides e são importantes para a estratificação de risco. A proposta de avaliar a frequência das alterações genéticas permite a identificação de fatores prognósticos na LMA pediátrica, uma vez que essas alterações estão associadas a determinantes de resposta terapêutica. Mais que isso, buscamos caracterizar grupos genéticos especiais, definidos pelas alterações moleculares recorrentes com baixa frequência (<2%) e casos considerados raros, como pacientes com irmão gemelar que nos possibilita estudar as variantes genéticas germinativas associadas com a etiologia da doença. O maior conhecimento dos marcadores genéticos da LMA pediátrica permitirá a implementação de estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes. Além disso, a abordagem molecular permite a implementação de um algoritmo de testes, parte da Rede Multicêntrica de Estudo das Leucemias Agudas.

3. OBJETIVOS

Principais:

- Caracterizar as LMA pediátricas de acordo com as alterações moleculares e testar as associações de risco com a sobrevida global;
- Investigar a genômica da LPA e identificar as principais variantes genéticas germinativas associadas à leucemogênese.

Secundários:

- Explorar a associação entre as alterações tipo I (*FLT3*, *KIT*, *KRAS*, *NRAS* e *PTPN11*) e tipo II (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBF β -MYH11*, *PML-RAR α* e *KMT2A-r*) nas LMAs pediátricas e verificar sua associação com dados clínico-demográficos (idade e sobrevida global);
- Identificar as fusões gênicas *MYST3-CREBBP*, *DEK-NUP214*, *RBM15-MKL1* e *CBFA2T3-GLIS2*, bem como os rearranjos envolvendo *NUP98*, e estabelecer a prevalência dessas alterações de acordo com a faixa etária ao diagnóstico;
- Descrever o perfil genômico de mutações das LPAs pediátricas e as variantes germinativas patogênicas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo multicêntrico de uma série histórica de LMA pediátrica. Essa coorte foi estabelecida no Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico, Centro de Pesquisa, INCA, a partir de janeiro de 2000 com o objetivo de caracterização diagnóstica e/ou pesquisa, conforme representado Figura 4.1. O diagnóstico inicial da leucemia foi estabelecido por análise morfológica e imunofenotípica, que permitiu a definição do grupo de LPA para análises específicas para a fusão *PML-RAR α* . Nos demais subtipos, foi realizada a pesquisa de *RUNX1-RUNX1T1*, *CBF β -MYH11* e *KMT2A-r*. Nos casos que não apresentavam essas alterações, foi realizada a pesquisa de *MYST3-CREBBP*, *DEK-NUP214*, *RBM15-MKL1* e *CBFA2T3-GLIS2*. Em todos os casos, foi realizada a pesquisa de mutações na via de sinalização MAPK. Em seguida, foi calculado o valor preditivo de óbito das variáveis do modelo nas análises de sobrevida global. A coorte de pacientes com idade ≤ 2 anos foi descrita separadamente. As amostras foram enviadas de diversos centros de tratamentos oncopediátricos representativos das regiões geográficas brasileiras (ANDRADE *et al.*, 2016b; em anexo). Informações clínicas e demográficas foram enviadas através de uma ficha de encaminhamento preenchida no sistema online (<https://imunomolecular.inca.gov.br>) representada no Anexo A.

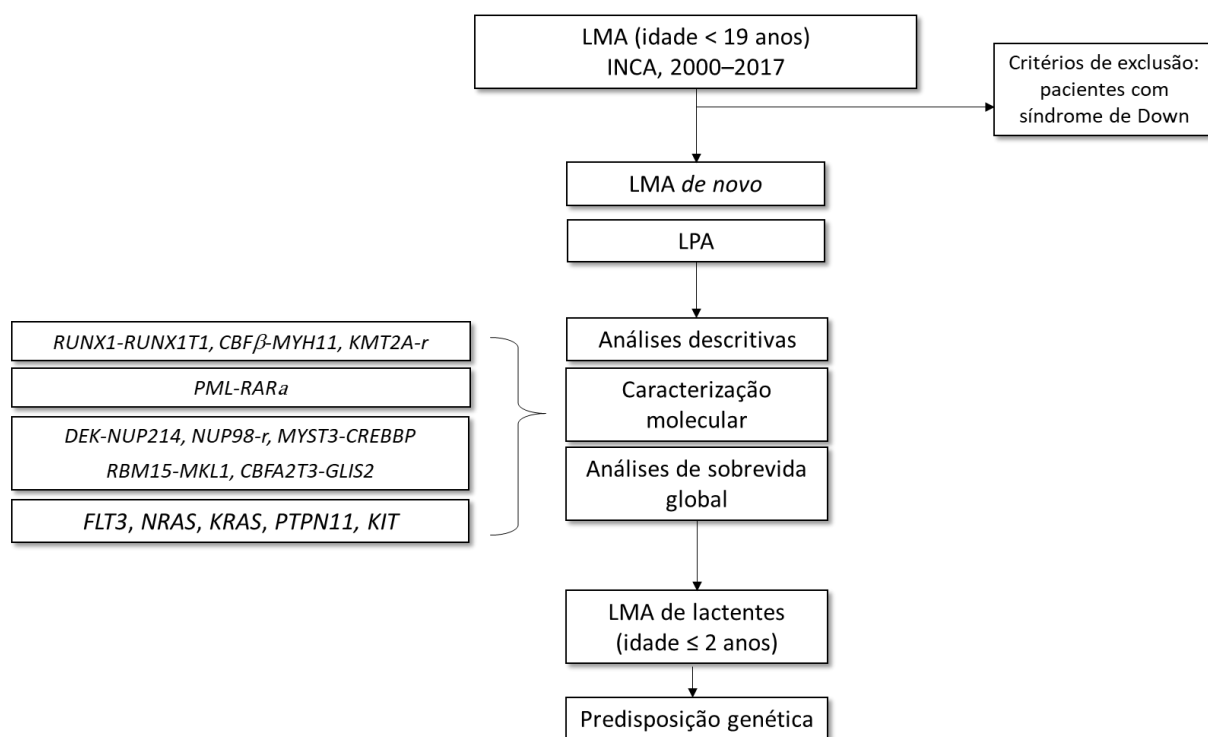


Figura 4.1. Desenho do estudo. LMA, leucemia mieloide aguda; LPA, leucemia promielocítica aguda.

Entre os casos de LPA, foi selecionado um paciente do sexo masculino, diagnosticado em Salvador/Bahia, aos 16 anos de idade, que apresentava irmão gemelar para a identificação de variantes germinativas (predisposição genética) associadas com o desenvolvimento da doença. Para isso, foi realizado o WES nas amostras de diagnóstico, remissão e de seu irmão gêmeo. O paciente apresentava leucometria e contagem de plaquetas ao diagnóstico de $1,4 \times 10^9/L$ e $58 \times 10^9/L$, respectivamente.

4.2. CASUÍSTICA

Foram incluídas amostras de pacientes com idade <19 anos, com diagnóstico de LMA *de novo* com pelo menos 20% de blastos na MO ao diagnóstico. Os critérios para classificação dos subtipos de LMA foram aplicados através da integração de aspectos morfológicos, imunofenotípicos e citogenético-moleculares, de acordo com as recomendações da OMS (ARBER *et al.*, 2016; VARDIMAN *et al.*, 2009). Foram excluídos os pacientes com síndrome de Down.

4.2.1. Ética em pesquisa

A autorização para a utilização das amostras nas pesquisas foi solicitada ao responsável legal da criança pelo médico local, após aprovação do projeto em 18/02/2013 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INCA, sob o número de protocolo #186.688, no projeto intitulado “Alterações imuno-moleculares nas leucemias mielóides agudas pediátricas: interação entre mutações somáticas e fatores de risco etiopatológicos”. A cópia da carta de aprovação do CEP se encontra no Anexo B.

4.2.2. Tratamento

Os pacientes não foram incluídos em um estudo clínico controlado, mas receberam um tratamento homogêneo seguindo as diretrizes internacionais consenso para o tratamento de LMA pediátrica. A partir de 2008, as amostras encaminhadas para o estudo foram obtidas de pacientes que receberam o protocolo de tratamento BFM-2004. Nesse período, as estratégias terapêuticas seguiram regimes de indução com citarabina, idarubicina e etoposídeo (BITTENCOURT *et al.*, 2016; PAGNANO *et al.*, 2014).

4.3. METODOLOGIA

4.3.1. Algoritmo de testes para a caracterização molecular das leucemias mieloides agudas pediátricas

As amostras de MO e SP foram, inicialmente, avaliadas morfológicamente. A análise morfológica foi realizada após coloração convencional utilizando-se May-Grünwald-Giemsa. As amostras foram direcionadas para o diagnóstico imunofenotípico e, para isso, incubadas com anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados para antígenos celulares de superfície e intracelulares. Inicialmente, foi feito um painel de triagem para estabelecer a linhagem dos blastos com os AcMo, incluindo MPO intracitoplasmático, CD79a intracitoplasmático, CD45, CD19, CD34, CD3 intracitoplasmático. Em seguida, foram usados AcMO direcionados para antígenos de membrana específicos de linhagem e maturação celular, sendo eles anti-MPO, HLA-DR, CD13, CD11b, CD14, CD15, CD33, CD36, CD41, CD42b, CD64, CD117 e CD235a.

Após o diagnóstico imunofenotípico, as amostras seguiram para a caracterização molecular dos subtipos. Para tal, foram realizadas as técnicas de RT-PCR, FISH e PCR seguido por sequenciamento de Sanger para a identificação das alterações moleculares objeto desse estudo, conforme descrito na Figura 4.2.

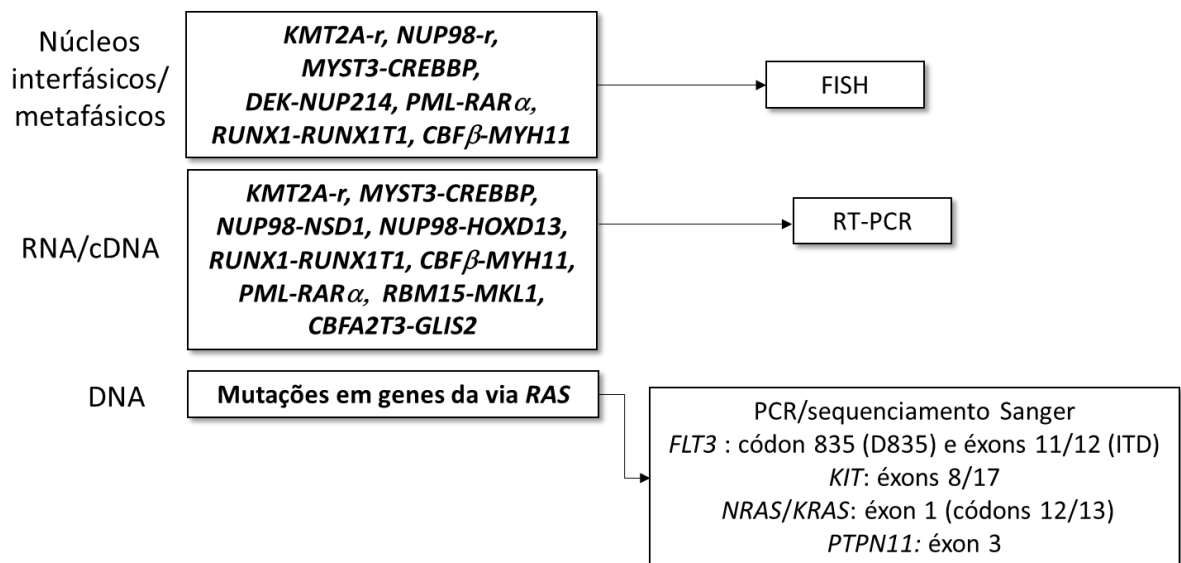


Figura 4.2. Testes realizados para a identificação das fusões gênicas e mutações pontuais nos casos de LMA pediátrica. FISH, hibridização *in situ* por fluorescência; RT-PCR, transcrição reversa seguida por PCR.

4.3.2. Purificação do RNA e síntese do DNA complementar

O material coletado em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foi processado de maneira a se obter 1×10^6 células/mL que foram, posteriormente, armazenadas em Trizol™ (Invitrogen, CA, USA) a -20°C , ou em dimetilsulfóxido (DMSO) a -80°C para extração do material genético e pesquisa das alterações cromossômicas recorrentes.

A purificação do ácido ribonucleico (RNA) foi realizada através do ensaio comercial Trizol™ (Invitrogen, CA, USA), conforme protocolo padrão estabelecido pelo fabricante. Após a extração, o RNA foi quantificado em um espectrofotômetro (NanoDrop1000, Wilmington, DE, USA), avaliando-se a absorvância a 260nm, e foram geradas as quantificações através do programa ND-1000 que acompanha o aparelho. Para cada 3µg de RNA, foram usados 0,8µl da enzima DNase na síntese do ácido desoxiribonucleico complementar (cDNA) (1U/µl; Promega, Madison, WI, USA). Após incubação à temperatura ambiente por 15 min, foi adicionado 1µL de EDTA (25mM) e a solução foi incubada a 65°C por 15 min. Após esse período, as amostras foram resfriadas a -20°C por 1 min. Foi adicionado 1µL de oligonucleotídeos ricos em timina (Oligo dT, 10µM) e as amostras foram incubadas a 70°C por 10 min. Após essa etapa, a solução foi resfriada a -20°C por 5 min. A etapa final de síntese de cDNA foi realizada utilizando-se 1µL da enzima transcriptase reversa (5U/mL, Invitrogen, CA, USA), tampão 2x (50mM KCl; 20nM Tris-HCl, pH 8,4) (Invitrogen, CA, USA), cloreto de magnésio (MgCl_2) a 2,4mM (Invitrogen, CA, USA) e oligonucleotídeos dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Invitrogen, CA, USA) a 0,2mM, resultando em um volume final de 20µL. A solução foi incubada a 25°C por 5 min, seguida de incubação a 42°C por 60 min e, posteriormente, incubação a 70°C por 10 min. Ao final da reação, adicionou-se 30 µL de água tratada com o reagente dietil pirocarbonato.

A integridade dos cDNAs foi verificada através da amplificação do gene constitutivo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) por PCR. Para essa reação, 3,5µL do cDNA recém-sintetizado foram adicionados a uma solução final de 20µL com as seguintes quantidades: iniciadores (senso 5'-TGACCCCTTCATTGACCTCA-3' e antisenso 5'-AGTCCTTCCACGATACCAA-3') a 0,2µM; dATP, dTTP, dCTP e dGTP a 0,2mM; solução tampão 1x (50mM KCl; 20nM Tris-HCl, pH 8,4) (Invitrogen, CA, USA), MgCl_2 a 2,5mM (Invitrogen, CA, USA) e 1U

de Taq-polimerase (Taq DNA Polymerase; Invitrogen, CA, USA). A reação de RT-PCR foi realizada em um termociclador PCR-System 9700 (Geneamp®, Applied Biosystems, CA, USA), onde os perfis térmicos da reação seguiram as seguintes condições: etapa inicial de desnaturação a 95°C por 1 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, temperatura e tempo de anelamento de 60°C por 30 seg, extensão a 72°C por 45 seg. Depois de amplificados, os produtos de PCR foram visualizados através de gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Biotium, CA, USA) e, posteriormente, visualizados em luz ultravioleta.

4.3.3. Purificação de DNA

O DNA foi obtido a partir de leucócitos através do ensaio comercial DNA Blood Mini kit (Qiagen, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante e/ou após obtenção do RNA, utilizando-se o reagente comercial Trizol™ (Invitrogen, CA, USA) conforme o protocolo padrão estabelecido pelo fabricante. Posteriormente, o DNA foi quantificado através do espectrofotômetro (NanoDrop 1000, Wilmington, DE, USA), com a absorvância a 260nm, e foram geradas as quantificações pelo programa ND-1000 que acompanha o aparelho. O material foi utilizado para a identificação das mutações em genes da via de sinalização RAS-MAPK (*FLT3*, *KIT*, *KRAS*, *NRAS*, *PTPN11*).

Para os ensaios de NGS, possíveis contaminantes residuais resultantes da extração do DNA armazenado em Trizol (Invitrogen, CA, USA) foram retirados através da purificação do material genético com o QIAamp DNA Micro kit (Qiagen, CA, USA), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante.

4.3.4. Hibridização *in situ* por fluorescência

Após separação e direcionamento das amostras para diagnóstico morfológico e imunofenotípico, 5×10^6 células do aspirado de MO em heparina foram incubadas por 24 horas (37°C, 5% de CO₂) com 4 mL de meio de cultura (desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial, RPMI, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 1 mL de soro fetal bovino (SFB; Invitrogen, CA, USA). Ao término do período de incubação, 25 µL de colchicina (Demecolcine solution, 10 µg/mL; Sigma Aldrich, MO,

USA) foram adicionados à solução e as amostras foram incubadas por mais 1 h (37°C, 5% de CO₂). Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 1500 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 5 mL da solução de cloreto de potássio (KCl) a 0,075 M (Merck KGaA, Darmstadt, DE). Os tubos foram, posteriormente, incubados a 37°C por 17 min e, novamente centrifugados por 5 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e foram gotejados, aos poucos, 5 mL da solução fixadora [solução de Carnoy (3 metanol:1 ácido acético); Sigma Aldrich, MO, USA]. As amostras “descansaram” por 20 min a 4°C e seguiram-se pelo menos três etapas de centrifugação por 5 min a 1500 rpm, retirada do sobrenadante e adição de 5 mL de fixador.

Para as análises retrospectivas, células congeladas em DMSO (-80°C) foram descongeladas rapidamente, ressuspensas em 10 mL de meio de cultura (RPMI, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e centrifugadas por 5 min a 1500 rpm. Após essa etapa, retirou-se o sobrenadante e as amostras foram ressuspensas em 5 mL de solução de Carnoy. As amostras foram incubadas por 20 min a 4°C e seguiram-se três centrifugações por 5 min a 1500 rpm, retirada do sobrenadante e adição de 5 mL de fixador. As lâminas foram preparadas gotejando-se cerca de 10 µL da amostra fixada e, posteriormente, direcionadas para a técnica de FISH, com sondas específicas.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio Olympus BX41 TR/URA/DP2 equipado com lâmpada de HBO 100 W. Para visualização da passagem de luz das sondas e contra coloração, foram utilizados os filtros nos espectros DAPI, FITC e TEXAS RED. Foram analisados, no mínimo, 100 núcleos e os casos foram considerados positivos quando apresentaram padrão positivo em >3% dos núcleos (desvio padrão de ±3%).

4.3.5. Identificação das alterações diretoras representadas pelas fusões gênicas

A técnica de FISH foi utilizada para a identificação das alterações *PML-RAR α* , *RUNX1-RUNX1T1*, *CBF β -MYH11*, *MYST3-CREBBP*, *DEK-NUP214*, *KMT2A-r* e *NUP98-r*, com as sondas descritas no Anexo C.

Existem duas abordagens principais para os desenhos de sondas de FISH: sinal de fusão (*fusion signal*) e sinal de separação no gene para detecção das translocações cromossômicas (*split signal* ou *breakapart*). Para esses padrões,

utilizam-se sondas que, geralmente, são marcadas com fluorocromos nas cores primárias (por exemplo, verde e vermelho) (BURG *et al.*, 2004; WOLFF *et al.*, 2007) que flanqueiam as regiões de ponto de quebra dos genes envolvidos na translocação ou rearranjo.

Para o padrão de sinal de fusão, em casos sem aberrações cromossômicas, dois sinais vermelhos e dois sinais verdes são observados. Na presença da translocação, um sinal vermelho e um verde serão justapostos, originando um sinal colocalizado, que pode aparecer, ainda, como um sinal amarelo. Mais dois sinais separados são visíveis, um verde e um vermelho, dos cromossomos não afetados (Figura 4.4). As sondas comerciais utilizadas para a detecção das fusões gênicas *PML-RAR α* , *RUNX1-RUNX1T1*, *CBF β -MYH11*, *MYST3-CREBBP* e *DEK-NUP214* possuem o padrão de dupla fusão, que permite a detecção da translocação balanceada, através da presença de dois sinais de fusão (translocação recíproca) adicional a um sinal verde e um vermelho, referentes aos cromossomos não alterados.

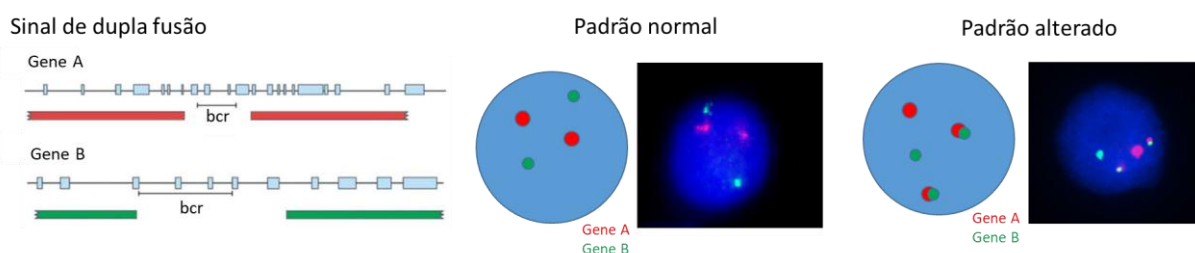


Figura 4.4. Padrão de sondas de dupla fusão utilizadas no FISH para a identificação de fusões gênicas. A. Duas sondas marcadas com fluorocromos diferentes flanqueiam as regiões de ponto de quebra dos dois genes envolvidos na translocação. Para o padrão normal, são esperados dois sinais verdes e dois sinais vermelhos. Na presença de translocação, espera-se observar dois sinais vermelhos e dois sinais verdes justapostos, originando dois sinais colocalizados. Mais dois sinais separados são visíveis, um verde e um vermelho, referentes aos cromossomos não envolvidos. As imagens representam núcleos interfásicos com a marcação de sondas para a identificação de *PML-RAR α* (autoria própria). *bcr*, *breakpoint cluster region*. (Modificado de BURG *et al.*, 2004).

O segundo tipo de sonda avalia o sinal de quebra no gene, onde as duas sondas marcadas estão localizadas em apenas um dos dois genes envolvidos (gene alvo), posicionadas em lados opostos da região do ponto de quebra do gene alvo (Figura 4.5). Esse padrão de sonda foi utilizado para a identificação de *KMT2A-r* e *NUP98-r*. Na ausência da translocação, dois sinais colocalizados estarão presentes.

A translocação será vista na presença de um sinal colocalizado (que pode ser visto em amarelo), correspondente ao cromossomo não alterado, adicional a um sinal verde e um sinal vermelho separados, referentes ao cromossomo que sofreu a translocação/quebra (Figura 4.5).

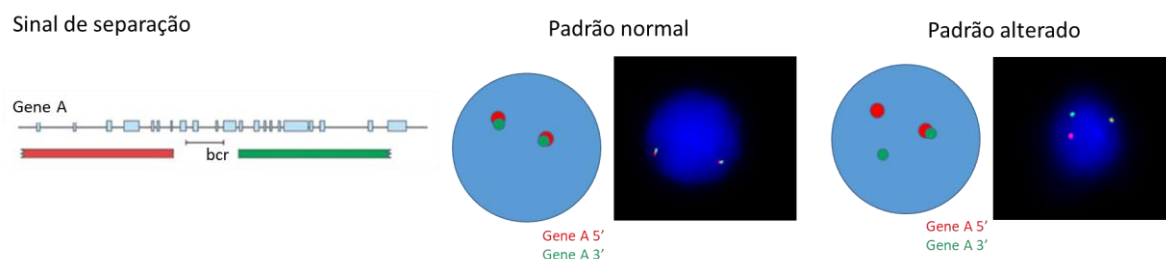


Figura 4.5. Padrão de sondas do FISH para a identificação de quebras no gene alvo. A. Duas sondas marcadas com fluorocromos diferentes delimitam a região do ponto de quebra (*bcr*). Na ausência da translocação (padrão normal), são esperados dois sinais colocalizados. Na presença de translocação, espera-se um sinal colocalizado, correspondente ao cromossomo não alterado, adicional a um sinal verde e um sinal vermelho separados, referentes ao cromossomo que sofreu a translocação/quebra. As imagens representam núcleos interfásicos com a marcação de sondas para a identificação de rearranjos nos genes *KMT2A* (autoria própria). *bcr*, *breakpoint cluster region*. (Modificado de BURG *et al.*, 2004).

Uma vez que para a maioria das fusões gênicas os pontos de quebra estão espalhados por regiões de pelo menos 10kb no DNA, sua amplificação por PCR convencional é dificultada (VAN DONGEN *et al.*, 1999). Por isso, para a identificação dos transcritos de fusão e confirmação das alterações encontradas nas análises de FISH, foi realizada a técnica de RT-PCR, descrita a seguir.

KMT2A-r. Para a definição do *status* do *KMT2A*, inicialmente, foi realizada a técnica de FISH seguindo os protocolos do fabricante (Anexo D). Para a detecção dos parceiros de fusão mais frequentes, incluindo os genes *MLLT3*, *MLLT10*, *MLLT4*, *AFF1*, *MLLT1* (*ENL*) e a duplicação parcial *in tandem* (PTD) do *KMT2A*, foi utilizada a técnica de RT-PCR, através de iniciadores abrangendo as diferentes regiões de quebra do gene (*multiplex*) (BURMEISTER *et al.*, 2015). Nos casos em que não foi possível a identificação do parceiro de fusão do *KMT2A* e para identificar a região BCR no gene *KMT2A*, foi realizada a técnica de PCR invertido de longa distância (LDI-PCR) em colaboração com o Dr. Claus Meyer, do *Diagnostic Center of Acute Leukemia*, Goethe-University of Frankfurt, Alemanha, que permitiu a identificação de

parceiros de fusão raros e sequências de fusão específicas (MEYER *et al.*, 2004, 2017).

RUNX1-RUNX1T1 e ***CBF β -MYH11***. Para a identificação da presença das fusões gênicas *RUNX1-RUNX1T1* e *CBF β -MYH11*, foram realizadas as técnicas de RT-PCR, de acordo com o descrito por (VAN DONGEN *et al.*, 1999) e FISH, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Anexo D).

PML-RAR α . Para a identificação da presença da fusão gênica *PML-RAR α* nos casos de LPA, foi realizada a técnica de FISH, seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante (Anexo D), com a modificação do tempo de hibridização para 3-4h e obtenção do resultado no mesmo dia de realização da técnica. A identificação do transcrito de fusão foi realizada por meio de RT-PCR *nested* (VAN DONGEN *et al.*, 1999), uma variação da RT-PCR convencional, utilizada com o objetivo de reduzir a amplificação de produtos inespecíficos e favorecer a amplificação de fragmentos raros. Para isso, foram utilizados dois conjuntos de iniciadores em duas PCRs sucessivas, sendo que, o segundo par de iniciadores tem a finalidade de amplificar um alvo secundário a partir do produto da primeira reação. As reações de PCR foram realizadas no termociclador PCR-System 9700 (Gene Amp®, Applied Biosystems, CA, USA), com as seguintes concentrações na reação: iniciadores a 20 pmol, dNTPs a 2,5 mM, solução tampão 1x (50mM KCl; 20nM Tris-HCl, pH 8,4; Invitrogen, CA, USA), 2,5 mM de MgCl₂, 1U de Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA) e água estéril para completar o volume de 50 μ L. Foram utilizadas as condições de ciclagem: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 65°C por 1 min, e 72°C por 1 min, para a primeira reação. A segunda reação foi realizada com os produtos amplificados na primeira reação, utilizando-se 1 μ L de produto e iniciadores diferentes para aumentar a especificidade da reação (VAN DONGEN *et al.*, 1999). A segunda reação de PCR foi realizada no mesmo termociclador, com as mesmas concentrações e condições de ciclagem da primeira reação, com exceção da etapa de anelamento (66°C), que foi realizada pelo tempo de 30 seg. Os produtos amplificados em ambas as reações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 3,0% corado com GelRed™ (Biotium, CA, USA), podendo se apresentar com três isoformas distintas, de acordo com a região de quebra no gene *PML*: bcr1 (214 ou 188 pb), bcr2 (178 ou 652 pb) e bcr3 (289 pb).

MYST3-CREBBP. As sondas para realização da FISH foram selecionadas a partir de clones de cromossomos bacterianos artificiais (BAC, Anexo C) (www.ensembl.org), seguindo o protocolo descrito no Anexo D. O DNA extraído de cada clone foi marcado com as moléculas fluorescentes SpectrumOrange (MYST3; laranja) ou SpectrumGreen (CREBBP; verde) pela empresa BlueGnome (Cambridge, UK). A fusão gênica *MYST3-CREBBP* foi confirmada pela RT-PCR para a identificação dos transcritos de fusão tipo I e II (*MYST3-CREBBP*), bem como *CREBBP-MYST3* (SCHMIDT *et al.*, 2004). Para detecção da fusão mais frequente *MYST3-CREBBP* tipo I (*MYST3* quebra no éxon 16 e *CREBBP* quebra no éxon 5), de ~1100 pb, foi realizada apenas uma reação utilizando um controle positivo gentilmente cedido pelo Dr. Oskar Haas, do St. Anna Kinderspital, Medical University Vienna, Vienna, Áustria.

NUP98-r. A FISH para identificar os *NUP98-r* foi realizada com pequenas modificações nos protocolos fornecidos pelo fabricante (Anexo D). Essas modificações incluíram o pré-tratamento das amostras com tampão salino de citrato de sódio (SSC) 2x por 2 min, desidratação em etanol (70%, 90% e 100%, 1 min cada) e desnaturação a 75°C, por 7 min. Após hibridização *overnight* a 37°C, as amostras foram tratadas com solução de SSC 1x a 72°C e, posteriormente, com solução de SSC 2x com 0,05% de Tween 20. Os parceiros de fusão *NDS1* e *HOXD13* foram identificados pela técnica de RT-PCR de acordo com os iniciadores descritos por (ROMANA *et al.*, 2006) e (EMERENCIANO *et al.*, 2011), respectivamente.

DEK-NUP214, RBM15-MKL1 e CBFA2T3-GLIS2. A identificação da fusão *DEK-NUP214* foi realizada através da técnica de FISH, com sondas descritas no Anexo C e seguindo o mesmo protocolo modificado para a identificação de *NUP98-r*. O transcrito da fusão *RBM15-MKL1* foi investigado nos casos de leucemia megacarioblástica aguda com idade ≤ 2 anos através de RT-PCR convencional, utilizando-se os iniciadores descritos por Rooij *et al.* (ROOIJ *et al.*, 2013). A RT-PCR convencional foi utilizada também para a identificação de *CBFA2T3-GLIS2* (GRUBER *et al.*, 2012).

O estabelecimento da técnica de RT-PCR para a identificação dos transcritos de fusão *NUP98-NSD1*, *RBM15-MKL1* e *CBFA2T3-GLIS2* se deu a partir de

amostras de pacientes que, presumivelmente, apresentariam essas alterações, por demonstrarem características clínico-laboratoriais e/ou citogenéticas similares às descritas na literatura, uma vez que não foram obtidos controles positivos para a reação e padronização da técnica. Para a anormalidade *CBFA2T3-GLIS2*, foram selecionados pacientes que apresentavam idade ≤ 24 meses ao diagnóstico, subtipo morfológico de leucemia megacarioblástica aguda e ausência de fusões gênicas recorrentes. Para a alteração *RBM15-MKL1*, foi utilizada a amostra de um paciente que apresentou a translocação $t(1;22)(p13;q13)$, característica da fusão gênica, descrita pelo cariótipo 53, XY, $t(1;8;22)(p13;q22;q13)$, $+del(1)(p13)$, +6, +7, +14, +17, +19, +21 [20], realizado no serviço de origem do paciente. Para a alteração *NUP98-NSD1*, a busca foi realizada, inicialmente, nos casos que apresentaram *NUP98-r* identificado pela técnica de FISH.

As reações de PCR foram realizadas a partir das seguintes concentrações e reagentes: 0,2 μ M de iniciadores, 0,5 mM de dNTPs, solução tampão 1x (50mM KCl; 20nM Tris-HCl, pH 8,4; Invitrogen, CA, USA), 2,0 mM de $MgCl_2$, 1U de Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA) e água estéril para completar o volume de 50 μ L. Foram utilizadas as condições de ciclagem: 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min, 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 7 min, realizadas no termociclador PCR-System 9700 (Gene Amp®, Applied Biosystems, CA, USA). Os produtos das reações passaram por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Biotium, CA, USA).

4.3.6. Identificação de mutações pontuais nos genes da via RAS-MAPK

As mutações nas regiões hotspots dos genes *FLT3*, *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, e *KIT* foram identificadas de acordo com os iniciadores e as condições sintetizadas na Tabela 4.1. Brevemente, a pesquisa de mutações nas regiões DTK (códon 835) e ITD (éxons 11/12) do gene *FLT3* foi realizada através de PCR e PCR seguido por polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP), respectivamente. Mutações pontuais nos genes *NRAS/KRAS* (códon 12/13), *PTPN11* (éxon 3) e *KIT* (éxons 8/17) foram detectadas através da técnica de sequenciamento de Sanger.

***FLT3* ITD.** O FLT3-DIT foi avaliado pela amplificação dos éxons 11 e 12, onde se localiza o domínio justamembrana, usando iniciadores previamente descritos e representados na Tabela 4.1 (NAKAO *et al.*, 1996). Para a reação de PCR, foram utilizados 100ng de DNA, em uma solução final de 50µl com os iniciadores a 50 pmol, dNTPs a 0,2mM, solução tampão 1x (50mM KCl; 20nM Tris-HCl, pH 8,4; Invitrogen, CA, USA), MgCl₂ a 1,5mM (Invitrogen, CA, USA), 1U de Taq-polimerase (Taq DNA Polymerase; Invitrogen, CA, USA). Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo, conforme ilustrado na Figura 4.9A. Entre os casos de LPA que apresentaram mutações *FLT3* ITD, foi realizada a análise da frequência do alelo mutado por meio da análise de fragmentos. Para isso, foi realizada uma reação de PCR com as mesmas condições descritas anteriormente, mas com o iniciador senso marcado com 6-FAM. Um µL do produto amplificado foi desnaturado a 95°C por 2 min, 0,3 µL de LIZ-600 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) e 10 µL de formamida. Os fragmentos desnaturados foram submetidos à análise no ABI3130XL (Applied Biosystems, CA, USA). A área abaixo da curva foi quantificada para os alelos mutados e selvagens no software ChimerMarker® (SoftGenetics, PA, USA). A razão entre os alelos foi expressa como uma razão entre a curva de *FLT3* ITD e o alelo normal.

***FLT3* D385.** As mutações em FLT3-D835 foram detectadas por ensaio de PCR para a amplificação do éxon 17, utilizando iniciadores previamente descritos (NAKAO *et al.*, 1996), seguida da digestão dos produtos com a enzima EcoRV. Para a reação

de PCR, foram utilizados 250ng de DNA. A solução adicionada ao DNA foi preparada contendo uma solução final de 50µl com iniciadores a 0,15µM, dNTPs a 0,2 mM, solução tampão 1x (50mM KCl; 20nM Tris-HCl, pH 8,4; Invitrogen, CA, USA), MgCl₂ a 2,5mM (Invitrogen, CA, USA), 5% de DMSO e 2,5U de Taq-polimerase (Taq DNA Polymerase; Invitrogen, CA, USA). A digestão de 3-10µl do produto da reação ocorreu no período *overnight* a 37°C, usando a enzima de restrição EcoRV (Biolabs, New England, UK). Os produtos digeridos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed™ (Biotium, CA, USA) (Figura 4.9B).

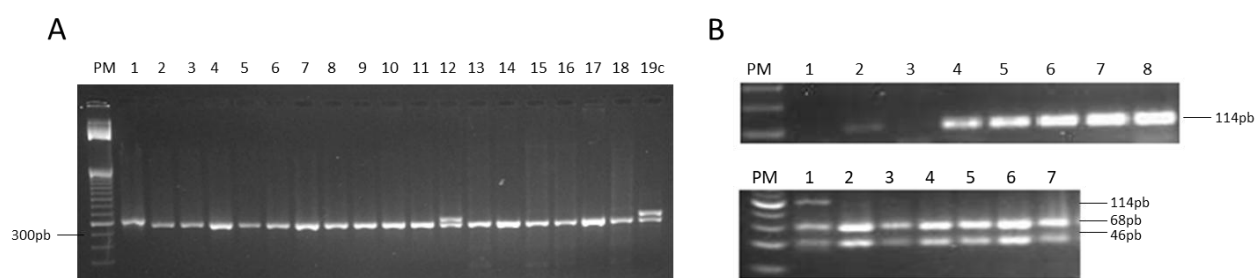


Figura 4.9. Gel de agarose 3% para detecção das mutações pontuais no gene *FLT3*. **A**, Detecção das duplicações em *tandem* (DIT) no domínio justamembrana. 1,12,19: Amostras que apresentam DIT; 2-11, 13-18: Amostras selvagens. **B**, Fragmento amplificado do gene *FLT3* contendo a região D835 (imagem superior). O fragmento amplificado foi tratado com a enzima EcoRV (imagem inferior). Nos casos selvagens a enzima encontra seu sítio de restrição e gera dois fragmentos, de 68pb e de 46pb. Nos casos mutados, a enzima não atua em um dos alelos, permanecendo visível a banda de 114pb. 1: amostra apresentando mutação no gene *FLT3*; 2-7: amostras selvagens na região analisada. PM, padrão de peso molecular.

KRAS. Para a reação de PCR foram utilizados 100-150ng de DNA. A solução adicionada ao DNA foi preparada para um volume final de 50µL com as seguintes concentrações: iniciadores a 0,5 µM; dNTPs a 0,2 mM, solução tampão 1x (50mM KCl; 20nM Tris-HCl, pH 8,4; Invitrogen, CA, USA), MgCl₂ a 2,5mM, (Invitrogen, CA, USA), 1U de Taq-polimerase (Taq DNA Polymerase; Invitrogen, CA, USA).

NRAS. 100-150ng de DNA foram amplificados na reação de PCR a partir de iniciadores a 0,5 µM; dNTPs a 0,2mM; solução tampão 1x (50mM KCl; 20nM Tris-HCl, pH 8,4) (Invitrogen, CA, USA), MgCl₂ a 2,5 mM, (Invitrogen, CA, USA), 1U de Taq-polimerase (Taq DNA Polymerase; Invitrogen, CA, USA), em um volume final de 50µL.

KIT. A reação de PCR foi preparada a partir de 200-500ng de DNA, iniciadores a 0,2 μ M; dNTPs a 0,2 mM; solução tampão HiFi PCR Buffer 1x (50mM KCl, 20 nM Tris-HCl pH 8,4; Invitrogen, CA, USA), sulfato de magnésio ($MgSO_4$) a 1,5mM, (Invitrogen, CA, USA), DMSO a 10%, 1U de Taq-polimerase HiFi (Taq DNA Polymerase HiFi; Invitrogen, CA, USA).

PTPN11. Foram utilizados 250ng de DNA, 0,2 mM dos iniciadores, 0,2 mM de dNTPs, solução tampão 1x (50mM KCl, 20nM Tris-HCl pH 8,4; Invitrogen, CA, USA), $MgCl_2$ a 2,5mM, (Invitrogen, CA, USA), 1,5U de Taq-polimerase (Taq DNA Polymerase; Invitrogen, CA, USA), para um volume final de 50 μ L na reação de PCR.

Tabela 4.1. Oligonucleotídeos iniciadores e condições de amplificação das reações de PCR utilizados para a identificação de mutações pontuais nos genes da via RAS-MAPK

| Gene ^a | Região | Tamanho do amplicon | Sequência senso (5'–3') | Sequência antisenso (5'–3') | Condições da PCR |
|---------------------|-------------|---------------------|-------------------------|-----------------------------|--|
| <i>FLT3</i> D835 | Éxon 20 | 114pb | CCGCCAGGAACGTGCTTG | CAGCCTCACATTGCCCC | 94°C 7', 35 ciclos de 94°C 30'', 61°C 30'', 72°C 45''; e 72°C 10' ^b |
| <i>FLT3</i> ITD | Éxons 11/12 | 300pb | GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC | CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC | 94°C 3', 35 ciclos de 94°C 30'', 56°C 1', 72°C 2'; e 72°C 7' |
| <i>KRAS</i> | Éxon 1 | 220pb | AACCTTATGTGTGACATGTTC | ATGGTCCTGCACCAGTAAT | 95°C 30'', 35 ciclos de 94°C 30'', 60°C 1', 72°C 30''; e 72°C 10' ^c |
| <i>NRAS</i> | Éxon 1 | 241pb | GACTGAGTACAACTGGTGG | TGCATAACTGAATGTATACCC | 94°C 5', 40 ciclos de 94°C 1', 57°C 1', 72°C 1'; e 72°C 10' ^c |
| <i>KIT</i> | Éxon 8 | 162pb | GACATATGGCCATTTCTGTT | CCAAAAATAATCATCTCACC | 94°C 1', 40 ciclos de 94°C 30'', 50°C 30'', 68°C 1'; e 68°C 3' ^c |
| <i>KIT</i> | Éxon 17 | 173pb | TGTATTCACAGAGACTTGGC | GAAACTAAAAATCCTTTGCAGGAC | 94°C 1', 40 ciclos de 94°C 30'', 50°C 30'', 68°C 1'; e 68°C 3' ^c |
| <i>PTPN11</i> | Éxon 3 | 384pb | CGACGTGGAAGATGAGATCTGA | CAGTCACAAGCCTTTGGAGTCAG | 94°C 8', 33 ciclos de 94°C 45'', 58°C 30'', 72°C 45''; e 72°C 10' ^c |

^a Sequências referência: *FLT3* NG_007066.1; *KRAS* NG_007524.1; *NRAS* NG_007572.1; *KIT* NG_007456.1; *PTPN11* NG_007459.1. ^b PCR seguida por RFLP. ^c PCR seguida por sequenciamento direto. pb, pares de bases.

4.3.6.1. Sequenciamento de Sanger

As reações de PCR foram realizadas no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA) e os produtos da PCR, com exceção de *FLT3*, foram visualizados através de gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Biotium, CA, USA) sendo, posteriormente, direcionados para o sequenciamento de Sanger.

O preparo das amostras para o sequenciamento se deu através da purificação dos produtos amplificados pela reação de PCR com o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, NE, UK), de acordo com o recomendado pelo fabricante. A quantificação desses produtos foi estimada com o auxílio do reagente Low Mass DNA Ladder (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA).

As placas de sequenciamento foram preparadas com o volume final de 10µl, utilizando como referência as quantidades e reagentes recomendados para a montagem da reação de sequenciamento com o BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems, CA, USA). As placas foram submetidas às reações utilizando a seguinte ciclagem básica no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA), com os perfis térmicos: etapa inicial de desnaturação a 96°C por 1 min, 25-40 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 seg, temperatura e tempo de anelamento de 50°C por 15 seg, e extensão a 60°C por 4 min. As amostras foram precipitadas na placa de sequenciamento seguindo o protocolo utilizado na Plataforma de Sequenciamento e Análise de Fragmentos PDTIS/Fiocruz, conforme o descrito: as placas foram centrifugadas a 600 rpm por 1 min; adicionou-se 30 µL de isopropanol 75% (Merck KGaA, Darmstadt, DE) e as amostras foram ressuspensas, com a pipeta, de 3 a 4 vezes, para homogeneizá-las. As placas foram incubadas, por 15 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e, posteriormente, centrifugadas a 4°C e 4.000 rpm, por 45 min. O sobrenadante foi descartado vertendo-se as placas sobre papel-toalha, através de movimentos circulares. Foram adicionados 50 µL de Etanol 75% (Merck KGaA, Darmstadt, DE) e seguiu-se uma nova centrifugação a 4°C/4.000 rpm, por 15 min. O sobrenadante foi, novamente, descartado e as placas aquecidas a 60°C, por 10 min, ao abrigo da luz. Foram adicionados 10 µL de Formamida Hi-Di™ (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA) em cada poço da placa, que foi submetida a aquecimento a 95°C durante 5 min no termociclador. Após estas

etapas, as amostras estavam adequadas para o processamento no sequenciador automático ABI3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). A análise das sequências geradas pelo aparelho foi realizada nos programas Chromas versão 2.6.4 (Technelysium, South Brisbane, AUS) e Mutation Surveyer® (Softgenetics, PA, USA).

4.3.7. Sequenciamento do exoma

As análises incluíram amostras de MO coletadas ao diagnóstico, amostra de SP coletadas no período de remissão clínica e molecular e, amostra de SP do irmão gemelar sem doença. As bibliotecas de DNA para o WES foram preparadas através do ensaio comercial SureSelect^{QTX} Target Enrichment for Illumina Multiplexed Sequencing (Agilent Technologies, CA, USA), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante, com as etapas representadas na Figura 4.10. Este *kit* captura 58 Mb do genoma que corresponde ao exoma total a partir de 50 ng de DNA genômico. O DNA foi fragmentado com a enzima transposase e ligados a adaptadores. Os fragmentos de DNA foram amplificados em uma reação de PCR e 750 ng do produto foram hibridizados com sondas de cDNA biotiniladas para seleção das regiões de éxons (*SureSelect*). Os fragmentos híbridos foram capturados com o auxílio de esferas magnéticas revestidas com estreptavidina, purificados e, novamente, amplificados em reação de PCR para o enriquecimento das regiões de interesse. Nessa reação, foram usados um par de iniciadores que serviram como índices para a identificação das amostras.

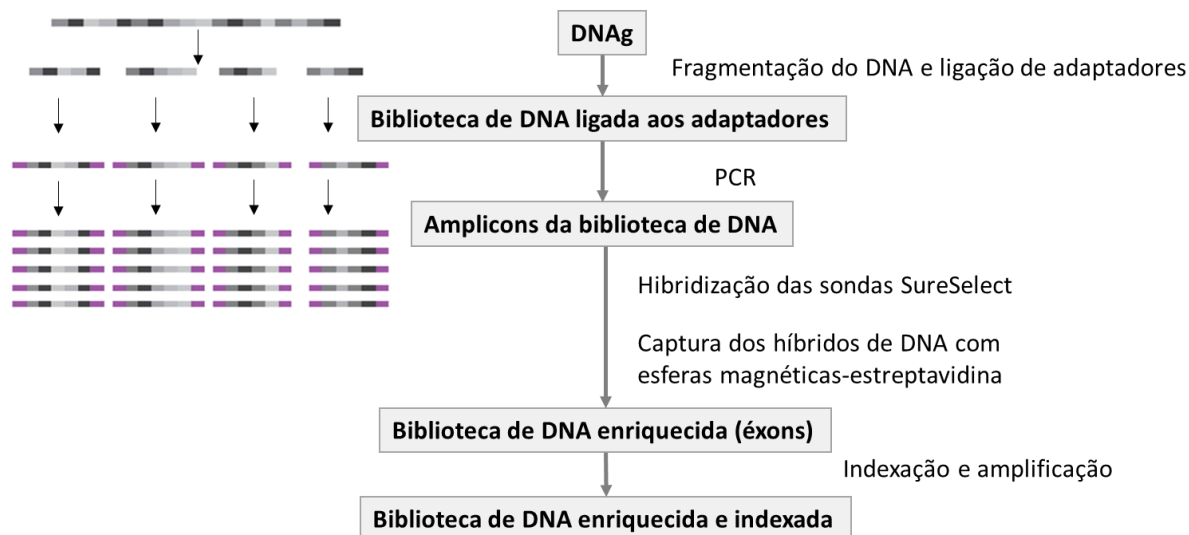


Figura 4.10. Representação esquemática das etapas do fluxo de trabalho de preparo das amostras de DNA para o sequenciamento do exoma.

A qualidade e o rendimento da biblioteca indexada foram avaliados através dos ensaios Agilent 2100 Bioanalyzer e High Sensitivity DNA (Agilent Technologies, CA, USA) e do Qubit™ dsDNA High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), respectivamente. Os *pools* de amostras foram incluídos na lâmina de sequenciamento (*flowcell*), seguida pela amplificação clonal em fase sólida (Illumina Inc, CA, USA), que é totalmente automatizada. Cada *pool* de amostras é colocado em uma linha da *flowcell* que contém sequências de fragmentos correspondentes às sequências contidas nos adaptadores utilizados na construção das bibliotecas, conforme representado na Figura 4.11. Essas sequências (sondas) funcionam como iniciadores para que ocorra uma amplificação em ponte na etapa de clusterização. Desse modo, os fragmentos são agrupados em *clusters*, onde são produzidas múltiplas cópias de fragmentos específicos por meio da desnaturação da dupla fita de DNA e incorporação de nucleotídeos na nova cadeia de DNA crescente, como acontece em uma PCR convencional. Após o término da clusterização, os fragmentos são desnaturados de modo que DNAs de fita única fiquem ligados à *flowcell* para posterior sequenciamento (Figura 4.11).

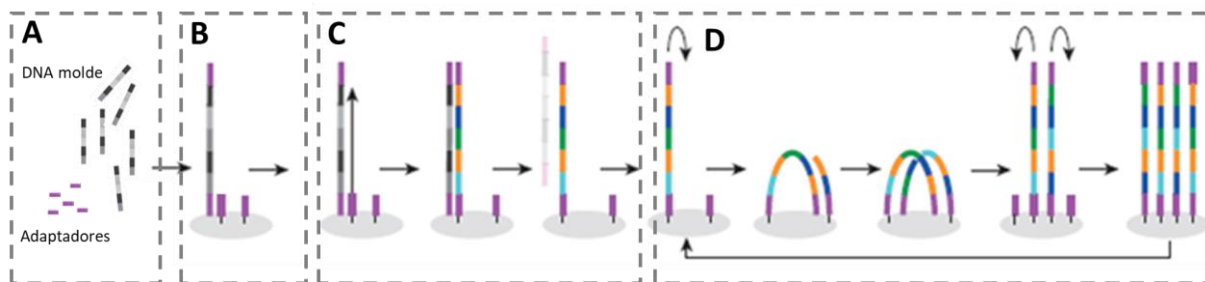


Figura 4.11. Representação esquemática das etapas que precedem o sequenciamento do exoma. **A**, Os fragmentos de DNA genômico são ligados a adaptadores em ambas as extremidades. **B**, Os fragmentos de DNA são desnaturados e fitas simples se ligam, randomicamente, aos adaptadores na *flowcell*. **C**, Amplificação dos fragmentos ligados, desnaturação e geração de fragmentos de fita simples. **D**, Novo anelamento com iniciadores acoplados na lâmina, seguido de amplificação em ponte e formação do *cluster*, com repetição das etapas. Modificado de SHENDURE, 2010.

O sequenciamento ocorre após a clusterização, com nova amplificação de moléculas de DNA dos *clusters*, porém, com nucleotídeos que possuem bases marcadas com fluoróforos, sendo cada base correspondente a uma cor diferente. A cada ciclo, uma base com fluoróforo é incorporada, a imagem do cluster é registrada e é retirado o fluoróforo juntamente com o agente terminador da cadeia crescente de DNA para que um novo ciclo se inicie. À medida que cada base é incorporada à cadeia crescente de DNA, o *cluster* emite uma fluorescência correspondente à base e assim, sucessivamente, até o completo sequenciamento dos fragmentos. Os sinais fluorescentes são lidos e interpretados, possibilitando a construção da sequência.

O sequenciamento foi realizado no equipamento HiSeq2500 (Illumina, CA, USA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Oito a 10 pM da biblioteca final foram usados para a geração de *clusters* e sequenciamento em uma *flowcell*, com o HiSeq PE Rapid Cluster Kit v2 (2 x 100 ciclos).

4.3.7.1. Análises de bioinformática

As sequências foram avaliadas quanto a qualidade utilizando o FASTQC e bases/ou *reads* inteiras de baixa qualidade (PHRED < 30) foram removidas usando o Trimmomatic. As *reads* remanescentes foram alinhadas no genoma de referência GRCh37 utilizando o programa BWA com opções *default*. A cobertura dos exomas foi avaliada com o programa BedTools. Para a detecção das variantes germinativas, nós seguimos o manual de boas práticas de análises do pacote *Genome Analysis Toolkit* (GATK) para a identificação de variantes de nucleotídeo único (SNV) e pequenas inserções e deleções (INDEL), com as opções padrão de chamada de

variantes (VAN DER AUWERA *et al.*, 2012). As variantes germinativas chamadas com menos de 6 e 32 leituras para SNVs e INDELs, respectivamente, e com frequência alélica menor que 0,2 foram filtradas e excluídas. Para as mutações somáticas, a ferramenta MuTect foi usada na comparação pareada com opções *default* (CIBULSKIS *et al.*, 2013). Nessa etapa, foram ignoradas as leituras de baixa qualidade ou com incompatibilidade no alinhamento das sequências, foram identificados sítios de mutação somática com alta confiança, foram eliminados os artefatos do sequenciamento, o alinhamento de leituras muito pequenas e de captura híbrida. As variantes foram anotadas e classificadas como de impacto alto, moderado ou leve utilizando a ferramenta *Variant Effector Prediction* (VEP).

A anotação das variantes contra bancos de dados, incluindo 1000 Genomes (<http://browser.1000genomes.org>), Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC; <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), Exome Aggregation Consortium (ExAC; <http://exac.broadinstitute.org/>) e Single Nucleotide Polymorphism database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) foi realizada pela ferramenta VEP. A predição pelos *softwares* SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant; <http://sift.jcvi.org/>) e Polyphen2 (Polymorphism Phenotyping v2; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) foi utilizada para estimar se uma determinada troca de aminoácidos afetaria a função da proteína. Esses *softwares* analisam o impacto da variante considerando as alterações físico-químicas causadas pelas substituições de aminoácidos na proteína e avaliam também a conservação evolutiva da posição da variante (ADZHUBEI *et al.*, 2010; KUMAR; HENIKOFF; NG, 2009). A classificação clínica das variantes foi realizada de acordo com o ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

4.3.8. Análises estatísticas

Foram realizadas análises descritivas de variáveis contínuas e categóricas, para a obtenção de uma medida de tendência central e dispersão e da distribuição de frequência. Os testes de qui-quadrado e Exato de Fisher foram utilizados para comparar as proporções entre os grupos. O teste não paramétrico Mann-Whitney U foi utilizado para essa comparação entre variáveis contínuas.

Um conjunto de dados pré-definidos contendo dados clínicos obtidos no diagnóstico inicial, incluindo idade, sexo, cor da pele e contagem de leucócitos foi analisado. A variável cor da pele foi categorizada em “negros” e “não negros”, de acordo com a informação fornecida pelos responsáveis do paciente, com o objetivo

de definir grupos menos heterogêneos (PENA *et al.*, 2011). A categoria “não negros incluiu pacientes cujos responsáveis declararam a cor da pele como sendo branca, parda ou de etnia indígena. Os dados referentes à sobrevida foram encaminhados pelos médicos colaboradores de cada instituição ao longo do estudo.

Para o propósito desse estudo, a idade foi considerada uma variável categórica e foram estabelecidos três grupos para análise, abrangendo os casos com idade ≤ 2 anos, com idade entre 2 e 10 anos e aqueles com idade >10 anos. Devido às diferenças nos marcadores de diagnóstico e nos protocolos de tratamento ao longo do tempo, as análises dos marcadores prognósticos foram divididas em dois períodos: primeiro período, que incluiu os casos com diagnóstico entre 2000 e 2008, e segundo período, contendo os casos diagnosticados entre 2009 e 2017.

A SG foi medida a partir do tempo decorrido da data de diagnóstico até a data do óbito por qualquer causa. Os pacientes que não obtiveram um evento (óbito) foram censurados na data do último contato no qual se obteve conhecimento. O método de Kaplan-Meier foi utilizado para calcular a probabilidade de SG (pSG) em 5 anos e os valores estimados de sobrevida foram comparados através do teste de log-rank, com o intuito de verificar a associação da presença de uma característica em particular com o desfecho do paciente. Foram excluídos das análises de sobrevida os pacientes que foram submetidos a TCTH. Entre os casos de LPA, também foram excluídos os pacientes que evoluíram a óbito nos dez dias após o diagnóstico.

A associação entre variáveis independentes e o desfecho foi avaliada através do modelo de regressão de risco proporcional de Cox (*Cox proportional-hazard regression*), representada pela razão de risco (RR) e intervalos de confiança (IC) de 95%. As variáveis com p valor $<0,20$ associadas com a biologia da doença foram incluídas nesse modelo de análise múltipla seguindo o método *stepwise forward*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. As análises foram realizadas no programa SPSS 21.0 (SPSS, Chicago, USA). Para a representação gráfica dos resultados de alterações genômicas, foi utilizado o gráfico de Circos Plot (<http://mkweb.bcgsc.ca/tableviewer/>), que fornece uma visão geral e comparativa da associação entre as diferentes classes de mutações (KRZYWINSKI *et al.*, 2009).

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE DESCRITIVA DOS CASOS

Foram incluídos 920 casos de LMA diagnosticados no período de 17 anos, sendo excluídos 132 casos com síndrome de Down. Dessa forma, 788 casos de LMA foram elegíveis para a caracterização molecular (Figura 5.1).

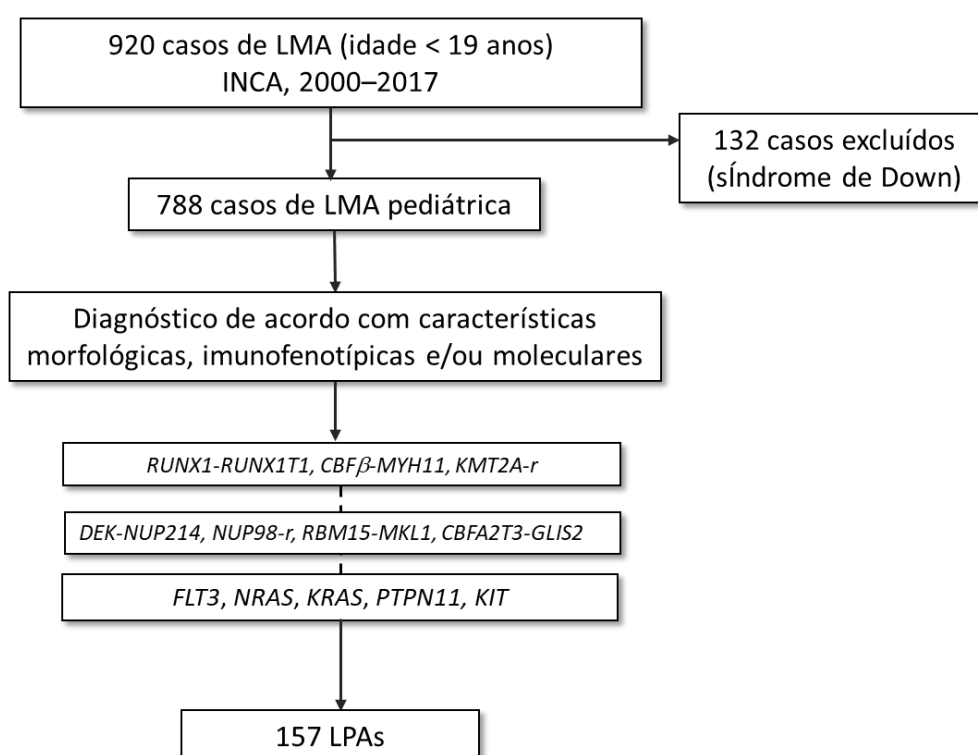


Figura 5.1. Total de casos de LMA que foram encaminhados para o laboratório do Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricos, INCA, no período de 2000-2017. Foram excluídos os casos de LMA com síndrome de Down. LMA, leucemia mieloide aguda; LPA, leucemia promielocítica aguda.

As amostras dos pacientes foram encaminhadas de 56 instituições médicas que são referência em tratamento onco-hematológico pediátrico. Os centros estão distribuídos no território brasileiro, com representação em todas as regiões geográficas. A Figura 5.2 ilustra, proporcionalmente, o número de casos encaminhado de cada Estado. A distribuição dos casos de LPA e LMA entre as

regiões geográficas foi semelhante. A média e mediana de idade dos casos foi de 7,9 ($\pm 5,6$) e 7,6 anos, respectivamente, não apresentando distribuição normal (Figura 5.2). Cento e oitenta pacientes (22,3%) são lactentes (idade ≤ 2 anos).

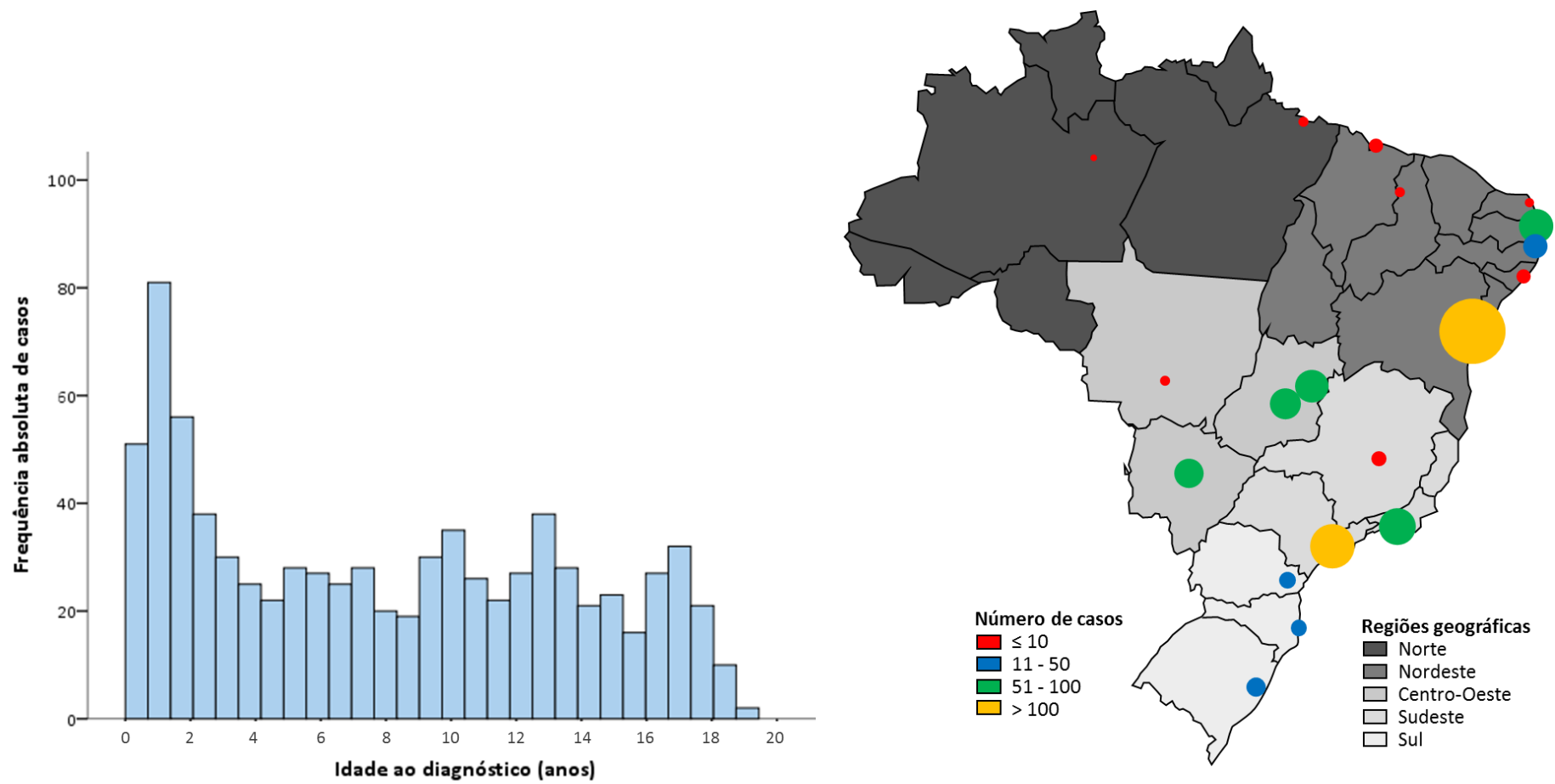


Figura 5.2. Histograma de distribuição dos casos de acordo com a idade (esquerda) e mapa brasileiro com o número de casos de LMA de cada região geográfica (direita). O número de casos de cada instituição está agrupado por Estado e apresentado como círculos proporcionais.

As características demográficas e laboratoriais dos casos de acordo com o período de diagnóstico estão representadas na Tabela 5.1, com diferenças estatisticamente significativas entre os dois períodos. Em ambos, predominaram os casos procedentes da região Nordeste e, no segundo período, a região Norte passou a ser incluída no estudo. Em relação à cor da pele, os pacientes negros representaram 18% e 7,0% no primeiro e segundo período, respectivamente, com 70 (8,5%) casos sem informação. Foi observada a ocorrência de uma frequência diferente de casos do sexo masculino e feminino no primeiro período do estudo, com predomínio do sexo masculino, correspondendo à razão masculino:feminino de 1,5:1.

Tabela 5.1. Características demográficas e laboratoriais dos casos de LMA pediátrica de acordo com o período de diagnóstico, Brasil, 2000-2017

| Características | Primeiro período (2000-2008), n (%) | Segundo período (2009-2017), n (%) | p |
|---|---|--|--------|
| Regiões geográficas brasileiras | | | <0,001 |
| Norte | - | 6 (1,3) | |
| Nordeste | 208 (56,7) | 175 (39,7) | |
| Centro Oeste | 49 (13,4) | 125 (28,3) | |
| Sudeste | 93 (25,3) | 114 (25,9) | |
| Sul | 17 (4,6) | 21 (4,8) | |
| Idade (anos) | | | 0,029 |
| ≤2 | 97 (26,4) | 83 (18,8) | |
| >2-10 | 138 (37,6) | 174 (39,5) | |
| ≥11 | 132 (36,0) | 184 (41,7) | |
| Cor da pele | | | <0,001 |
| Negros | 55 (18,0) | 31 (7,0) | |
| Não negros | 250 (82,0) | 409 (93,0) | |
| Sexo | | | 0,003 |
| Feminino | 146 (39,8) | 222 (50,3) | |
| Masculino | 221 (60,2) | 219 (49,7) | |
| Classificação morfológica/imunofenotípica | | | 0,014 |
| LMA minimamente diferenciada | 15 (4,2) | 19 (4,4) | |
| LMA sem maturação | 29 (8,0) | 23 (5,4) | |
| LMA com maturação | 52 (14,4) | 50 (11,7) | |
| LPA | 59 (16,3) | 98 (23,0) | |
| Leucemia mielomonocítica aguda | 78 (21,6) | 110 (25,8) | |
| Leucemia aguda monocítica/monoblástica | 45 (12,5) | 58 (13,6) | |
| Leucemia aguda eritroide | 11 (3,0) | 4 (0,9) | |
| Leucemia megacarioblástica aguda | 34 (9,4) | 33 (7,7) | |
| Leucemia de fenótipo misto mieloide/T | 2 (0,6) | 7 (1,6) | |
| LMA sem especificação de linhagem | 36 (10,0) | 25 (5,9) | |
| Desfecho clínico ^a | | | 0,018 |
| Vivo | 135 (44,7) | 112 (34,0) | |
| Óbito | 97 (32,1) | 118 (35,9) | |
| Sem informação | 70 (23,2) | 99 (30,1) | |
| Total, n (%) | 367 (45,4) | 441 (54,6) | |

^a Excluindo os casos de leucemia promielocítica aguda. LPA, leucemia primielocítica aguda; LMA, leucemia mieloide aguda. Análises estatísticas realizadas com os testes qui-quadrado e exato de Fisher.

Foram observadas diferenças entre os subtipos de LMA classificados morfológica e imunofenotipicamente entre os dois períodos de análise. Apesar da predominância do subtipo com diferenciação mielomonocítica em ambos, no segundo período ocorreu aumento do número de casos de LPA e diminuição dos casos sem especificação de linhagem (Tabela 5.1).

5.2. ALTERAÇÕES MOLECULARES FREQUENTES NAS LMAS PEDIÁTRICAS *DE NOVO*

As alterações genéticas chamadas tipo II, conhecidamente mais frequentes nas LMAs pediátricas *de novo* (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBF β -MYH11*, *KMT2A-r* e *PML-RAR α*), foram encontradas em 46,4% dos casos em relação ao total e, as chamadas mutações tipo I (*KRAS*, *NRAS*, *FLT3*, *KIT* e *PTPN11*) em 55,0% dos casos. A distribuição das alterações tipo I/II de acordo com as características demográficas e laboratoriais dos casos está representada na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Distribuição das alterações tipo I/II de acordo com as características demográficas e laboratoriais dos casos de LMA pediátrica, Brasil, 2000-2017

| | Mutações tipo II ^a | | Mutações tipo I ^b | |
|--|-------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|
| | Presente, n (%) | <i>p</i> ^c | Presente, n (%) | <i>p</i> ^c |
| Idade (anos) | | 0,977 | | <0,001 |
| | ≤2 | 73 (22,5) | 30 (12,6) | |
| | >2-10 | 124 (38,2) | 94 (39,5) | |
| | ≥11 | 128 (39,4) | 114 (47,9) | |
| Cor da pele | | 0,161 | | 0,072 |
| | Negros | 29 (9,6) | 33 (14,7) | |
| | Não negros | 274 (90,4) | 191 (85,3) | |
| Sexo | | 0,857 | | 0,364 |
| | Feminino | 146 (44,9) | 102 (42,9) | |
| | Masculino | 179 (55,1) | 136 (57,1) | |
| Contagem de leucócitos (x10 ⁹ /L) | | 0,571 | | <0,001 |
| | ≤10 | 95 (29,8) | 51 (21,5) | |
| | >10 | 224 (70,2) | 186 (78,5) | |
| Classificação morfológica/imunofenotípica | | <0,001 | | <0,001 |
| LMA minimamente diferenciada | 2 (0,6) | | 6 (2,5) | |
| LMA sem maturação | 11 (3,4) | | 23 (9,7) | |
| LMA com maturação | 50 (15,4) | | 31 (13,0) | |
| LPA | 116 (35,7) | | 59 (24,8) | |
| Leucemia mielomonocítica aguda | 76 (23,4) | | 71 (39,8) | |
| Leucemia aguda monocítica/monoblástica | 40 (12,3) | | 27 (11,3) | |
| Leucemia aguda eritroide | - | | 1 (0,4) | |
| Leucemia megacarioblástica aguda | 10 (3,1) | | 9 (3,8) | |
| Leucemia de fenótipo misto mieloide/T | 1 (0,3) | | 3 (1,3) | |
| LMA sem especificação de linhagem | 19 (5,8) | | 8 (3,4) | |

^a Mutações tipo II incluem as alterações *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11*, rearranjos do *KMT2A* e *PML-RARα*. ^b Mutações tipo I incluem mutações pontuais em *KRAS*, *NRAS*, *FLT3*, *KIT* e *PTPN11*. ^c Resultado da análise de associação entre os casos que apresentavam (“presente”) ou não as mutações tipo I e II de acordo com as variáveis do modelo. LPA, leucemia promielocítica aguda; LMA, leucemia mieloide aguda. Análises estatísticas realizadas com os testes qui-quadrado e exato de Fisher.

A frequência das mutações tipo I foi maior nas faixas etárias superiores, ou seja, 12,6% de mutações tipo I foram identificadas nos casos com idade ≤ 2 anos apresentaram; 39,5% e 47,9% de mutações tipo I foram identificadas nos casos com idade entre 2-10 anos e ≥ 11 , respectivamente. Além disso, a maioria dos casos com mutações tipo I (78,5%) apresentou alta contagem leucocitária ($>10 \times 10^9$ células/L). Essas diferenças não foram observadas para os casos apresentando mutações tipo II. Apesar disso, ambos os tipos de mutação foram associados com os subtipos morfológicos/imunofenotípicos, sendo a maioria das mutações predominando entre os casos de LPA e de LMA com diferenciação mielomonocítica (Tabela 5.2). Entre os casos de LPA, 118/147 (80,3%) dos pacientes apresentaram *PML-RAR α* , que passou a ser investigada sistematicamente nas amostras a partir do ano de 2008. Em 49/86 casos (57%) em que a busca da fusão *PML-RAR α* foi realizada através das técnicas de RT-PCR e FISH, houve discordância do resultado. Nestas, apesar do resultado positivo encontrado pela FISH, não foi possível identificar o transcrito de fusão pela RT-PCR. Os transcritos de fusão *bcr1*, *bcr2* e *bcr3* representaram 40%, 16% e 44% dos casos de LPA, respectivamente. As diferentes isoformas do transcrito *PML-RAR α* não apresentaram associação estatisticamente significativa com a idade, sexo e leucometria ao diagnóstico.

Os casos que apresentam alterações genéticas recorrentes passaram a ser classificados de acordo com a alteração identificada, conforme estabelecido na classificação da OMS. A Figura 5.3 representa os subtipos moleculares e morfológicos e a frequência de cada subtipo em relação a coorte total.

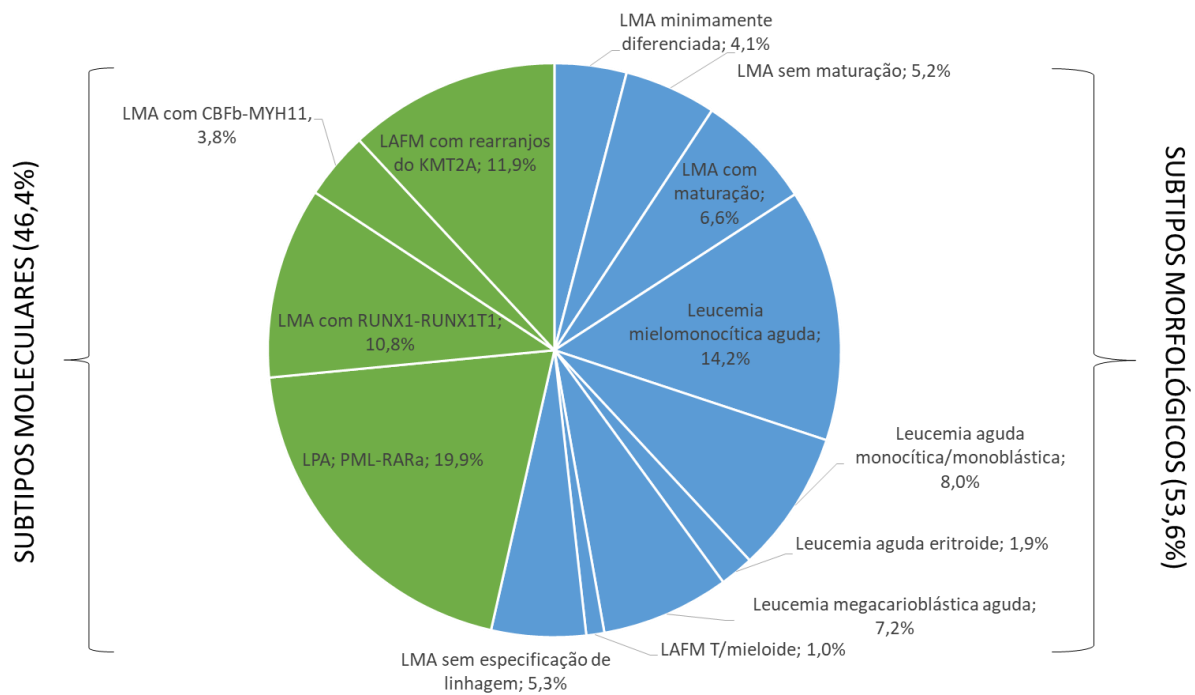


Figura 5.3. Frequência dos subtipos genéticos e morfológicos/imunofenotípicos de LMA. LAFM, leucemia aguda de fenótipo misto; LPA, leucemia promielocítica aguda; LMA, leucemia mieloide aguda.

A distribuição das mutações tipo II de acordo com a idade está representada na Figura 5.4. Todas as alterações apresentaram associação com a idade ($p < 0,001$). As alterações CBF (*RUNX1-RUNX1T1* e *CBF β -MYH11*) e os casos de LPA apresentam distribuição semelhante, com a maioria dos casos diagnosticados com idade entre 5-15 anos. A prevalência dos *KMT2A-r* foi maior entre os pacientes com idade menor diminuindo, progressivamente, nas faixas etárias superiores (Figura 5.4). Os genes envolvidos na fusão com o *KMT2A* foram, principalmente, *MLLT3* (27/94; 28,7%), *AFF1* (10/94; 10,6%), *MLLT10* (9/94; 9,6%), *MLLT1* (6/94; 6,4%) e *MLLT4* (4/94; 4,3%), entre outros menos frequentes. Em 28 casos (29,8%), o gene parceiro do *KMT2A* não foi identificado.

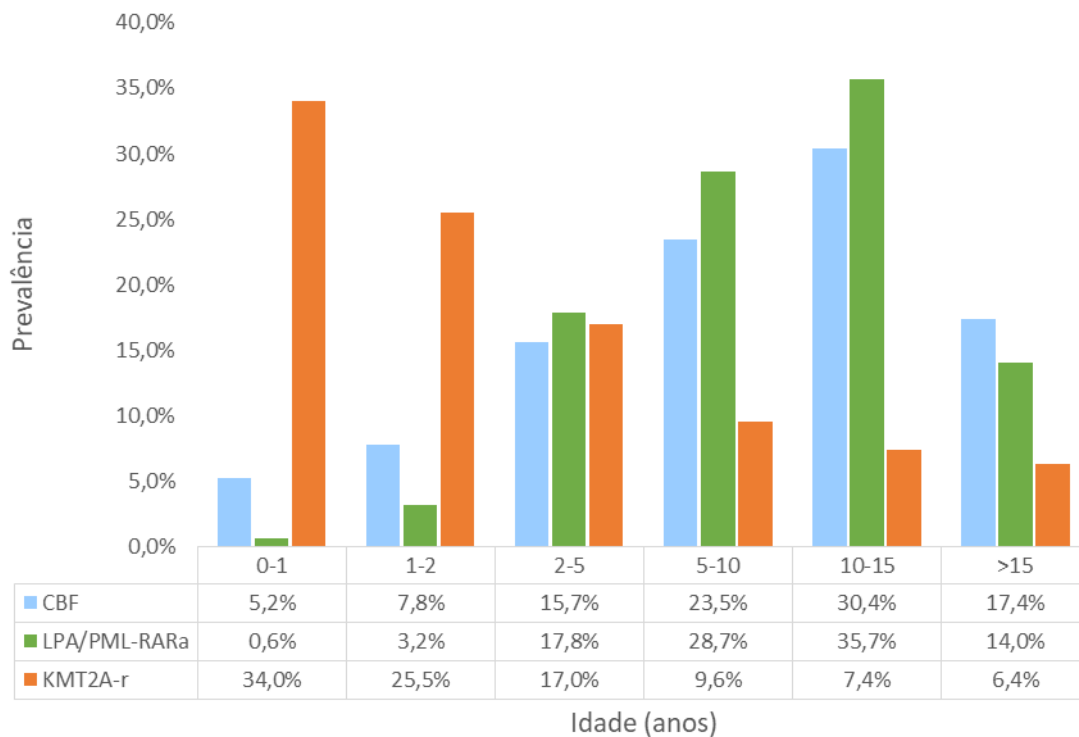


Figura 5.4. Distribuição das mutações tipo II de acordo com a idade. CBF, *core binding factor* (representada pelas alterações *RUNX1-RUNX1T1* e *CBF β -MYH11*); LPA, leucemia promielocítica aguda; *KMT2A-r*, rearranjos do *KMT2A*.

A Figura 5.5 representa a distribuição da frequência das mutações tipo I de acordo com a idade, com mutações em *FLT3* apresentando associação estatisticamente significativa ($p < 0,001$). As crianças com idade ≤ 1 ano apresentaram o menor número de alterações ($n=12$) e os pacientes com idade entre 5-10 anos apresentaram o maior número de alterações ($n=69$).

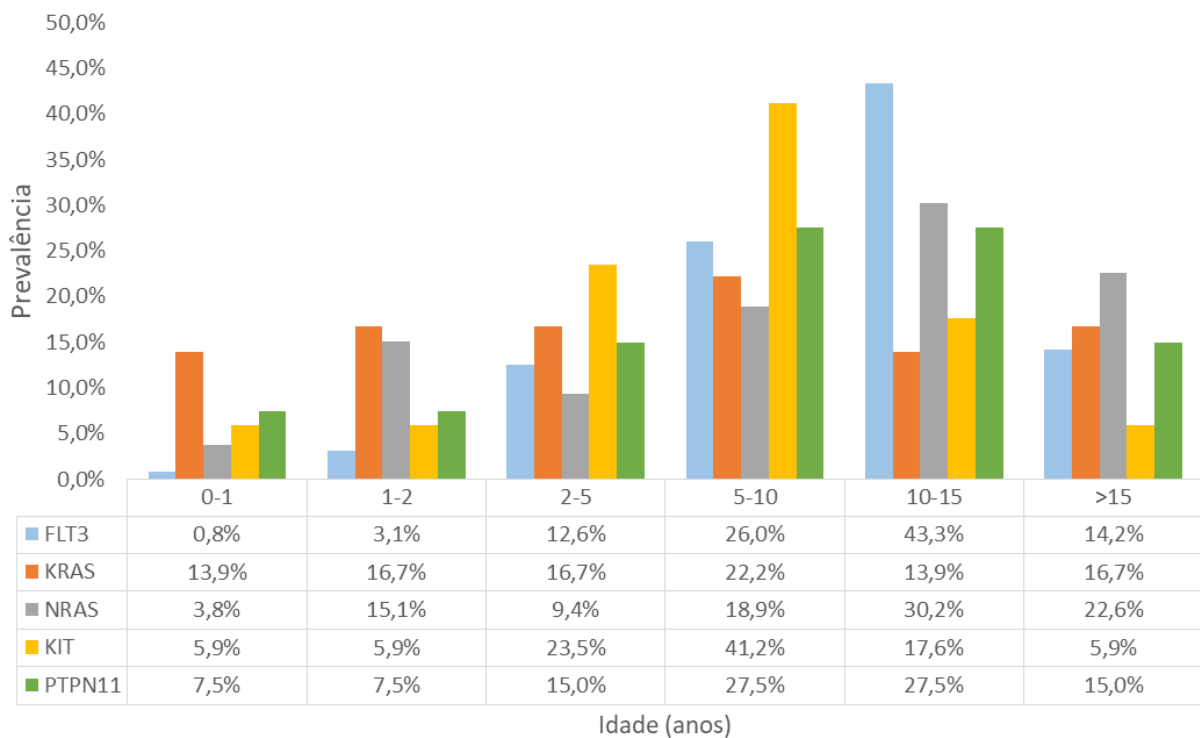


Figura 5.5. Distribuição das mutações tipo I de acordo com a idade.

A Tabela 5.3 representa a frequência das alterações moleculares de acordo com as características demográficas e contagem de leucócitos ao diagnóstico. A frequência das alterações está representada em relação ao total de casos analisados. As mutações em *FLT3* foram mais frequentes entre os casos com idade maior ($p < 0,001$). A fusão *CBF β -MYH11* foi associada a alta contagem leucocitária ($>10 \times 10^9/L$; 93,1%), assim como a coorte total (72,5%) e casos apresentando mutações em *NRAS* (84,3%) (Tabela 5.3).

A maioria das mutações em *FLT3* foi representada pelo tipo ITD (79,2%). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as mutações ITD/D835 e a idade, sexo e contagem de leucócitos ao diagnóstico. Da mesma maneira, a mediana de idade e leucometria não foi diferente entre os dois tipos de mutação ($p = 0,547$ e $p = 0,253$, respectivamente).

Tabela 5.3. Frequência das alterações moleculares dos casos de LMA de acordo com as características demográficas e laboratoriais, Brasil, 2000-2017

| Alteração molecular ^a | Frequência n/total (%) | Mediana (mín-máx) | Idade (anos) | | | <i>p</i> | Sexo | | <i>p</i> | Contagem de leucócitos (x10 ⁹ /L) | | | <i>p</i> |
|----------------------------------|---------------------------|----------------------|--------------|----------------|--------------|----------|-------------------|--------------------|----------|--|--------------|--------------|----------|
| | | | ≤2 n (%) | >2-10 n (%) | ≥11 n (%) | | Feminino n (%) | Masculino n (%) | | Mediana (mín-máx) | ≤10 n (%) | >10 n (%) | |
| Mutações tipo II | | | | | | | | | | | | | |
| <i>RUNX1-RUNX1T1</i> | 85/469 (18,1) | 9,3 (0,2-18,3) | 9 (10,6) | 36 (42,4) | 40 (47,1) | <0,001 | 35 (41,2) | 50 (58,8) | 0,166 | 20,1 (1,7-136) | 23 (27,7) | 60 (72,3) | 0,357 |
| <i>CBFβ-MYH11</i> | 30/457 (6,6) | 9,3 (0,3-17,8) | 5 (16,7) | 10 (33,3) | 15 (50,0) | 0,073 | 17 (56,7) | 13 (43,3) | 0,321 | 96,9 (2,2-373) | 2 (6,9) | 27 (93,1) | 0,024 |
| <i>KMT2A-r</i> | 94/436 (21,6) | 1,7 (0-18,2) | 55 (58,5) | 26 (27,7) | 13 (13,8) | <0,001 | 46 (48,9) | 48 (51,1) | 0,534 | 42 (0,9-451) | 17 (18,5) | 75 (81,5) | 0,088 |
| LPA, <i>PML-RARα</i> | 157/788 (19,9) | 9,8 (0,8 -18,7) | 6 (3,8) | 73 (46,5) | 78 (49,7) | <0,001 | 68 (43,3) | 89 (56,7) | 0,575 | 10,6 (0,2-800) | 75 (48,4) | 80 (51,6) | <0,001 |
| Mutações tipo I | | | | | | | | | | | | | |
| <i>FLT3</i> (ITD ou D835) | 125/549 (23,0) | 10,9 (1,0-18,9) | 5 (4,1) | 48 (38,4) | 72 (57,6) | <0,001 | 57 (45,6) | 68 (54,4) | 0,913 | 34,2 (0,8-800) | 33 (26,4) | 92 (73,6) | 0,453 |
| <i>KRAS</i> | 35/568 (6,2) | 6,0 (0,5-18,3) | 10 (28,6) | 14 (40,0) | 11 (31,4) | 0,527 | 13 (37,1) | 22 (62,9) | 0,271 | 34,2 (1-700) | 7 (20,0) | 28 (80,0) | 0,223 |
| <i>NRAS</i> | 51/510 (10,0) | 10,1 (0,7-18,0) | 9 (17,6) | 16 (31,4) | 26 (51,0) | 0,433 | 23 (45,1) | 28 (54,9) | 0,953 | 50 (5,1-800) | 8 (15,7) | 43 (84,3) | 0,020 |
| <i>KIT</i> | 18/265 (6,8) | 5,8 (0,3-16,3) | 2 (11,8) | 11 (64,7) | 4 (23,5) | 0,090 | 6 (35,3) | 11 (64,7) | 0,204 | 45,7 (4,5-168) | 2 (12,5) | 14 (87,5) | 0,120 |
| <i>PTPN11</i> | 40/445 (9,0) | 8,2 (0,4-17,6) | 6 (15,0) | 17 (42,5) | 17 (42,5) | 0,874 | 13 (32,5) | 27 (67,5) | 0,067 | 42,1 (1-374) | 8 (20,0) | 32 (80,0) | 0,117 |

^a O número total de casos analisados reflete a disponibilidade de material biológico para as análises moleculares. ^b Os casos de leucemia promielocítica aguda (LPA) foram analisados em relação à coorte total. ITD, duplicações internas em *tandem*; máx, máximo; mín, mínimo; n, número de casos. Análises estatísticas realizadas com os testes qui-quadrado e Mann-Whitney U.

5.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE AS MUTAÇÕES TIPO I E TIPO II

Apesar das alterações tipo II serem mutualmente excludentes entre si, segundo o modelo de leucemogênese, elas estão associadas às mutações tipo I. A análise de associação entre a presença de alterações tipo I e as fusões gênicas demonstrou que *CBFβ-MYH11* e *LPA/PML-RARα* apresentam maior frequência dessa classe de mutações (53,3% e 37,6%, respectivamente), conforme descrito na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Associação entre a presença de mutações tipo I e II

| | Mutação tipo I | | p |
|----------------------|-------------------|------------------|-------|
| | Presente n (%) | Ausente n (%) | |
| Mutação tipo II | | | |
| <i>RUNX1-RUNX1T1</i> | 23 (27,1) | 62 (72,9) | 0,347 |
| <i>CBFβ-MYH11</i> | 16 (53,3) | 14 (46,7) | 0,006 |
| LPA, <i>PML-RARα</i> | 59 (37,6) | 98 (62,4) | 0,022 |
| <i>KMT2A-r</i> | 23 (24,5) | 71 (75,5) | 0,183 |

LPA, leucemia promielocítica aguda; *KMT2A-r*, rearranjos do *KMT2A*. Análises estatísticas realizadas com o teste qui-quadrado.

Foi testada a associação entre cada mutação tipo I e os subtipos genéticos definidos pelas alterações tipo II, com a distribuição das frequências representada na Figura 5.6. Na figura, o *circos plot* representa, proporcionalmente, as alterações moleculares das LMAs pediátricas (segmentos externos no círculo). As linhas interiores que conectam cada segmento representam a ocorrência concomitante entre cada alteração. A tabela utilizada para a construção do *circos plot* está representada no Anexo E. Visualmente, a Figura 5.6 demonstra maior frequência de mutações em *FLT3* entre os casos de *LPA/PML-RARα* e mutações em *KRAS* entre os casos *KMT2A-r*. As frequências e as associações entre as alterações tipo I e II estão descritas na Tabela 5.5. Foram observadas mutações concomitantes entre as alterações tipo I. Trinta casos (12,7%) apresentaram mais de uma mutação tipo I, sendo 2 deles com três genes alterados [*NRAS*, *FLT3* (ITD e D835) e *PTPN11* (c.255C>T, p.H85H e c.227A>C, p.Q76A)].

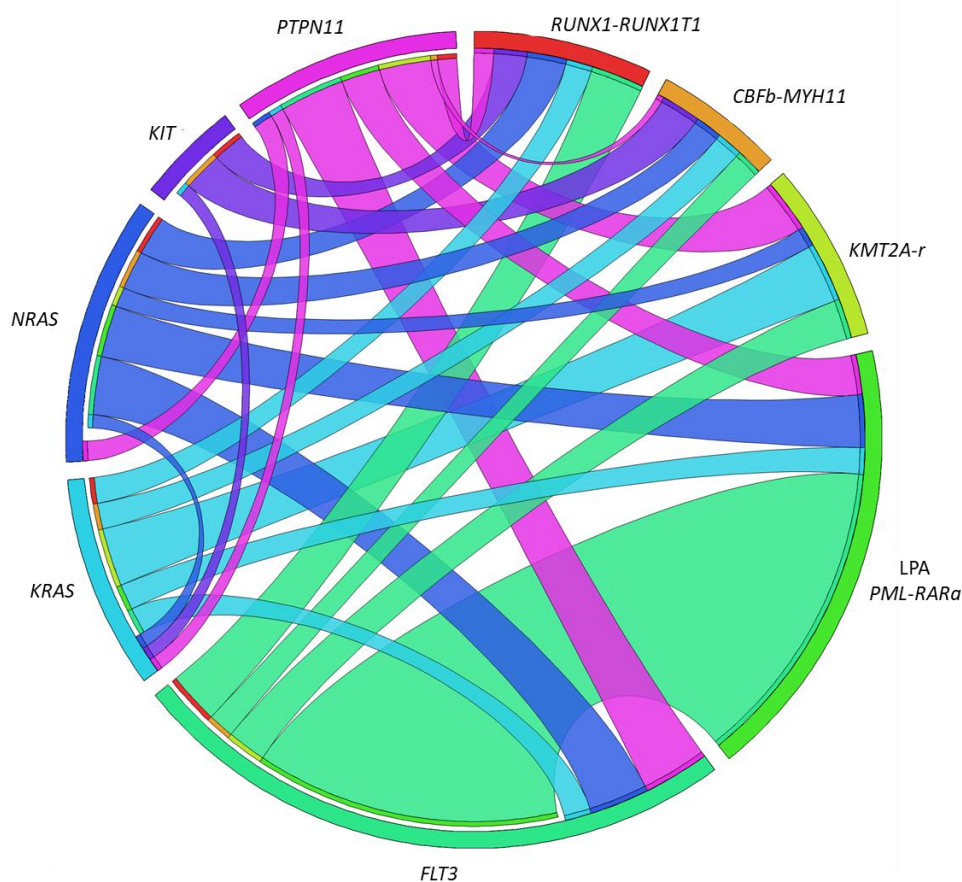


Figura 5.6. Distribuição das alterações tipo I (*FLT3*, *KRAS*, *NRAS*, *KIT*, *PTPN11*) entre os subtipos genéticos de LMA definidos pelas alterações tipo II (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11*, rearranjos do *KMT2A* e *PML-RARα*). *Circos plot* representando, proporcionalmente, as alterações moleculares das LMAs pediátricas (segmentos externos no círculo). As linhas interiores conectando cada segmento representam a ocorrência concomitante entre cada alteração.

Os subtipos de LMA com a fusão *RUNX1-RUNX1T1* e com a fusão *CBFβ-MYH11* apresentaram, principalmente, mutações em *KIT* (20,0% e 23,1%, respectivamente). Os casos de LPA/*PML-RARα* foram associados às mutações em *FLT3* (45,2%). A maioria dos casos com *KMT2A-r* (60,7%) não apresentou mutação nos genes analisados (Tabela 5.5).

Tabela 5.5. Associação entre as mutações tipo I e tipo II

| | Mutações tipo I | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-----------------|---------------|--------|---------------|---------------|-------|---------------|---------------|-------|---------------|---------------|-------|---------------|---------------|-------|
| | <i>FLT3</i> | | | <i>KRAS</i> | | | <i>NRAS</i> | | | <i>KIT</i> | | | <i>PTPN11</i> | | |
| | Pos, n (%) | Neg, n (%) | p | Pos, n (%) | Neg, n (%) | p | Pos, n (%) | Neg, n (%) | p | Pos, n (%) | Neg, n (%) | p | Pos, n (%) | Neg, n (%) | p |
| Mutações tipo II | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>RUNX1-RUNX1T1</i> | 8 (11,6) | 61 (88,4) | 0,244 | 4 (5,8) | 64 (94,2) | 0,722 | 6 (9,7) | 56 (90,3) | 0,939 | 5 (20,0) | 20 (80,0) | 0,019 | 5 (5,8) | 49 (94,2) | 0,394 |
| <i>CBFβ-MYH11</i> | 4 (13,8) | 25 (86,2) | 0,807 | 4 (14,3) | 24 (85,7) | 0,113 | 4 (14,3) | 24 (85,7) | 0,384 | 6 (23,1) | 20 (76,9) | 0,003 | 1 (4,2) | 23 (95,8) | 0,385 |
| LPA, <i>PML-RARα</i> | 47 (45,2) | 57 (54,8) | <0,001 | 4 (3,3) | 117 (96,7) | 0,141 | 7 (6,3) | 104 (93,7) | 0,142 | - | 40 (100,0) | 0,068 | 6 (5,6) | 102 (94,4) | 0,152 |
| <i>KMT2A-r</i> | 6 (8,3) | 66 (91,7) | 0,052 | 9 (11,8) | 67 (88,2) | 0,022 | 3 (5,4) | 53 (94,6) | 0,228 | - | 43 (100,0) | 0,034 | 8 (13,8) | 50 (86,2) | 0,108 |

KMT2A-r, rearranjos do *KMT2A*; LPA, leucemia promielocítica aguda; n, número; Neg, negativo; Pos, positivo. Análises estatísticas realizadas com os testes qui-quadrado e exato de Fisher.

Entre os casos LPA, as mutações em *FLT3* foram associadas à maior leucometria e ao transcrito de fusão do *PML-RAR α* chamado bcr3, caracterizado pela quebra no gene *PML* entre os éxons 3 e 4 (Tabela 5.6).

Tabela 5.6. Associação entre as mutações em *FLT3* e as características demográficas e laboratoriais dos casos de leucemia promielocítica aguda

| | <i>FLT3</i> ^{mut} , n (%) | <i>FLT3</i> ^{wt} , n (%) | p |
|---|------------------------------------|-----------------------------------|---------|
| Mediana de idade ao diagnóstico (anos) | 11,2 | 9,3 | 0,294 |
| Idade (anos) | | | 0,136 |
| ≤ 2 | 0 (0,0) | 3 (4,9) | |
| > 2–10 | 19 (39,6) | 30 (49,2) | |
| ≥ 11 | 29 (60,4) | 28 (45,9) | |
| Sexo | | | 0,120 |
| Feminino | 16 (31,2) | 2 (45,9) | |
| Masculino | 33 (68,8) | 33 (54,1) | |
| Mediana da contagem de leucócitos (x10 ⁹ /L) | 22,850 | 7,000 | 0,003 |
| Contagem de leucócitos (x10 ⁹ /L) | | | 0,001 |
| ≤10 | 14 (29,2) | 37 (60,7) | |
| >10 | 34 (70,8) | 24 (39,3) | |
| Mediana de plaquetas (x10 ⁹ /L) | 21,000 | 30,000 | 0,127 |
| Plaquetas (x10 ⁹ /L) | | | 0,053 |
| ≤40 | 35 (81,4) | 37 (63,8) | |
| >40 | 8 (18,6) | 21 (36,2) | |
| Subtipo morfológico da LPA | | | 0,057 |
| Hipergranular | 38 (79,2) | 56 (91,8) | |
| Microgranular | 10 (20,8) | 5 (8,2) | |
| Região do ponto de quebra de PML | | | <0,0001 |
| Bcr 1 | 2 (10,5) | 10 (58,8) | |
| Bcr 2 | 0 (0,0) | 4 (23,5) | |
| Bcr 3 | 17 (89,5) | 3 (17,6) | |

Bcr, *breakpoint cluster region*; LPA, leucemia promielocítica aguda; Mut, mutado; n, número de casos; wt, *wild type* (selvagem). Análises estatísticas realizadas com os testes qui-quadrado e Mann-Whitney U.

A análise da frequência alélica das mutações *FLT3* ITD foi realizada em 29 de 38 casos de LPA que apresentaram material biológico. Os casos de LPA/*PML-RAR α* apresentaram mediana da razão entre a frequência do alelo variante de *FLT3* e o alelo selvagem de 0,35 (0,03-0,46). Os casos com maior frequência do alelo mutado (razão acima da mediana) foram associados a maior faixa etária e maior leucometria ao diagnóstico (Tabela 5.7).

Tabela 5.7. Frequência alélica das mutações *FLT3* ITD entre casos de leucemia promielocítica aguda

| | Razão da frequência do alelo <i>FLT3</i> ITD mutado | | <i>p</i> |
|---|---|-----------------|-----------|
| | $\leq 0,35$, n (%) | $> 0,35$, n(%) | |
| Idade (anos) | | | 0,008 |
| | ≤ 2 | - | |
| | >2-10 | 3 (21,4) | 10 (71,4) |
| | ≥ 11 | 11 (78,6) | 4 (28,6) |
| Sexo | | | 0,053 |
| | Feminino | 8 (57,1) | 3 (21,4) |
| | Masculino | 6 (42,9) | 11 (78,6) |
| Contagem de leucócitos ($\times 10^9/L$) | | | 0,013 |
| | ≤ 10 | 8 (57,1) | 1 (7,1) |
| | > 10 | 6 (42,9) | 13 (92,9) |

ITD, duplicação interna em *tandem*. Análises estatísticas realizadas com o teste qui-quadrado.

5.4. SOBREVIDA GLOBAL DOS CASOS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA PEDIÁTRICA DE NOVO EXCLUINDO OS CASOS DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA

As análises univariadas para a pSG em ambos os períodos de estudo e a contribuição potencial dos marcadores moleculares no desfecho clínico dos pacientes estão representadas na Tabela 5.8. Trinta e sete (3%) pacientes foram submetidos a TCTH e foram excluídos das análises.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas da pSG para a idade, sexo, cor da pele e contagem de leucócitos ao diagnóstico nos casos de LMA (Tabela 5.8). A mediana do tempo de pSG para a coorte de LMA de novo, excluindo os casos de LPA, foi de 16,3 meses (IC 95% 12,4-20,3 meses; pSG em 5 anos = $36,2 \pm 3,0\%$). Os casos tratados nas regiões Norte/Nordeste e Centro Oeste apresentaram pSG menor que aquela calculada para os casos das regiões Sul/Sudeste (Tabela 5.8).

Em relação às alterações moleculares, foram comparados os casos positivos *versus* negativos para a presença da alteração. A fusão gênica *CBF β -MYH11* conferiu aos casos com essa alteração maior pSG que os casos sem a alteração ($71,5 \pm 10,9\%$ e $30,9 \pm 3,5\%$, respectivamente, $p=0,010$). Para as mutações tipo I, os pacientes com mutações em *KRAS*, *NRAS* ou *KIT* apresentaram maior sobrevida que os casos selvagens, com pSG de $44,1 \pm 11,7\%$, $49,6 \pm 10,5\%$ e $53,0 \pm 18,7\%$, respectivamente. Por outro lado, casos apresentando mutações em *PTPN11* apresentaram pSG mais baixa que os casos sem mutações ($13,0 \pm 8,4\%$ e $33,7 \pm 4,2\%$, respectivamente), com mediana de sobrevida de 3,3 meses (IC 95% 1,6-5,1 meses). Os 12,7% dos casos que apresentaram mais de uma mutação tipo I demonstraram pSG inferior que a pSG calculada para os casos apresentando apenas uma mutação (Tabela 5.8).

Tabela 5.8. Análise univariada para a probabilidade de sobrevida global dos casos de LMA pediátrica *de novo*, Brasil, 2000-2017

| | N (N de eventos) | Análise univariada ^a | | |
|-----------------------------------|------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------|
| | | pSG em 5 anos, (EP) | Mediana ^b , (IC 95%) | <i>p</i> |
| Períodos de diagnóstico | | | | 0,146 |
| Primeiro período (2000-2008) | 221 (94) | 39,4 (4,2) | 19,2 (8,3-30,1) | |
| Segundo período (2009-2017) | 212 (109) | 32,9 (4,3) | 14,8 (10,0-19,5) | |
| Regiões geográficas de tratamento | | | | 0,009 |
| Norte/Nordeste | 206 (88) | 33,0 (4,9) | 16,3 (10,0-23,3) | |
| Sul/Sudeste | 121 (52) | 48,6 (5,2) | 47,4 ^d | |
| Centro Oeste | 106 (63) | 24,6 (5,1) | 7,3 (0,1-14,5) | |
| Idade (anos) | | | | 0,449 |
| ≤2 | 140 (76) | 33,1 (5,1) | 13,1 (7,1-19,1) | |
| >2-10 | 146 (64) | 35,5 (5,4) | 19,3 (13,3-25,4) | |
| ≥11 | 147 (63) | 39,0 (5,0) | 15,2 (8,9-21,6) | |
| Cor da pele | | | | 0,771 |
| Negros | 49 (21) | 29,5 (9,4) | 17,0 (7,9-26,1) | |
| Não negros | 348 (168) | 35,5 (3,3) | 15,8 (11,4-20,1) | |
| Sexo | | | | 0,631 |
| Feminino | 183 (90) | 38,6 (4,2) | 15,3 (10,1-20,5) | |
| Masculino | 250 (113) | 34,5 (4,1) | 19,1 (13,7-24,5) | |
| Leucometria (x10 ⁹ /L) | | | | 0,903 |
| ≤10 | 119 (55) | 36,6 (5,6) | 16,3 (8,1-24,6) | |
| >10 | 299 (143) | 35,1 (3,6) | 16,2 (11,9-20,6) | |
| Mutações tipo II ^c | | | | |
| <i>RUNX1-RUNX1T1</i> | 55 (26) | 32,8 (8,2) | 13,5 (6,8-20,2) | 0,813 |
| <i>CBFβ-MYH11</i> | 19 (5) | 71,5 (10,9) | ^{d, e} | 0,010 |
| <i>KMT2A-r</i> | 74 (39) | 36,7 (6,7) | 11,5 (3,6-19,4) | 0,646 |
| Mutações tipo I ^c | | | | |
| <i>FLT3</i> | 54 (33) | 18,0 (7,4) | 11,8 (8,4-15,2) | 0,056 |
| <i>K/N-RAS</i> | 54 (23) | 45,0 (8,3) | 17,5 ^d | 0,333 |
| <i>PTPN11</i> | 26 (16) | 13,0 (8,4) | 3,3 (1,6-5,1) | 0,005 |
| Mutações tipo II concomitantes | | | | 0,052 |
| Mutação única | 114 (55) | 37,2 (5,8) | 17,6 (10,1-25,2) | |
| Mais de uma mutação | 18 (11) | 16,0 (10,3) | 6,4 (0,0-19,7) | |

^a Excluindo os casos de leucemia promielocítica aguda. ^b Mediana de sobrevida em meses. ^c Análises realizadas na mesma variável, considerando as categorias com/sem alteração. ^d Intervalos de confiança não definidos. ^e Mediana não alcançada. EP, erro padrão; IC, intervalo de confiança; N, número; pSG, probabilidade de sobrevida global. Análises estatísticas realizadas com o teste de log rank.

A estratificação das análises nos dois períodos de diagnóstico demonstrou diferenças na pSG, conforme representado na Figura 5.7. No primeiro período (2000-2008), os valores mais baixos de pSG foram observados para os pacientes

com idade ao diagnóstico ≤ 2 anos (pSG $27,7 \pm 5,7\%$), quando comparados aos pacientes das demais idades. No segundo período (2009-2017), os casos encaminhados e tratados nas regiões Sul/Sudeste apresentaram melhor sobrevida (pSG $55,7 \pm 7,9\%$) que os casos das demais regiões (Figura 5.7).

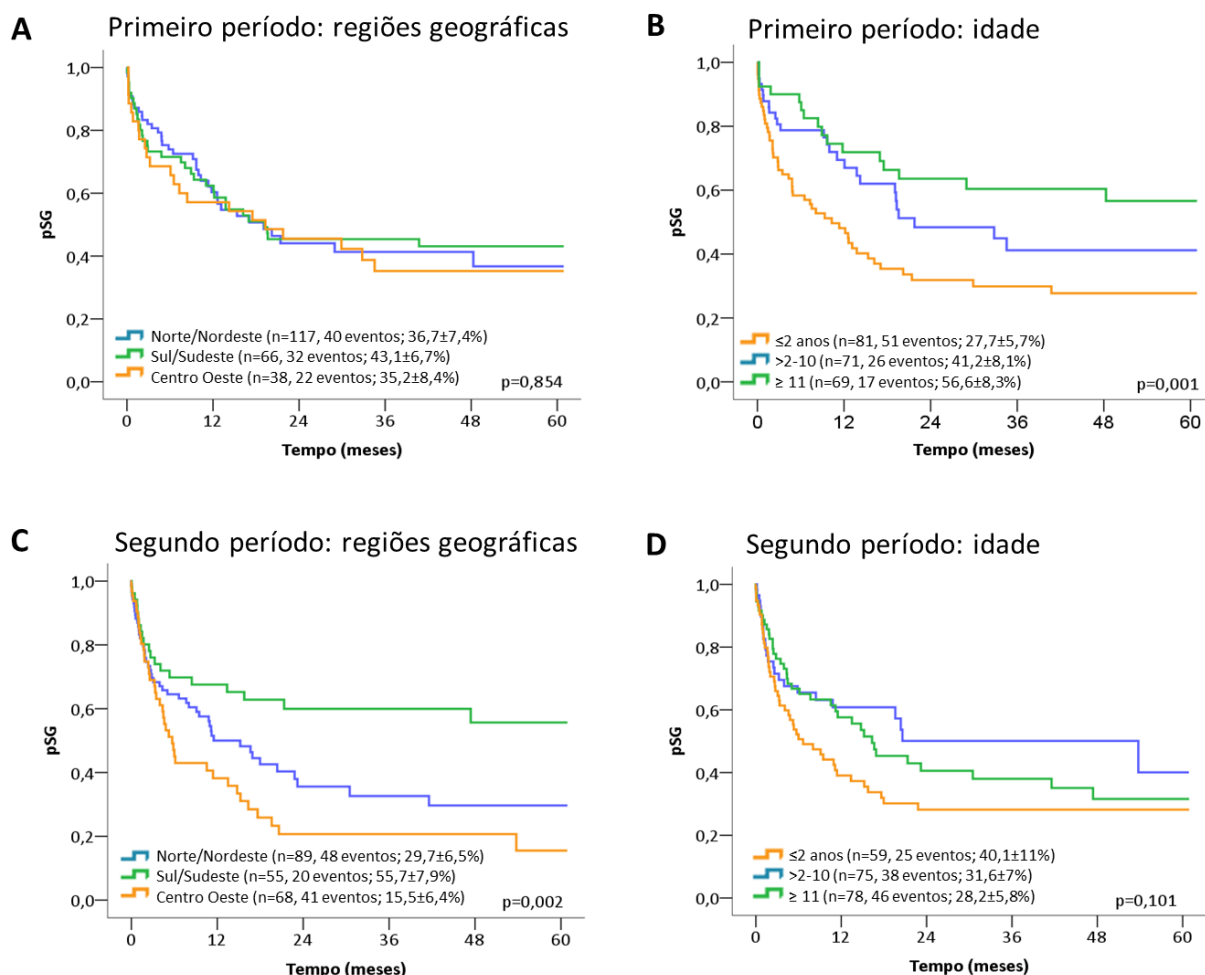


Figura 5.7. Sobrevida global dos casos de LMA pediátrica *de novo*. Probabilidade de sobrevida global (pSG) dos casos diagnosticados no primeiro ou segundo período de análise de acordo com as regiões geográficas de origem/tratamento (A,C) e idade (B e D). O primeiro período corresponde aos casos diagnosticados entre os anos de 2000-2008 e o segundo período, entre os anos de 2009-2017.

A análise univariada realizada através do modelo de regressão Cox identificou os casos das regiões Sul/Sudeste apresentando melhor sobrevida que os casos das demais regiões, com RR de 0,7 (IC 95% 0,5-0,9; p=0,014), e os casos da região Centro Oeste com a pior sobrevida (RR 1,5; IC 95% 1,1-2,0; p=0,009), conforme descrito na Tabela 5.9. A RR calculada para os casos apresentando as LMAs-CBF

demonstraram menor risco de óbito, refletindo um prognóstico favorável (RR 0,7; IC 95% 0,5-1,0; $p=0,060$) e os casos com mutações em *PTPN11* como prognóstico adverso (RR 2,1; IC 95% 1,2-3,6; $p=0,009$, Tabela 5.9). Análises múltiplas demonstraram que a localidade de tratamento se mantém como uma variável de risco prognóstico favorável, com as regiões Sul/Sudeste conferindo o RR de 0,5 (IC 95% 0,3-0,8; $p=0,006$). Mutações em *PTPN11* foram identificadas como variável independente de prognóstico adverso, conferindo RR de 1,9 (IC 95% 1,1-3,3; $p=0,015$) aos casos com essa alteração.

Tabela 5.9. Sobrevida global dos casos de LMA pediátrica *de novo* no modelo de regressão Cox, Brasil, 2000-2017

| | | Modelo de regressão Cox | |
|--|-----------------------------|-------------------------|----------|
| | | RR (IC 95%) | <i>p</i> |
| Período de análise | | | |
| | Segundo período (2008-2015) | 1,3 (0,9-1,6) | 0,147 |
| Regiões geográficas de tratamento ^a | | | |
| | Norte/Nordeste | 1,0 (0,8-1,3) | 0,913 |
| | Sul/Sudeste | 0,7 (0,5-0,9) | 0,014 |
| | Centro Oeste | 1,5 (1,1-2,0) | 0,009 |
| Idade (anos) | | | |
| | ≤2 | 1,2 (0,9-1,6) | 0,237 |
| | >2-10 | 0,9 (0,6-1,2) | 0,321 |
| | >11 | 1,0 (0,7-1,3) | 0,855 |
| Cor da pele | | | |
| | Negros | 0,9 (0,6-1,5) | 0,772 |
| Sexo | | | |
| | Masculino | 1,0 (0,9-1,2) | 0,631 |
| Leucometria (x10 ⁹ /L) | | | |
| | >10 | 1,0 (0,7-1,3) | 0,904 |
| Mutações tipo II ^a | | | |
| | CBF | 0,7 (0,6-0,0) | 0,060 |
| | <i>KMT2A-r</i> | 1,1 (0,8-1,6) | 0,647 |
| Mutações tipo I ^a | | | |
| | <i>FLT3</i> | 1,4 (1,0-2,0) | 0,058 |
| | <i>KRAS/NRAS/KIT</i> | 0,8 (0,5-1,3) | 0,376 |
| | <i>PTPN11</i> | 2,1 (1,2-3,6) | 0,006 |
| Mutações tipo I concomitantes | | | |
| | Mais de uma mutação | 1,9 (1,0-3,6) | 0,056 |

^a Análises realizadas entre os grupos positivos e negativos para a alteração molecular. IC, intervalo de confiança; CBF, alteração no fator de ligação ao núcleo (incluem os casos com *RUNX1-RUNX1T1* e *CBFβ-MYH11*); RR, razão de risco.

5.5. SOBREVIDA GLOBAL DOS CASOS DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA

As análises de sobrevida para os casos de LPA foram realizadas para os casos diagnosticados após o ano de 2002. O óbito nos primeiros 10 dias após o diagnóstico ocorreu em 29,8% (34/114) dos casos e esses pacientes foram excluídos das análises. A pSG dos casos de LPA foi de $68,2 \pm 6,2\%$, com média de sobrevida de 45,1 meses (IC 95% 39,3-50,9 meses; mediana não alcançada), comparada a pSG dos casos de LMA *de novo* de $38,1 \pm 3,1\%$ ($p=0,001$), conforme representado na Figura 5.8. Os casos diagnosticados entre os anos de 2002-2008 apresentaram sobrevida melhor que aqueles diagnosticados nos últimos 9 anos do estudo (2009-2017), com pSG de $83,7 \pm 7,8\%$ e $60,4 \pm 8,8\%$, respectivamente ($p=0,040$; Figura 5.8; Tabela 5.10).

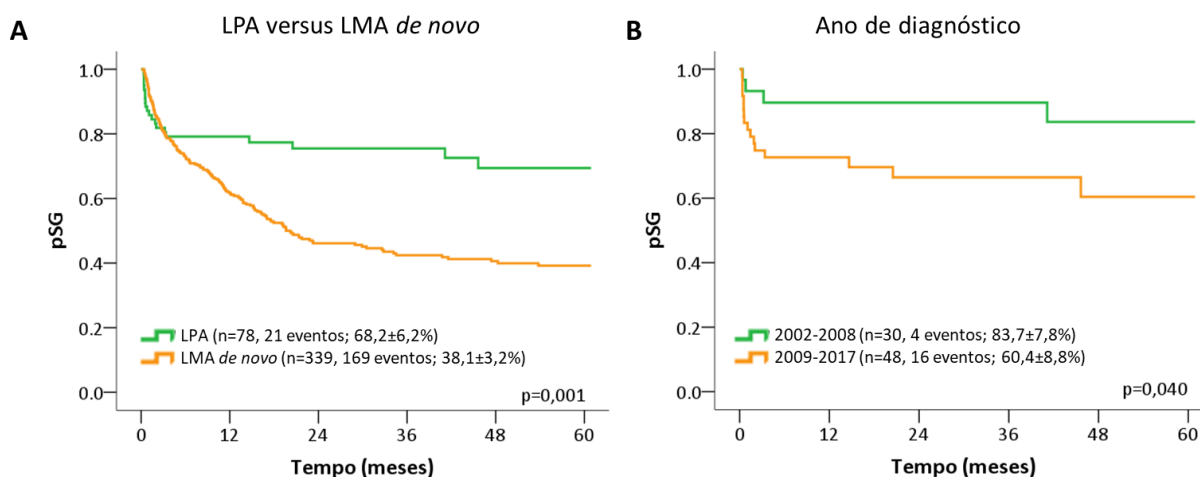


Figura 5.8. Sobrevida global dos casos de LPA diagnosticados após o ano de 2002. Probabilidade de sobrevida global (pSG) dos casos de LPA em relação aos casos LMA *de novo* (A) e de acordo com o período de diagnóstico (B).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas da pSG para os casos de LPA de acordo com as demais variáveis analisadas (Tabela 5.10).

Tabela 5.10. Análise univariada para a probabilidade de sobrevida global dos casos de LPA, Brasil, 2002-2017

| Análise univariada ^{a, b} | | | | |
|------------------------------------|------------------|---------------------|-------------------------------|----------|
| | N (N de eventos) | pSG em 5 anos, (EP) | Média ^c , (IC 95%) | <i>p</i> |
| Períodos de diagnóstico | | | | 0,040 |
| Primeiro período (2002-2008) | 30 (4) | 83,7 (7,8) | 53,6 (46,7-60,4) | |
| Segundo período (2009-2017) | 48 (16) | 60,4 (8,8) | 39,8 (31,8-47,8) | |
| Subtipo de leucemia | | | | 0,001 |
| Leucemia promielocítica aguda | 78 (21) | 68,2 (6,2) | 45,1 (39,3-50,9) | |
| Leucemia mieloide aguda (não LPA) | 339 (169) | 38,1 (3,1) | 30,5 (27,4-33,5) | |
| Regiões geográficas de tratamento | | | | 0,734 |
| Norte/Nordeste | 29 (6) | 74,2 (10,1) | 49,1 (40,6-57,6) | |
| Sul/Sudeste | 26 (8) | 64,1 (11,0) | 43,2 (33,2-53,5) | |
| Centro Oeste | 23 (6) | 70,6 (10,5) | 44,7 (33,7-55,8) | |
| Idade (anos) | | | | 0,341 |
| ≤2 | 1 (0) | - | ^e | |
| >2-10 | 42 (8) | 71,8 (9,7) | ^e | |
| ≥11 | 35 (12) | 64,8 (8,3) | ^e | |
| Cor da pele | | | | 0,185 |
| Negros | 5 (0) | - | ^e | |
| Não negros | 67 (20) | 64,1 (7,2) | ^e | |
| Sexo | | | | 0,999 |
| Feminino | 38 (10) | 67,2 (9,2) | 46,1 (38,1-54,1) | |
| Masculino | 40 (10) | 72,3 (7,7) | 45,5 (37,3-53,7) | |
| Leucometria (x10 ⁹ /L) | | | | 0,748 |
| ≤10 | 45 (11) | 71,2 (7,9) | 46,4 (38,9-53,9) | |
| >10 | 32 (9) | 66,4 (10,1) | 44,6 (35,5-53,5) | |
| Mutações tipo I ^d | | | | |
| <i>FLT3</i> | 17 (6) | 54,4 (15,6) | 40,6 (27,7-54,9) | 0,412 |
| <i>KRAS/NRAS</i> | 8 (0) | - | ^e | 0,135 |

^a Análises realizadas para os casos diagnosticados após o ano de 2002 e excluindo os casos de óbito nos primeiros 10 dias após o diagnóstico. ^c Média de sobrevida em meses. ^d Análises realizadas na mesma variável, considerando as categorias com/sem alteração. ^e Média não calculada porque todos os casos foram censurados. EP, erro padrão; IC, intervalo de confiança; LPA, leucemia promielocítica aguda; N, número; pSG, probabilidade de sobrevida global. Análises estatísticas realizadas com o teste log rank.

5.6. ALTERAÇÕES MOLECULARES RARAS NAS LMAs PEDIÁTRICAS

As alterações genéticas recorrentes *RUNX1-RUNX1T1*, *KMT2A-r*, *CBFβ-MYH11* e *PML-RARα* foram identificadas em 18,1%, 21,6%, 6,6% e 19,9%, respectivamente. Nas amostras dos casos negativos para essas alterações, foram pesquisadas as fusões gênicas consideradas raras em LMA pediátrica, representadas por *NUP98-r*, *DEK-NUP214*, *RBM15-MKL1* e *CBFA2T3-GLIS2*. A Figura 5.9 representa os fragmentos de 627pb, 242pb e 135pb, para as alterações *CBFA2T3-GLIS2*, *RBM15-MKL1* e *NUP98-NSD1*, respectivamente.

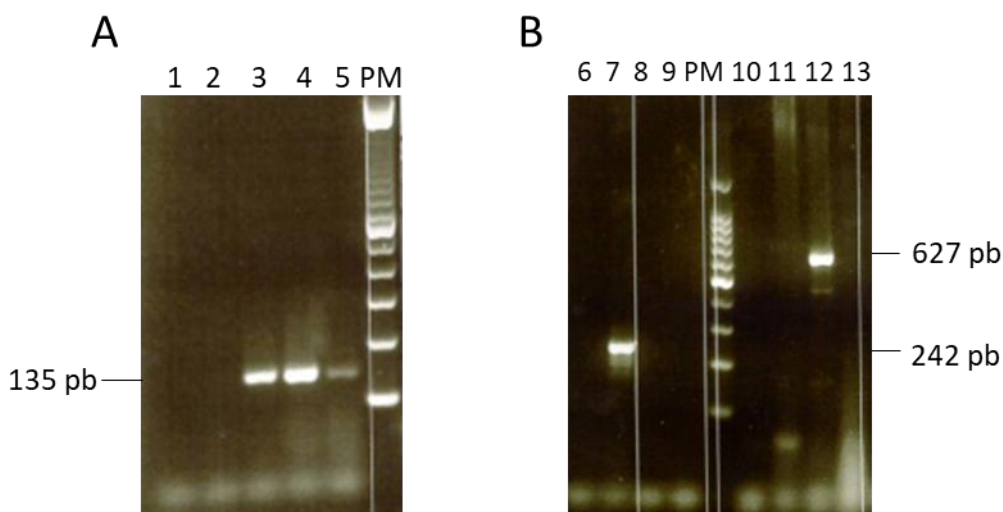


Figura 5.9. Gel de agarose a 1,5% com os transcritos de fusão *NUP98-NSD1* (A), *RBM15-MKL1* e *CBFA2T3-GLIS2* (B). 1,2,6,8-11,13: Amostras negativas; 3-5: amostras apresentando o transcrito *NUP98-NSD1*; 7: amostra apresentando o transcrito *RBM15-MKL1*; 12: amostra apresentando o transcrito *CBFA2T3-GLIS2*. Pb, pares de bases; PM, padrão de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen, CA, USA).

Os fragmentos amplificados nas reações de PCR foram isolados do gel de agarose sequenciados. A Figura 5.10. representa a fusão *NUP98-NSD1* amplificada pela reação de RT-PCR referente aos casos #288/13 (A), #332/15 (B) e #191/14 (C).

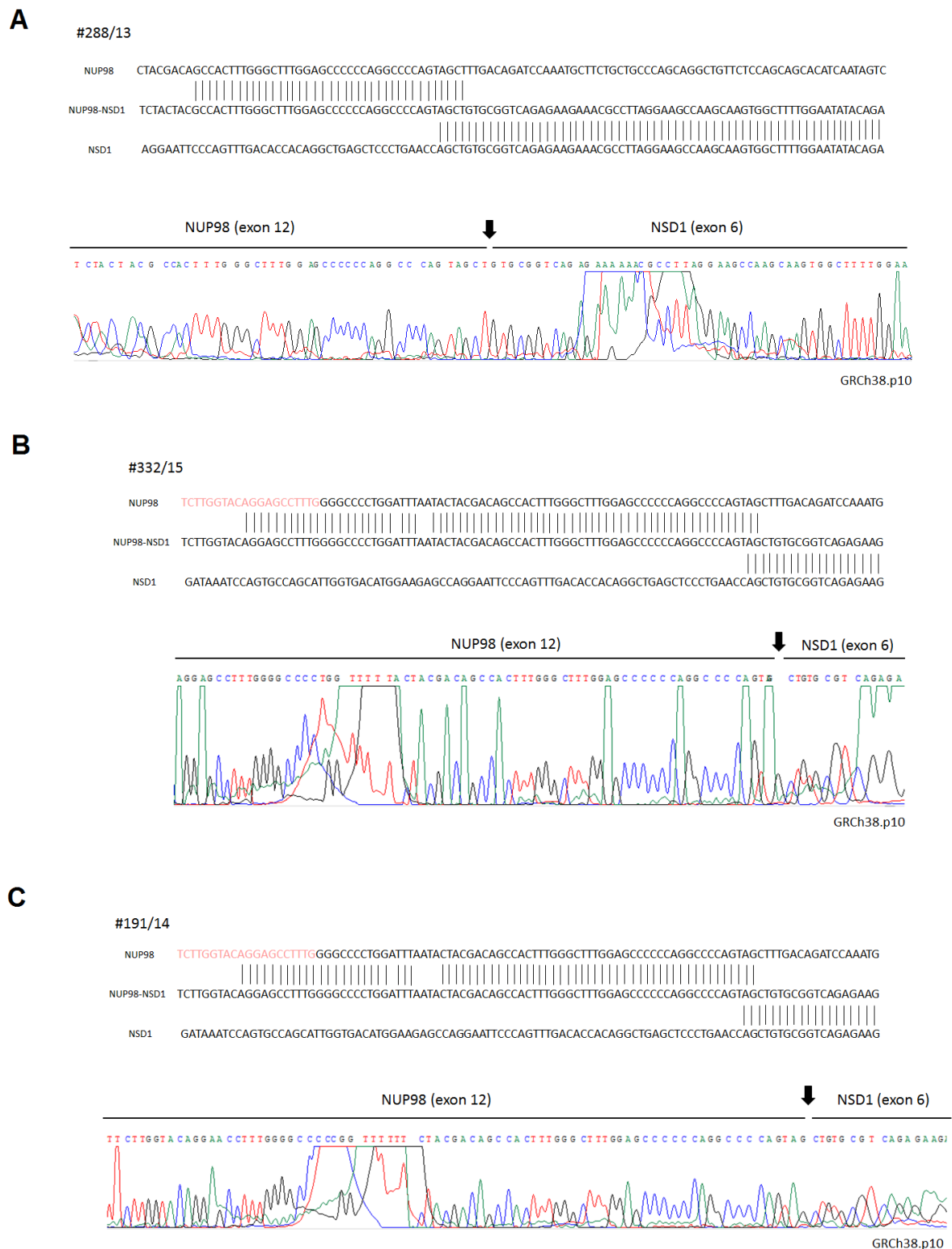


Figura 5.10. Sequências de fusão entre os genes *NUP98* e *NSD1* dos transcritos identificados na reação de RT-PCR em três pacientes distintos (A, B e C). As barras que ligam os nucleotídeos nas sequências superiores correspondem às bases complementares entre a sequência referência e aquelas identificadas pela técnica de sequenciamento de Sanger. Os eletroferogramas foram gerados como resultado do sequenciamento. A marcação em rosa (B e C) corresponde à região complementar ao iniciador senso utilizado para a amplificação e sequenciamento da região.

O resultado do sequenciamento dos transcritos amplificados nas reações de *RBM15-MKL1* e *CBFA2T3-GLIS2* está representado na Figura 5.11.

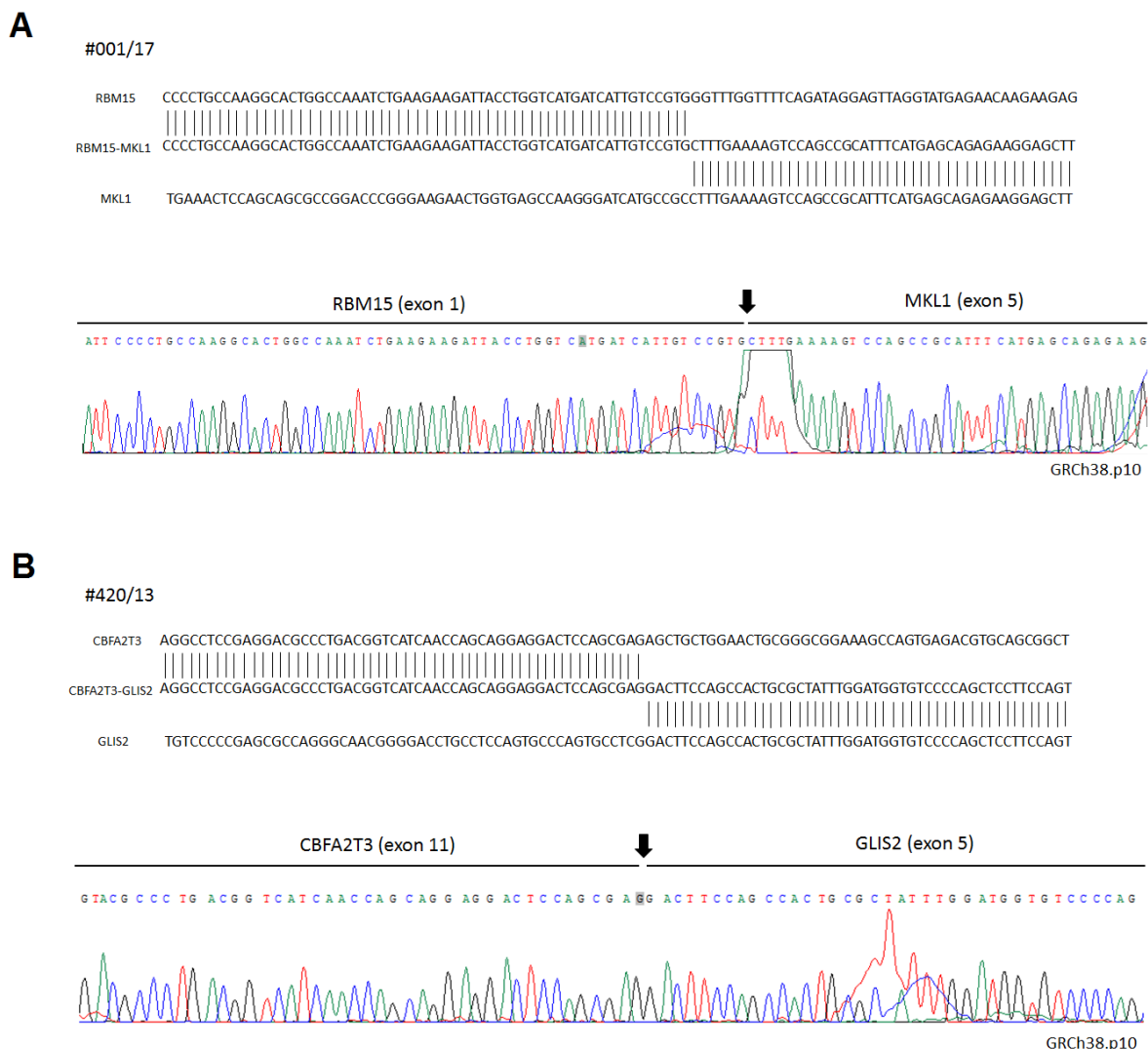


Figura 5.11. Sequências dos transcritos *RBM15-MKL1* e *CBFA2T3-GLIS2* identificados na reação de RT-PCR. As barras que ligam os nucleotídeos nas sequências superiores correspondem às bases similares entre a sequência referência e aquelas identificadas pela técnica de sequenciamento de Sanger. A, Sequências de fusão entre os genes *RMB15* e *MKL1* do caso #001/17. B, Sequências de fusão entre os genes *CBFA2T3* e *GLIS2* do caso #420/13.

Após a padronização da técnica de FISH, a alteração *DEK-NUP214* foi investigada em 64 casos selecionados, como primeiro grupo de análise, pela presença de mutações no gene *FLT3* (frequentemente associada com *DEK-NUP214*), sendo que nenhum deles apresentou a alteração.

Quebras no gene *NUP98* foram pesquisadas em 70 casos de LMA *de novo*, selecionados randomicamente, e identificadas em 12 casos, representando 2,8%

das coorte total analisada molecularmente. Foram buscadas as fusões de *NUP98* com os parceiros *NSD1* e *HOXD13*. Foram identificados 4/48 (8,3%) e 3/17 (17,7%) casos apresentando as fusões *NUP98-NSD1* e *NUP98-HOD13*, respectivamente.

A fusão gênica *CBFA2T3-GLIS2* foi investigada entre os casos de LMA de novo, não LPA, diagnosticados após o ano de 2010 devido à maior disponibilidade de material biológico viável para a realização da técnica. Foram analisados 36/142 casos e desses, 1 caso (2,7%) apresentou a alteração. Este, um paciente do sexo masculino, diagnosticado com LMA megacarioblástica aos 15 meses de vida, com contagem de leucócitos ao diagnóstico de $28,9 \times 10^9$ células/L, evoluiu para óbito 5 dias após o diagnóstico.

A alteração *RBM15-MKL1*, exclusiva dos casos de LMA com idade ≤ 2 anos ao diagnóstico, será descrita no tópico a seguir.

5.7. CARACTERIZAÇÃO DA COORTE DE LMA INFANTIL (≤ 2 ANOS DE IDADE)

A menor idade dos casos ao diagnóstico foi de 1 dia, observada em 3 pacientes, além de outros 2 casos com 4 e 14 dias de vida, ambos considerados como leucemia congênita. Entre esses, a mediana de leucometria foi de 126×10^9 células/L e em 4/5 casos foi possível investigar a presença de alterações moleculares. Os *KMT2A-r* foram identificados em 2 casos (*KMT2A-MLLT1* e *KMT2A-MLLT3*) e, nos demais, foram observadas as alterações citogenéticas del7q e t(2;19)(q31;q13.2), respectivamente, segundo informações disponibilizadas pelo médico do paciente.

Diferentes prevalências dos subtipos de LMA foram observados de acordo com a idade e com *KMT2A-r*, que nos pacientes com idade ≤ 2 anos, correspondeu a 30,7% (55/179). As principais diferenças dos subtipos morfológicos/imunofenotípicos entre as LMAs nos pacientes com idade ≤ 2 anos e > 2 anos foram representadas pela alta frequência da LMA com diferenciação monocítica/monoblástica e megacarioblástica na LMA infantil (≤ 2 anos de idade; 24,6% e 23,5%, respectivamente) e maior frequência dos subtipos com maturação e de LPA nos casos de LMA pediátrica (> 2 anos de idade; ambos com 15,3%), conforme descrito na Tabela 5.11.

Tabela 5.11. Características demográficas e subtipos de classificação das LMAs de acordo com a idade, Brasil, 2000-2017

| | Casos com idade ≤2 anos | Casos com idade >2 anos | |
|--|-------------------------|-------------------------|--------|
| | LMA infantil, n (%) | LMA pediátrica, n (%) | p |
| Regiões geográficas brasileiras | | | <0,001 |
| Norte | 1 (0,6) | 5 (0,8) | |
| Nordeste | 65 (36,3) | 311 (51,1) | |
| Sul | 22 (12,3) | 15 (2,5) | |
| Sudeste | 49 (27,4) | 149 (24,5) | |
| Centro Oeste | 42 (23,5) | 129 (21,2) | |
| Sexo | | | 0,505 |
| Feminino | 85 (47,5) | 272 (44,7) | |
| Masculino | 94 (52,5) | 337 (55,3) | |
| Leucometria (x10 ⁹ /L) | | | 0,051 |
| ≤10 | 43 (24,9) | 194 (32,7) | |
| >10 | 130 (75,1) | 400 (67,3) | |
| Classificação morfológica/imunofenotípica ^a | | | <0,001 |
| LMA minimamente diferenciada | 7 (3,9) | 27 (4,4) | |
| LMA sem maturação | 7 (3,9) | 45 (7,4) | |
| LMA com maturação | 9 (5,0) | 93 (15,3) | |
| LPA | 6 (3,4) | 93 (15,3) | |
| Leucemia mielomonocítica aguda | 50 (27,9) | 138 (22,7) | |
| Leucemia aguda monocítica/monoblástica | 44 (24,6) | 59 (9,7) | |
| Leucemia aguda eritroide | 4 (2,2) | 11 (1,8) | |
| Leucemia megacarioblástica aguda | 42 (23,5) | 25 (4,1) | |
| Leucemia aguda de fenótipo misto mieloide/T | 1 (0,6) | 8 (1,3) | |
| LMA sem especificação de linhagem | 9 (5,0) | 52 (8,5) | |
| Total | 179 (22,7) | 609 (77,3) | |

LMA, leucemia mieloide aguda; LPA, leucemia promielocítica aguda; n, número de casos. Análises estatísticas realizadas com o teste qui-quadrado.

A fusão *RUNX1-RUNX1T1* foi identificada em 5,7% (9/158) dos casos. O baixo número de casos com essa alteração impede uma análise com poder estatístico, mas observou-se que, entre eles, a maior parte deles era do sexo masculino (77,8%; 7/9). Entre os demais subtipos, não foram observadas diferenças nas frequências entre os casos com ou sem alteração genética.

A fusão gênica *RBM15-MKL1* foi investigada entre os casos de LMA infantil com diferenciação megacarioblástica. Trinta e dois casos foram elegíveis para essa pesquisa, por não apresentarem outras alterações tipo II recorrentes. Destes, 11

casos (34,4%) não apresentavam material biológico para as análises moleculares. Entre os demais, *RBM15-MKL1* foi identificada em 10,5% (2/19) dos casos, correspondendo a 1,1% do total da coorte de LMA infantil (Figura 5.12).

A frequência das alterações genéticas identificadas nas LMAs infantis está representada na Figura 5.12, incluindo 3 casos apresentando a fusão gênica *MYST3-CREBBP*. Essa alteração foi investigada em estudos prévios (ANDRADE *et al.*, 2016a) em lactentes com LMA apresentando eritrofagocitose na análise morfológica de esfregaço da MO. Quarenta e nove por cento dos casos não apresentou nenhuma alteração genética recorrente.

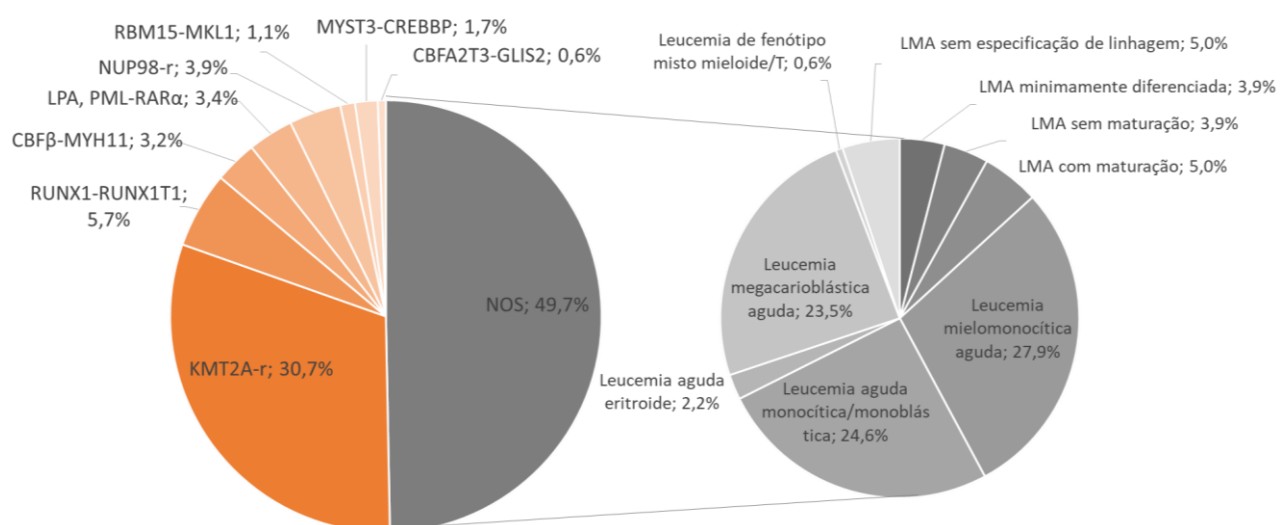


Figura 5.12. Distribuição dos casos de LMA com idade ≤ 2 anos de acordo com os subtipos genéticos e com a classificação morfológica. NOS, sigla em inglês para *not otherwise specified* (não especificado de acordo com as alterações moleculares).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis selecionadas nos casos de LMA infantil. Devido ao pequeno número de casos, as demais alterações moleculares não foram incluídas nas análises de sobrevida global (Tabela 5.12).

Tabela 5.12. Análise univariada da probabilidade de sobrevida global dos casos de LMA com idade ≤ 2 anos, Brasil, 2000-2017

| | Análise univariada ^a | | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|----------|
| | N (N de eventos) | pSG em 5 anos, (EP) | Mediana ^b , (IC 95%) | <i>p</i> |
| Períodos de diagnóstico | | | | 0,074 |
| Primeiro período (2000-2008) | 81 (51) | 27,7 (5,7) | 10,3 (6,3-16,4) | |
| Segundo período (2009-2017) | 59 (25) | 40,1 (11,0) | 53,8 (11,0-95,6) | |
| Regiões geográficas de tratamento | | | | 0,710 |
| Norte/Nordeste | 53 (30) | 29,9 (7,9) | 13,1 (7,9-18,4) | |
| Sul/Sudeste | 52 (27) | 42,4 (7,7) | 13,8 (0,0-47,8) | |
| Centro Oeste | 35 (19) | 25,5 (9,9) | 7,3 (0,0-26,7) | |
| Idade (anos) | | | | 0,236 |
| ≤ 2 | 140 (76) | 33,1 (5,1) | 13,1 (7,1-19,2) | |
| > 2 | 293 (127) | 37,6 (3,7) | 17,5 (12,5-22,5) | |
| Cor da pele | | | | 0,759 |
| Negros | 9 (5) | 33,9 (18,2) | 29,9 (4,1-55,7) | |
| Não negros | 128 (69) | 36,9 (6,8) | 12,6 (4,9-20,4) | |
| Sexo | | | | 0,283 |
| Feminino | 67 (37) | 27,4 (8,3) | 8,1 (0,0-17,6) | |
| Masculino | 73 (39) | 34,7 (9,0) | 19,6 (11,1-28,1) | |
| Leucometria ($\times 10^9/L$) | | | | 0,280 |
| ≤ 10 | 30 (18) | 26,6 (9,5) | 7,5 (0,0-15,5) | |
| > 10 | 105 (56) | 34,2 (6,0) | 15,3 (7,1-23,6) | |
| Alteração molecular | | | | 0,891 |
| <i>KMT2A</i> selvagem | 83 (46) | 31,3 (6,9) | 13,1 (6,9-19,4) | |
| <i>KMT2A-r</i> | 48 (26) | 34,9 (8,3) | 7,1 (0,0-24,2) | |

^a Excluindo os casos de leucemia promielocítica aguda. ^b Mediana de sobrevida em meses. EP, erro padrão; IC, intervalo de confiança; *KMT2A-r*, *KMT2A* rearranjado; N, número; pSG, probabilidade de sobrevida global. Análises estatísticas realizadas com o teste log rank.

A pSG em 5 anos para os casos com idade ≤ 2 anos foi similar aos valores encontrados para os casos > 2 anos, conforme representado na Tabela 5.10 e Figura 5.13. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis analisadas.

LMA infantil versus LMA pediátrica

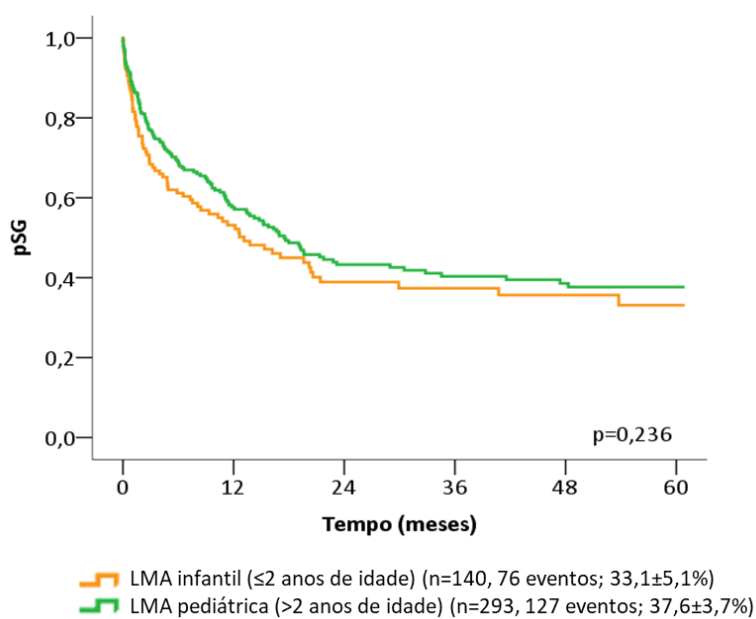


Figura 5.13. Análise de sobrevivência dos casos de LMA com idade ≤ 2 anos. Comparação entre a probabilidade de sobrevivência global dos casos de LMA de lactentes (≤ 2 anos de idade) e demais casos de LMA pediátrica (> 2 anos de idade)*. N, número de casos; pSG, probabilidade de sobrevivência global. *Excluindo os casos de leucemia promielocítica aguda.

5.8. A GENÔMICA DA LPA PEDIÁTRICA

A média de cobertura para o paciente, para a amostra de remissão e para seu irmão sem doença foi de 80,3X, 51,2X e 42,6X, respectivamente. Oitenta e cinco por cento das bases foram cobertas com o mínimo de dez leituras para ambos os exomas. O sequenciamento do exoma identificou 26.854 variantes germinativas nas três amostras analisadas: MO do paciente com LPA, SP após sua remissão e SP do seu irmão gêmeo sem doença. Do total, 2.052 (7,6%) corresponderam a variantes novas, ou seja, que não estão descritas nos bancos de dados avaliados. As variantes foram filtradas de modo a incluir: variantes heterozigotas e homozigotas em todas as amostras, variantes que passaram nos filtros de qualidade do GATK, variantes com impacto alto pelo VEP, variantes raras na população (frequência do alelo variante $<0,01\%$), e variantes com número de reads >6 e 32 (para SNVs e INDELS, respectivamente). Após seleção consecutiva nos filtros, 128 variantes com predição de efeito de alto impacto foram identificadas (Figura 5.14). As variantes com alto impacto que apresentaram divergência entre as amostras de remissão e do irmão representaram $<2\%$ do total de variantes identificadas.

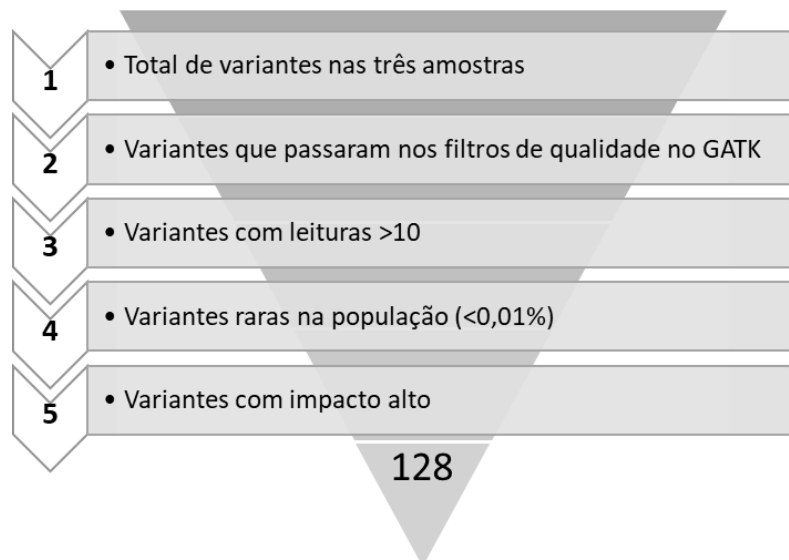


Figura 5.14. Variantes geradas após seleção progressiva nos filtros de análise. Cinco filtros consecutivos selecionaram as variantes germinativas, resultando em 128 variantes que apresentam alto impacto.

As consequências da anotação das variantes somáticas usando a ferramenta VEP para as amostras do paciente com LPA e de seu irmão sem doença estão representadas na Tabela 5.13, com a descrição do total das variantes preditas como patogênicas pelos *softwares* SIFT e Polyphen2. O percentual médio de variantes missenses e sinônimas entre as três amostras foi de 42,5% e 50,0%, respectivamente. As demais classes de variantes representaram, em média, 6,8% do total de variantes.

Tabela 5.13. Número de variantes identificadas no sequenciamento do exoma do paciente com LPA e seu irmão sem doença

| | Amostra tumoral | Amostra de remissão | Irmão sem doença |
|------------------------------|-----------------|---------------------|------------------|
| Total de leituras mapeadas | 2.433.131.938 | 1.956.835.981 | 1.659.173.962 |
| Média de cobertura | 73,9 | 59,4 | 50,4 |
| Cobertura do exoma (%) | | | |
| ≥10x | 66,6 | 94,9 | 94,0 |
| ≥20x | 52,4 | 84,2 | 81,4 |
| ≥30x | 45,3 | 71,8 | 66,8 |
| Número total de variantes | 23.835 | 26.388 | 26.346 |
| Razão Ti/Tv | 3,04 | 3,02 | 3,03 |
| Razão NS/S | 1,09 | 1,11 | 1,11 |
| Número total de SNVs | 22.008 | 24.460 | 26.346 |
| Classe das variantes | | | |
| UTRs | 122 | 133 | 131 |
| Intergênicas | 21 | 26 | 26 |
| Intrônicas | 322 | 370 | 366 |
| Missense | 9.501 | 10.723 | 10.673 |
| Não codificantes | 359 | 381 | 369 |
| Regiões regulatórias | 1 | 2 | 2 |
| Aceptoras de <i>splicing</i> | 5 | 7 | 7 |
| Doadoras de <i>splicing</i> | 16 | 18 | 18 |
| Regiões de <i>splicing</i> | 374 | 435 | 429 |
| Perda do iniciador | 10 | 12 | 11 |
| Ganho de parada | 62 | 71 | 72 |
| Perda de parada | 15 | 16 | 16 |
| Retenção de parada | 8 | 9 | 9 |
| Sinônimas | 11.367 | 12.487 | 12.482 |
| Downstream ao gene | 89 | 91 | 92 |
| Upstream ao gene | 105 | 108 | 102 |
| Outras | 22 | 29 | 29 |
| Predição de dano | | | |
| SIFT | 1.395 | 1.620 | 1.612 |
| PolyPhen2 | 646 | 733 | 724 |

LPA, leucemia promielocítica aguda; INDEL, inserções e deleções; NS, não sinônimas; S, sinônimas; SNV, variações de nucleotídeo único; Ti, transição; Tv, transversão; UTR, região não traduzida.

Para avaliar a probabilidade de variantes falso-positivas, foi calculada a razão de transições/transversões (Ti/Tv) e de variantes não-sinônimas/sinônimas (NS/S), que demonstrou que a chamada de variantes produziu um conjunto de dados de boa qualidade (Tabela 5.13).

A comparação entre os exomas das amostras do diagnóstico e da remissão do paciente com LPA revelou 5888 variantes, sendo 75,1% representadas por SNVs e, as demais, INDELS. As alterações missense representaram a maior parte das variantes em regiões codificantes; as predições dos softwares SIFT e PolyPhen demonstraram que a maior parte das variantes era tolerada/benigna (Figura 5.15).

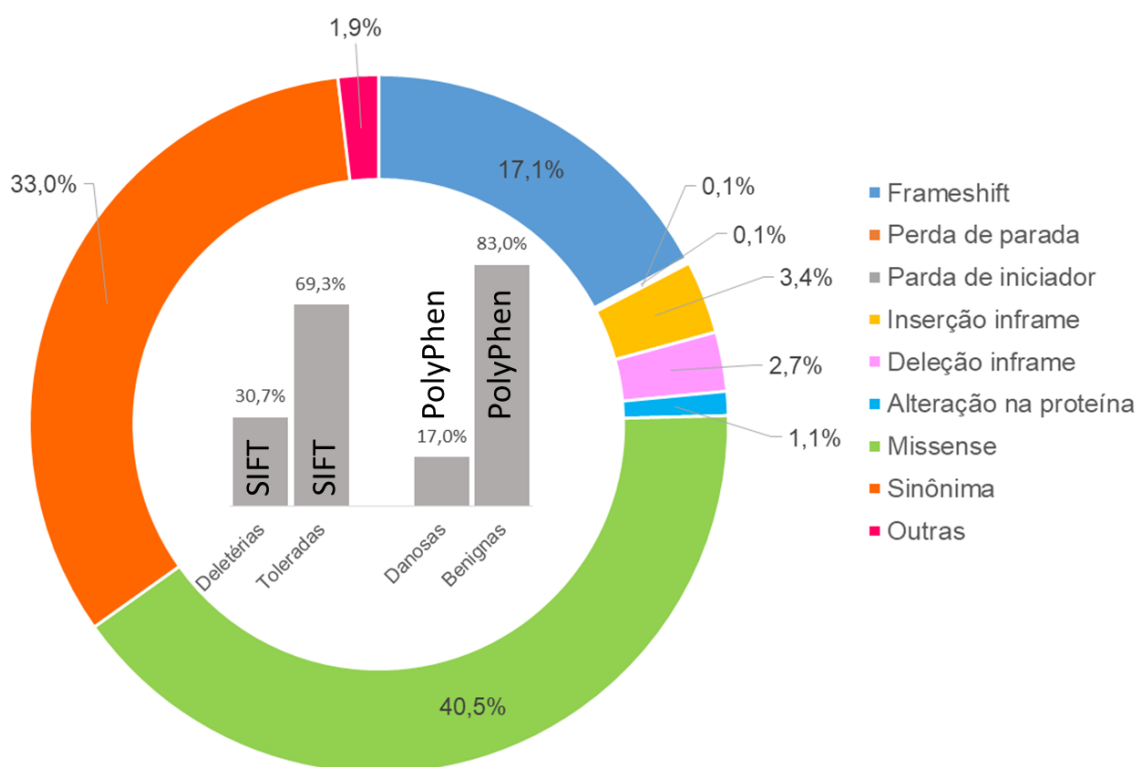
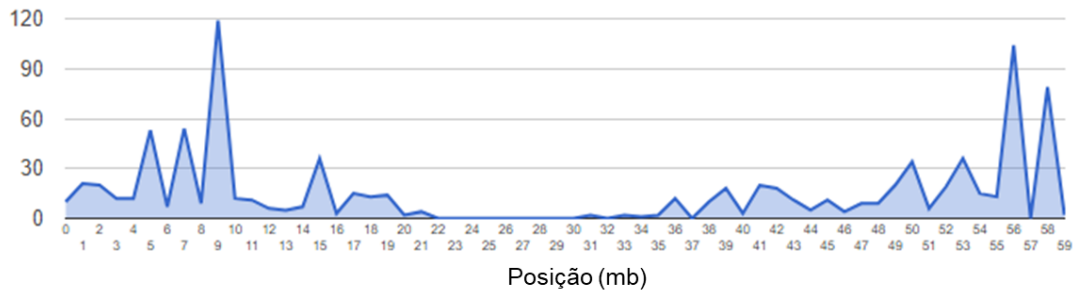


Figura 5.15. Percentual das variantes diferenciais entre a amostra tumoral e a amostra de remissão de acordo com as consequências na região codificante dos genes. A anotação das variantes foi realizada com o VEP.

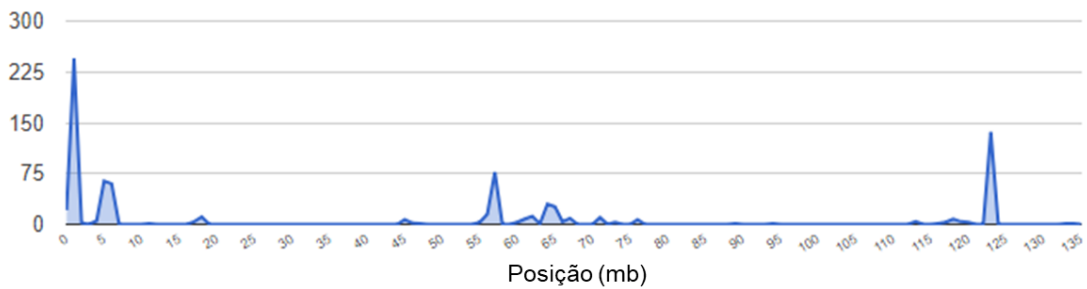
Na análise pareada entre a amostra tumoral e a amostra do irmão sem doença, foram identificadas 5911 variantes em 1551 genes. Dessas, 75,5% correspondiam a SNVs e 24,5% a INDELS. A maior parte das variantes estava

localizada nos cromossomos 19, 11 e 6 (15,4%, 13,4% e 9,6%, respectivamente) e o menor número de variantes ocorreu nos cromossomos 18, 13 e 4 (0,2%, 0,7% e 1,2%, respectivamente). Apesar de estar em maior número nos cromossomos 9, 11 e 6, as variantes não estavam distribuídas de maneira homogênea ao longo dos cromossomos, conforme representado na Figura 5.16.

Cromossomo 19



Cromossomo 11



Cromossomo 6

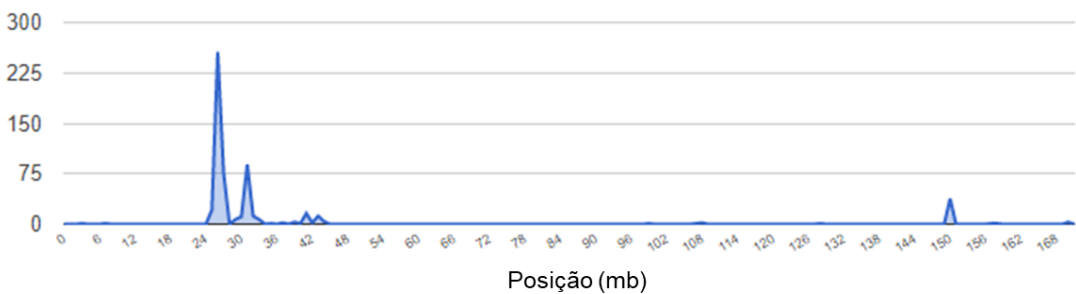


Figura 5.16. Distribuição das variantes nos cromossomos 19, 11 e 6 identificadas na análise pareada entre a amostra tumoral e a amostra do irmão sem doença.

A frequência das variantes discordantes entre as amostras dos irmãos em relação à consequência relacionada ao gene está representada na Figura 5.17. De acordo com a predição do SIFT e do PolyPhen2, a maioria das variantes era tolerada ou benigna (68,8% e 72,8%, respectivamente). As variantes com impacto

deletério para a proteína e provavelmente danosas representaram 25,8% e 15,4% pelo SIFT e PolyPhen2, respectivamente.

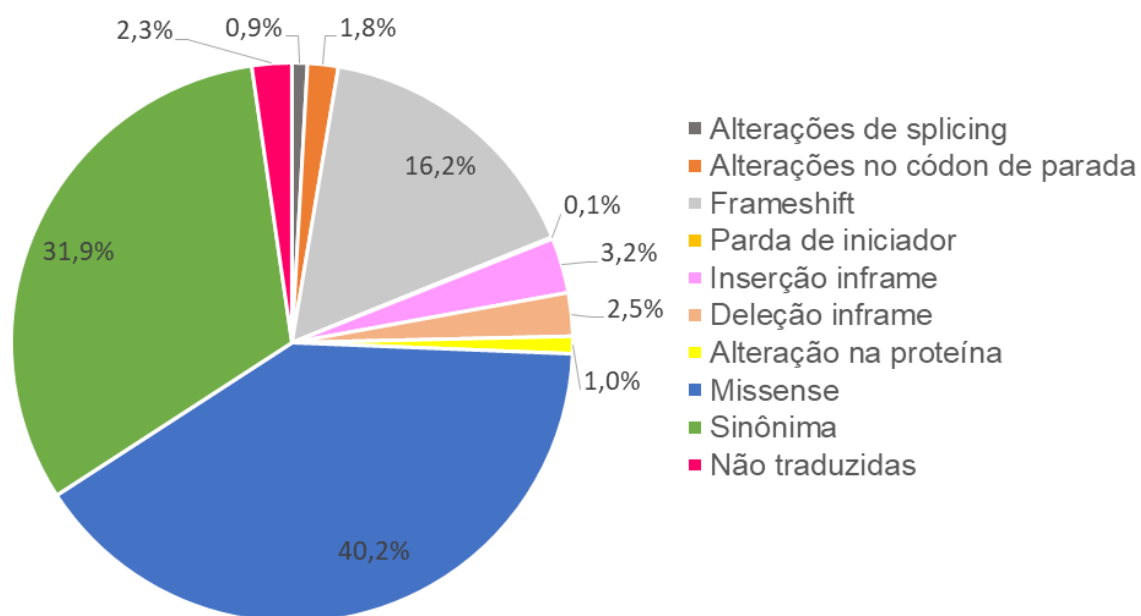


Figura 5.17. Percentual das variantes discordantes entre a amostra tumoral e a amostra do irmão sem doença de acordo com as consequências relacionadas ao gene. A anotação das variantes foi realizada com o VEP. Alterações de splicing incluem variantes em regiões de splicing, doadoras ou aceptoras de splicing. Alterações no códon de parada incluem ganho, perda ou retenção de parada. Alterações não traduzidas incluem variantes nas regiões 5'UTR e 3'UTR, associadas a maturação de microRNA, em regiões intrônicas, upstream e downstream da região codificante.

Foi realizada uma análise sítio-dirigida para 116 genes associados a predisposição genética para neoplasias mieloides ou a etiopatogênese das LMAs de acordo com a literatura (Anexo F). Destes, 46 genes apresentaram variantes nas amostras tumoral e de remissão do paciente e do irmão sem doença, correspondendo a 133 variantes totais. Cinquenta e seis variantes (42,1%) foram do tipo não sinônimas. Os genes que apresentaram variantes estão descritos na Tabela 5.14.

Tabela 5.14. Genes investigados na análise sítio-dirigida que apresentaram variantes entre as amostras do paciente com LPA (tumoral e remissão) e do irmão sem doença

| Genes associados a predisposição genética para neoplasias mieloides (n=21) | Genes associados a etiopatogênese das leucemias mieloides agudas (n=25) |
|---|---|
| <i>ANKRD26, ATG2B, ATM, BLM, BRCA1, BRCA2, CTC1, DDX41, DKC1, EPCAM, FANCA, FANCD2, FANCE, FANCI, FANCM, GF11, MSH6, PMS2, RBBP6, RTEL1, WRAP53</i> | <i>ASXL1, ARID1B, BCOR, CBLB, CREBBP, CUX1, EP300, FLT3, GATA2, GATA3, GNAS, HERC1, HRAS, IDH2, IKZF1, JAK2, KDM5A, KRAS, PTPN11, TP53, U2AF2, WT1, XRCC1, XRCC3, ZRSR2</i> |

Na Tabela 5.15 estão descritas as alterações presentes em pelo menos uma amostra. A maioria das variantes foi considerada benigna ou não patogênica, contudo, quatro variantes foram caracterizadas como deletérias e possivelmente danosas de acordo com os bancos de dados SIFT e Polyphen, nos genes *ASXL1*, *BRCA1*, *FANCD2* e *FLT3*. Outras duas variantes, apresentaram genótipo discordante nas amostras analisadas. A variante p.Gln1383Glu no gene *ATG2B* não foi identificada na amostra tumoral (0/0) foi identificada como heterozigota (0/1) nas amostras de remissão e do gêmeo sem doença. A variante p.Gln65His no gene *FANCD2*, por sua vez, não foi identificada na amostra de remissão (0/0) e foi identificada como heterozigota (0/1) nas amostras tumoral e do gêmeo. Do total de variantes não sinônimas identificadas nessa análise, em 8,9% (5/56) o resultado da chamada de variantes não foi conclusivo (./.) (Tabela 5.15).

Tabela 5.15. Alterações nos genes relacionados às malignidades mieloides e a etiopatogênese das LMAs

| Gene | Posição no cDNA ^a | Consequência | Genótipo no tumor | Genótipo na remissão | Genótipo no irmão sem doença | GMAF | ClinVar Significado clínico | Impacto VEP | Predições de dano | |
|----------------|------------------------------|------------------------------------|-------------------|----------------------|------------------------------|--------|-----------------------------|-------------|-----------------------------------|----------------------|
| | | | | | | | | | SIFT (score) | PolyPhen (score) |
| <i>ANKRD26</i> | p.Phe1514Leu | Missense | ./. | 1/1 | 1/1 | 0,3173 | Benigna | Moderado | Tolerada (1) | Benigna(0) |
| <i>ANKRD26</i> | p.Val1305Ile | Missense | ./. | 1/1 | 1/1 | 0,3173 | Benigna | Moderado | Tolerada (1) | Benigna(0) |
| <i>ANKRD26</i> | p.Gln20Arg | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,9447 | Benigna | Moderado | Tolerada (1) | Benigna(0) |
| <i>ASXL1</i> | p.Val751Ile | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,0196 | Benigna | Moderado | Tolerada, baixa confiança (1) | Benigna(0) |
| <i>ASXL1</i> | p.Leu815Pro | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1 | SI | Moderado | Tolerada, baixa confiança (0,27) | Benigna(0) |
| <i>ASXL1</i> | p.Arg1247Cys | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,0008 | SI | Moderado | Tolerada, baixa confiança (0,19) | Benigna(0) |
| <i>ASXL1</i> | p.Leu1325Phe | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,029 | Benigna | Moderado | Deletéria, baixa confiança (0,01) | Poss. danosa (0,854) |
| <i>ATG2B</i> | p.Ile1567Thr | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,9508 | SI | Moderado | Tolerada (0,99) | Benigna(0) |
| <i>ATG2B</i> | p.Gln1383Glu | Missense | 0/0 | 0/1 | 0/1 | 0,2498 | SI | Moderado | Tolerada (0,9) | Benigna (0,003) |
| <i>ATG2B</i> | p.Asn1124Asp | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,9065 | SI | Moderado | Tolerada(1) | Benigna(0) |
| <i>ATM</i> | p.Asn1983Ser | Missense | ./. | 1/1 | 1/1 | 1 | Benigna | Moderado | Tolerada(1) | Benigna(0) |
| <i>ATM</i> | p.Ile2030Val | Missense | ./. | 0/1 | 0/1 | 0,0066 | SI Prov. | Moderado | Tolerada(0,06) | Benigna(0) |
| <i>BLM</i> | p.Val1321Ile | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,0671 | Benigna | Moderado | Tolerada(0,33) | Benigna (0,003) |
| <i>BRCA1</i> | p.Pro871Leu | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,885 | Benigna | Moderado | Tolerada(1) | Benigna(0) |
| <i>BRCA1</i> | p.Gln356Arg | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,0218 | Benigna | Moderado | Deletéria (0,02) | Poss. danosa (0,795) |
| <i>BRCA2</i> | p.Val2466Ala | Missense | ./. | 1/1 | 1/1 | 0,9758 | Benigna | Moderado | Tolerada(1) | Benigna(0) |
| <i>CTC1</i> | p.Ile1005Val | Missense e região de <i>splice</i> | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,6635 | Benigna | Moderado | Tolerada(1) | Benigna(0) |

Tabela 5.16. Continuação

| | | | | | | | | | | |
|---------------|--------------|-----------|------------|------------|------------|--------|---------|-------------|---------------------------------|---------------------|
| <i>CTC1</i> | p.Ile820Val | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,9373 | Benigna | Moderado | Tolerada(1) | Benigna(0) |
| <i>CUX1</i> | p.Ala464Thr | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,5591 | SI | Moderado | Tolerada(0,32) | Benigna(0,006) |
| <i>EPCAM</i> | p.Met115Thr | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,6661 | Benigna | Moderado | Tolerada(1) | Benigna(0) |
| <i>EPCAM</i> | rs58450758 | Intrônica | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,2091 | SI | Modificador | SI | SI |
| <i>FANCA</i> | p.Ala1435Thr | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,0016 | Benigna | Moderado | Tolerada(0,27) | Prov. danosa(0,945) |
| <i>FANCA</i> | p.Gly809Asp | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,6667 | Benigna | Moderado | Tolerada(0,31) | Benigna(0) |
| <i>FANCA</i> | p.Gly501Ser | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,624 | Benigna | Moderado | Tolerada(1) | Benigna(0) |
| <i>FANCA</i> | p.Thr266Ala | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,6905 | Benigna | Moderado | Tolerada(1) | Benigna(0) |
| <i>FANCA</i> | p.Ala181Val | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,0533 | Benigna | Moderado | Tolerada(0,3) | Benigna(0,161) |
| <i>FANCD2</i> | p.Gln65His | Missense | 0/1 | 0/0 | 0/1 | 0,0098 | Benigna | Moderado | Tolerada(0,07) | Prov. danosa(0,976) |
| <i>FANCD2</i> | p.Ile172Met | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,0196 | SI | Moderado | Tolerada(1) | Benigna(0,019) |
| <i>FANCD2</i> | p.Leu456Arg | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,0313 | Benigna | Moderado | Tolerada(0,35) | Poss. danosa(0,862) |
| <i>FANCD2</i> | p.Gln623Pro | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,0831 | SI | Moderado | Deletéria(0,02) | Poss. danosa(0,862) |
| <i>FANCD2</i> | p.Pro714Leu | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,1425 | Benigna | Moderado | Tolerada(0,31) | Benigna(0) |
| <i>FANCI</i> | p.Ala86Val | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,2598 | Benigna | Moderado | Tolerada(0,1) | Benigna(0,055) |
| <i>FANCI</i> | p.Cys742Ser | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,265 | Benigna | Moderado | Tolerada(0,39) | Benigna(0,006) |
| <i>FANCM</i> | p.Thr77Ala | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,0162 | Benigna | Moderado | Tolerada(0,54) | Benigna(0) |
| <i>FANCM</i> | p.Ser175Phe | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,2059 | Benigna | Moderado | Tolerada(1) | Benigna(0) |
| <i>FLT3</i> | p.Thr227Met | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,5587 | SI | Moderado | Deletéria(0,01) | Poss. danosa(0,69) |
| <i>FLT3</i> | p.Asp7Gly | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,3736 | SI | Moderado | Tolerada, baixa confiança(0,49) | Benigna(0) |
| <i>GATA3</i> | rs501764 | Upstream | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,9215 | SI | Modificador | SI | SI |
| <i>GATA3</i> | rs485411 | Upstream | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,9062 | SI | Modificador | SI | SI |

Tabela 5.16. Continuação

| | | | | | | | | | | |
|---------------|------------------------|----------|------------|------------|------------|--------|---|-------------|------------------------------------|----------------|
| <i>HERC1</i> | p.Glu3722Asp | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,8744 | SI | Moderado | Tolerada(0,4) | Benigna(0) |
| <i>HERC1</i> | p.Ile2220Val | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,366 | SI | Moderado | Tolerada(0,28) | Benigna(0) |
| <i>HERC1</i> | p.Thr1995Ala | Missense | 0/0 | 0/1 | 0/1 | 0,0341 | SI | Moderado | Tolerada(0,82) | Benigna(0) |
| <i>HERC1</i> | p.Gly1696Ala | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,8744 | SI | Moderado | Tolerada(0,56) | Benigna(0) |
| <i>KDM5A</i> | rs757934909 | UTR | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,0219 | SI | Modificador | SI | SI |
| <i>PMS2</i> | p.Lys541Glu | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,8832 | Benigna | Moderado | Tolerada(1) | Benigna(0) |
| <i>PMS2</i> | p.Pro470Ser | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,3582 | Benigna | Moderado | Tolerada(0,43) | Benigna(0) |
| <i>RTEL1</i> | p.Asn124Ser | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,0353 | SI | Moderado | Tolerada(1) | Benigna(0,003) |
| <i>RTEL1</i> | p.Gln1066His | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,7368 | Benigna Benigna/ resposta a | Moderado | Tolerada, baixa confiança(0,12) | Benigna(0) |
| <i>TP53</i> | p.Pro72Arg | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,3313 | drogas | Moderado | Tolerada(0,57) | Benigna(0,045) |
| <i>WRAP53</i> | p.Arg68Gly | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,4067 | Benigna | Moderado | Tolerada, baixa confiança(1) | Benigna(0) |
| <i>WRAP53</i> | p.Ala522Gly rs6508& | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,9327 | Benigna | Moderado | Tolerada(1) | Benigna(0) |
| <i>WT1</i> | CM057468 | Upstream | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,1508 | SI | Modificador | SI | SI |
| <i>WT1</i> | rs3087923 | Upstream | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,2802 | SI | Modificador | SI | SI |
| <i>XRCC1</i> | p.Asn576Tyr | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1 | SI | Moderado | Tolerada(1) | Benigna(0) |
| <i>XRCC1</i> | p.Gln399Arg | Missense | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0,7396 | Resposta a drogas Fator de risco | Moderado | Tolerada(0,59) | Benigna(0) |
| <i>XRCC3</i> | p.Thr241Met | Missense | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0,2169 | | Moderado | Tolerada(0,17) | Benigna(0,19) |

^a Nos casos em que a alteração ocorreu em uma região não codificante, a anotação está representada como *rs* (refSNP). As siglas dos aminoácidos estão descritas no Anexo G.

SI, sem informação. GMAF, frequência do menor alelo da variante, para todas as populações de acordo com 1000 genomes; prov., provavelmente; poss, possivelmente; VAF, frequência do alelo variante.

6. DISCUSSÃO

6.1. A COORTE GERAL DE LMA PEDIÁTRICA

A leucemia é o tipo de câncer infantojuvenil mais incidente em todo o mundo e a maior parte dos casos corresponde às leucemias de origem linfóide. As LMAs representam ~20% dos casos de leucemia pediátrica e são características da idade adulta, mas, em ambas as faixas etárias, são doenças geneticamente complexas e heterogêneas. A identificação de alterações genômicas pouco frequentes só é possível em coortes robustas e entre grupos cooperativos de forma a possibilitar que uma alteração muito rara seja encontrada.

Nós realizamos uma análise de casos retrospectivos (2000-2014) e incidentes (2015-2018) de LMA pediátrica que formam a maior série de casos de leucemia da população brasileira e, portanto, com grande cobertura de base hospitalar. Ao longo de 17 anos (janeiro de 2000 a dezembro de 2017), foram recebidos 4.150 casos de LMA pediátrica para caracterização molecular (antes do tratamento), correspondendo à frequência de 19,4% do total de amostras recebidas no período. Esse número substancial de casos só foi possível pela ação conjunta dos médicos colaboradores (Anexo H) que encaminharam as amostras biológicas dos pacientes para a caracterização imunofenotípica e molecular dos estudos epidemiológicos, criando condições particulares para o estudo da história natural das leucemias pediátricas. As instituições que fazem parte do Grupo Colaborativo para Estudo das Leucemias Pediátricas representam cerca de 70% dos centros de tratamento onco-hematológico pediátrico no território brasileiro, considerando o número de casos de leucemia esperado de acordo com os registros de câncer de base populacional e o número de casos incluídos no estudo (THULER; POMBO-DE-OLIVEIRA, 2016). A organização dessa rede se deu com propósitos clínicos e acadêmicos, buscando incorporar na prática clínica os marcadores moleculares para a classificação da doença como alto e baixo risco prognóstico com base no protocolo BFM-2004, guiando, portanto, a estratificação terapêutica (RASCHE *et al.*, 2018). Esses marcadores foram incorporados a partir do ano de 2008, fato que motivou a análise detalhada dos períodos anterior e posterior a 2008. Nós demonstramos que é possível o diagnóstico molecular realizado em um laboratório central.

As leucemias pediátricas, como todos os tumores, são um produto de duas ou mais alterações moleculares em uma célula tronco que é capaz de se dividir e se manter indiferenciada. Além disso, por serem células sanguíneas, apresentam uma capacidade inerente de invasão. Esses atributos estão entre os pilares do câncer e podem explicar porque as leucemias parecem necessitar menos alterações genéticas que os tumores sólidos para se estabelecer e evoluir (HANAHAN; WEINBERG, 2011b; VOGELSTEIN *et al.*, 2013). Essa simplicidade genética das leucemias combinada ao curto período de exposição dos pacientes pediátricos permitiu o delineamento do momento de origem do evento genético fundador (alteração primária) que, nas leucemias pediátricas é representado pelas translocações cromossômicas e fusões gênicas (SCHNEIDAWIND *et al.*, 2018; WHITEHEAD *et al.*, 2016). A necessidade de “individualizar” os pacientes em grupos, relativamente, homogêneos com fatores biológicos comuns gera a possibilidade de considerar essas informações para a estratégias de prevenção primária e estratificação de risco terapêutico. Após a análise abrangendo todas as LMAs pediátricas (casos com idade <19 anos), nós consideramos essas características para definir os “grupos especiais” de LMA de acordo com a biologia de cada um deles: LPAs e LMAs precoce (casos com idade de 0-2 anos). Dessa forma, após descrever o panorama geral das LMAs, caracterizamos molecularmente os demais subtipos e testamos as associações de risco entre os marcadores moleculares e os dados clínico-demográficos dos pacientes. Nosso estudo tornou possível definir os subgrupos genéticos das LMAs e discorrer sobre a biologia da doença, adaptando as recomendações de diagnóstico para o tratamento (CREUTZIG *et al.*, 2012). Ao longo dos anos, novas tecnologias foram incorporadas; se por um lado, os dados suportam as questões epidemiológicas, por outro, permitem achados novos e pouco usuais (POMBO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2016).

O câncer pediátrico, generalizado como aquele que ocorre em crianças, adolescentes e adultos jovens (<19 anos) é considerado raro quando comparado com o câncer em adultos, correspondendo de 2-3% de todos os tumores malignos registrados no Brasil. A estimativa realizada pelo INCA previu os maiores números de casos para as regiões Sudeste e Nordeste, seguidas pelas Regiões Sul, Centro-Oeste e Norte (INCA, 2016).

Existem diferenças nos padrões de incidência entre as populações europeias e norte americanas: as maiores taxas de incidência foram descritas nos Estados Unidos - apenas para a população hispânica, com 160,6 casos/milhão - e na

Finlândia (173,2 casos/milhão) e, as menores, na Inglaterra (122,1 casos/milhão) (BARRINGTON-TRIMIS *et al.*, 2016). No nosso estudo, nós identificamos diferenças regionais na distribuição dos casos de LMA. Nos países em desenvolvimento, os registros de câncer de base populacional cobrem apenas uma parcela da população e as análises são afetadas pela checagem inadequada dos dados e variações prejudicadas por fatores econômicos. Sendo assim, as taxas reais de incidência de leucemia infantil ainda podem ser subestimadas, apesar de os dados serem reportados no cenário regional (DE SOUZA REIS *et al.*, 2011; VALSECCHI; STELIAROVA-FOUCHER, 2008). A maioria dos casos de LMA incluída no estudo foi da região Nordeste (47,3%), seguida das regiões Sudeste (25,6%), Centro Oeste (21,6%), Sul (4,7%) e Norte (0,7%) do Brasil. Esses números não refletem a incidência das regiões brasileiras, mas correspondem ao maior número de centros colaboradores. Além disso, a maior representação de determinadas regiões pode ser explicada pelo uso dos serviços públicos de saúde. Localidades onde a maior parte da população apresenta menor *status* socioeconômico (medido pela renda familiar e nível educacional), o uso dos serviços públicos de saúde é maior do que dos serviços privados (POMBO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2016). Em relação à região Norte, ela só passou a ser incluída no estudo a partir de 2015 e fatores logísticos ainda precisam ser melhorados. A distância geográfica dificultou o envio das amostras que, para as análises moleculares, precisam ser processadas em até 48h após a coleta.

As LMAs ocorrem em todas as idades, mas o perfil genômico de cada faixa etária é muito diferente, o que está associado à etiologia da doença. Nossa distribuição de frequência de acordo com a idade demonstrou um maior número de casos com idade ≤ 2 anos. De fato, de acordo com dados de registros de câncer base populacional, essa é a faixa etária com maior incidência de LMA entre a população pediátrica. Além disso, na nossa coorte, há maior adesão dos médicos colaboradores para os estudos epidemiológicos das leucemias de lactentes.

Diferentes fatores do hospedeiro, como sexo, raça, índice de massa corporal e polimorfismos genéticos já apresentaram risco associado ao desenvolvimento da LMA (revisado em RADHI; MESHINCHI; GAMIS, 2010). Crianças do sexo masculino apresentam maior risco de câncer que crianças do sexo feminino (KAATSCH, 2010) e a incidência de LMA difere de acordo com o gênero (DORES *et al.*, 2011). Nós demonstramos uma frequência equivalente de pacientes do sexo masculino e feminino (54,4% e 45,6%, respectivamente). Frequências similares foram

observadas na população germânica (CREUTZIG *et al.*, 2008, 2011), norte-americana (PUI *et al.*, 2000) e japonesa (HORIBE *et al.*, 2013).

Extrapolar o tratamento ao longo do espectro de idade dependeria do pressuposto de que todas as ocorrências de LMA estão sujeitas a uma mesma etiologia. Por isso, as LMAs devem ser consideradas em relação a faixas etárias, mesmo entre os pacientes que são classificados como pediátricos (CHAUDHURY *et al.*, 2015). As LMAs da idade precoce, aqui referidas como LMA infantis (traduzidas do inglês *infant*, termo usado para lactentes e crianças entre 1-2 anos de idade), são, em sua maioria, de origem intrauterina (revisado em POMBO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2016). No outro extremo, estão os adolescentes e os adultos jovens (>15 anos), que compreendem uma faixa etária intermediária entre a oncologia pediátrica e a oncologia de adultos. CREUTZIG *et al.* (2008) demonstraram que pacientes com idade entre 13 e 21 anos apresentam uma sobrevida discretamente inferior à de crianças mais novas. Existem algumas controvérsias em relação à faixa etária que deve ser considerada como adolescente e adulto jovem e ainda não há consenso sobre qual o limite de idade para classificar as LMAs como pediátricas. O padrão da incidência de câncer entre adolescentes (13-19 anos) e adultos jovens (>19-29 anos) é diferente tanto da criança com idade inferior a 13 anos) quanto do adulto (INCA, 2016). Nós consideramos pacientes pediátricos até 19 anos de idade, seguindo DOLL *et al.* (1996).

Nós estratificamos os pacientes em idade ≤ 2 anos de idade (22,3%), >2-10 anos (38,6%) e >10 anos (39,1%). CREUTZIG *et al.* (2012b) avaliaram a resposta ao tratamento de 615 casos de LMA pediátrica separados em grupos com idade <1 ano, 1-<2 anos e <10 anos. Todos os pacientes <1 ano-idade foram classificados como alto risco, exceto 4% dos casos que apresentavam características de risco padrão (com diagnóstico de LMA com os subtipos FAB M1/M2 e bastonetes de Auer observados morfológicamente, subtipos FAB M3, M4 com eosinofilia, alterações moleculares *PML-RAR α* , *RUNX1-RUNX1T1* ou *CBF β -MYH11*, considerados bons respondedores). Os grupos de pacientes com idade <1 ano e entre 1-<2 anos apresentaram características similares de hiperleucocitose, subtipos morfológicos M4/M5 e M7, envolvimento do SNC ou órgãos extramedulares, e *KMT2A-r*, que foram mais frequentes do que na faixa etária ≥ 2 -10 anos-idade. PUI *et al.* (2000) também descreveram que crianças com LMA e idade ≤ 2 anos, em geral, apresentam características de LMA de risco intermediário e de alto risco e, BALGOBIND *et al.* (2011) observaram diferenças nas alterações genéticas entre

crianças com LMA ≤ 2 anos-idade e > 2 anos-idade. Embora as características descritas não sejam sugestivas de que o tratamento com base na idade possa beneficiar os pacientes, diferenças biológicas podem levar a diferentes estratégias de tratamento para as categorias de idade. A idade reflete a biologia da doença, sua origem pré-natal e, conseqüentemente, a variação na frequência das alterações moleculares.

Historicamente, características que pareciam ser inerentes às leucemias incluíam fatores como contagem de leucócitos ao diagnóstico e fenótipo do blasto leucêmico. CREUTZIG *et al.* (1999) demonstraram que a leucometria foi um fator prognóstico para as LMAs, sendo que, casos com leucometria $< 20 \times 10^9/L$ foram associados a um prognóstico melhor e, casos apresentando leucometria $> 100 \times 10^9/L$ foram associados a prognóstico adverso. Portanto, a leucometria ao diagnóstico demonstrou ser uma variável para a sobrevida; alta leucometria está associada à menor sobrevida (CREUTZIG *et al.*, 1999). Isso pode ser explicado pela interação entre as células leucêmicas e as células endoteliais dos vasos sanguíneos por meio de moléculas de adesão. Esse processo é ativado por citocinas inflamatórias que são produzidas pelos blastos leucêmicos. A viscosidade do sangue e os agregados leucêmicos passam a ocupar a maior parte do lúmen vascular causando hipoxemia e dano local (STUCKI *et al.*, 2001).

Na nossa coorte, a distribuição dos casos em relação a leucometria não apresentou distribuição normal. Quando considerada uma variável contínua, para avaliar a associação da leucometria com os marcadores moleculares, nós o utilizamos o teste de Mann-Whitney (U), que testa a igualdade das medianas e permite mais generalidade dos resultados. Quando considerada uma variável categórica, nós definimos arbitrariamente duas categorias: $\leq 10 \times 10^9/L$ vs. $> 10 \times 10^9/L$. Estudos demonstraram evidências do impacto da leucometria ao diagnóstico na conduta clínica das LPAs (TESTA; LO-COCO, 2016). Usando como ponto de corte a contagem de leucócitos de $10 \times 10^9/L$, a alta leucometria confere risco de morte precoce e recaída para as LPAs (PARK *et al.*, 2011). Já para as LMAs, não existe consenso, por isso, a identificação de mecanismos biológicos responsáveis pela proliferação e sobrevivência celular levando à leucocitose proporcionam meios mais efetivos de avaliação do risco de falha no tratamento, tornando-se ferramentas mais relevantes de serem estabelecidas ao diagnóstico. Eventos moleculares que medeiam a leucemogênese mielóide e levam à leucocitose incluem mutações *FLT3*-

ITD (FENSKI *et al.*, 2000; HAYAKAWA *et al.*, 2000; KIYOI *et al.*, 1998) e mutações em *KRAS*, entre outros (BRAUN *et al.*, 2004; SABNIS *et al.*, 2009).

Nós avaliamos a associação entre a cor da pele e as alterações moleculares. Apesar de não observarmos diferenças, é importante considerar a variável “cor da pele” para a população brasileira, que apresenta uma origem étnica única, como resultado de um intenso processo de mistura genética desde os tempos coloniais e que ainda está acontecendo, o que torna nossa população única. Diferenças raciais já foram associadas à sobrevida, sendo que pacientes negros apresentaram sobrevida pior do que os correspondentes de cor da pele branca (CHILDREN’S ONCOLOGY GROUP *et al.*, 2006). Diferenças entre crianças hispânicas e não hispânicas de cor da pele branca já foram descritas nos Estados Unidos (LI *et al.*, 2008).

A baixa ocorrência de algumas mutações nas LMAs pediátricas sugere que seus eventos patogênicos são diferentes da LMA do adulto: esse foi o fundamento para a seleção das alterações moleculares desse estudo. Por exemplo, mutações em *NPM1* e *CEBPA* são ausentes nas LMAs de crianças ≤ 2 anos de idade, ocorrem em 5-10% dos casos pediátricos e ~35% dos casos em adultos (GREEN *et al.*, 2010; HO *et al.*, 2009; HOLLINK *et al.*, 2009; TASKESSEN *et al.*, 2011; THIEDE *et al.*, 2006). Mutações em *NPM1* são uma alteração diretora (*driver*) tardia e não é única, i.e., apresenta alterações concomitantes que modificam o curso clínico. Apesar disso, a avaliação desses genes será considerada para estudos posteriores no grupo.

Mutações em *TP53*, que estão associadas ao cariótipo complexo e outras alterações cromossômicas, caracterizam um subgrupo da LMA do adulto (6% dos casos) (PAPAEMMANUIL *et al.*, 2016). As mutações em *TP53* identificadas por BOLOURI *et al.* em uma coorte pediátrica representaram <1% do total (BOLOURI *et al.*, 2017). Esses dados reforçam que os programas de progressão tumoral que são críticos em adultos (como a instabilidade genômica que aumenta com a idade) podem ser desnecessários nas crianças, resultando em susceptibilidade diferente para o desenvolvimento da LMA (CHAUDHURY *et al.*, 2015). Ley *et al.* identificaram mutações em *DNMT3A* em ~20% das LMAs do adulto, como um evento precoce que resulta na produção de clones pré-leucêmicos e predizem a resposta terapêutica (LEY *et al.*, 2010). Alterações no *DNMT3A* são quase ausentes nos casos pediátricos e não existem evidências de que sua origem possa ser intrauterina (HO *et al.*, 2011; THOL *et al.*, 2011). Por outro lado, existem alterações que são mais

prevalentes nos casos pediátricos do que nos adultos, como o *KMT2A-r* (38% vs. 2%, respectivamente), ou são ausentes nos adultos, como *NUP98-NSD1*, *CBFA2T3-GLIS2* e *RBM15-MKL1*.

Uma mesma alteração molecular pode levar a destinos diferentes de autorrenovação, transformação e expressão gênica por influência das características dependentes da idade da célula (CHAUDHURY *et al.*, 2015). A paisagem genômica das leucemias revelou subgrupos genéticos que direcionaram nossa atenção para a arquitetura clonal das LMAs, com mutações secundárias que ocorrem em estágios posteriores da evolução tumoral, como as mutações em genes de vias de proliferação. Nós avaliamos os principais pontos de mutação nos genes *K/N-RAS*, *FLT3*, *KIT* e *PTPN11*: D835 e ITD (éxons 11/12) no *FLT3*; éxons 8 e 17 no *KIT*; éxon 3 no *PTPN11* e éxon 1 em *K/N-RAS*. Alguns estudos recomendam a investigação do éxon 2 de *K/N-RAS* (códon 61), que se mostraram em frequência muito baixa nas LMAs pediátricas (0,6-3,2%) e não foram incluídos no estudo (AL-KZAYER *et al.*, 2015; SANO *et al.*, 2012); <https://pecan.stjude.cloud/bubble/HM-AML>), o que minimiza nossa perda.

Incorporar uma classificação padrão é um pré requisito para comparações epidemiológicas e biológicas. A OMS tem sido fundamental para o estabelecimento dessas classificações a partir de recomendações dos grupos cooperativos European LeukemiaNet e BFM, que estudam a LMA e pediátrica do adulto, respectivamente (CREUTZIG *et al.*, 2012; DÖHNER *et al.*, 2017). As diferenças biológicas idade-dependentes impactam diretamente na sobrevida (revisado em CHAUDHURY *et al.*, 2015). Apesar de a classificação molecular da OMS se aplicar para casos adultos e pediátricos, a noção de que existem particularidades em ambos deve ser avaliada entre os testes de diagnóstico. A evolução na classificação das LMAs que, pela classificação FAB se baseava apenas no fenótipo do blasto e, com a classificação da OMS passou a incorporar os marcadores citogenético-moleculares, reflete também a evolução na classificação dos casos desse estudo entre os dois períodos de análise.

A citogenética convencional (bandeamento G) é uma técnica que contribuiu com os avanços na compreensão da biologia da LMA, revelando parte dos marcadores importantes de diagnóstico e prognóstico mencionados (CREUTZIG *et al.*, 2012; HARRISON *et al.*, 2010). Determinadas fusões gênicas, produto de translocações crípticas, ou perdas cromossômicas específicas não são identificadas por essa técnica; a obtenção de índice mitótico adequado, a sensibilidade restrita e a

análise dos resultados (complexa e laboriosa) são fatores limitantes. Esses fatores foram considerados quando optamos por realizar a identificação dos marcadores moleculares por RT-PCR e FISH, o que é relevante para amostras processadas 24-48h após a coleta e que sofrem as variações do transporte. RT-PCR e FISH podem ser utilizadas em amostras criopreservadas, com pouca celularidade e não há a necessidade de obtenção de metáfases.

Todos os subtipos de LMA compartilham alterações em vias que regulam proliferação, diferenciação e morte celular, que são os eventos fundadores da leucemia ou que possibilitam sua evolução, já que apenas uma mutação, sozinha, não parece desempenhar a transformação leucêmica. Como eventos fundadores mutualmente excludentes, nós identificamos as fusões gênicas mais frequentes nas LMAs pediátricas. Seguindo um algoritmo de testes, identificamos as fusões gênicas raras (<2% dos casos) na coorte. Após a caracterização completa desses subtipos, investigamos os eventos genéticos associados com um subtipo único de leucemia: as LPAs. Nestas, nós investigamos, por meio de uma abordagem genômica em um conjunto de amostras de gêmeos, se existem variantes germinativas associadas com a origem da doença.

Na caracterização das LMAs, nossas perdas foram representadas, principalmente, pelos casos do primeiro período (2000-2008) sem amostra biológica para as análises. Ainda assim, esses casos foram incluídos no estudo uma vez que, mesmo sem a realização dos testes moleculares, a forte associação entre genótipo-fenótipo permite a identificação das LPAs. A caracterização das LPAs é de extrema importância não só no âmbito terapêutico, mas também no contexto epidemiológico, por apresentar associação com a diversidade genética populacional.

Está cada vez mais aceito que um insulto genético específico determina o fenótipo celular. Modelos murinos indicaram que o tipo celular, sendo uma CTH ou um progenitor comprometido, está associado com o fenótipo leucêmico (COZZIO *et al.*, 2003). Nos casos pediátricos predominam as fusões gênicas e, nos adultos, cariótipo normal com mutações pontuais. O intrigante é que uma mesma anormalidade oncogênica pode resultar em uma doença biologicamente diversa. Já ficou claro que os perfis genéticos das LMA pediátricas e do adulto são diferentes, mas o prognóstico semelhante dos subtipos genéticos demonstra que vias similares são ativadas pelas mesmas anormalidades nas duas doenças.

As translocações cromossômicas e rearranjos gênicos ocorrem em >90% dos casos de LMA pediátrica. As fusões gênicas mais frequentes incluem *RUNX1-*

RUN1T1, *CBF β -MYH11*, *PML-RAR α* e *KMT2A-r*, representando 50% dos casos (BALGOBIND *et al.*, 2011; CREUTZIG *et al.*, 2012). Nesse estudo, essas alterações foram encontradas em 66,2% dos casos. A frequência das alterações CBF foi de 24,7%, sendo 18,1% representados por *RUNX1-RUN1T1* e 6,6% representados por *CBF β -MYH11*. A frequência de *RUNX1-RUN1T1* está discretamente maior que a descrita por outros grupos, como BALGOBIND *et al.* (2011), que realizou estudo envolvendo pacientes pediátricos europeus, YATSENKO *et al.*, que avaliou pacientes da Rússia (ambos descrevem 12,6%), e por WELLS *et al.*, que relatou a frequência de 13% em pacientes dos Estados Unidos (WELLS *et al.*, 2002; YATSENKO *et al.*, 2013). Em relação à frequência do transcrito *CBF β -MYH11* encontrada, ela está de acordo com a descrita em uma revisão realizada por MANOLA, cuja variação ocorre entre 3-8% (MANOLA, 2009). BALGOBIND *et al.* (2011) encontraram 9,5%, YATSENKO *et al.*, 5,7% e WELLS *et al.* encontraram anormalidades envolvendo o cromossomo 16 em 6% dos casos (WELLS *et al.*, 2002; YATSENKO *et al.*, 2013). Maiores frequências da alteração *CBF β -MYH11* já foram descritas na população chinesa, de 11,6% (CHAN *et al.*, 2004).

O *KMT2A-r* foi observado em 21,6% do total de casos. VON NEUHOFF *et al.* descrevem a frequência de 20% e BALGOBIND *et al.* relatam 24,1% (BALGOBIND *et al.*, 2011; NEUHOFF *et al.*, 2010). Outros estudos já relataram frequências inferiores, variando de 14-22% (HARRISON *et al.*, 2010; RAVINDRANATH *et al.*, 2005; WELLS *et al.*, 2002). Nas crianças com idade ≤ 2 anos predominou o *KMT2A-r* (58,5%). Diferentes estudos afirmam que, nessa faixa etária, os rearranjos são observados em >50% das LMAs (HARRISON *et al.*, 2010; VON NEUHOFF *et al.*, 2010; BALGOBIND *et al.*, 2011; CREUTZIG *et al.*, 2012). As leucemias agudas com *KMT2A-r* são de interesse particular por serem um modelo para a história natural das leucemias. É possível que as células da primeira onda do desenvolvimento hematopoético com populações celulares que se dividem mais vezes são mais sensíveis a insultos genotóxicos do que as CTH quiescentes (revisado em POMBO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2016).

CREUTZIG *et al.* recomendam a avaliação do *KMT2A-r* por FISH e RT-PCR com iniciadores específicos, uma vez que rearranjos complexos e crípticos são frequentes (CREUTZIG *et al.*, 2012). A frequência do *KMT2A-r* em casos de LMA pediátrica pode variar de 40-65% (revisado em MANOLA, 2009). Essas variações ocorrem nos estudos devido à sensibilidade dos métodos de detecção utilizados. Os

parceiros de fusão mais frequentes do *KMT2A* que identificamos foram *MLLT3* (28,7%), *AFF1* (10,6%) e *MLLT10* (9,6%), respectivamente. MEYER *et al.* (2017) estabeleceram uma rede internacional para estudo do *KMT2A-r* que permitiu a diversas instituições ao redor do mundo obter os pontos de quebra genômicos do *KMT2A* e os parceiros envolvidos na translocação, publicando periodicamente um catálogo que define o “recombinoma” do *KMT2A* (MEYER *et al.*, 2017). Segundo a publicação, os genes de fusão mais frequentes na LMA pediátrica são *MLLT3*, *MLLT10* e *ELL*, com 27,1%, 22,5% e 11,5%, respectivamente. Na LMA do adulto, os rearranjos mais frequentes são com *MLLT3* e a PTD. Os autores explicam essas frequências com uma correlação funcional entre as proteínas codificadas por esses genes, que estão organizadas em um complexo que afeta a atividade transcricional. Assinaturas epigenéticas que acompanham as fusões e alterações na complexa rede de proteínas que repara danos ao DNA podem ser fatores associados à recorrência de determinados rearranjos.

Os casos com *NUP98-r* formam um subgrupo único de LMA; esses rearranjos foram descritos por Struski *et al.* (2016) em 3,8% dos casos pediátricos. Na nossa coorte, o *NUP98-r* correspondeu a 4,4% do total e a 3,9% dos casos com idade ≤ 2 anos. Na primeira infância e de maneira similar ao *KMT2A-r*, os *NUP98-r* são um modelo para abordagem da sua origem intrauterina. Por ser um gene com muitos parceiros de fusão, nós utilizamos uma sonda na FISH que identifica qualquer quebra no *NUP98*, de modo a evitar perdas. O gene *NSD1* é o principal parceiro de fusão, correspondendo a 1,5% na nossa coorte. Outros estudos demonstraram frequências mais elevadas, de 3-4,8% entre as LMAs pediátricas, sendo ainda maiores entre os casos com cariótipo normal, i.e., 9,9% (FARRAR *et al.*, 2016; HOLLINK *et al.*, 2011; SHIBA *et al.*, 2013). A avaliação de um maior número de casos e estudos posteriores são necessários para validar a prevalência encontrada para essa alteração na nossa coorte. Da mesma forma, as análises de *DEK-NUP214* e *CBFA2T3-GLIS2* precisam ser estendidas para todos os casos de maneira a alcançarmos um número robusto de casos capaz de estabelecer as associações.

Nós identificamos frequências similares de mutações tipo I àquelas descritas para a LMA do adulto e frequências discretamente diferentes das descritas para a LMA pediátrica (CREUTZIG *et al.*, 2012; BALGOBIND *et al.*, 2011). Ao refinar a estratificação da idade (Figura 5.5), observamos que os casos com idade >15 anos apresentam menos alterações que a faixa etária intermediária (5-15 anos). Isso pode

ser explicado pelo fato de que os pacientes >15 anos de idade passam a apresentar alterações moleculares características da LMA do adulto, que não foram investigadas nesse estudo (como *NPM1*, *CEPBA*, *TP53*, em genes do complexo spliceossomo, entre outros). Diante disso, especulamos que pacientes com essa idade são, molecularmente, mais parecidos com os pacientes adultos do que com os pediátricos.

As mutações em *FLT3* representaram 23% dos nossos casos. Mutações *FLT3*-ITD corresponderam a 18,2% do total de casos. MESHINCHI *et al.* descrevem alterações *FLT3*-ITD com prevalência de 16,5% dos pacientes pediátricos e BALGOBIND *et al.* relatam 18,0% (BALGOBIND *et al.*, 2011; MESHINCHI *et al.*, 2001). Mutações pontuais no domínio de ativação (DTK) de *FLT3* são descritas em 2-8% dos casos pediátricos e são mutualmente excludentes das outras alterações no gene (BALGOBIND *et al.*, 2011; MESHINCHI *et al.*, 2006). Ao analisar as mutações em *FLT3* (consideradas juntas D835 e ITD), identificamos maior frequência entre os casos LPA/*PML-RAR α* sendo que, de acordo com a literatura, as mutações predominam também nos grupos de cariótipo normal e com *NUP98-NSD1*, aumentando sua prevalência com a idade (BALGOBIND *et al.*, 2011; MESHINCHI *et al.*, 2006; PUI *et al.*, 2011; SCHNEIDER *et al.*, 2012). SCHLENK *et al.* relataram que mutações em *FLT3* podem estar associadas com características clínicas e/ou fenotípicas que permitem a identificação de uma entidade leucêmica específica, servindo como indicadores de prognóstico (SCHLENK *et al.*, 2008). A associação da frequência alélica das mutações em *FLT3* ITD e leucometria nos casos de LPA está relacionada com a alta proporção de células leucêmicas que carregam a mutação. As mutações em *FLT3* estão entre as alterações mais comuns nas LMAs e estão associadas a altas taxas de recaída em adultos e crianças. O inibidor de *FLT3*, *midostaurin*, foi aprovado para uso no tratamento da LMA do adulto e é provável que os casos pediátricos também se beneficiem da incorporação desses inibidores à quimioterapia (LEVIS, 2017; SEXAUER; TASIAN, 2017).

A frequência das mutações em *RAS* nesse estudo foi de 16,2%, similar à descrita por SANO *et al.* (18,2%) (SANO *et al.*, 2012). Da mesma maneira, identificamos que as mutações em *NRAS* são mais frequentes que em *KRAS*, similar ao descrito para as LMAs pediátrica e do adulto (BALGOBIND *et al.*, 2011; DÖHNER *et al.*, 2017). Nós identificamos mutações em *PTPN11* em 9% dos casos, frequência acima da descrita por BALGOBIND *et al.* (2%), e a maioria dos nossos casos com mutação foi do sexo masculino (~70%), o que não foi observado no

estudo daquele grupo (BALGOBIND *et al.*, 2011). A associação de mutações do *PTPN11* com o sexo é descrita na literatura e suporta a premissa de que esse gene está envolvido na proliferação das células espermatogônias (PURI; WALKER, 2016). As diferenças observadas entre o nosso estudo e de BALGOBIND *et al.* podem ser explicadas pelas regiões do gene investigadas: nós analisamos o éxon 3 e BALGOBIND *et al.* incluíram, além do éxon 3, o éxon 13. Sabemos que as mutações no éxon 13 do *PTPN11* estão associadas, principalmente, a casos de leucemia mielomonocítica juvenil e são raras nas LMAs (STIEGLITZ *et al.*, 2015)(BUENO, 2018), o que pode explicar a frequência encontrada por aquele grupo. Precisamos considerar, ainda, que as mutações germinativas em *RAS* e *PTPN11* já foram associadas ao desenvolvimento de leucemia mielomonocítica juvenil mas na nossa coorte, foram avaliadas apenas em células somáticas. As semelhanças biológicas entre a leucemia mielomonocítica juvenil com mutações germinativas em genes da via RAS-MAPK e a LMA pediátrica sugere que elas possam apresentar os mesmos eventos genéticos iniciadores da leucemia.

Apesar de o modelo de leucemogênese, inicialmente proposto por KELLY e GILLILAND, ser reformulado com a descoberta de novas classes de mutações, nas LMAs pediátricas as alterações de classe I e II ainda são as mais frequentes (KELLY; GILLILAND, 2002). As alterações de classe I são representadas por mutações em genes de via de proliferação e, as de classe II, em sua maioria, por fusões gênicas. Biologicamente, as alterações de classe II são o evento fundador da leucemogênese e, as de classe I, são eventos cooperativos e secundários necessários para a transformação celular. Esses fatos sustentam o algoritmo de testes que estabelecemos para a identificação das alterações e nossas análises de associação entre as duas classes de genes.

Nós identificamos mutações tipo I concomitantes (2-3 alterações), na mesma via de sinalização, em 12,7% dos casos. Essa coocorrência já foi descrita para as leucemias mielomonocíticas juvenis e para as LMAs-CBF (ITZYKSON *et al.*, 2018; STIEGLITZ *et al.*, 2015). Nós hipotetizamos que, para as mutações concomitantes, uma delas pode apresentar maior potencial oncogênico que a outra ou ainda que elas aconteceram em clones independentes. Uma vez que nós investigamos os *hotspots* de mutações, é possível que outras alterações genômicas aconteçam muitas vezes durante a evolução da célula leucêmica, levando a um número subestimado de mutações e, conseqüentemente, de clones leucêmicos (ITZYKSON *et al.*, 2018).

A incidência do câncer pediátrico nos países desenvolvidos tem aumentado desde a década de 1950 e essas taxas foram acompanhadas de melhoras no prognóstico. O aumento da incidência pode ser explicado pelo aumento da exposição a fatores de risco mas pode ser apenas aparente, em consequência do aumento no registro de casos e pelo avanço nos métodos de diagnóstico. Mas a melhora da sobrevida das LMAs foi real e também pode ser explicada pelas melhoras no diagnóstico, pela introdução de estratégias de tratamento e melhor cuidado de suporte para reduzir o risco de complicações relacionadas à doença, à toxicidade ou à infecções (revisado em KAATSCH, 2010).

Entretanto, apesar das mudanças nos protocolos terapêuticos, grandes melhoras não vêm sendo observadas na sobrevida na última década. Os casos pediátricos atingiram um platô, no qual apenas ~60% dos pacientes alcança sobrevida a longo prazo e, mesmo assim, apresentam altas taxas de morbidades resultado da exposição a antraciclinas ou sequelas do TCTH (revisado em BOLOURI *et al.*, 2017). Na nossa coorte, a sobrevida global em 5 anos foi <40% e está aquém das taxas observadas para os países desenvolvidos. Pesquisadores da Coreia do Sul avaliaram a sobrevida da LMA pediátrica entre 1996 e 2015 e observaram melhora da primeira para a segunda metade do estudo (40% vs. 70%) (SONG *et al.*, 2017). A sobrevida de ~70% também é observada em países desenvolvidos como Japão (75%), Estados Unidos (64%) e países da Europa (69%) (DAMA *et al.*, 2006; HORIBE *et al.*, 2013; RASCHE *et al.*, 2018; RUBNITZ, 2017; WARD *et al.*, 2014). Diferente do esperado, nós não observamos melhora nos dois períodos de análise. Nossa sobrevida global é similar à observada em outros países em desenvolvimento, como China (33%) e Tailândia (35%) (WIANGNON *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2010). É importante observar que, nas análises estratificadas por período (ano de diagnóstico) e região (localidade de tratamento), os casos das regiões Sul/Sudeste diagnosticados no segundo período alcançaram a maior sobrevida (>50%). Muitos fatores podem explicar essas disparidades, como o *status* socioeconômico regional e o surgimento de novos centros de oncologia nos últimos anos, que descentralizaram o tratamento e precisam ser avaliados quanto às suas limitações para tratar doenças emergenciais que evoluem rapidamente, como a LPA e a leucemia dos lactentes. Mais ainda, diferenças nos protocolos de tratamento não foram avaliadas aqui. Em muitos países, a maioria dos pacientes pediátricos é incorporada em estudos clínicos. Na Alemanha, por exemplo, ~100% das crianças com leucemia são tratadas em estudos clínicos, o que não acontece no Brasil

(revisado em KAATSCH, 2010). Além disso, por ser um estudo multi-institucional, o tratamento “não controlado” pode sofrer pequenas variações que precisam ser consideradas, além das dificuldades de obtenção das informações de seguimento associadas ao tratamento. Por outro, esse tipo de estudo é necessário para uma doença rara e de baixa incidência, como a LMA pediátrica. Estratégias de uniformidade precisam ser estabelecidas para avaliar a efetividade do protocolo terapêutico em cada instituição.

O TCTH é uma modalidade de tratamento recomendada para adultos com LMA de alto risco ou risco padrão na primeira remissão completa (CORNELISSEN *et al.*, 2007). O TCTH melhorou a sobrevida desses grupos de pacientes específicos, mas está altamente associado a mortalidade quando não há o tratamento de suporte e condicionamento adequados, bem como o controle de infecções e profilaxia para a doença de enxerto contra o hospedeiro. Uma vez que não conseguimos analisar essas variáveis, nós excluímos das análises de sobrevida os pacientes de foram submetidos a TCTH.

A idade é um fator preditor de prognóstico, com maior sobrevida para os casos pediátricos do que adultos, refletindo uma doença mais responsiva, com menos comorbidades e melhor tolerância ao tratamento. Nós observamos diferença na sobrevida entre as faixas etárias no primeiro período de análise, quando os marcadores moleculares não eram a principal variável de estratificação de risco. Nas LMAs pediátricas, as alterações genéticas de risco favorável são mais comuns nas crianças com idade entre 1-10 anos (revisado em CHAUDHURY *et al.*, 2015). Na nossa coorte, essas alterações foram mais frequentes nos casos com idade >11 anos, o que explica essa maior sobrevida no primeiro período.

Nossos resultados corroboram com os dados da literatura de que *CBF β -MYH11* e *LPA/PML-RAR α* são preditoras de bom prognóstico. Com exceção das mutações no *PTPN11*, o significado das outras anormalidades não pôde ser definido. Mesmo sendo agrupadas como LMA-CBF, existem diferenças clínicas e biológicas entre *CBF β -MYH11* e *RUNX1-RUNX1T1*, como a associação de apenas *CBF β -MYH11* com a alta leucometria (DUPLOYEZ *et al.*, 2016). BALGOBING *et al.* demonstraram que a sobrevida do *KMT2A-r* depende do parceiro de fusão. *KMT2A-MLLT4* e *KMT2A-MLLT10* estão associadas ao prognóstico desfavorável e, a alteração *KMT2A-MLLT3* está associada a uma taxa de sobrevida significativamente maior (BALGOBING *et al.*, 2009; NEUHOFF *et al.*, 2010; RUBNITZ *et al.*, 2002). A

estratificação dos rearranjos do *KMT2A* de acordo com o parceiro de fusão deve ser considerada em análises futuras.

As mutações em *PTPN11* foram associadas ao pior prognóstico. Esse dado não foi descrito em outros estudos. Ao revelar o padrão mutacional associado com as recaídas nas LMAs pediátricas, MASETTI *et al.* demonstraram que a mutação em *PTPN11* está envolvida com esse evento. Nós demonstramos que as mutações concomitantes também parecem estar associadas ao pior prognóstico. Não apenas a interação entre uma mutação e o microambiente tumoral, mas também a competição entre os subclones e a cinética de proliferação – somados à vantagem que a mutação confere – de cada um, são fundamentais para a evolução clonal e recaída (MASETTI *et al.*, 2016).

6.2. A LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA

As variações na prevalência e na ocorrência de determinadas alterações moleculares refletem a etiologia da doença. A alta frequência de LPA em pacientes de origem latina, descrita por esse e outros estudos (ZHANG *et al.*, 2015), pode estar relacionada às características étnicas e/ou a fatores de exposição ambiental distintos. Nós demonstramos frequências elevadas de LPA entre os casos de LMA, representando 19,9%. Frequências inferiores de LPA foram descritas para as populações europeia (4-11%)(ORTEGA *et al.*, 2005), norte americana (5-10%) (revisado em GREGORY; FEUSNER, 2009) e japonesa (8%) (HORIBE *et al.*, 2013). Registros hospitalares e de base populacional sugerem que a população latina apresenta maior proporção de LPA entre os diagnósticos de LMA, alcançando 37,5% (REGO; JÁCOMO, 2011). REGO e JÁCOMO relataram que as LPAs representam 28,2% dos casos de LMA no Brasil, frequência similar à obtida por MELO *et al.*, de 28% no Hemocentro de Recife, Pernambuco, e a dados de países latinos como México (20%), Venezuela (27,8%) e Peru (22%) (DE SALVO *et al.*, 1989; DOUER *et al.*, 1996; MELO *et al.*, 2006). Possivelmente, a alta frequência de LPA em pacientes latinos está relacionada às características étnicas e/ou a fatores de exposição ambiental distintos que refletem a frequência de LPA mais alta também em crianças (MENDES *et al.*, 2004).

Por apresentar uma forte relação entre genótipo e fenótipo, as LPAs e os casos com *PML-RAR α* são considerados uma única categoria na classificação da

OMS; >95% dos casos de LPA apresenta essa fusão gênica (ARBER *et al.*, 2016). Entretanto, por ser indicativa de terapia-alvo (ATRA), recomenda-se a identificação de *PML-RAR α* para diagnóstico e monitoramento de doença residual mínima. Nós observamos discordância do resultado pela RT-PCR e FISH em >50% dos casos, nos quais o transcrito de fusão não foi identificado pela RT-PCR. A RT-PCR é uma técnica sensível realizada a partir do RNA/cDNA. Por ser muito sensível ao tempo e a variações de temperatura, a qualidade do RNA diminui após 24h ou se a amostra de sangue for resfriada/congelada. Para o DNA, por exemplo, a qualidade só diminui após 15 dias (HUANG *et al.*, 2017). Uma vez que não temos controle sobre as variações de transporte e armazenamento das nossas amostras e, na maioria dos casos, a chegada demora >24h, esses fatos podem explicar a falha da RT-PCR para identificar o *PML-RAR α* . Essas divergências não foram observadas para as demais fusões gênicas, nas quais o resultado de FISH e RT-PCR foram concordantes.

A introdução do ATRA à terapia das LPAs revolucionou o manejo e a sobrevida desses pacientes, se tornando o primeiro paradigma para terapia alvo. Na nossa coorte, a sobrevida da LPA atingiu ~70%, o que é um bom indicador de sucesso quando comparado com os outros subtipos de LMA. Os pacientes tratados no Consórcio Internacional das Leucemias Agudas apresentam sobrevida >80% (revisado em REGO, 2017). Alguns fatores pontuados por Sanz *et al.* devem ser considerados nas análises de sobrevida das LPAs: as LPAs são doenças raras e a maioria dos pacientes é tratada em instituições com recursos limitados; as altas taxas de cura podem gerar uma sensação aparente de satisfação que pode subestimar a importância do manejo adequado das LPAs; e algumas questões do tratamento da LPA permanecem desconhecidas. A cura dos pacientes com LPA depende, não apenas da combinação efetiva da quimioterapia e terapia alvo, mas também do manejo das complicações associadas com esse subtipo particular. A suspeita de diagnóstico da LPA deve ser considerada uma emergência médica que requer uma ação simultânea incluindo o início imediato da terapia com ATRA, o diagnóstico molecular e o tratamento de coagulopatias (SANZ *et al.*, 2008).

As abordagens de NGS podem levar a descobertas de genes, até então, não associados à doença e a novas pistas para estudos futuros. Casos excepcionais fornecem muitas informações sobre a etiologia, que podem ser validadas e extrapoladas para os demais casos. Diversos trabalhos investigaram a origem intrauterina das leucemias a partir do estudo de gêmeos, que são um modelo único de investigação: os irmãos compartilham o mesmo ambiente intrauterino, a mesma

exposição pré-natal (que é muito semelhante também no período pós natal) e grande parte do seu conteúdo genético. Nós analisamos um conjunto de amostras de dois irmãos gêmeos: um que desenvolveu LPA aos 16 anos de idade e seu irmão gemelar sem doença.

Para a identificação das variantes germinativas na amostra leucêmica, nós realizamos o sequenciamento do exoma do DNA constitutivo do paciente, obtido na amostra do SP após remissão hematológica, representando o DNA germinativo do indivíduo. Apesar de não possuímos a informação se são gêmeos monozigóticos, esse é o primeiro estudo a descrever o perfil genômico da LPA pediátrica e as variantes germinativas possivelmente envolvidas na leucemogênese. O que também é intrigante é que a simplicidade genética da LPA em pacientes que não exibem mutações cooperativas ao *PML-RAR α* não explica a ocorrência de recaídas. Essa “simplicidade” reflete a presença de um evento genético marcador da doença que é alvo de terapia – e não a presença de poucas alterações na célula leucêmica. Nós identificamos mais de 20.000 variantes genéticas nas três amostras analisadas e especulamos que a maioria delas seja alteração “passageira” (*passenger*) ou sem efeito deletério; muitas alterações podem ser raramente recorrentes ou desempenhar um papel de significado incerto na leucemogênese.

Com o objetivo de realizar uma análise descritiva do panorama das principais variantes genéticas nas amostras, nós demonstramos que a cobertura do sequenciamento permite a comparação entre elas. Outros parâmetros são importantes para avaliar a qualidade do sequenciamento, como as razões Ti/Tv e NS/S. A transição é a transformação de uma base nitrogenada purina em outra purina ou pirimidina em outra pirimidina. A transição é a transformação de uma purina em pirimidina ou vice-versa. Para o WES de DNA humano, a razão Ti/Tv esperada é ~3,0 (BAINBRIDGE *et al.*, 2011). Com razões entre 3,02-3,04, esperamos poucos erros de sequenciamento. No espectro mutacional das LPAs, assim como nas LMAs, predominam as transições C>T (IBÁÑEZ *et al.*, 2016; MADAN *et al.*, 2016). A desaminação espontânea de citosinas metiladas em regiões codificantes podem ser responsáveis por essa associação (WELCH *et al.*, 2012). O estudo genômico de uma série de casos de LMA demonstrou um aumento na taxa de transversões nas amostras de recaída, como efeito da quimioterapia (DING *et al.*, 2012). Mais estudos são necessários para avaliar se essas características estão relacionadas aos efeitos tóxicos do tratamento.

Os *softwares* SIFT e PolyPhen predizem se uma substituição de aminoácidos afeta a função ou a estabilidade da proteína com base nas propriedades físicas dos aminoácidos e em uma comparação evolutiva e estrutural, podendo distinguir entre uma troca funcionalmente neutra e deletéria. A maioria das variações genéticas humanas é representada por SNPs que podem causar diferenças fenotípicas entre os indivíduos (ADZHUBEI; JORDAN; SUNYAEV, 2013; NG; HENIKOFF, 2003). Nós focamos as análises nas variantes não sinônimas, i.e., variações nos nucleotídeos localizadas em regiões codificantes que resultam em mudança de aminoácidos e afetam a proteína. As variantes sinônimas representaram 50% do total e, as missenses, 42,5% nas três amostras. De acordo com a predição do SIFT e PolyPhen, um terço das variantes apresentou impacto deletério para a proteína. Dois por cento das variantes com alto impacto divergiram nas amostras de remissão do paciente e do irmão, representando as possíveis variantes patogênicas associadas com o desenvolvimento da LPA.

Não podemos excluir a ocorrência de mutações em regiões não codificantes, uma vez que apesar de as sondas para captura e sequenciamento do exoma serem direcionadas para as regiões codificantes, regiões que flanqueiam os éxons também acabam sendo sequenciadas. Essas regiões, em geral, apresentam função regulatória e também podem levar a mudanças na proteína ou alterar a estabilidade do DNA.

Para descrever a paisagem genômica das LPAs e caracterizar as mutações que levaram a resistência ao tratamento, FASAN *et al.* investigaram alterações em 26 genes por meio de NGS. Cerca de 70% dos casos apresentaram pelo menos uma alteração adicional ao *PML-RAR α* , sendo a maioria delas, em *FLT3*. Nas amostras de recaída, os autores identificaram uma mudança no padrão de mutações sem, entretanto, uma evidência clara de um gene diretor (*driver*) capaz de prever a recaída (FASAN *et al.*, 2017). MADAN *et al.* sugeriram que *PML-RAR α* , sozinha, poderia ser suficiente para desenvolver a doença, agindo como um evento único (SANTOS; KATS; PANDOLFI, 2013). CERVERA *et al.* afirmam que esses achados podem estar mais relacionados ao conhecimento molecular gerado e às limitações metodológicas. As variantes em regiões não codificantes ou alterações estruturais não detectadas pelas abordagens convencionais poderiam explicar esses achados (CERVERA; SANZ, 2017). De fato, diferenças na chamada de variantes podem levar a resultados conflitantes (BODINI *et al.*, 2014).

Nas análises sítio-dirigidas, nós identificamos variantes deletérias pelo SIFT e PolyPhen em quatro genes: *ASXL1*, *BRCA1*, *FANCD1* e *FLT3*. De acordo com o ClinVar, as variantes em *ASXL1*, *BRCA1* e *FANCD1* são benignas. O ClinVar fornece uma interpretação da variante no contexto das doenças humanas, com uma análise baseada no dbSNP e com evidências que sustentam cada interpretação (LANDRUM *et al.*, 2013). A variante p.Thr227Met em *FLT3*, por sua vez, não possui seu impacto determinado pelo ClinVar. BODIAN *et al.* demonstraram que a frequência desse alelo variante de *FLT3* varia de acordo com a população e que, apesar de mutações nesse gene estarem associadas ao desenvolvimento do câncer e resposta ao tratamento, essa associação possivelmente apresenta pouco efeito (BODIAN *et al.*, 2014).

Em relação às variantes com genótipo discordante nas amostras, a variante p.Gln1383Glu em *ATG2B* não foi identificada na amostra tumoral (0/0) e foi heterozigota (0/1) nas amostras de remissão e do gêmeo sem doença. Esse resultado é esperado quando há perda de heterozigosidade e a variante deixa de ser identificada. *ATG2B* é expresso durante a hematopoiese mieloide e codifica uma proteína necessária para autofagia por meio da formação do autofagossomo. A duplicação germinativa da região 14q32.13-q32.2, que contém o gene *ATG2B*, está associada com a predisposição a malignidades mieloides (PLO; BELLANNÉ-CHANTELOT; VAINCHENKER, 2015). Por outro lado, a inibição da autofagia promove o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e de dano ao DNA, presumivelmente ativando vias celulares que bloqueiam diferenciação hematopoiética e transformam uma CTH normal em pré leucêmica. Esse estado pré leucêmico instável se tornaria favorável à transformação leucêmica por meio de alterações genéticas cooperativas, como *PML-RAR α* . Assim, a autofagia reduzida estabiliza as oncoproteínas de fusão (AUBERGER; PUISSANT, 2016). Uma análise exploratória dos dados precisa ser realizada para identificar as vias alteradas e o fator causal associado a *PML-RAR α* .

Os resultados mostrados são representativos das LMAs pediátricas; para as análises de sobrevida, variáveis dos protocolos de tratamento precisam ser consideradas para validar os nossos dados. Associar a epidemiologia molecular com os dados clínicos é um desafio recompensador ao revelar melhor prognóstico para determinados subtipos da doença e levantar questionamentos sobre estratégias para melhorar o prognóstico dos demais subtipos. Nem sempre a sobrevida está associada à biologia da doença: identificar as variáveis que interferem nessas

características é a primeira conduta necessária para beneficiar os pacientes e suas famílias. Como ilustrado aqui, a LMA pediátrica é uma doença heterogênea e complexa. Muito progresso foi feito para decifrar sua paisagem genômica. Nesse sentido, nós buscamos preencher algumas lacunas na literatura, em especial na coorte brasileira, que ajudam a entender a biologia da doença.

7. CONCLUSÕES

- A maioria dos casos com LMA-CBF (*RUNX1-RUNX1T1* e *CBF β -MYH11*) e LPA apresentou idade entre 5-15 anos;
- *KMT2A-r* foi associado com a idade ≤ 2 anos; os principais parceiros de fusão foram: *MLLT3*, *AFF1* e *MLLT10*;
- A presença das mutações tipo I foi associada com a idade ≥ 11 anos e alta leucometria;
- Os casos tratados nas regiões Norte/Nordeste e Centro Oeste apresentaram pSG menor que para os casos das regiões Sul/Sudeste;
- As LMAs-CBF demonstraram menor risco de óbito (prognóstico favorável) e os casos com mutações em *PTPN11* maior risco (prognóstico adverso);
- Entre os pacientes com idade ≤ 2 anos, as alterações *MYST3-CREBBP*, *RBM15-MKL1*, *NUP98-r* e *CBFA2T3-GLIS2* foram identificados em 1,7%, 1,1%, 3,9% e 0,6%;
- O percentual médio de variantes missenses e sinônimas identificadas no sequenciamento do exoma foi de 42,5% e 50,0%, respectivamente.
- Na análise pareada entre a amostra tumoral e a amostra do irmão sem doença, a maior parte das variantes foram SNVs e estava localizada nos cromossomos 19, 11 e 6;
- A maioria das variantes genéticas identificadas no sequenciamento do exoma era tolerada ou benigna;
- Uma análise exploratória do sequenciamento do exoma precisa ser realizada para a identificação de eventos leucemogênicos.

8. REFERÊNCIAS

ABRAHAMSSON, J. *et al.* Response-Guided Induction Therapy in Pediatric Acute Myeloid Leukemia With Excellent Remission Rate. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, p. 310–315, 1 jan. 2011.

ADJEI, A. A. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 14, p. 1062–1074, 18 jul. 2001.

ADZHUBEI, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nature methods**, v. 7, n. 4, p. 248–249, 1 abr. 2010.

ADZHUBEI, I.; JORDAN, D. M.; SUNYAEV, S. R. Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. **Current Protocols in Human Genetics**, v. 76, p. 7–20, 1 jan. 2013.

AKASHI, K. *et al.* A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. **Nature**, v. 404, p. 193–197, 1 mar. 2000.

ALBERTS B *et al.* Replicação do DNA, reparo e recombinação. Em: *Biologia Molecular da Célula*. 2ª Reimp. 4ª ed. São Paulo, Artmed, 235-298, 2006.

ALCALAY, M. *et al.* Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukemia lies within the retinoic acid receptor alpha locus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 1977–1981, 1 mar. 1991.

ALFORD, K. A. *et al.* Analysis of GATA1 mutations in Down syndrome transient myeloproliferative disorder and myeloid leukemia. **Blood**, v. 118, p. 2222–2238, 1 jun. 2011.

AL-KZAYER, L. F. Y. *et al.* Analysis of KRAS and NRAS Gene Mutations in Arab Asian Children With Acute Leukemia: High Frequency of RAS Mutations in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 62, p. 2157–2161, 1 jul. 2015.

ANDRADE, F. G. *et al.* RAS mutations in early age leukaemia modulated by NQO1 rs1800566 (C609T) are associated with second-hand smoking exposures. **BMC Cancer**, v. 14, 1 fev. 2014.

ANDRADE, F. G. *et al.* Identification of the MYST3-CREBBP fusion gene in infants with acute myeloid leukemia and hemophagocytosis. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, p. 291–297, 1 out. 2016a.

ANDRADE, F. G. *et al.* Molecular Characterization of Pediatric Acute Myeloid Leukemia: Results of a Multicentric Study in Brazil. **Archives of Medical Research**, v. 47, p. 656–667, 1 nov. 2016b.

ARBER, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, p. 2391–2405, 1 abr. 2016.

ARBER, D. A. *et al.* Initial Diagnostic Workup of Acute Leukemia: Guideline From the College of American Pathologists and the American Society of Hematology. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 141, p. 1342–1393, 1 out. 2017.

ARLT, M. F. *et al.* Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. **DNA repair**, v. 5, n. 9–10, p. 1126–1135, 8 set. 2006.

AUBERGER, P.; PUISSANT, A. Autophagy, a key mechanism of oncogenesis and resistance in leukemia. **Blood**, v. 129, p. 547–552, 1 dez. 2016.

BAINBRIDGE, M. N. *et al.* Targeted enrichment beyond the consensus coding DNA sequence exome reveals exons with higher variant densities. **Genome biology**, v. 12, n. 7, p. R68, 25 jul. 2011.

BALGOBIND, B. V. *et al.* Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. **Blood**, v. 114, p. 2489–2496, 1 jun. 2009.

BALGOBIND, B. V. *et al.* Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 96, p. 1478–1487, 1 jul. 2011.

BARABÉ, F. *et al.* Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. **Science (New York, N.Y.)**, v. 316, n. 5824, p. 600–604, 27 abr. 2007.

BARR, F. G. Translocations, cancer and the puzzle of specificity. **Nature genetics**, v. 19, n. 2, p. 121–124, 1 jun. 1998.

BARRINGTON-TRIMIS, J. L. *et al.* Trends in childhood leukemia incidence over two decades from 1992 to 2013. **International Journal of Cancer**, v. 140, p. 1000–1008, 1 nov. 2016.

BÉNÉ, M. C.; PORWIT, A. Acute leukemias of ambiguous lineage. **Seminars in diagnostic pathology**, v. 29, n. 1, p. 12–18, 1 fev. 2012.

BENNETT, J. M. *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **British journal of haematology**, v. 33, n. 4, p. 451–458, 1 ago. 1976.

BENNETT, J. M. *et al.* Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). **British journal of haematology**, v. 78, n. 3, p. 325–329, 1 jul. 1991.

BETTS, D. R. *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, n. 6, p. 468–476, 5 jun. 2007.

BIONDI, A. *et al.* Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. **Blood**, v. 96, n. 1, p. 24–33, 1 jul. 2000.

BISIO, V. *et al.* NUP98-fusion transcripts characterize different biological entities within acute myeloid leukemia: a report from the AIEOP-AML group. **Leukemia**, v. 31, p. 974–977, 1 nov. 2016.

BITTENCOURT, R. *et al.* Guidelines on the treatment of acute myeloid leukemia: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, p. 58–74, 1 jan. 2016.

BODIAN, D. L. *et al.* Germline Variation in Cancer-Susceptibility Genes in a Healthy, Ancestrally Diverse Cohort: Implications for Individual Genome Sequencing. **PLoS ONE**, v. 9, p. 94554, 1 abr. 2014.

BODINI, M. *et al.* The hidden genomic landscape of acute myeloid leukemia: subclonal structure revealed by undetected mutations. **Blood**, v. 125, p. 600–605, 1 dez. 2014.

BOLOURI, H. *et al.* The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia

reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. **Nature Medicine**, v. 24, p. 103–112, 1 dez. 2017.

BOYES, J. *et al.* Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. **Nature**, v. 396, n. 6711, p. 594–598, 10 dez. 1998.

BRAUN, B. S. *et al.* Somatic activation of oncogenic Kras in hematopoietic cells initiates a rapidly fatal myeloproliferative disorder. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 2, p. 597–602, 13 jan. 2004.

BROWN, D. *et al.* A PMLRARalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 6, p. 2551–2556, 18 mar. 1997.

BUENO, Filipe Vicente dos Santos. Identificação de mutações no gene PTPN11 nas neoplasias mieloides pediátricas. 2017. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

BUNTING, S. F.; NUSSENZWEIG, A. End-joining, translocations and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, p. 443–454, 1 jun. 2013.

BURG, M. VAN DER *et al.* Split-signal FISH for detection of chromosome aberrations in acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 18, p. 895–908, 1 mar. 2004.

BURMEISTER, T. *et al.* Evidence-based RT-PCR methods for the detection of the 8 most common MLL aberrations in acute leukemias. **Leukemia Research**, v. 39, p. 242–247, 1 fev. 2015.

CAMARGO, B. DE *et al.* Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: First report of 14 population-based cancer registries. **International Journal of Cancer**, v. 126, p. 715–720, 1 fev. 2010.

CAMÓS, M. *et al.* Gene expression profiling of acute myeloid leukemia with translocation t(8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement reveals a distinctive signature with a specific pattern of HOX gene expression. **Cancer research**, v. 66, n. 14, p. 6947–6954, 15 jul. 2006.

CAPELSON, M.; DOUCET, C.; HETZER, M. W. Nuclear Pore Complexes: Guardians

of the Nuclear Genome. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 75, p. 585–597, 1 jan. 2010.

CASTILLA, L. H. *et al.* Failure of Embryonic Hematopoiesis and Lethal Hemorrhages in Mouse Embryos Heterozygous for a Knocked-In Leukemia Gene Cbfb-MYH11. **Cell**, v. 87, p. 687–696, 1 nov. 1996.

CASTILLA, L. H. *et al.* The fusion gene Cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia. **Nature genetics**, v. 23, n. 2, p. 144–146, 1 out. 1999.

CEN, B. *et al.* Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 18, p. 6597–6608, 1 set. 2003.

CERVERA, J.; SANZ, M. A. Revealing the mutational landscape of acute promyelocytic leukemia. **Translational Cancer Research**, v. 6, p. 127, 1 fev. 2017.

CHAN, N. P. H. *et al.* Childhood acute myeloid leukemia with CBFbeta-MYH11 rearrangement: study of incidence, morphology, cytogenetics, and clinical outcomes of Chinese in Hong Kong. **American journal of hematology**, v. 76, n. 3, p. 300–303, 1 jul. 2004.

CHATEL, G.; FAHRENKROG, B. Dynamics and diverse functions of nuclear pore complex proteins. **Nucleus**, v. 3, p. 162–171, 1 mar. 2012.

CHAUDHURY, S. S. *et al.* Insights into cell ontogeny, age, and acute myeloid leukemia. **Experimental Hematology**, v. 43, p. 745–755, 1 set. 2015.

CHILDREN'S ONCOLOGY GROUP *et al.* Ethnicity and survival in childhood acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group. **Blood**, v. 108, n. 1, p. 74–80, 1 jul. 2006.

CHYLA, B. J. *et al.* Deletion of Mtg16, a Target of t(16;21), Alters Hematopoietic Progenitor Cell Proliferation and Lineage Allocation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, p. 6234–6247, 1 ago. 2008.

CIBULSKIS, K. *et al.* Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. **Nature Biotechnology**, v. 31, p. 213–219, 1 fev.

2013.

CLARKSON, B. POSSIBLE EXPLANATION OF THE HIGH CONCORDANCE FOR ACUTE LEUKEMIA IN MONOZYGOTIC TWINS. **The Lancet**, v. 297, p. 699–701, 1 abr. 1971.

CLASSEN, C. F. *et al.* Spontaneous complete and sustained remission of a rearrangement CBP (16p13)-positive disseminated congenital myelosarcoma. **Annals of hematology**, v. 84, n. 4, p. 274–275, 17 abr. 2005.

COENEN, E. A. *et al.* Pediatric acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13), a distinct clinical and biological entity: a collaborative study by the International-Berlin-Frankfurt-Munster AML-study group. **Blood**, v. 122, p. 2704–2713, 1 ago. 2013.

CORNELISSEN, J. J. *et al.* Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? **Blood**, v. 109, n. 9, p. 3658–3666, 1 maio 2007.

CORRAL, J. *et al.* Acute leukemias of different lineages have similar MLL gene fusions encoding related chimeric proteins resulting from chromosomal translocation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 18, p. 8538–8542, 15 set. 1993.

COUSTAN-SMITH, E. *et al.* Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet Oncology**, v. 10, p. 147–156, 1 fev. 2009.

COWELL, I. G.; AUSTIN, C. A. Do transcription factories and TOP2B provide a recipe for chromosome translocations in therapy-related leukemia? **Cell Cycle**, v. 11, p. 3143–3144, 1 set. 2012.

COZZIO, A. *et al.* Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. **Genes & development**, v. 17, n. 24, p. 3029–3035, 15 dez. 2003.

CREUTZIG, U. *et al.* Definition of a standard-risk group in children with AML. **British journal of haematology**, v. 104, n. 3, p. 630–639, 1 mar. 1999.

CREUTZIG, U. *et al.* Significance of age in acute myeloid leukemia patients younger than 30 years. **Cancer**, v. 112, p. 562–571, 1 fev. 2008.

CREUTZIG, U. *et al.* Favorable outcome in infants with AML after intensive first- and second-line treatment: an AML-BFM study group report. **Leukemia**, v. 26, p. 654–661, 1 out. 2011.

CREUTZIG, U. *et al.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. **Blood**, v. 120, p. 3187–3205, 1 ago. 2012.

CREUTZIG, U. *et al.* Changes in cytogenetics and molecular genetics in acute myeloid leukemia from childhood to adult age groups. **Cancer**, v. 122, p. 3821–3830, 1 ago. 2016.

DAMA, E. *et al.* Time trends and prognostic factors for survival from childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Registry of Piedmont (Italy). **European journal of pediatrics**, v. 165, n. 4, p. 240–249, 13 abr. 2006.

DASH, A.; GILLILAND, D. G. Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 14, p. 49–64, 1 mar. 2001.

DE SALVO, L. *et al.* [Acute promyelocytic leukemia in the west of Venezuela]. **Sangre**, v. 34, n. 5, p. 329–331, 1 out. 1989.

DE SOUZA REIS, R. *et al.* Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. **Pediatric blood & cancer**, v. 56, p. 58–64, 1 jan. 2011.

DE THÉ, H. *et al.* The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. **Nature**, v. 347, n. 6293, p. 558–561, 11 out. 1990.

DING, L. *et al.* Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 481, p. 506–510, 1 jan. 2012.

DINULOS, J. G. *et al.* Spontaneous remission of congenital leukemia. **The Journal of pediatrics**, v. 131, n. 2, p. 300–303, 1 ago. 1997.

DOBSON, C. L. The Mll-AF9 gene fusion in mice controls myeloproliferation and specifies acute myeloid leukaemogenesis. **The EMBO Journal**, v. 18, p. 3564–3574, 1 jul. 1999.

DOHNER, 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, 1 out. 2009.

DÖHNER, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. **Blood**, v. 129, n. 4, p. 424–447, 26 jan. 2017.

DOORN-KHOSROVANI, S. B. VAN W. VAN *et al.* Dietary flavonoids induce MLL translocations in primary human CD34⁺ cells. **Carcinogenesis**, v. 28, p. 1703–1709, 1 abr. 2007.

DORES, G. M. *et al.* Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. **Blood**, v. 119, p. 34–43, 1 nov. 2011.

DOUER, D. *et al.* High frequency of acute promyelocytic leukemia among Latinos with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 87, n. 1, p. 308–313, 1 jan. 1996.

DOULATOV, S. *et al.* Hematopoiesis: A Human Perspective. **Cell Stem Cell**, v. 10, p. 120–136, 1 fev. 2012.

DOWNING, J. R. *et al.* The Pediatric Cancer Genome Project. **Nature Genetics**, v. 44, p. 619–622, 1 jun. 2012.

DOWNING, J. R.; SHANNON, K. M. Acute leukemia: a pediatric perspective. **Cancer cell**, v. 2, n. 6, p. 437–445, 1 dez. 2002.

DUPLOYEZ, N. *et al.* Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2451–2459, 19 maio 2016.

EMERENCIANO, M. *et al.* Backtracking to birth of the NUP98-HOXD13 gene fusion in an infant acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 25, p. 1192–1194, 1 abr. 2011.

FARRAR, J. E. *et al.* Genomic Profiling of Pediatric Acute Myeloid Leukemia Reveals a Changing Mutational Landscape from Disease Diagnosis to Relapse. **Cancer**

Research, v. 76, p. 2197–2205, 1 mar. 2016.

FASAN, A. *et al.* Molecular landscape of acute promyelocytic leukemia at diagnosis and relapse. **Haematologica**, v. 102, p. 222, 1 mar. 2017.

FENSKI, R. *et al.* Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. **British journal of haematology**, v. 108, n. 2, p. 322–330, 1 fev. 2000.

FORD, A. M. *et al.* In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. **Nature**, v. 363, p. 358–360, 1 maio 1993.

GALE, K. B. *et al.* Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 25, p. 13950–13954, 9 dez. 1997.

GERMAIN, P. *et al.* International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 4, p. 712–725, 1 dez. 2006.

GERVAIS, C. *et al.* Acute myeloid leukaemia with 8p11 (MYST3) rearrangement: an integrated cytologic, cytogenetic and molecular study by the groupe francophone de cytogénétique hématologique. **Leukemia**, v. 22, p. 1567–1575, 1 jun. 2008.

GHANTOUS, A. *et al.* Optimized DNA extraction from neonatal dried blood spots: application in methylome profiling. **BMC Biotechnology**, v. 14, p. 60, 2013.

GILLILAND, D. G.; GRIFFIN, J. D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1532–1542, 1 set. 2002.

GILLILAND, D. G.; JORDAN, C. T.; FELIX, C. A. The molecular basis of leukemia. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 80–97, 2003.

GODLEY, L. A. Profiles in Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 366, p. 1152–1153, 1 mar. 2012.

GREAVES, M. F. *et al.* Leukemia in twins: lessons in natural history. **Blood**, v. 102, n. 7, p. 2321–2333, 1 out. 2003.

GREAVES, M. F.; WIEMELS, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 9, p. 639–649, 1 set. 2003.

GREAVES, M.; MALEY, C. C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, v. 481, p. 306–313, 1 jan. 2012.

GREEN, C. L. *et al.* Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 16, p. 2739–2747, 1 jun. 2010.

GREGORY, J.; FEUSNER, J. Acute promyelocytic leukemia in childhood. **Current oncology reports**, v. 11, n. 6, p. 439–445, 1 nov. 2009.

GRIGNANI, F. *et al.* Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 815–818, 19 fev. 1998.

GRIMWADE, D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 14, p. 497–529, 1 set. 2001.

GRIMWADE, D. *et al.* Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. **Blood**, v. 116, p. 354–365, 1 abr. 2010.

GRUBER, T. A. *et al.* An Inv(16)(p13.3q24.3)-Encoded CBFA2T3-GLIS2 Fusion Protein Defines an Aggressive Subtype of Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia. **Cancer Cell**, v. 22, p. 683–697, 1 nov. 2012.

GU, W.; ROEDER, R. G. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. **Cell**, v. 90, n. 4, p. 595–606, 22 ago. 1997.

HAFERLACH, T. *et al.* AML with translocation t(8;16)(p11;p13) demonstrates unique cytomorphological, cytogenetic, molecular and prognostic features. **Leukemia**, v. 23, p. 934–943, 1 fev. 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 1 mar. 2011a.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011b.

HARRISON, C. J. *et al.* Cytogenetics of Childhood Acute Myeloid Leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment Trials AML 10 and 12. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, p. 2674–2681, 1 jun. 2010.

HAYAKAWA, F. *et al.* Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. **Oncogene**, v. 19, n. 5, p. 624–631, 3 fev. 2000.

HE, L.-Z. *et al.* Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RAR transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 5302–5307, 1 maio 1997.

HIGUCHI, M. *et al.* Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. **Cancer cell**, v. 1, n. 1, p. 63–74, 1 fev. 2002.

HILLESTAD, L. K. Acute promyelocytic leukemia. **Acta medica Scandinavica**, v. 159, n. 3, p. 189–194, 29 nov. 1957.

HO, P. A. *et al.* Prevalence and prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children's Oncology Group. **Blood**, v. 113, n. 26, p. 6558–6566, 25 jun. 2009.

HO, P. A. *et al.* Leukemic mutations in the methylation-associated genes DNMT3A and IDH2 are rare events in pediatric AML: A report from the Children's Oncology Group. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 57, p. 204–209, 1 abr. 2011.

HOLLINK, I. H. I. M. *et al.* Favorable prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. **Leukemia**, v. 23, n. 2, p. 262–270, 20 fev. 2009.

HOLLINK, I. H. I. M. *et al.* NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group

in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. **Blood**, v. 118, p. 3645–3656, 1 ago. 2011.

HORIBE, K. *et al.* Incidence and survival rates of hematological malignancies in Japanese children and adolescents (2006-2010): based on registry data from the Japanese Society of Pediatric Hematology. **International journal of hematology**, v. 98, n. 1, p. 74–88, 24 jul. 2013.

HUANG, L.-H. *et al.* The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. **PLOS ONE**, v. 12, p. 0184692, 1 set. 2017.

HUANG, M. E. *et al.* Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 72, n. 2, p. 567–572, 1 ago. 1988.

HUETHER, R. *et al.* The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer genomes. **Nature Communications**, v. 5, 1 abr. 2014.

HUNGER, S. P. *et al.* Oncogenesis in utero: fetal death due to acute myelogenous leukaemia with an MLL translocation. **British Journal of Haematology**, v. 103, p. 539–542, 1 nov. 1998.

IBÁÑEZ, M. *et al.* The Mutational Landscape of Acute Promyelocytic Leukemia Reveals an Interacting Network of Co-Occurrences and Recurrent Mutations. **PLOS ONE**, v. 11, p. 0148346, 1 fev. 2016.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: Inca, 2016.

ITZYKSON, R. *et al.* Clonal interference of signaling mutations worsens prognosis in core-binding factor acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 132, p. 187–196, 1 abr. 2018.

JAISSWAL, S. *et al.* Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. **New England Journal of Medicine**, v. 371, p. 2488–2498, 1 dez. 2014.

JOANNIDES, M.; GRIMWADE, D. Molecular biology of therapy-related leukaemias.

Clinical and Translational Oncology, v. 12, p. 8–14, 1 jan. 2010.

KAATSCH, P. Epidemiology of childhood cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 36, p. 277–285, 1 jun. 2010.

KATSUMOTO, T. *et al.* MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. **Genes & development**, v. 20, n. 10, p. 1321–1330, 15 maio 2006.

KELLY, L. M.; GILLILAND, D. G. Genetics of myeloid leukemias. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 3, p. 179–198, 1 set. 2002.

KERN, W. *et al.* Prognosis in therapy-related acute myeloid leukemia and impact of karyotype. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 22, n. 12, p. 2510–2511, 15 jun. 2004.

KITABAYASHI, I. Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. **The EMBO Journal**, v. 17, p. 2994–3004, 1 jun. 1998.

KITABAYASHI, I. Activation of AML1-mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ-CBP fusion protein. **The EMBO Journal**, v. 20, p. 7184–7196, 1 dez. 2001.

KIYOI, H. *et al.* Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. **Leukemia**, v. 12, n. 9, p. 1333–1337, 1 set. 1998.

KOHL, T. M. *et al.* KIT exon 8 mutations associated with core-binding factor (CBF)-acute myeloid leukemia (AML) cause hyperactivation of the receptor in response to stem cell factor. **Blood**, v. 105, n. 8, p. 3319–3321, 15 abr. 2005.

KONDO, M.; WEISSMAN, I. L.; AKASHI, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. **Cell**, v. 91, n. 5, p. 661–672, 28 nov. 1997.

KONOPLEVA, M. Y.; JORDAN, C. T. Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 29, n. 5, p. 591–599, 10 fev. 2011.

KRZYWINSKI, M. *et al.* Circos: An information aesthetic for comparative genomics. **Genome Research**, v. 19, p. 1639–1645, 1 jun. 2009.

KUMAR, P.; HENIKOFF, S.; NG, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. **Nature Protocols**, v. 4, p. 1073–1081, 1 jun. 2009.

LANDRUM, M. J. *et al.* ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 980, 1 nov. 2013.

LENGAUER, C. How do tumors make ends meet? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 22, p. 12331–12333, 23 out. 2001.

LENNARTSSON, J. *et al.* Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 23, n. 1, p. 16–43, 2004.

LEVIS, M. Midostaurin approved for FLT3-mutated AML. **Blood**, v. 129, p. 3403–3406, 1 maio 2017.

LEY, T. J. *et al.* DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 363, p. 2424–2433, 1 dez. 2010.

LI, J. *et al.* Cancer incidence among children and adolescents in the United States, 2001-2003. **Pediatrics**, v. 121, n. 6, p. e1470–e1477, 1 jun. 2008.

LIANG, D.-C. *et al.* Cooperating gene mutations in childhood acute myeloid leukemia with special reference on mutations of ASXL1, TET2, IDH1, IDH2, and DNMT3A. **Blood**, v. 121, p. 2988–2995, 1 jan. 2013.

LIEBER, M. R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. **Annual review of biochemistry**, v. 79, p. 181–211, 2009.

LINABERY, A. M.; ROSS, J. A. Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992–2004). **Cancer**, v. 112, p. 416–432, 2007.

LIU, H. *et al.* Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class

III receptor tyrosine kinases. **The EMBO journal**, v. 26, n. 3, p. 891–901, 7 fev. 2007.

LOH, M. L. *et al.* PTPN11 mutations in pediatric patients with acute myeloid leukemia: results from the Children's Cancer Group. **Leukemia**, v. 18, p. 1831–1834, 1 set. 2004.

LOPEZ-LAZARO, M. *et al.* Green tea constituents (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and gallic acid induce topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells mediated by pyrogallol-induced hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v. 26, p. 489–498, 1 mar. 2011.

LÓPEZ-LÁZARO, M.; WILLMORE, E.; AUSTIN, C. A. The dietary flavonoids myricetin and fisetin act as dual inhibitors of DNA topoisomerases I and II in cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 696, p. 41–47, 1 fev. 2010.

MADAN, V. *et al.* Comprehensive mutational analysis of primary and relapse acute promyelocytic leukemia. **Leukemia**, v. 30, p. 1672–1681, 1 abr. 2016.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. RAS oncogenes: the first 30 years. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 6, p. 459–465, 1 jun. 2003.

MANOLA, K. N. Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia. **European journal of haematology**, v. 83, n. 5, p. 391–405, 25 nov. 2009.

MASETTI, R. *et al.* CBFA2T3-GLIS2 fusion transcript is a novel common feature in pediatric, cytogenetically normal AML, not restricted to FAB M7 subtype. **Blood**, v. 121, p. 3469–3472, 1 fev. 2013.

MASETTI, R. *et al.* Genomic complexity and dynamics of clonal evolution in childhood acute myeloid leukemia studied with whole-exome sequencing. **Oncotarget**, v. 7, n. 35, p. 56746–56757, 30 ago. 2016.

MATUTES, E. *et al.* Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. **Blood**, v. 117, p. 3163–3171, 1 jan. 2011.

MAURITZSON, N. *et al.* Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and de novo adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic

syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001. **Leukemia**, v. 16, n. 12, p. 2366–2378, 1 dez. 2002.

MCHALE, C. M. *et al.* Prenatal origin of childhood acute myeloid leukemias harboring chromosomal rearrangements t(15;17) and inv(16). **Blood**, v. 101, n. 11, p. 4640–4641, 1 jun. 2003.

MEABURN, K. J.; MISTELI, T.; SOUTOGLOU, E. Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. **Seminars in cancer biology**, v. 17, n. 1, p. 80–90, 26 fev. 2007.

MEJSTRIKOVA, E. *et al.* Prognosis of children with mixed phenotype acute leukemia treated on the basis of consistent immunophenotypic criteria. **Haematologica**, v. 95, p. 928–935, 1 fev. 2010.

MELO, R. A. M. *et al.* PML-RARalpha fusion gene transcripts and biological features in acute promyelocytic leukemia patients. **Clinical and laboratory haematology**, v. 28, n. 2, p. 126–129, 1 abr. 2006.

MENDES, W. L. *et al.* The apparent excess of acute promyelocytic leukemia in infant acute leukemias in Brazil. **Haematologica**, v. 89, n. 11, p. ELT16, 1 nov. 2004.

MESHINCHI, S. *et al.* Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 97, n. 1, p. 89–94, 1 jan. 2001.

MESHINCHI, S. *et al.* Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. **Blood**, v. 108, n. 12, p. 3654–3661, 1 dez. 2006.

MEYER, C. *et al.* Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 449–454, 1 dez. 2004.

MEYER, C. *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. **Leukemia**, v. 27, n. 11, p. 2165–2176, 30 nov. 2013.

MEYER, C. *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. **Leukemia**, v. 32, p. 273–284, 1 jul. 2017.

MISTELLI, T. Higher-order Genome Organization in Human Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, p. 000794, 1 jun. 2010.

MORI, H. *et al.* Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 12, p. 8242–8247, 11 jun. 2002.

MOURA, S. V. *et al.* Clinical and molecular epidemiology of neonatal leukemia in Brazil. **Leukemia & Lymphoma**, v. 56, p. 903–909, 1 jan. 2015.

MUINDI, J. *et al.* Continuous treatment with all-trans retinoic acid causes a progressive reduction in plasma drug concentrations: implications for relapse and retinoid “resistance” in patients with acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 79, n. 2, p. 299–303, 15 jan. 1992.

NAKAO, M. *et al.* Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 10, n. 12, p. 1911–1918, 1 dez. 1996.

NAMBIAR, M.; KARI, V.; RAGHAVAN, S. C. Chromosomal translocations in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1786, p. 139–152, 1 dez. 2008.

NAMBIAR, M.; RAGHAVAN, S. C. How does DNA break during chromosomal translocations? **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 5813–5825, 1 abr. 2011.

NEUHOFF, C. VON *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. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, p. 2682–2689, 1 jun. 2010.

NG, P. C.; HENIKOFF, S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 13, p. 3812–3814, 1 jul. 2003.

NICKELS, E. M. *et al.* Recognizing familial myeloid leukemia in adults. **Therapeutic Advances in Hematology**, v. 4, p. 254–269, 1 maio 2013.

NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 338–350, 1 abr. 2009.

OANCEA, C. *et al.* The t(6;9) associated DEK/CAN fusion protein targets a population of long-term repopulating hematopoietic stem cells for leukemogenic transformation. **Leukemia**, v. 24, p. 1910–1919, 1 set. 2010.

ORTEGA, J. J. *et al.* Treatment with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy for children with acute promyelocytic leukemia: a multicenter study by the PETHEMA Group. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 30, p. 7632–7640, 20 out. 2005.

PAGNANO, K. B. B. *et al.* Guidelines on the diagnosis and treatment for acute promyelocytic leukemia: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular Guidelines Project: Associação Médica Brasileira - 2013. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 36, p. 71–89, 1 jan. 2014.

PAPAEMMANUIL, E. *et al.* Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 374, p. 2209–2221, 1 jun. 2016.

PARK, J. H. *et al.* Early death rate in acute promyelocytic leukemia remains high despite all-trans retinoic acid. **Blood**, v. 118, p. 1248–1254, 1 jun. 2011.

PASCHKA, P. Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia. **Seminars in Oncology**, v. 35, p. 410–417, 1 ago. 2008.

PENA, S. D. J. *et al.* The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. **PLoS ONE**, v. 6, p. 17063, 1 fev. 2011.

PENDLETON, M. *et al.* Topoisomerase II and leukemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1310, p. 98–110, 1 fev. 2014.

PLO, I.; BELLANNÉ-CHANTELOT, C.; VAINCHENKER, W. ATG2B and GSKIP: 2 new genes predisposing to myeloid malignancies. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 3, p. 1094564, 1 out. 2015.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. *et al.* Early-age Acute Leukemia: Revisiting Two Decades of the Brazilian Collaborative Study Group. **Archives of Medical Research**, v. 47, p. 593–606, 1 nov. 2016.

PUI, C. H. *et al.* Prognostic factors in infants with acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 14, n. 4, p. 684–687, 1 abr. 2000.

PUI, C.-H. *et al.* Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 29, n. 5, p. 551–565, 10 fev. 2011.

PURI, P.; WALKER, W. H. The regulation of male fertility by the PTPN11 tyrosine phosphatase. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 59, p. 27–34, 1 nov. 2016.

RADHI, M.; MESHINCHI, S.; GAMIS, A. Prognostic Factors in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 5, p. 200–206, 1 jul. 2010.

RADTKE, I. *et al.* Genomic analysis reveals few genetic alterations in pediatric acute myeloid leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 12944–12949, 1 jul. 2009.

RAFFINI, L. J. *et al.* Panhandle and reverse-panhandle PCR enable cloning of der(11) and der(other) genomic breakpoint junctions of MLL translocations and identify complex translocation of MLL, AF-4, and CDK6. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 7, p. 4568–4573, 2 abr. 2002.

RASCHE, M. *et al.* Successes and challenges in the treatment of pediatric acute myeloid leukemia: a retrospective analysis of the AML-BFM trials from 1987 to 2012. **Leukemia**, 22 fev. 2018.

RAVANDI, F.; STONE, R. Acute Promyelocytic Leukemia: A Perspective. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 17, p. 543–544, 1 set. 2017.

RAVINDRANATH, Y. *et al.* Pediatric Oncology Group (POG) studies of acute myeloid leukemia (AML): a review of four consecutive childhood AML trials conducted between 1981 and 2000. **Leukemia**, v. 19, n. 12, p. 2101–2116, 1 dez. 2005.

REGO, E. M. Impact of the ICAL on the treatment of acute leukemia: **Blood Advances**, v. 1, p. 516–516, 1 mar. 2017.

REGO, E. M.; JÁCOMO, R. H. Epidemiology and treatment of acute promyelocytic leukemia in latin america. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, v. 3, n. 1, p. e2011049, 24 out. 2011.

REIS, R. DE S. *et al.* Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 56, p. 58–64, 1 nov. 2010.

ROMANA, S. P. *et al.* NUP98 rearrangements in hematopoietic malignancies: a study of the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique. **Leukemia**, v. 20, p. 696–706, 1 fev. 2006.

ROOIJ, J. D. E. DE *et al.* NUP98/JARID1A is a novel recurrent abnormality in pediatric acute megakaryoblastic leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. **Leukemia**, v. 27, p. 2280–2288, 1 mar. 2013.

ROSS, J. A. Dietary flavonoids and the MLL gene: A pathway to infant leukemia? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 9, p. 4411–4413, 25 abr. 2000.

ROSS, J. A. Environmental and Genetic Susceptibility to MLL-Defined Infant Leukemia. **JNCI Monographs**, v. 2008, p. 83–86, 1 jul. 2008.

ROWLEY, J. D. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. **Annual Review of Genetics**, v. 32, p. 495–519, 1 dez. 1998.

RUBNITZ, J. E. How I treat pediatric acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 119, n. 25, p. 5980–5988, 21 jun. 2012.

RUBNITZ, J. E. Current Management of Childhood Acute Myeloid Leukemia. **Paediatric drugs**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 1 fev. 2017.

RUBNITZ, J. E.; INABA, H. Childhood acute myeloid leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 159, p. 259–276, 1 set. 2012.

SABNIS, A. J. *et al.* Oncogenic Kras initiates leukemia in hematopoietic stem cells. **PLoS biology**, v. 7, n. 3, p. e59, 17 mar. 2009.

SANDAHL, J. D. *et al.* t(6;9)(p22;q34)/DEK-NUP214-rearranged pediatric myeloid leukemia: an international study of 62 patients. **Haematologica**, v. 99, p. 865–872, 1

jan. 2014.

SANO, H. *et al.* RAS mutations are frequent in FAB type M4 and M5 of acute myeloid leukemia, and related to late relapse: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. **International Journal of Hematology**, v. 95, p. 509–515, 1 mar. 2012.

SANTOS, G. A. DOS; KATS, L.; PANDOLFI, P. P. Synergy against PML-RAR α : targeting transcription, proteolysis, differentiation, and self-renewal in acute promyelocytic leukemia. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, p. 2793–2802, 1 dez. 2013.

SANZ, M. A. *et al.* Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 113, p. 1875–1891, 1 set. 2008.

SCHLENK, R. F. *et al.* Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 358, n. 18, p. 1909–1918, 1 maio 2008.

SCHMIDT, H. H. *et al.* RT-PCR and FISH analysis of acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;13) and chimeric MOZ and CBP transcripts: breakpoint cluster region and clinical implications. **Leukemia**, v. 18, p. 1115–1121, 1 abr. 2004.

SCHNEIDAWIND, C. *et al.* MLL leukemia induction by t(9;11) chromosomal translocation in human hematopoietic stem cells using genome editing. **Blood Advances**, v. 2, p. 832–845, 1 abr. 2018.

SCHNEIDER, F. *et al.* Age-dependent frequencies of NPM1 mutations and FLT3-ITD in patients with normal karyotype AML (NK-AML). **Annals of hematology**, v. 91, n. 1, p. 9–18, 9 jan. 2012.

SCHNITTGER, S. *et al.* Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. **Blood**, v. 100, n. 1, p. 59–66, 1 jul. 2002.

SCHUBACK, H. L.; ARCECI, R. J.; MESHINCHI, S. Somatic Characterization of

Pediatric Acute Myeloid Leukemia Using Next-Generation Sequencing. **Seminars in Hematology**, v. 50, p. 325–332, 1 out. 2013.

SCHUBBERT, S.; SHANNON, K.; BOLLAG, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 4, p. 295–308, 1 abr. 2007.

SCHWEITZER, J. *et al.* Improved outcome of pediatric patients with acute megakaryoblastic leukemia in the AML-BFM 04 trial. **Annals of Hematology**, v. 94, p. 1327–1336, 1 abr. 2015.

SEXAUER, A. N.; TASIAN, S. K. Targeting FLT3 Signaling in Childhood Acute Myeloid Leukemia. **Frontiers in Pediatrics**, v. 5, 1 nov. 2017.

SHEN, Z. X. *et al.* Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. **Blood**, v. 89, n. 9, p. 3354–3360, 1 maio 1997.

SHENDURE, J. Next-generation human genetics. **Genome Biology**, v. 12, p. 408, 2010.

SHIBA, N. *et al.* NUP98-NSD1 gene fusion and its related gene expression signature are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 52, n. 7, p. 683–693, 30 jul. 2013.

SMITH, C. E.; LLORENTE, B.; SYMINGTON, L. S. Template switching during break-induced replication. **Nature**, v. 447, n. 7140, p. 102–105, 3 maio 2007.

SONG, T. Y. *et al.* Improvement of treatment outcome over 2 decades in children with acute myeloid leukemia. **Blood Research**, v. 53, p. 25, 2017.

STARK, B. *et al.* Classical and molecular cytogenetic abnormalities and outcome of childhood acute myeloid leukaemia: report from a referral centre in Israel. **British Journal of Haematology**, v. 126, p. 320–337, 1 ago. 2004.

STIEGLITZ, E. *et al.* The genomic landscape of juvenile myelomonocytic leukemia. **Nature Genetics**, v. 47, p. 1326–1333, 1 out. 2015.

STRATTON, M. R. Exploring the Genomes of Cancer Cells: Progress and Promise. **Science**, v. 331, p. 1553–1558, 1 mar. 2011.

STUCKI, A. *et al.* Endothelial cell activation by myeloblasts: molecular mechanisms of leukostasis and leukemic cell dissemination. **Blood**, v. 97, n. 7, p. 2121–2129, 1 abr. 2001.

TAKEDA, A.; YASEEN, N. R. Nucleoporins and nucleocytoplasmic transport in hematologic malignancies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 27, p. 3–10, 1 ago. 2014.

TAKEDA, S. Proteolysis of MLL family proteins is essential for Taspase1-orchestrated cell cycle progression. **Genes & Development**, v. 20, p. 2397–2409, 1 set. 2006.

TARLOCK, K.; MESHINCHI, S. Pediatric Acute Myeloid Leukemia. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, p. 75–93, 1 fev. 2015.

TARTAGLIA, M. Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia. **Blood**, v. 104, p. 307–313, 1 jul. 2004.

TASKESEN, E. *et al.* Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. **Blood**, v. 117, n. 8, p. 2469–2475, 24 fev. 2011.

TENEN, D. G. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 2, p. 89–101, 1 fev. 2003.

TESTA, U.; LO-COCO, F. Prognostic factors in acute promyelocytic leukemia: strategies to define high-risk patients. **Annals of Hematology**, v. 95, p. 673–680, 1 fev. 2016.

TESTI, A. M.; LOCOCO, F. Acute promyelocytic leukemia (APL): comparison between children and adults. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 6, p. 2014032, 1 abr. 2014.

THÉ, H. DE. Differentiation therapy revisited. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, p. 117–127, 1 dez. 2017.

THIEDE, C. *et al.* Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485

adult patients with acute myeloid leukemia (AML). **Blood**, v. 107, n. 10, p. 4011–4020, 15 maio 2006.

THOL, F. *et al.* DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 96, n. 8, p. 1238–1240, 17 ago. 2011.

THULER, L. C. S.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. Acute promyelocytic leukaemia is highly frequent among acute myeloid leukaemias in Brazil: a hospital-based cancer registry study from 2001 to 2012. **Annals of Hematology**, v. 96, p. 355–362, 1 out. 2016.

TIDYMAN, W. E.; RAUEN, K. A. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. **Current opinion in genetics & development**, v. 19, n. 3, p. 230–236, 19 jun. 2009.

TORRES, L. *et al.* Acute megakaryoblastic leukemia with a four-way variant translocation originating the RBM15-MKL1 fusion gene. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 56, p. 846–849, 1 jan. 2011.

TURNER, A. M. *et al.* Identification and characterization of a soluble c-kit receptor produced by human hematopoietic cell lines. **Blood**, v. 85, n. 8, p. 2052–2058, 15 abr. 1995.

VALSECCHI, M. G.; STELIAROVA-FOUCHER, E. Cancer registration in developing countries: luxury or necessity? **The Lancet. Oncology**, v. 9, n. 2, p. 159–167, 1 fev. 2008.

VAN DER AUWERA, G. A. *et al.* From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. **Current protocols in bioinformatics**, v. 43, p. 11.10.1-11.1033, 2012.

VAN DONGEN, J. J. *et al.* Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. **Leukemia**, v. 13, n. 12, p. 1901–1928, 1 dez. 1999.

VARDIMAN, J. W. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood**, v. 100, p. 2292–2302, 1 jun. 2002.

VARDIMAN, J. W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, p. 937–951, 1 abr. 2009.

VARDIMAN, J. W. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, p. 16–20, 1 mar. 2010.

VARDIMAN, J. W.; HARRIS, N. L.; BRUNNING, R. D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood**, v. 100, n. 7, p. 2292–2302, 1 out. 2002.

VOGELSTEIN, B. *et al.* Cancer Genome Landscapes. **Science**, v. 339, p. 1546–1558, 1 mar. 2013.

WANDZIOCH, E. *et al.* Activation of the MAP kinase pathway by c-Kit is PI-3 kinase dependent in hematopoietic progenitor/stem cell lines. **Blood**, v. 104, n. 1, p. 51–57, 1 jul. 2004.

WARD, E. *et al.* Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 2, p. 83–103, 1 maio 2014.

WEINBERG, O. K.; ARBER, D. A. Mixed-phenotype acute leukemia: historical overview and a new definition. **Leukemia**, v. 24, p. 1844–1851, 1 set. 2010.

WELCH, J. S. *et al.* The Origin and Evolution of Mutations in Acute Myeloid Leukemia. **Cell**, v. 150, p. 264–278, 1 jul. 2012.

WELLS, R. J. *et al.* Prognostic variables in newly diagnosed children and adolescents with acute myeloid leukemia: Children's Cancer Group Study 213. **Leukemia**, v. 16, n. 4, p. 601–607, 1 abr. 2002.

WHITEHEAD, T. P. *et al.* Childhood Leukemia and Primary Prevention. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 46, p. 317–352, 1 out. 2016.

WIANGNON, S. *et al.* Childhood cancer incidence and survival 2003-2005, Thailand: study from the Thai Pediatric Oncology Group. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 12, n. 9, p. 2215–2220, 2010.

WIEMELS, J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. **Chemico-biological interactions**, v. 196, n. 3, p. 59–67, 5 abr. 2012.

WIEMELS, J. L. *et al.* In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3801–3805, 15 maio 2002.

WOLFF, D. J. *et al.* Guidance for Fluorescence in Situ Hybridization Testing in Hematologic Disorders. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 9, p. 134–143, 1 abr. 2007.

WOLMAN, I. J. Parallel responses to chemotherapy in identical twin infants with concordant leukemia. **The Journal of pediatrics**, v. 60, p. 91–95, 1 jan. 1962.

WONG, K.-F. *et al.* t(8;16)(p11;p13) predisposes to a transient but potentially recurring neonatal leukemia. **Human Pathology**, v. 39, p. 1702–1707, 1 nov. 2008.

XIE, M. *et al.* Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. **Nature Medicine**, v. 20, p. 1472–1478, 1 out. 2014.

XU, X.-J. *et al.* Long-term outcome of childhood acute myeloid leukemia in a developing country: experience from a children's hospital in China. **Leukemia & lymphoma**, v. 51, n. 12, p. 2262–2269, 7 dez. 2010.

YAMAMOTO, Y. *et al.* Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. **Blood**, v. 97, n. 8, p. 2434–2439, 15 abr. 2001.

YATSENKO, Y. *et al.* NPM1, FLT3, and c-KIT mutations in pediatric acute myeloid leukemia in Russian population. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 35, n. 3, p. e100–e108, 1 abr. 2013.

YUAN, Y. *et al.* AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 18, p. 10398–10403, 28 ago. 2001.

ZAGO MA; FALCÃO RP; PASQUINI R. Hematopoese. Regulação e Microambiente. Em: Hematologia Fundamentos e Prática. 2ª Reimp. 1ª ed. São Paulo, Atheneu, 15-73, 2004.

ZAKER, F.; MOHAMMADZADEH, M.; MOHAMMADI, M. Detection of KIT and FLT3 mutations in acute myeloid leukemia with different subtypes. **Archives of Iranian medicine**, v. 13, n. 1, p. 21–25, 1 jan. 2010.

ZHANG, L. *et al.* Global characteristics of childhood acute promyelocytic leukemia. **Blood Reviews**, v. 29, p. 101–125, 1 mar. 2015.

ZHOU, Z. *et al.* Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. **Nature**, v. 419, n. 6903, p. 182–185, 12 set. 2002.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO A. Ficha de encaminhamento dos pacientes

| | | | |
|--|-----------|-----------------------------------|----------------|
| Número da Requisição | | Status | |
| Nº Entrada | | Ano | Index |
| Dados do Paciente | | | |
| Nome Paciente | | | |
| Nome da Mãe | | | |
| Identificação da Mãe | | | |
| Nome do Pai | | | |
| Data nascimento | | | Idade |
| Data diagnóstico | | Sexo | Cor |
| Registro Hospitalar | | | |
| Síndrome Down | | | |
| Outras Síndromes Genéticas | | | |
| Estado Residência | | Município Residência | |
| Região Residência | | | |
| Estado Naturalidade | | Município Naturalidade | |
| Dados da Instituição/Médico | | | |
| Instituição | UF | | |
| Médico | | | |
| Dados Clínicos | | | |
| Suspeita Diagnóstica | | | |
| Tratamento Utilizado | | | |
| Outras Informações Clínicas | | | |
| Baço | | | |
| Fígado | | | |
| Linfonodos | | | |
| Tumoração | | | |
| Sistema Nervoso Central Comprometido | | | |
| Alargamento de Mediastino | | | |
| Medicamentos sendo usados pelo paciente | | | |
| Uso Prévio de Corticóide | | | |
| Tem irmã(o) gemelar? | | | |
| Tem irmã(o) não gemelar ou primo de 1º grau com câncer? | | | |
| Dados Laboratoriais | | | |
| Leucometria | | Hematócrito | |
| Hemoglobina | | Plaquetas | |
| Blastos | | | |
| Dados da Amostra | | | |
| Amostra Enviada | | | |
| Sangue Periférico: | | Anticoagulante: | Outros: |
| Medula Óssea: | | Anticoagulante: | |
| Lâminas Medula Óssea: | | Lâminas Sangue Periférico: | |
| Motivo da Coleta | | | |
| Diagnóstico: | | Recaída: | DRM: |
| Amostra da Mãe: | | Outros: | |
| Data da Coleta | | Observação | |

9.2. ANEXO B. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer



INSTITUTO NACIONAL DE
CÂNCER/ INCA/ RJ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ALTERAÇÕES IMUNO-MOLECULARES NAS LEUCEMIAS MIELÓIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS: INTERAÇÃO ENTRE MUTAÇÕES SOMÁTICAS E FATORES DE RISCOS ETIOPATOLÓGICOS.

Pesquisador: Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 05241112.5.1001.5274

Instituição Proponente: Coordenação de Pesquisa

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 186.688

Data da Relatoria: 18/02/2013

Apresentação do Projeto:

O presente Projeto de Pesquisa já recebeu os Pareceres Consubstanciados números 145.293, de 12/11/2012 e 181.940, de 20/01/2013.

Objetivo da Pesquisa:

O presente Projeto de Pesquisa já recebeu os Pareceres Consubstanciados números 145.293, de 12/11/2012 e 181.940, de 20/01/2013.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O presente Projeto de Pesquisa já recebeu os Pareceres Consubstanciados números 145.293, de 12/11/2012 e 181.940, de 20/01/2013.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente Projeto de Pesquisa já recebeu os Pareceres Consubstanciados números 145.293, de 12/11/2012 e 181.940, de 20/01/2013.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Foram apresentados os documentos adequadamente. Em relação aos TCLE, todos foram dirigidos adequadamente aos pais como responsáveis pelos menores de 12 anos e aos adolescentes, assim como estão redigidos em forma de convite e com linguagem adequada.
- Foram apresentadas as garantias de sigilo e confidencialidade pelo uso das informações.

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203

Bairro: CENTRO

CEP: 20.231-092

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3207-4550

Fax: (21)3207-4556

E-mail: cep@inca.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
CÂNCER/ INCA/ RJ



Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apresentadas nos Pareceres Consubstanciados precedentes foram adequadamente respondidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

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

RIO DE JANEIRO, 18 de Janeiro de 2013

Assinador por:
Carlos Henrique Debenedito Silva
(Coordenador)

9.3. ANEXO C. Sondas utilizadas para a identificação das alterações citogenético-moleculares

| Alteração molecular | Sonda | Fabricante |
|----------------------|--|--------------------------|
| <i>KMT2A</i> -r | LSI MLL Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe | Cytocell, Cambridge, UK |
| <i>RUNX1-RUNX1T1</i> | AML1/ETO Translocation Probe Dual Fusion | Cytocell, Cambridge, UK |
| <i>CBFβ-MYH11</i> | CBFβ/MYH11 Translocation Probe Dual Fusion | Cytocell, Cambridge, UK |
| <i>PML-RARα</i> | PML-RARα Translocation Probe, Dual Fusion | Cytocell, Cambridge, UK |
| <i>MYST3-CREBBP</i> | BACs RP11-231D20 e RP11-108L9 (<i>MYST3</i>) e BACs RP11-387O21 e RP11-461A8 (<i>CREBBP</i>) | BlueGnome, Cambridge, UK |
| <i>NUP98</i> -r | NUP98 (11p15) Break FISH probe | Kreatech, Amsterdam, NL |
| <i>DEK-NUP214</i> | DEK / NUP214 t(6;9) FISH probe | Kreatech, Amsterdam, NL |

BAC, cromossomo bacteriano artificial; FISH, hibridização *in situ* por fluorescência; *KMT2A*-r, rearranjos do *KMT2A*; *NUP98*-r, rearranjos do *NUP98*.

9.4. ANEXO D. Protocolo para realização da técnica de hibridização in situ por fluorescência (FISH)

Dia 1:

- Preparo das lâminas com 10 µl de amostra;
- Lavagem da lâmina com solução tampão 2X *saline-sodium citrate* (SSC, pH 7,0) por 2 min;
- Lavagem da lâmina em etanol a 70%, 90% e 100%, por 2 min cada;
- Aplicação de 2 µl da sonda da lâmina e cobertura da região com lamínula 13 mm;
- Incubação da lâmina para desnaturação a 75°C, por 2 min^a, no ThermoBrite System™ (Leica Biosystems);
- Incubação da lâmina em câmara úmida a 37°C por 2-16 h.

Dia 2:

- Após o período de incubação, remoção da lamínula;
- Lavagem em solução 1X SSC a 75°C por 2 min;
- Lavagem em solução 2X SSC + 0,1% de Tween^b à temperatura ambiente por 1 min;
- Aplicação de 2 ml de DAPI para contra coloração;
- Aplicação de uma nova lamínula;
- Visualização.

^a Para as sondas Kreatech, a desnaturação se deu a 75°C por 7 min.

^b Para as sondas Kreatech e BlueGnome, a solução utilizada foi 2X SSC + 0,05% de Tween.

9.5. ANEXO E. Tabela utilizada para a construção do *circos plot*

| Variável | <i>RUNX1- RUNX1T1</i> | <i>CBFb- MYH11</i> | <i>PML- RARA</i> | <i>KMT2A-r</i> | <i>FLT3</i> | <i>KRAS</i> | <i>NRAS</i> | <i>KIT</i> | <i>PTPN11</i> |
|----------------------|---------------------------|------------------------|----------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|------------|---------------|
| <i>RUNX1-RUNX1T1</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 4 | 6 | 5 | 3 |
| <i>CBFb-MYH11</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 6 | 1 |
| <i>PML-RARA</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 | 4 | 7 | 0 | 7 |
| <i>KMT2A-r</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 9 | 3 | 0 | 8 |
| <i>FLT3</i> | 8 | 4 | 48 | 6 | 1 | 4 | 9 | 0 | 10 |
| <i>KRAS</i> | 4 | 4 | 4 | 9 | 4 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| <i>NRAS</i> | 6 | 4 | 7 | 3 | 9 | 2 | 0 | 0 | 3 |
| <i>KIT</i> | 5 | 6 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>PTPN11</i> | 3 | 1 | 7 | 8 | 10 | 2 | 3 | 0 | 0 |

Os valores representados correspondem ao número absoluto de casos com a alteração.

9.6. ANEXO F. Genes associados a predisposição genética ou a etiopatogênese das neoplasias mieloides avaliados na análise sítio-dirigida

| Predisposição genética | | Etiopatogênese | |
|------------------------|---------------|----------------|----------------|
| <i>ACD</i> | <i>FANCM</i> | <i>ASXL1</i> | <i>MDM2</i> |
| <i>ANKRD26</i> | <i>FANCN</i> | <i>ASXL2</i> | <i>MLL</i> |
| <i>ATG2B</i> | <i>FANCP</i> | <i>ARID1A</i> | <i>MLL2</i> |
| <i>ATM</i> | <i>FANCQ</i> | <i>ARID1B</i> | <i>MLL3</i> |
| <i>BLM</i> | <i>FANCS</i> | <i>ATRX</i> | <i>MLL5</i> |
| <i>BRCA1</i> | <i>GFI1</i> | <i>BCOR</i> | <i>MGMT</i> |
| <i>BRCA2</i> | <i>GSKIP</i> | <i>BRAF</i> | <i>MPL</i> |
| <i>CHEK2</i> | <i>HAX1</i> | <i>CBL</i> | <i>MYC</i> |
| <i>CTC1</i> | <i>MLH1</i> | <i>CBLB</i> | <i>NF1</i> |
| <i>DDX41</i> | <i>MSH2</i> | <i>CDKN2A</i> | <i>NPM1</i> |
| <i>DKC1</i> | <i>MSH6</i> | <i>CDKN2B</i> | <i>NRAS</i> |
| <i>ELA2</i> | <i>NHP2</i> | <i>CEBPA</i> | <i>OGG1</i> |
| <i>EPCAM</i> | <i>NOP10</i> | <i>CREBBP</i> | <i>PHF6</i> |
| <i>FANCA</i> | <i>PARN</i> | <i>CUX1</i> | <i>PRPF40B</i> |
| <i>FANCB</i> | <i>PMS2</i> | <i>DNMT3A</i> | <i>PTEN</i> |
| <i>FANCC</i> | <i>RAF1</i> | <i>EP300</i> | <i>PTPN11</i> |
| <i>FANCD1</i> | <i>RBBP6</i> | <i>ETV6</i> | <i>RAD21</i> |
| <i>FANCD2</i> | <i>RTEL1</i> | <i>EZH2</i> | <i>RAD51</i> |
| <i>FANCE</i> | <i>SOS1</i> | <i>FBXW7</i> | <i>RB1</i> |
| <i>FANCF</i> | <i>SRP72</i> | <i>FLT3</i> | <i>RUNX1</i> |
| <i>FANCG</i> | <i>TERC</i> | <i>GATA1</i> | <i>SF1</i> |
| <i>FANCI</i> | <i>TERT</i> | <i>GATA2</i> | <i>SF3A1</i> |
| <i>FANCJ</i> | <i>TINF2</i> | <i>GATA3</i> | <i>SF3B1</i> |
| <i>FANCL</i> | <i>WRAP53</i> | <i>GNAS</i> | <i>SFRS2</i> |
| | | <i>HERC1</i> | <i>SH2B3</i> |
| | | <i>HRAS</i> | <i>STAG2</i> |
| | | <i>IDH1</i> | <i>TET2</i> |
| | | <i>IDH2</i> | <i>TP53</i> |
| | | <i>IKZF1</i> | <i>U2AF1</i> |
| | | <i>JAK2</i> | <i>U2AF2</i> |
| | | <i>KDM5A</i> | <i>WT1</i> |
| | | <i>KDM6A</i> | <i>XRCC1</i> |
| | | <i>KIT</i> | <i>XRCC3</i> |
| | | <i>KRAS</i> | <i>ZRSR2</i> |

| Predisposição genética | Etiopatogênese |
|------------------------|----------------|
| <i>ANKRD26</i> | <i>ASXL1</i> |
| <i>ATG2B</i> | <i>ARID1B</i> |
| <i>ATM</i> | <i>BCOR</i> |
| <i>BLM</i> | <i>CBLB</i> |
| <i>BRCA1</i> | <i>CREBBP</i> |
| <i>BRCA2</i> | <i>CUX1</i> |

| | |
|--------|--------|
| CTC1 | EP300 |
| DDX41 | FLT3 |
| DKC1 | GATA2 |
| EPCAM | GATA3 |
| FANCA | GNAS |
| FANCD2 | HERC1 |
| FANCE | HRAS |
| FANCI | IDH2 |
| FANCM | IKZF1 |
| GF11 | JAK2 |
| MSH6 | KDM5A |
| PMS2 | KRAS |
| RBBP6 | PTPN11 |
| RTEL1 | TP53 |
| WRAP53 | U2AF2 |
| | WT1 |
| | XRCC1 |
| | XRCC3 |
| | ZRSR2 |

9.7. ANEXO G. Nomenclatura dos aminoácidos

| Aminoácido | Abreviatura de três letras | Abreviatura de uma letra |
|------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Alanina | Ala | A |
| Arginina | Arg | R |
| Asparagina | Asn | N |
| Aspartato ou Ácido aspártico | Asp | D |
| Cisteína | Cys, Cis | C |
| Fenilalanina | Phe, Fen | F |
| Glicina | Gly, Gli | G |
| Glutamato ou Ácido glutâmico | Glu | E |
| Glutamina | Gln | Q |
| Histidina | His | H |
| Isoleucina | Ile | I |
| Leucina | Leu | L |
| Lisina | Lys, Lis | K |
| Metionina | Met | M |
| Prolina | Pro | P |
| Serina | Ser | S |
| Tirosina | Tyr, Tir | Y |
| Treonina | Thr, Tre | T |
| Triptofano | Trp, Tri | W |
| Valina | Val | V |

9.8. ANEXO H. Grupo Colaborativo para Estudo das Leucemias Pediátricas

| Estado | Instituição | Médico responsável |
|---------------|---|--|
| MT | Agape Instituto Médico Cuiabá | Suely Santos Araujo |
| SE | Associação de Voluntario a Servico da Oncologia em Aracaju | Daniela Amorim |
| SP | Centro de Hematologia de São Paulo | Paula Gracielle Guedes Granja |
| MA | Centro de Pesquisa Clínica do Maranhão, Hospital Universitário - UFMA | Raimundo Antonio Gomes Oliveira |
| SP | Centro de Tratamento Fabiana Macedo de Moraes, São José Dos Campos | Marcelo Milone Silva |
| SP | Centro Infantil Dr Domingos a Boldrini Campinas | Vitoria Regia Pereira Pinheiro |
| GO | Clinica CEBROM - Centro Brasileiro De Radioterapia Oncologia e Mastologia | Leandra Paiva Queiroz |
| MA | Fundacao Antonio Jorge Dino | Geni Lourdes de Resende Ramos |
| AM | Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM | Maria do Perpetuo Socorro Sampaio Carvalho |
| SP | Fundacao Pio XII - Hospital do Câncer de Barretos | Luis Fernado Lopes |
| RN | Hemocentro Dalton Barbosa Cunha - HEMONORTE | Geraldo Barroso Cavalcanti Junior |
| SP | Hospital Amaral Carvalho, Jaú | Claudia Tereza Oliveira |
| SP | Hospital Amaral Carvalho, Jaú | Eda Manzo; |
| SP | Hospital Amaral Carvalho, Jaú | Maura V.Ikoma |
| SP | Hospital Amaral Carvalho, Jaú | Alejandro M. Arancibia |
| GO | Hospital Araujo Jorge - Associação de Combate ao Cncer | Patricia Carneiro de Brito |
| GO | Hospital Araujo Jorge - Associação de Combate ao Câncer | Anna Carolina Silva Dias |
| BA | Hospital Aristides Maltez - Onco-Pediatria | Nilma Pimentel de Brito |
| PR | Hospital Bom Jesus Iapon, Ponta Grossa | Monica Lankszner |
| MG | Hospital da Baleia - Fundação Benjamin Guimarães | Vanessa Carvalho Lima |
| RS | Hospital da Criança Conceição | Klerize Ancely de Souza Silva |
| DF | Hospital da Criança de Brasilia José Alencar - HCB | Isis Maria Q. Magalhães |
| DF | Hospital da Criança de Brasilia José Alencar - HCB | José Carlos Cordoba |
| DF | Hospital da Criança de Brasilia José Alencar - HCB | Ricardo Camargo |
| AC | Hospital de Câncer do Acre, Rio Branco Acre | Valeria Pereira Paiva |
| PR | Hospital de Clínicas - Universidade Federal Do Paraná | Mara Albonei Pianovski |
| MG | Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlandia | Ieda Cunha |
| RS | Hospital de Clínicas de Porto Alegre | Adriana Vanessa Santini Deyl |
| RS | Hospital de Clínicas de Porto Alegre | Rebeca Ferreira Marques |
| RS | Hospital de Clínicas de Porto Alegre | Adriano Nori Rodrigues Taniguchi |
| AL | Hospital do Açúcar e Alcool, Maceio | Juliana Amorim Matos |
| AL | Hospital do Açúcar e Alcool, Maceio | Luana Novais Bonfim |
| SP | Hospital do Câncer de Franca | Reynaldo José Sant 'Anna Pereira De Souza |
| MT | Hospital do Câncer de Mato Grosso | George Sampaio Freitas Junior |
| RJ | Hospital Dos Servidores Do Estado - HSE | Renata Pereira De Sousa Barros |
| RJ | Hospital Dos Servidores Do Estado - HSE | Fernando Werneck |

Continuação.

| | | |
|----|---|-----------------------------------|
| PR | Hospital Erasto Gaertner | Tiago Hessel Tormen |
| BA | Hospital Estadual da Criança | Maria Dolores F. Dorea |
| SP | Hospital GPACI Sorocaba - Hospital do Câncer Infantil - "Sarina Rolim Caracante" | Gustavo Ribeiro Neves |
| SP | Hospital Infantil Darcy Vargas | Gustavo Zamperlini |
| SC | Hospital Infantil Joana de Gusmão | Ana Freund Winn |
| SC | Hospital Infantil Joana de Gusmão | Denise Bowsfield Silva |
| SC | Hospital Infantil Joana de Gusmão | Imarui Costa |
| PR | Hospital Infantil Pequeno Príncipe | Flora Mitie Watanabe |
| BA | Hospital Manoel Novaes – Santa Casa de Misericórdia de Itabuna | Fabia Idalina R. Neves |
| BA | Hospital Manoel Novaes – Santa Casa de Misericórdia de Itabuna | Regiana Quinto de Souza |
| BA | Hospital Manoel Novaes – Santa Casa de Misericórdia de Itabuna | Teresa C. C. Fonseca |
| BA | Hospital Martagao Gesteira, Salvador | Ana Maria Marinho |
| BA | Hospital Martagao Gesteira, Salvador | Eny Guimaraes Carvalho |
| BA | Hospital Martagao Gesteira, Salvador | Luciana Nunes |
| PB | Hospital Napoleao Laureano | Andrea Gadelha |
| PB | Hospital Napoleao Laureano | Eloisa Cartaxo |
| PB | Hospital Napoleao Laureano | Glacianne Torres |
| PA | Hospital Oncológico Infantil Octávio Lobo | Alayde Vieira Wanderley |
| MS | Hospital Regional de Mato Grosso do Sul Rosa Pedrossian - CETOHI | Marcelo Souza |
| MS | Hospital Regional de Mato Grosso do Sul Rosa Pedrossian - CETOHI | Rosania Maria Basegio |
| GO | Hospital Santa Casa de Misericórdia de Goiania | Everaldo Ruan Junior |
| BA | Hospital Santa Isabel - SCM | Bruno M. Rocha Freire |
| SP | Hospital Santa Marcelina | Renato Guedes |
| SP | Hospital Santa Marcelina | Renato Melaragno |
| SP | Hospital Santa Marcelina | Sidnei Epelman |
| PI | Hospital São Marcos - Associação Piauiense de Combate ao Câncer | Paulo Henrique de Carvalho Melo |
| PI | Hospital São Marcos - Associação Piauiense de Combate ao Câncer | Gildene Alves da Costa |
| PB | Hospital Universitário Alcides Carneiro | Renata S. C. Gurgel |
| PE | Hospital Universitário Oswaldo Cruz - CEON | Terezinha de Jesus Marques Salles |
| RS | Hospital Universitário Santa Maria | Virginia Maria Coser |
| SP | Instituto da Criança do Hospital da Clínicas de Faculdade de Medicina da Universidade de SP | Lilian Maria Cristofani |
| PB | Instituto de Hematologia | Gilson Spinola Guedes Filho |
| SP | Hospital Santa Marcelina | Maria Lucia Lee |
| ZP | Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo | Silvia Maria Luporini |
| RN | Liga Norteriograndense Contra o Câncer | Cassandra Teixeira Valle |
| MG | Santa Casa de Belo Horizonte | Joaquim Caetano de Aguirre Neto |
| MT | Sociedade Beneficente Santa Casa de Misericórdia de Cuiaba | Claudia Pettengill |
| PR | Uopecan Hospital do Câncer de Cascavel | Carmem Maria Costa Mendonca Fiori |



ORIGINAL ARTICLE

Molecular Characterization of Pediatric Acute Myeloid Leukemia: Results of a Multicentric Study in Brazil

Francianne Gomes Andrade,^a Elda Pereira Noronha,^a Gisele Dallapicola Brisson,^a
 Filipe dos Santos Vicente Bueno,^a Ingrid Sardou Cezar,^a Eugênia Terra-Granado,^a
 Luiz Claudio Santos Thuler,^b Maria S. Pombo-de-Oliveira,^a and Brazilian Study Group of Childhood
 Acute Myeloid Leukemia (IMol-AMLBSG) as co-authors

^aPediatric Hematology-Oncology Program, Research Center, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

^bClinical Research Program, Research Center, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

Received for publication August 30, 2016; accepted November 23, 2016 (ARCMED-D-16-00520). FGA and MSPO share the first authorship.

Background and Aims. The biological characterization of childhood acute myeloid leukemia (c-AML) is an important outcome predictor. In Brazil, very little is known about the frequency of AML subgroups, although c-AML accounts for about 18% of leukemias. We carried out this study to investigate the contribution of type I and II gene mutations in the probability of overall survival (pOS) of c-AML in Brazil.

Methods. Seven hundred and three *de novo* pediatric AML cases (2000–2015) were assessed throughout a multicentric network study. Mutations in hotspot regions of *FLT3*, *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, and *c-KIT* genes were analyzed as well as fusion genes (*RUNX1-RUNX1T1*, *MLL/KMT2A-r*, *CBFβ-MYH11*, and *PML-RARα*) associated with AML. Patients were treated out of the clinical trial although following the BFM-AML2004 protocol. Acute promyelocytic leukemia (APL) was treated differently. AML with Down syndrome was excluded.

Results. There were significant differences in gene mutations among age ranges (≤ 2 years-old; > 2 –10 years old and ≥ 11 years old) and the nonrandom association between type I/II mutations. Lower white blood cell count ($\leq 50 \times 10^9/L$) was associated with *RUNX1-RUNX1T1*, whereas higher WBC with *CBFβ-MYH11* ($p < 0.05$). Cumulative pOS in 5 years was $37.7 \pm 2.8\%$ for total AMLs and $59.8 \pm 6.2\%$ for APL ($p = 0.03$). pOS differences were observed between Brazilian regions. The South-Southeast regions had a better 5-year pOS, whereas the Midwest region presented the poorest pOS ($23.7 \pm 4.9\%$). *PTPN11* mutations conferred an adverse prognosis as an independent prognostic factor.

Conclusions. Identification of genetic subgroups contributes to the molecular epidemiology and biology of AML worldwide, reflecting the profile of pediatric AML cases in Brazil. © 2016 IMSS. Published by Elsevier Inc.

Key Words: Pediatric AML, Brazilian AML, Type I/II mutations, Molecular markers, Prognosis.

Address reprint requests to: Maria S. Pombo-de-Oliveira, MD, PhD, Pediatric Hematology-Oncology Program, Research Center, Instituto Nacional de Câncer-INCA, Rua André Cavalcanti, 37, Zip code: 20231-050, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; Phone: (+55) (21) 3207-6505; FAX: (+55) (21) 3207-6553; E-mail: mpombo@inca.gov.br.

Introduction

The improvement of childhood acute myeloid leukemia (c-AML) characterization represents an important challenge in pediatric hematology. In Brazil, little is known regarding the epidemiology and the distribution of biological markers of c-AML, a disease that accounts for 18–24% of all diagnosed cases ≤ 19 years of age (1). Over the past decade, considerable knowledge has been achieved

about the leukemia pathogenesis throughout genetic subtypes. Some founder leukemogenic effects are largely described as somatic translocations and fusion genes (2). These recurrent genetic aberrations are important prognostic factors in c-AML and an increasing number of study groups are using them for risk group stratification (3–5). Within the World Health Organization (WHO) classification, these disease-defining genetic aberrations have been used to define unique disease categories and update the new associations over time (6,7).

The leukemogenic process, like another human carcinogenesis pathway, is a consequence of more than one mutation that leads to advantage survival of a single clone and to the heterogeneity of the disease. The two major types of genetic events in AML are type I and II aberrations that, in general, enhance the self-renewal and proliferation potential of the myeloid progenitor. Type I aberrations occur as mutations in hotspots of specific genes involved in signal transduction pathways (*FLT3*, *c-KIT*, *NRAS*, *KRAS* and *PTPN11*), which lead to uncontrolled proliferation and/or survival of leukemic cells. Type II aberrations are often chromosomal rearrangements of transcription factors resulting in the translation of fusion proteins leading to impaired differentiation of the leukemic cells (*PML-RAR α* *t*(15,17)(q22;q21), *RUNX1-RUNX1T1* *t*(8,21)(q22;q22), *CBF β -MYH11* *inv*(16)(p13q22)/*t*(16,16)(p13;q22) and 11q23/*MLL* (now named as *KMT2A* gene)-rearrangements (8). The third class of aberrations called type III mutations is proposed for AML pathogenesis affecting epigenetic regulators with special reference in adulthood AML (9,10), which reinforces the fact that pediatric cases are a different entity. Moreover, it has been shown that the broad range of type II alterations seems to originate during early life as the first event for overt leukemia (11–13).

A comprehensive analysis of the main type I and II mutations in c-AML was performed, providing an overview of the largest AML series in Brazil as recommended by the WHO for classification of myeloid neoplasms. We determined the distribution frequencies of AML subtypes according to somatic alterations and investigated the potential contribution of these markers with the clinical outcome.

Materials and Methods

Patients

This is a retrospective and multicentric study of 703 *de novo* c-AML received at the Pediatric Hematology-Oncology Research Program (PHOP), Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro between January 1, 2000 and December 31, 2015. Cases included were forwarded from 49 Brazilian medical institutions that are reference in oncological care for children with leukemia for diagnostic purpose. The equipped centers were located in four out of five

geographical regions of the country (Northeast, South, Southeast, and Midwest) as shown in Figure 1; c-AML was diagnosed according to morphology and immunophenotyping characterization in bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) samples from patients aged ≤ 21 years. Molecular analysis was based on results of the good quality of the diagnostic material. Exclusion criteria consisted of prior chemotherapy, prior myelodysplastic syndrome and associated genetic syndromes (e.g., Down, Bloom, Noonan).

For each center, the information regarding the number of cases was presented as a proportional scale. In order to portray a number of cases in a broad map (Figure 1). Each center performed a review of the morphology according to the WHO/French-American-British (FAB) classification; in six institutions immunophenotyping was also performed and samples were sent to us for additional tests. Clinical and biological data including cytogenetic results when performed were obtained from these medical centers.

A predefined set of data was collected for each case containing clinical data obtained at initial diagnosis, including sex, age, race, and white blood cell (WBC) count. For race, cases were categorized into “whites” and “non-whites” as determined by the parents or guardians of the children. In order to cluster fewer heterogeneity groups. Even though, racial categorization in Brazil is a poor predictor of genomic ancestry (14).

Ethics

The institutional review board approved the treatment according to local laws and guidelines, with informed consent obtained in accordance with the Declaration of Helsinki. For this research project, local agreements and approvals were obtained by the Instituto Nacional de Câncer Research and Ethics Committee under the registry number 186688 as “Immuno-molecular alterations in pediatric AML: an

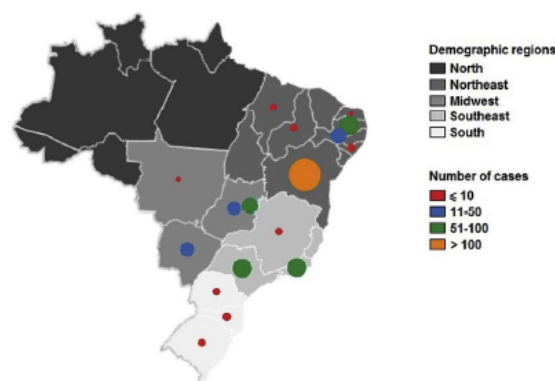


Figure 1. Brazilian map of c-AML cases sent from each geographic region. The number of cases from each collaborative institution is grouped by states and presented as proportional circles. (A color figure can be found in the online version of this article.)

interaction between somatic mutations and etiopathological risk factors”.

Treatment of AML Patients

Patients were treated out of a unique controlled clinical trial but received relatively homogeneous treatment following international consensus guidelines on AML treatment. Due to differences in diagnostic procedures over time, the analyses of treatment and prognostic markers with relevance were divided into two periods: cases diagnosed from 2000–2007 (first period) and those from 2008–2015 (second period). Treatment strategies were mainly standardized with two different induction regimens using cytarabine, idarubicin, and etoposide as the BFM-AML2004 protocol in the second period of the case ascertainment. The clinical decisions in the majority of settings followed the guidelines on the treatment of AML published elsewhere (15). Stem cell transplantation was performed in selected high-risk patients (16). Acute promyelocytic leukemia (APL) cases were treated with all-trans retinoic acid and specific therapeutic strategies (17).

Identification of Type I Mutations

Genomic DNA was purified from BM samples with QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Mutations were determined in the hotspot regions of *FLT3*, *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, and *c-KIT* as previously described or following primers and PCR conditions provided in Supplementary Table 1 (18). Briefly, *FLT3* mutations were examined at the tyrosine kinase domain (TKD) in codon 835 and juxtamembrane domain in exons 11/12 as internal tandem duplications (ITD). *NRAS/KRAS* status was determined by searching mutations in exon 1 (with special attention in codons 12/13), *PTPN11* mutations were screened in exon 3, and *c-KIT* mutations were identified in exons 8/17.

Identification of Type II Mutations

Total RNA was purified from BM cells using TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). cDNA was synthesized following transcriptase reverse enzyme addition and cDNA integrity was evaluated throughout *GAPDH* amplification (19). Type II mutations were screened for the four most frequent fusion genes in pediatric AML cases including *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11*, *KMT2A*-rearrangements (*KMT2A-r*) and *PML-RARα*. The last one was directly performed according to acute promyelocytic leukemia (APL) morphology and immunophenotyping profile. The fusion genes and *KMT2A* breaks were also identified by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with commercial DNA probes (*PML/RARα* Translocation Probe Dual Fusion; *AML1/ETO* Translocation Probe Dual Fusion; *CBFβ/MYH11* Translocation Probe Dual Fusion; *MLL* Dual Color Break Apart Rearrangement Probe; Cytocell, UK).

The fusion transcripts were confirmed as described elsewhere (19,20). The most common fusion partners of *KMT2A* gene (*MLLT3/AF9*, *MLLT10/AF10*, *MLLT1/ENL*, *MLLT4/AF6*, *AFF1/AF4*) were identified by reverse transcriptase polymerase chain reaction according to Burmeister et al. (20).

Statistical Analysis

Descriptive analyses were performed through continuous variables in order to measure central tendency and dispersion, as well as categorical variables to determine the frequency distribution. χ^2 or Fisher's exact test was used to compare proportions between groups. The non-parametric Mann-Whitney *U* test was used for continuous variables. For the purpose of this study, age was considered a categorical variable with three groups for analysis, comprising cases who were ≤ 2 years old, between 2 and 10 years old and ≥ 11 years old. Also, the distribution of cases was tested for distinct periods: first period (2000–2007) and second period (2008–2015) of c-AML diagnosis.

Overall survival (OS) was measured from the date of diagnosis to the date of the last follow-up or death from any cause. Patients who did not experience an event were censored at the time of the last follow-up and those who did not attend a follow-up were censored at their date of last known contact. Kaplan-Meier survival analysis method was used to calculate the 5-year probabilities of OS (pOS), and estimated survival values were compared using the log-rank test in order to verify the association of the presence of one genetic alteration in patients' outcome. Association between independent variables and outcome was performed using Cox proportional-hazard regression model with estimated hazard ratio (HR) and 95% confidence intervals (CI) were presented. Variables with $p < 0.20$ were included in this model for multivariate analysis following the stepwise forward method. All p values were considered significant when < 0.05 . All analyses were performed using SPSS 21.0 (SPSS, Chicago, IL, 2004).

Results

Demography and frequency of c-AML subtypes according to period of incident cases are described in Table 1. There was a high frequency of cases from the Northeast region ($p < 0.001$) and an increased number of c-AML from the Midwest region was observed in the second period of case ascertainment. There were no differences regarding age groups and race distributions over time and the majority of c-AML were considered as non-white (61.2%). The overall age distribution of patients showed a median age of 7.3 years, ranging from 0–21 years. Cases aged ≤ 2 years old represented 24.0%, those with ages between 2 and 10 years represented 37.7% and those patients aged

Table 1. Demographic characteristics and classification of pediatric AML cases according to periods of analysis, Brazil, 2000–2015

| AML features | First period (2000–2007), n (%) | Second period (2008–2015), n (%) | <i>p</i> |
|---|------------------------------------|-------------------------------------|----------|
| Brazilian geographic regions | | | <0.001 |
| Northeast | 179 (59.1) | 170 (42.5) | |
| South | 14 (4.6) | 15 (3.8) | |
| Southeast | 78 (25.7) | 98 (24.5) | |
| Midwest | 32 (10.6) | 117 (29.2) | |
| Age groups (years) | | | 0.32 |
| ≤2 | 81 (26.7) | 88 (22.0) | |
| > 2–10 | 108 (35.6) | 157 (39.2) | |
| ≥11 | 114 (37.6) | 155 (38.8) | |
| Race | | | 0.31 |
| Whites | 86 (36.3) | 161 (40.4) | |
| Non-whites | 151 (63.7) | 238 (59.6) | |
| Sex | | | 0.01 |
| Males | 183 (60.4) | 203 (50.8) | |
| Females | 120 (39.6) | 197 (49.2) | |
| ICD-O3 code | | | 0.004 |
| 9806/3 (Mixed phenotype acute leukemia with <i>BCR-ABL1</i>) | 1 (0.3) | 2 (0.5) | |
| 9809/3 (Mixed phenotype acute leukemia, T/myeloid) | 1 (0.3) | 3 (0.8) | |
| 9840/3 (Acute erythroid leukemia) | 12 (4.0) | 5 (1.2) | |
| 9861/3 (Not otherwise specified, NOS) | 21 (6.9) | 14 (3.5) | |
| 9866/3 (Acute promyelocytic leukemia; <i>PML-RARα</i>) | 49 (16.2) | 81 (20.2) | |
| 9867/3 (Acute myelomonocytic leukemia) | 32 (10.6) | 65 (16.2) | |
| 9871/3 (Acute myeloid leukemia, <i>CBFβ-MYH11</i> ; FAB M4Eo) | 8 (2.6) | 28 (7.0) | |
| 9872/3 (AML with minimal differentiation) | 14 (4.6) | 14 (3.5) | |
| 9873/3 (AML without maturation) | 18 (5.9) | 17 (4.2) | |
| 9874/3 (AML with maturation) | 31 (10.2) | 21 (5.2) | |
| 9891/3 (Acute monoblastic/monocytic leukemia) | 25 (8.3) | 41 (10.2) | |
| 9896/3 (Acute myeloid leukemia, <i>RUNX1-RUNX1T1</i>) | 33 (10.9) | 40 (10.0) | |
| 9897/3 (11q23 abnormalities) | 33 (10.9) | 41 (10.2) | |
| 9910/3 (Acute megakaryoblastic leukemia) | 25 (8.3) | 28 (7.0) | |
| Status ^a | | | <0.001 |
| Alive | 123 (40.6) | 170 (42.5) | |
| Dead | 87 (28.7) | 165 (41.5) | |
| Missing | 93 (30.7) | 65 (16.2) | |
| Total, n (%) | 303 (43.1) | 400 (56.9) | |

FAB, French-American-British classification; ICD-O3 International Classification of Diseases for Oncology 3rd Edition; WHO, World Health Organization.
^aExcluding acute promyelocytic cases.

≥11 years represented 38.3%; c-AML occurred in different frequencies among boys and girls in the first period of the study, with male predominance ($p = 0.01$), corresponding to a male:female ratio of 1.5:1 in the first period and 1:1 in the second period. Differences among the c-AML subtype classification over time were observed, mainly with a decrease of not otherwise specified (NOS)-AML subtype in the second period of the study.

The frequency distribution of type I and II molecular alterations according to age strata and AML morphology are shown in the supplementary material. The number of type I mutations increased in the upper ranges of age, i.e., cases aged ≤2 years old presented 12.5% of type I mutations, cases ranging from > 2–10 years old and ≥11 years old presented 39.5% and 47.7% of type I mutations, respectively, as shown in Supplementary Table 2. Non-white cases presented more type I mutations than cases considered white, with 68.7 and 31.3% ($p = 0.001$), respectively.

These differences were not observed for type II mutations. Both type I/II mutations were associated with morphological subtypes, with the majority of them occurring in AML cases with myelomonocytic differentiation. We identified more than one type II mutation occurring concomitantly in 13.2% of the cases.

The distribution frequencies of molecular alterations in c-AML according to demography and WBC count at diagnosis are shown in Table 2. All type II mutations presented an association with age range. *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11* and *PML-RARα* were more frequent in cases aged ≥11 years (48.6, 56.5, 57.1%, respectively). Similarly, both types of *FLT3* mutations (ITD/TKD) were found with older cases (55.8, 66.7%, respectively). c-AML with 11q23/*KMT2A* fusion genes grouped as *KMT2A-r* were found in children at an early age (≤2 years old) in 67.6% of cases compared with AML without *KMT2A-r* in different age groups ($p < 0.001$). The frequency of partner gene was

Table 2. Distribution frequency of molecular alterations in c-AML cases according to demography and white blood cells count, Brazil, 2000–2015

| Molecular alteration ^a | Frequency, n/total (%) | Age (years) | | | Sex | | WBC count ($\times 10^9/l$) | | | p | | |
|-----------------------------------|---------------------------|-----------------|---------------|-------------|--------------|----------------|-------------------------------|-------------|-----------------|-----------|-----------|--------|
| | | Median (range) | > 2–10, n (%) | | Males, n (%) | Females, n (%) | Median (range) | > 50, n (%) | | | | |
| | | | ≤ 2, n (%) | ≥ 11, n (%) | | | | p | ≤ 50, n (%) | | | |
| Type II mutations | | | | | | | | | | | | |
| <i>RUNX1-RUNX1T1</i> | 74/590 (12.9) | 9.3 (0.2–18.3) | 9 (12.2) | 29 (39.2) | 36 (48.6) | <0.001 | 44 (59.5) | 30 (40.5) | 20.1 (1.7–136) | 58 (80.6) | 14 (19.4) | 0.001 |
| <i>CBFβ-MYH11</i> | 23/576 (6.1) | 13.3 (0.3–19.3) | 4 (17.4) | 6 (26.1) | 13 (56.5) | 0.04 | 10 (43.5) | 13 (56.5) | 111.0 (7.2–268) | 6 (27.3) | 16 (72.7) | <0.001 |
| <i>KMT2A</i> rearrangements | 74/508 (24.0) | 1.3 (0.0–21.1) | 50 (67.6) | 16 (21.6) | 8 (10.8) | <0.001 | 36 (48.6) | 38 (51.4) | 54.1 (2.4–451) | 36 (50.0) | 36 (50.0) | 0.004 |
| <i>PML-RARα</i> | 63/87 ^b (72.4) | 11.2 (1.3–18.0) | 2 (3.2) | 25 (39.7) | 36 (57.1) | 0.06 | 31 (49.2) | 32 (50.8) | 10.8 (0.1–800) | 48 (77.4) | 14 (22.6) | 0.34 |
| Type I mutations | | | | | | | | | | | | |
| <i>FLT3</i> (ITD or TKD) | 110/473 (23.3) | 11.0 (1.0–21.3) | 5 (4.5) | 41 (37.3) | 64 (58.2) | <0.001 | 60 (54.5) | 50 (45.5) | 33.5 (0.8–800) | 65 (59.1) | 45 (40.9) | 0.10 |
| <i>FLT3-ITD</i> | 86/473 (18.2) | 10.9 (1.0–21.3) | 3 (3.5) | 35 (40.7) | 48 (55.8) | <0.001 | 47 (54.7) | 39 (45.3) | 35.6 (0.8–540) | 50 (58.1) | 36 (41.9) | 0.10 |
| <i>FLT3-TKD</i> | 24/473 (5.1) | 11.9 (1.8–19.3) | 2 (8.3) | 6 (25.0) | 16 (66.7) | 0.001 | 13 (54.2) | 11 (45.8) | 25.8 (2.5–800) | 15 (62.5) | 9 (37.5) | 0.61 |
| <i>KRAS</i> | 30/464 (6.5) | 4.6 (0.5–18.3) | 9 (30.0) | 12 (40.0) | 9 (30.0) | 0.73 | 20 (66.7) | 10 (33.3) | 40.4 (1–700) | 16 (53.3) | 14 (46.7) | 0.16 |
| <i>NRAS</i> | 44/410 (10.7) | 10.2 (0.7–18.0) | 8 (18.2) | 13 (29.5) | 23 (52.3) | 0.27 | 24 (54.5) | 20 (45.5) | 48.5 (5.1–800) | 23 (52.3) | 21 (47.7) | 0.07 |
| <i>c-KIT</i> | 22/210 (10.8) | 5.0 (0.3–19.3) | 5 (22.7) | 12 (54.5) | 9 (33.3) | 0.29 | 13 (59.1) | 9 (40.9) | 45.2 (4.5–168) | 12 (57.1) | 9 (42.9) | 0.51 |
| <i>PTPN11</i> | 27/260 (10.4) | 7.5 (0.4–17.1) | 5 (18.5) | 13 (48.1) | 9 (32.3) | 0.66 | 18 (66.7) | 3 (20.0) | 40.0 (1.0–300) | 17 (63.0) | 10 (37.0) | 0.53 |

ITD, internal tandem duplication; TKD, tyrosine kinase domain; WBC, white blood cell count at diagnosis.

^aThe total numbers of analyzed cases reflect the availability of biological material for molecular tests.^bThe total of *PML-RARα* analyzed was considered among the acute promyelocytic leukemia.

MLL3 (20/74, 27.0%), *AFF1* (10/74, 13.5%), *MLL10* (7/74, 9.5%), *MLL1* (4/74, 5.4%) and *MLL4* (2/74, 2.7%), and other less frequent such as *KMT2A-PTD* (data not shown in tables). Type II aberration *RUNX1-RUNX1T1* was associated with low WBC count ($\leq 50 \times 10^9/l$, 80.6%), whereas *CBFβ-MYH11* was associated with high WBC count ($> 50 \times 10^9/l$, 72.7%). All the association results were confirmed in a WBC count analysis as continuous variable by the Mann-Whitney U test (data not shown). *NRAS* mutations were associated with higher WBC count at diagnosis (median $48.5 \times 10^9/l$ for *NRAS* mutated cases vs. $29.5 \times 10^9/l$ for wild-type cases; $p = 0.02$). We observed that mutations in *KRAS* and *PTPN11* mutations seem to present a different male:female ratio from the overall cohort, with 2:1 and 6:1, respectively.

Overall distribution frequencies of type I among type II mutations are represented in Figure 2. Association between the presence of any type I mutation and fusion genes in c-AML showed that *RUNX1-RUNX1T1* and *PML-RARα* are the aberrations presenting the higher number of type I mutations (28.6 and 33.8%, respectively; data not shown). The variation frequencies of *FLT3*, *KRAS* and *NRAS* mutations in all of the type II subtypes were observed, which seem to be differently distributed among them.

Statistical values calculated for the nine molecular alterations, including p values and OR, are shown in Supplementary Table 3. *c-KIT* mutations were more frequently observed within the core-binding factor (CBF)-AML group, including both *CBFβ-MYH11* (OR 3.1, 95% CI 1.1–9.1) and *RUNX1-RUNX1T1* (OR 3.7, 95% CI 1.2–10.9), compared to other type II subtypes.

The univariate analysis for pOS in both periods of ascertainment cases and the potential contribution of the molecular markers in clinical outcome are shown in Table 3. No statistically significant associations were found for age, sex and WBC count in the overall cohort according to the two periods of analysis. The median of pOS time of the whole AML cohort, excluding APL, was 17.1 months (95% CI 12.9–21.2 months; 5-year pOS $37.7 \pm 2.8\%$); for APL, the 5-year pOS was $59.8 \pm 6.2\%$ and the median was not reached. In the first period of the study, the variables that presented significant pOS values were age strata, the presence of *FLT3* mutations and APL as shown in Figures 3A–3C.

In the second period of the study, the region where the treatment was placed showed differences in 5-year pOS (shown in Figures 4A–4F). Cases from the South/Southeast region of Brazil presented better outcome (5-year pOS $54.7 \pm 6.5\%$) than others. AML with *CBFβ-MYH11* and APL with *PML-RARα* had better 5-year pOS than other AML subtypes ($p = 0.03$ and $p = 0.08$, respectively). AML with *PTPN11* mutations were associated with the worst 5 year pOS ($p < 0.001$).

Five-year pOS showed large differences between type II aberrations as described as a whole in detail in Table 3. We

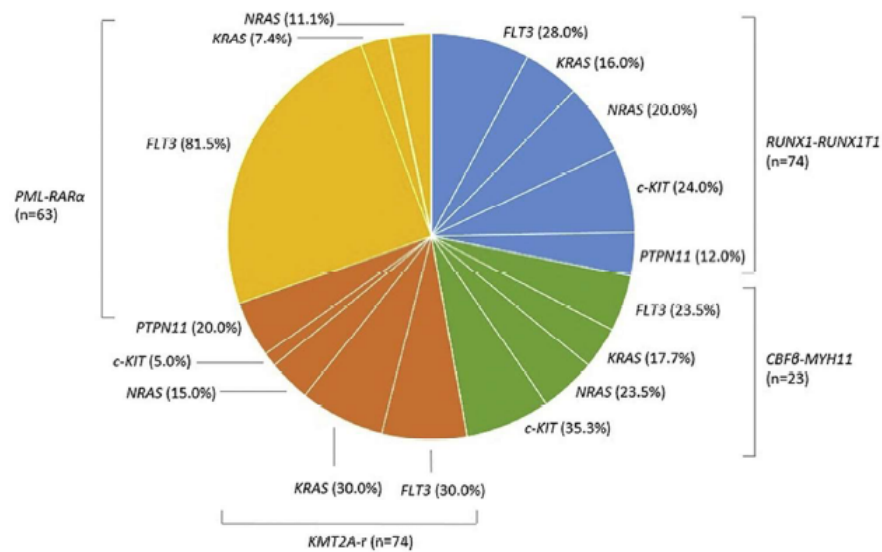


Figure 2. Pie chart illustrating the frequency of type II mutations among subgroups of type I mutations in c-AML. (A color figure can be found in the online version of this article.)

compared positive vs. negative cases for the specific type II mutations except for *PML-RARα*, within which analysis was performed in order to compare cases with *PML-RARα* and other genetic subtypes. Patients carrying the fusion genes *CBFβ-MYH11* or *PML-RARα* showed the most favorable outcome with 5-year pOS of $67.9 \pm 10.9\%$ and $72.8 \pm 7.0\%$, respectively, as well as identified by Cox proportional hazard model (Supplementary Table 4). Patients presenting *KMT2A-r* (different fusion genes together) showed the lowest 5-year pOS ($35.0 \pm 6.9\%$) compared to cases negative to this molecular alteration.

For type I mutation analysis, patients presenting *NRAS* and *c-KIT* mutations had a better outcome than the other AML cases, with 5-year pOS of $57.8 \pm 9.0\%$ and $58.1 \pm 12.7\%$, respectively; however, this was not statistically significant. On the other hand, cases presenting *PTPN11* mutations showed the worst prognosis with 5-year pOS of $10.4 \pm 9.0\%$ (Table 3 and Supplementary Table 4). Multivariate analysis identified *PTPN11* mutations as an independent prognostic factor to predict adverse pOS (HR 2.3, 95% CI 1.3–4.1; $p = 0.004$).

Discussion

This retrospective analysis of *de novo* c-AML cases gathered throughout molecular diagnostic characterization represents the largest AML series in Brazilian children and adolescents. The substantial amount of cases was only possible due to the joint effort of collaborating institutions that sent the samples for diagnostic characterization and epidemiological studies (21). These cover ~70% of the

main pediatric onco-hematology hospital in the Brazilian regions. Because of the morphological and molecular heterogeneity of AML, our study has made it possible to identify subgroups defined by molecular aberrations, adapting the diagnosis to recommendations of specific treatments and to understand the biology of the disease (5). In addition, the AML classification based on morphological features is not sufficient to predict prognostic value.

The present study demonstrated the high percentage of APL (16.2–20.2%) in both the first and second periods of analysis followed by the AML myelomonocytic subtype (10.6–16.2%) among the entire AML setting. The NOS-AML category in WHO classification is a universal concern because it gathers AML with heterogeneous biology that evolved with different distributions throughout time. NOS-AML frequency was found especially high in the first period of the study (2000–2007 = 6.9%) compared to the second period (2008–2015 = 3.5%) when an algorithm of tests allowed allocating cases in a specific AML subgroup. Considering that more sensitive and specific molecular tests such as FISH were accessed in Brazil over time, APL remains more frequent than other subtypes. APL group still represents the main subtype specified in the Brazilian series in both periods, before and after the inclusion of molecular markers. The present results reinforce the premises and fulfill gaps on AML epidemiology and molecular profile characterized by a high rate of APL/*PML-RARα* in children and younger adults. By that means, this study leads to the great effect of knowledge about c-AML subtypes in a Latin American country. High proportions of APL have been found in regions such as Italy, Spain, Central America and South America (22).

Table 3. Univariate analysis for overall survival parameters of c-AML cases, 2000–2015, Brazil

| | n (n of events) | Univariate analysis | | p* |
|--|-----------------|---------------------|------------------------------|-------|
| | | 5-year pOS (SE) | Median ^a (95% CI) | |
| Periods of analysis ^c | 443 (218) | | | 0.38 |
| Phase I (2000–2007) | 171 (81) | 40.1 (4.4) | 19.6 (7.3–32.0) | |
| Phase II (2008–2015) | 272 (137) | 36.3 (3.7) | 15.4 (10.1–21.2) | |
| Geographic regions of treatment ^b | 443 (218) | | | 0.003 |
| Northeast | 197 (87) | 37.8 (4.8) | 18.0 (10.9–25.1) | |
| South/Southeast | 139 (63) | 47.6 (4.7) | 40.7 ^c | |
| Midwest | 107 (68) | 23.7 (4.9) | 10.5 (3.4–17.7) | |
| Age range (years) ^b | 443 (218) | | | |
| ≤2 | 147 (79) | 34.6 (4.9) | 13.9 (6.6–21.2) | 0.40 |
| >2–10 | 148 (68) | 38.8 (2.1) | 21.8 (10.5–33.1) | 0.14 |
| ≥11 | 148 (71) | 38.8 (4.7) | 11.8 (5.0–18.7) | 0.49 |
| Race ^c | 407 (200) | | | 0.29 |
| Whites | 168 (84) | 40.5 (4.5) | 19.6 (6.7–32.5) | |
| Non-Whites | 239 (116) | 33.3 (4.1) | 15.2 (10.0–20.7) | |
| Sex ^b | 443 (218) | | | 0.93 |
| Males | 250 (124) | 35.2 (3.9) | 19.1 (13.0–22.7) | |
| Females | 193 (94) | 40.1 (4.2) | 16.3 (10.0–22.7) | |
| WBC count (×10 ⁹ /l) ^b | 428 (211) | | | 0.64 |
| ≤50 | 284 (134) | 39.2 (3.5) | 17.5 (13.5–21.5) | |
| >50 | 144 (77) | 34.5 (4.9) | 13.8 (5.8–21.8) | |
| Morphological classification | 545 (252) | | | 0.02 |
| Acute promyelocytic leukemia | 102 (34) | 59.8 (6.2) | ^d | |
| Other subtypes | 443 (218) | 37.7 (2.8) | 17.1 (12.9–21.2) | |
| Type II mutations ^c | | | | |
| <i>RUNX1-RUNX1T1</i> ^b | 329 (170) | 36.9 (7.9) | 16.6 (9.5–23.7) | 0.53 |
| <i>CBFB-MYH11</i> ^b | 318 (168) | 67.9 (10.9) | ^d | 0.02 |
| <i>KMT2A</i> rearrangements ^b | 260 (131) | 35.0 (6.9) | 10.3 (3.3–17.3) | 0.25 |
| <i>PML-RARα</i> ^d | 545 (252) | 72.8 (7.0) | ^d | 0.003 |
| Type I mutations ^{bc} | | | | |
| <i>FLT3</i> | 388 (183) | 26.1 (6.7) | 13.5 (7.4–19.6) | 0.01 |
| <i>KRAS</i> | 383 (176) | 46.8 (10.9) | 47.4 ^c | 0.60 |
| <i>NRAS</i> | 334 (159) | 57.8 (9.0) | ^d | 0.13 |
| <i>c-KIT</i> | 186 (80) | 58.1 (12.7) | ^d | 0.28 |
| <i>PTPN11</i> | 206 (93) | 10.4 (9.0) | 4.3 (0.3–8.4) | 0.003 |
| Concomitant type I mutations ^b | 131 (68) | | | 0.16 |
| Single mutation | 115 (56) | 36.9 (5.8) | 19.1 (12.2–25.9) | |
| More than one mutation | 16 (12) | 25.0 (10.8) | 2.4 (0.0–10.9) | |

CI, confidence interval; n, number; pOS, probability of overall survival; SE, standard error.

*p values from log-rank test indicate whether the differences are significant between subgroups.

^aMedian survival in months.

^bExcluding acute promyelocytic leukemia subtype.

^cAnalysis performed between groups positive and negative for the molecular alteration.

^dMedian not reached.

^eConfidence intervals undefined.

The present findings have an impact on enhancing epidemiological studies involving genetic markers and requiring environmental exposures investigations as well as to guide strategies for tailoring treatment. APL subgroup is at the same time highly fatal and highly curable, deserving a separate and urgent treatment strategy (23,24).

Comparing the present data with the recent publication of AML with hospital-based registries and a population-based study, the findings confirm the differences in regional distribution of c-AML. For instance, we have noticed a male predominance noted in all c-AML groups found here, which corroborates with findings from hospital-based and

population-based cancer registries (25,26). Moreover, different host factors such as sex, race, body mass index and genetic background have been associated with increased risk of AML development (27). The findings that mutations in *KRAS* and *PTPN11* were more frequent in males supports the premises that both genes would be involved in the proliferation and survival of spermatogonial stem cells (28).

All subtypes of AML probably share abnormalities in common pathways that regulate proliferation, differentiation, and cell death. These include mutations that affect proliferative and cell survival signals, and mutations that

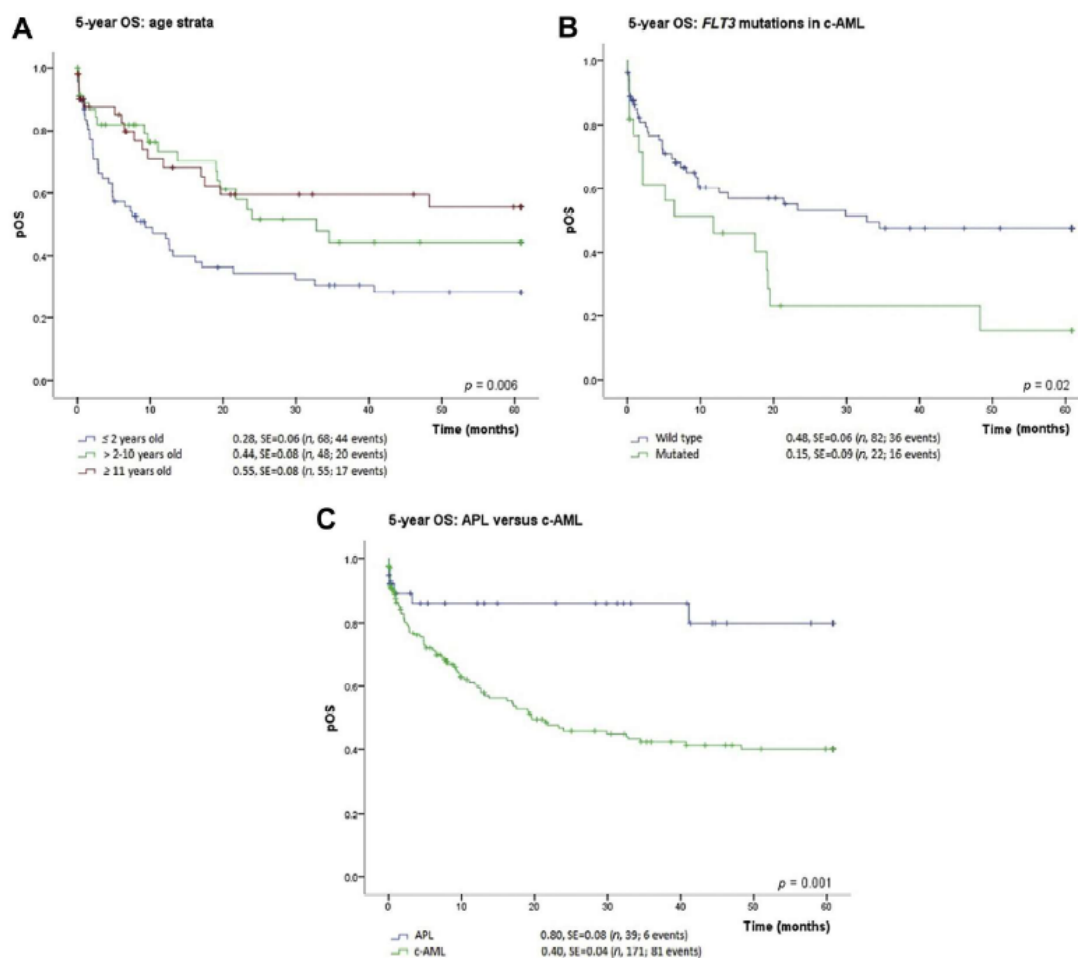


Figure 3. Survival analysis of the c-AML cases of the First Period (2000–2007). Kaplan-Meier estimates for the probability of overall survival (pOS) for age strata (A), *FLT3* mutations in c-AML (B), and APL (C). p values were calculated using log-rank test. SE, standard error. (A color figure can be found in the online version of this article.)

lead to differentiation arrest or enhanced cell self-renewal (8). A discussion about the value of molecular markers in the c-AML treatment should begin with recognizing that various prognostic subtypes are closely linked to the chromosomal karyotypes present in the leukemia cells as the founder element of AML pathogenesis (29). The karyotype and/or molecular aberration allow the segregation of c-AML into three categories of favorable, adverse, and intermediate prognosis subgroups. Our results corroborate with the literature as *CBF β -MYH11* and *PML-RAR α* are predictors of favorable outcomes. The prognostic significance of other genetic abnormalities individually could not be assessed because of the small number of cases in each subgroup.

AML with *RUNX1-RUNX1T1* and *CBF β -MYH11* have been recognized as unique entities among AML with their predictive values and both aberrations affect CBF and are

usually named and gathered as CBF-AMLs. However, considerable clinical and biological heterogeneity exists within CBF-AMLs (30). For instance, we found that *RUNX1-RUNX1T1* was associated with low WBC count, whereas *CBF β -MYH11* was associated with high WBC count. The pathogenic mechanisms of *CBF β -MYH11* responsible for high proliferation rate and consequently high WBC count provide an effective benefit evaluation. Therefore, high WBC count in subsets of AML should be considered with caution and molecular markers become more relevant tools than WBC count at diagnosis. Distinct molecular events that result in leukocytosis might be markers inherent of the disease, underscoring the pathogenic consequences of both rearrangements.

The distribution of type II aberrations in infant AML (i-AML) differs in older patients as *RUNX1-RUNX1T1* and *PML-RAR α* are seldom found in these settings,

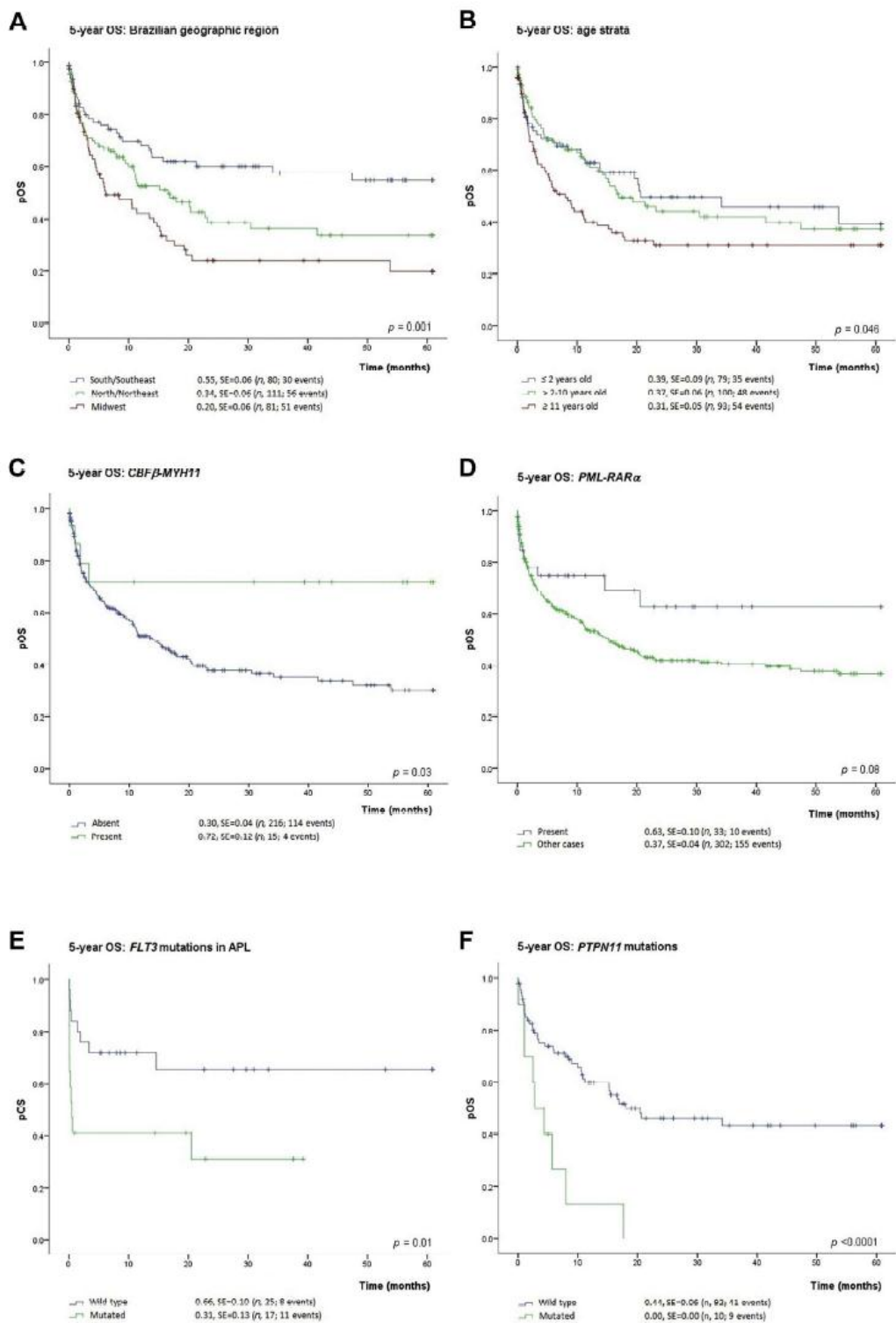


Figure 4. Survival analysis of the c-AML cases of the second period (2008–2015). Kaplan-Meier estimates for the probability of overall survival (pOS) for geographic region (A), age strata (B), presence of *CBF β -MYH11* (C), presence of *PML-RAR α* vs. other cases (D), *FLT3* mutations in APL (E), and *PTPN11* mutations in c-AML (F). p values were calculated using log-rank test. SE, standard error. (A color figure can be found in the online version of this article.)

suggesting different mechanisms of leukemogenesis. As a whole, our findings are similar to those reported previously (31). Nevertheless, we found a higher frequency proportion of i-AML with associated with *KMT2A-r* (67.6%) compared to that described in the literature (31,32). A possible explanation for this phenomenon could be the fact that we are a reference for infant leukemia diagnosis (33). However, these findings deserve further ecological investigation. Concerning the prognostic predictive values, i-AML have been associated with adverse prognostic features (34). Additionally, in this current study, patients aged ≥ 11 years presented an inferior outcome as demonstrated previously (35), pointing out biological parameters in different age groups of c-AML patients. As outcome data strongly depend on treatment, it is important to evaluate whether different age groups have been treated similarly. There is also a big difference for children and adolescents to access treatment in clinical trials, which might influence prognosis (35–37). Survival data for the specific c-AML are rarely found in the medical literature.

Regarding the findings of type I mutations (5,7), we identified similar frequencies in *FLT3*, *NRAS* and *c-KIT* mutations compared to what has been described in adulthood AML, although slightly lower frequencies were identified than described in c-AML elsewhere (31,38–41). The recurrent somatic mutations *FLT3* and *PTPN11* may allow additional refinement in prognostication and, in some cases, would provide opportunities for targeted treatment.

Limitations of these data should be acknowledged and considered in order to interpret the findings. First of all, the results are based on analysis of retrospective data collected in 49 treatment centers, which might have caused constraints on adherence to returns and lack of information requested. The lower death rate (28.7%) and better pOS in the first period of the study would affect the differences in the estimate rates due to the higher proportion of missing information on follow-up (30.7%) when compared with the second period of the study (16.2% of missing reports). One speculation is that in the first period, although with a low number of centers with adherence to this project, they had more controlled management therapeutic protocols, whereas in the second period of the study the increased number of centers located in less developed regions and low research resources compromised the overall pOS. Another pitfall is concerning the variable (mode of treatments) that catalyzes the improvements in AML. They were not assessed in this study (as it is in controlled therapeutic protocol) such as AML risk-stratification and management support care.

Even with these limitations, it is noteworthy to explain that patient access to the national public health system (SUS created in 1988) reorganized and allowing free treatments, and the access to PHOP research facilities to leukemia characterization, the molecular and epidemiological scenarios described herein, certainly reflect the reality of

Brazil over time (21). The high number of patients included and the wide time frame covered enabled us to have a representative frequency of distribution of c-AML. Although the clinicians and the infrastructure of each center involved in AML treatment were off-clinical trial research, a variety of guideline procedures such as supportive care and management of complications and information and comparison with published results were shared through dissemination of innovation care in the network (24,42). Nevertheless, additional clinical controlled studies would be necessary to reinforce the present results.

In conclusion, differences in OS ratio were observed between Brazilian regions, with the South-Southeast regions with better 5-year pOS, whereas the Northeast-Midwest regions had the poorest OS. Although they are not population-based, these findings contribute with important data in the epidemiology scenario of c-AML as a whole. Survival data for the specific c-AML subtype in Latin American countries are rarely found in the literature. Inclusion of cytogenetic-molecular markers in the characterization of AML are of great predictive value for OS. *PTPN11* mutations conferred adverse prognosis as an independent prognostic factor.

Co-authors

Alejandro Mauricio Arancibia,^a Rosania Maria Basegio,^b Patricia Carneiro de Brito,^c Eny Guimarães Carvalho,^d José Carlos Martins Cordoba,^e Imarui Costa,^f Virginia Maria Cóser,^g Adriana Vanessa Santini Deyl,^h Anna Carolina Silva Dias,^c Eloisa Cartaxo Fialho,ⁱ Bruno Marcelo Rocha Freire,^j Renata Silva de Carvalho Gurgel,^k Maura Rosane Valério Ikoma,^a Ingrid Koster,^l Isis Maria Quezado Magalhães,^e Ana Maria Marinho,^c Renato Melaragno,^m Suellen Valadares Moura,^l Gustavo Ribeiro Neves,ⁿ Claudia Teresa Oliveira,^a Ilana Zalberg Renault,^l Terezinha de Jesus Marques Salles,^o Denise Browsfield Silva,^f Marcelo Santos Souza,^b Tállita Meciany Farias Vieira,^l Fernando de Almeida Werneck,^p Ana Freund Winn,^f and Gustavo Zamperlini^q

^aHospital Amaral Carvalho, Jaú, São Paulo, Brazil

^bHospital Regional de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^cHospital Araújo Jorge, Goiânia, Goiás, Brazil

^dHospital Martagão Gesteira, Salvador, Bahia, Brazil

^eHospital da Criança, Brasília, Distrito Federal, Brazil

^fHospital Infantil Joana de Gusmão, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^gHospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

^hHospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ⁱHospital Napoleão Laureano, João Pessoa, Paraíba, Brazil

^jHospital Santa Isabel, Salvador, Bahia, Brazil

^kHospital Universitário Alcides Carneiro, Campina Grande, Paraíba, Brazil

^lInstituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^mHospital Santa Marcelina, São Paulo, São Paulo, Brazil

ⁿHospital Sarina Rolin Caracante, Sorocaba, São Paulo, Brazil

^oHospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil

^pHospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^qHospital Infantil Darcy Vargas, São Paulo, São Paulo, Brazil

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the contributions of Paola Cappelletti for technical support and Luisa Vieira Marques for help related to the statistical analysis. This work was supported by grants from the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq #481104/2012-7) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, E-26/110.712/2012. MSPO is a scholar supported by CNPq #301.594/2015-5 and FAPERJ-CNE #E-26/102.337/2013.

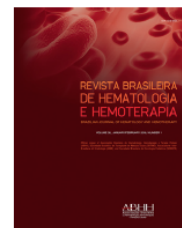
Supplementary Data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2016.11.015>.

References

- de Souza Reis R Sr, de Camargo B, de Oliveira Santos M, et al. Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. *Pediatr Blood Cancer* 2010;56:58–64.
- Rowley JD. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu Rev Genet* 1998;32:495–519.
- Meshinchi S, Arceci RJ. Prognostic factors and risk-based therapy in pediatric acute myeloid leukemia. *Oncologist* 2007;12:341–355.
- Kaspers GJL, Creutzig U. Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions. *Leukemia* 2005;19:2025–2029.
- Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood* 2012;120:3187–3205.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114:937–951.
- 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;127:2391–2405.
- Gilliland DG. The molecular basis of leukemia. *Hematology* 2004;2004:80–97.
- Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010;363:2424–2433.
- Liang DC, Liu HC, Yang CP, et al. Cooperating gene mutations in childhood acute myeloid leukemia with special reference on mutations of ASXL1, TET2, IDH1, IDH2, and DNMT3A. *Blood* 2013;121:2988–2995.
- Hunger SP, McGavran L, Meltesen L, et al. Oncogenesis in utero: fetal death due to acute myelogenous leukaemia with an MLL translocation. *Br J Haematol* 1998;103:539–542.
- Greaves MF. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood* 2003;102:2321–2333.
- Ford AM, Ridge SA, Cabrera ME, et al. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature* 1993;363:358–360.
- Pena SDJ, Pietro GD, Fuchshuber-Moraes M, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011;6:e17063.
- Bittencourt R, Bortolheiro TC, de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille M, et al. Guidelines on the treatment of acute myeloid leukemia: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2016;38:58–74.
- Silla LM, Dulley F, Saboya R, et al. Bone marrow transplantation and acute myeloid leukemia: Brazilian guidelines. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2012;35:56–61.
- Pagnano KBB, Rego EM, Rohr S, et al. Guidelines on the diagnosis and treatment for acute promyelocytic leukemia: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular Guidelines Project: Associação Médica Brasileira—2013. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2014;36:71–89.
- Barbosa TC, Andrade FG, Lopes BA, et al. Impact of mutations in FLT3, PTPN11 and RAS genes on the overall survival of pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Brazil. *Leuk Lymphoma* 2014;55:1501–1509.
- Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13:1901–1928.
- Burmeister T, Meyer C, Gröger D, et al. Evidence-based RT-PCR methods for the detection of the 8 most common MLL aberrations in acute leukemias. *Leuk Res* 2015;39:242–247.
- Pombo de Oliveira MS, Koifman S, Vasconcelos GM, et al. Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 2009;42:121–125.
- Zhang L, Samad A, Pombo-de-Oliveira MS, et al. Global characteristics of childhood acute promyelocytic leukemia. *Blood Rev* 2015;29:101–125.
- Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2013;88:317–327.
- Ribeiro RC, Rego E. Management of APL in developing countries: epidemiology, challenges and opportunities for international collaboration. *ASH Education Program Book* 2006;(1):162–168.
- Guimarães RM, Chaiblich JV, Valente BCS. Trends in mortality due to myeloid leukemia in regions of Brazil and the country as a whole between 1980 and 2012. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2016;38:172–174.
- Thuler LCS, Pombo-de-Oliveira MS. Acute Promyelocytic Leukaemia is Highly Frequent Among Acute Myeloid Leukaemias in Brazil: a Hospital-Based Cancer Registry Study From 2001–2012. *Ann Hematol*; 2016. [Epub ahead of print].
- Radhi M, Meshinchi S, Gamis A. Prognostic factors in pediatric acute myeloid leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2010;5:200–206.
- Puri P, Walker WH. The regulation of male fertility by the PTPN11 tyrosine phosphatase. *Semin Cell Dev Biol* 2016;59:27–34.
- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010;116:354–365.

30. Duployez N, Marceau-Renaut A, Boissel N, et al. Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* 2016;127:2451–2459.
31. Balgobind BV, Hollink IH, Arentsen-Peters ST, et al. Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2011;96:1478–1487.
32. von Neuhoff C, Reinhardt D, Sander A, 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* 2010;28:2682–2689.
33. Emerenciano M, Meyer C, Mansur MB, et al. The distribution of MLL breakpoints correlates with outcome in infant acute leukaemia. *Br J Haematol* 2013;161:224–236.
34. Pui CH, Raimondi SC, Srivastava DK, et al. Prognostic factors in infants with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2000;14:684–687.
35. Creutzig U, Büchner T, Sauerland MC, et al. Significance of age in acute myeloid leukemia patients younger than 30 years. *Cancer* 2008;112:562–571.
36. Bleyer WA, Tejada H, Murphy SB, et al. National cancer clinical trials: children have equal access; adolescents do not. *J Adolesc Health* 1997;21:366–373.
37. Bleyer A. Older adolescents with cancer in North America: deficits in outcome and research. *Pediatr Clin North Am* 2002;49:1027–1042.
38. Goemans BF, Zwaan CM, Miller M, et al. Mutations in KIT and RAS are frequent events in pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005;19:1536–1542.
39. Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL, et al. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood* 2006;108:3654–3661.
40. Balgobind BV, Van den Heuvel-Eibrink MM, De Menezes RX, et al. Evaluation of gene expression signatures predictive of cytogenetic and molecular subtypes of pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2010;96:221–230.
41. Dohner H, Gaidzik VI. Impact of genetic features on treatment decisions in AML. *Hematology* 2011;2011:36–42.
42. Creutzig U, Zimmermann M, Ritter J, et al. Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* 2005;19:2030–2042.



Original article

Identification of the MYST3-CREBBP fusion gene in infants with acute myeloid leukemia and hemophagocytosis



Francianne Gomes Andrade^a, Elda Pereira Noronha^a, Rosania Maria Baseggio^b,
Teresa Cristina Cardoso Fonseca^c, Bruno Marcelo Rocha Freire^d,
Isis M. Quezado Magalhaes^e, Ilana R. Zalberg^a, Maria S. Pombo-de-Oliveira^{a,*}

^a Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Hospital Regional do Mato Grosso do Sul Rosa Pedrossian (HRMS), Campo Grande, MS, Brazil

^c Hospital Manoel Novais, Santa Casa de Misericórdia de Itabuna (HMN-SCMI), Itabuna, BA, Brazil

^d Hospital Santa Izabel, Salvador, BA, Brazil

^e Hospital da Criança Jose de Alencar (HCB), Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2015

Accepted 16 June 2016

Available online 26 July 2016

Keywords:

Infant leukemia

Acute myeloid leukemia

t(8 ;16)(p11 ;p13)

MYST3-CREBBP (or, MOZ-CBP)

Hemophagocytosis

ABSTRACT

Background: Acute myeloid leukemia presenting the MYST3-CREBBP fusion gene is a rare subgroup associated with hemophagocytosis in early infancy and monocytic differentiation. The aim of this study was to define the relevant molecular cytogenetic characteristics of a unique series of early infancy acute myeloid leukemia cases (≤ 24 months old), based on the presence of hemophagocytosis by blast cells at diagnosis.

Methods: A series of 266 infant cases of acute myeloid leukemia was the reference cohort for the present analysis. Acute myeloid leukemia cases with hemophagocytosis by blast cells were reviewed to investigate the presence of the MYST3-CREBBP fusion gene by fluorescence in situ hybridization (FISH) and reverse transcription polymerase chain reaction.

Results: Eleven cases with hemophagocytosis were identified with hemophagocytic lymphohistiocytosis being ruled out. Six cases were classified as myelomonocytic leukemia, three as AML-M7 and two as AML-M2. In five cases, the presence of the MYST3-CREBBP fusion gene identified by molecular cytogenetics was confirmed by fluorescence in situ hybridization. All patients received treatment according to the Berlin-Frankfurt-Münster acute myeloid leukemia protocols and only one out of the five patients with the MYST3-CREBBP fusion gene is still alive.

Conclusions: Our findings demonstrate that the presence of hemophagocytosis in acute myeloid leukemia was not exclusively associated to the MYST3-CREBBP fusion gene. Improvements in molecular cytogenetics may help to elucidate more complex chromosomal rearrangements in infants with acute myeloid leukemia and hemophagocytosis.

© 2016 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author at: Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rua André Cavalcanti, 37, 20231-050 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail address: mpombo@inca.gov.br (M.S. Pombo-de-Oliveira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.06.005>

1516-8484/© 2016 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Distinct cytogenetic subgroups of acute myeloid leukemia (AML) have been associated with age-specific frequencies and the incidence of unbalanced aberrations; in particular complex karyotypes increase sharply with age.¹ AML presenting the reciprocal translocation (8;16)(p11;p13) that generates the MYST3-CREBBP (former named as MOZ-CBP) fusion gene is mostly observed in adult patients.² The fusion of the MYST3 and CREBBP genes occurs when both show histone acetyltransferase activities leading to the activation of several targets involved in transcriptional regulation and cell cycle control.²⁻⁴ The evidence of AML with the MYST3-CREBBP fusion gene in children was reported by the International Berlin-Frankfurt-Munster (I-BFM) study group.⁵ Sixty-two pediatric AML were identified in which karyotype records revealed t(8;16)(p11;p13) in the AML observed at an early age, monocyte differentiation [French-American-British classification (FAB) AML-M5] and presence of hemophagocytosis; all of which are associated with very poor outcomes.⁵ Furthermore, the MYST3-CREBBP fusion gene associated with disseminated intravascular coagulation and high mortality rates was observed in a series of French AML patients.⁶ These particular clinical, cytological, cytogenetic, and molecular characteristics of AML with MYST3-CREBBP led to the suggestion of a unique category in the World Health Organization (WHO) classification due to the poor prognosis.⁷ Among the clinical spectrum conditions, hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) should be included as differential diagnosis. However, HLH presents phagocyte activation caused by immune disorders that compromise T cell/natural killer cells and the normal monocyte-macrophage lineage.⁸

An accurate case identification requires the evaluation of morphological, cytogenetic and molecular features following correlation of obtained parameters, including serological tests. In this study, the availability of a unique series of early onset AML cases prompted us to search for AML-MYST3-CREBBP cases and to define relevant molecular cytogenetic characteristics.

Methods

Subjects

A series of 266 infant AML (i-AML) cases enrolled in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia (BCSGIAL) from 2003 to 2012 is the reference cohort and subject for the present analysis.⁹ The selection criteria were infants (≤ 24 months old) with a diagnosis of AML and the presence of hemophagocytosis by leukemic blasts (Figure 1). Additionally, 48 i-AML cases without the hemophagocytic feature in the diagnostic samples were randomly selected to compare with i-AML cases with hemophagocytosis by blast cells.

Hemophagocytosis was defined as the presence of phagocytosis of red cells, lymphocytes and/or platelets only by blast cells. The morphological findings were discussed by physicians (RMB, TCCF, BF, IMQM) and cytologists (EPN, MSPO); clinical and laboratorial data were checked in each case for the consistency of inclusion criteria. Gender, age, white

blood cell count (WBC), hemoglobin levels, platelet count, central nervous system (CNS) involvement, chloroma and cutaneous leukemia, FAB classification as well as the presence of hemophagocytosis by leukemic blasts were carefully reviewed. Exclusion criteria included secondary AML, down's syndrome, HLH and/or hemophagocytic syndrome associated with immune disorders and unexplained fever. Frozen samples from bone marrow (BM) aspirates, peripheral blood and smears of i-AML cases were selected for further cytogenetic and molecular studies according to the availability of good biological material.

All children were treated out of clinical trials, but following international AML protocols.

Characterization of leukemia cells

Leukemia classification of AML was based on criteria published by the WHO.⁷ The diagnosis of AML-M7 was based on the presence of CD41/CD61 and CD42 markers on blast cells identified by immunophenotyping. Karyotypes of BM aspirates were tested before any chemotherapy treatment. Chromosomes were identified and analyzed as recommended by the International System of Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 2005.¹⁰

Reverse transcription polymerase chain reaction

Total RNA from BM mononuclear cells at the time of diagnosis was purified using the TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions (Gibco/BRL, Life Technologies, CA, USA). Briefly, 2 μ g of total RNA was reverse-transcribed using the First-Strand cDNA Synthesis KitTM (Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ, USA). The integrity of cDNA was examined by amplifying a fragment of the GAPDH gene using previously described primers and cDNA was used as templates in subsequent polymerase chain reaction (PCR) assays. All cases were investigated for the presence of the RUNX1-RUNX1T1, CBF β -MYH11, BCR-ABL1, MLL-AFF1 and MLL-MLL3 fusion genes.¹¹⁻¹²

Detection of the MYST3-CREBBP and reverse CREBBP-MYST3 fusion transcripts were conducted as described elsewhere.¹³ Single PCR reactions to detect MYST3-CREBBP fusion transcripts type I (MYST3 exon 16-CREBBP exon 3) and type II (MYST3 exon 16-CREBBP exon 4), as well as the type I CREBBP-MYST3 fusion transcript (CREBBP exon 2-MYST3 exon 17) were performed using the primers listed in Table 1. A semi-nested reaction, adapted from Schmidt et al., was required to detect type I transcripts.¹³ Samples from confirmed AML cases with MYST3-CREBBP were added as positive controls for type I transcripts. PCR products for MYST3-CREBBP transcripts (type I-II) were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gel and subsequently purified using NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kits (Macherey-Nagel, VWR International, Oslo, Norway). Amplicons were mixed with the Big Dye terminator v3.1 Kit (Applied Biosystems) and forward or reverse primers and sequenced in an ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

The identification of somatic mutations in KRAS, FLT3 and c-KIT genes were performed by direct sequencing.¹⁴⁻¹⁶

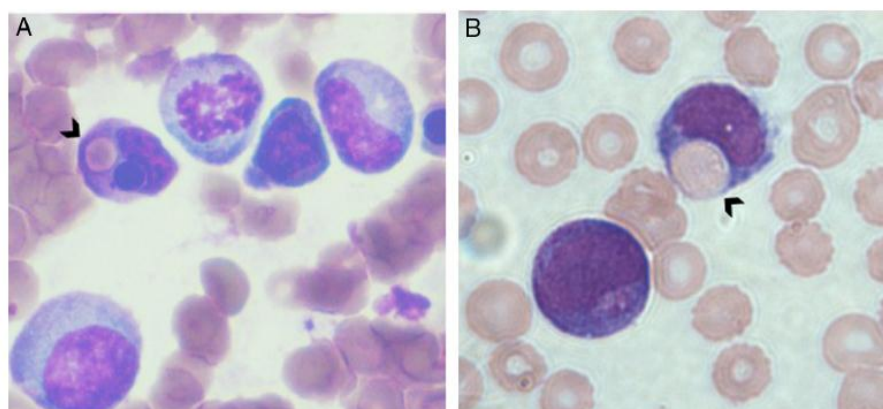


Figure 1 – Morphology of AML-M4 with hemophagocytosis by blast cells. Bone marrow aspiration stained by May-Grunwald-Giemsa shows myeloblast and monoblast cells with phagocytosis of red cells and lymphocytes.

Fluorescence in situ hybridization

Fluorescence in situ hybridization (FISH) for the *MLL* rearrangements was performed at the time of diagnosis with fresh biological material using a commercial LSI *MLL* Dual Color, Break Apart Rearrangement probe (Cytocell Ltd., Cambridge, UK) according to the manufacturer's instructions. The *MYST3-CREBBP* FISH was performed in interphase nuclei prepared from frozen viable cells of available cases using bacteria-derived artificial chromosome (BAC). These clones were retrieved from the human genome high resolution BAC re-arrayed clone set available in a web format (<http://bacpac.chori.org>) and selected according to physical and genetic mapping data reported on Ensembl Browser website (<http://www.ensembl.org>). DNA was extracted and probes were labeled and hybridized by Blue Genome (Cambridge, UK), with Spectrum Orange or Spectrum Green and validated as a FISH probe set on normal controls. The clones used were RP11-231D20 (chr8:42184655-42188062) and RP11-108L9 (chr8:41832025-41864392) flanking the *MYST3* gene (orange) and RP11-387O21 (chr16:3918191-4104380) and RP11-461A8 (chr16:3663996-3693579) flanking the *CREBBP* gene (green). Procedures were performed according to the manufacturer's instructions. The first step was FISH mapping of clones on normal cells from healthy blood donors in order to confirm their chromosomal location. Cut-off values were calculated as $6 \pm 3\%$ of fusion gene signals in 100–300 interphase nuclei.

Ethical considerations

Treatment was approved by local laws and regulations as well as by the Institutional Review Boards of each participating center. Medical informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki. This study was approved by the Research Ethics Committee at the Instituto Nacional de Câncer in Rio de Janeiro, Brazil (CEP/CAEE: 186.688).

Results

The clinical-demographic characteristics of the eleven cases that fulfilled the selection criteria are shown in Table 2. All patients presented hepatosplenomegaly and three were reported to have chloroma and one CNS disease. The majority of the patients were male (72.7%) with a median age of 12 months (range: 0–23 months). The WBC count varied from 5.7 to $111.1 \times 10^9/L$ with a median of $35.9 \times 10^9/L$; six cases were diagnosed as myelomonocytic leukemia (M4/M5), three cases as AML-M7 and two as AML-M2. Serological tests for viral infections (Epstein-Barr virus, parvovirus B19 and human immunodeficiency virus) and coagulation examinations were within normal ranges. No infections triggering HLH were found in any of the eleven cases.

Using the selected BAC clones of the *MYST3-CREBBP* fusion gene, three types of hybridization patterns were observed (Figure 2). The first, separated signals of the

Table 1 – Sequences of the primers used for reverse transcription polymerase chain reaction.

| Designation | Sequence (from 5' to 3') | Position |
|-------------|--------------------------|-------------|
| MOZ3558F | GAGGCCAATGCCAAGATTAGAAC | MOZ exon 16 |
| CBP1201R | GTTGCAATTGCTTGTGGGTAC | CBP exon 5 |
| MOZ3536F | CCTTTTGAAGATTCTGACTCCG | MOZ exon 16 |
| CBP404R | CCTCGTAGAAGCTCCGACAGTT | CBP exon 3 |
| CBP96F | CGCTCGTCTCTCCCTCGCAG | CBP exon 2 |
| MOZ3953R | TGAAACGATGGCTCAATGACGC | MOZ exon 17 |
| CBP174F | GGGCTGTTTTCGCGAGCAGGTG | CBP exon 2 |
| MOZ3844R | GGCTCTTGCCCTTTGGGCCATCC | MOZ exon 17 |

Table 2 – Demographic and clinical characteristics of selected i-AML cases.

| Case | Age (Mo.) | Gender | Clinical features | Hb (g/dL) | WBC ($\times 10^9/L$) | Plat count ($\times 10^9/L$) | Hemoph* | FAB | Conclusion | Outcome |
|------|-----------|--------|--|-----------|-------------------------|--------------------------------|---------|-----|------------------------|----------|
| 1 | 12 | F | Hepatosplenomegaly | 5.68 | 111.1 | 40.0 | + | M4 | AML-M4 MYST3-CREBPP | Deceased |
| 2 | 11 | M | Hepatosplenomegaly | 4.0 | 25.4 | 26.0 | + | M5 | AML-M5 | Alive |
| 3 | <1 | F | Hepatosplenomegaly Chloroma | 10.7 | 8.6 | 29.0 | + | M4 | AML-M4 MYST3-CREBPP | Deceased |
| 4 | 12 | M | Hepatosplenomegaly | 4.2 | 36.8 | 35.0 | + | M2 | AML-M2 MYST3-CREBPP | Alive |
| 5 | 18 | M | Hepatosplenomegaly Chloroma | 7.0 | 5.7 | 3.0 | +/- | M5 | AML-M5 MYST3-CREBPP | Deceased |
| 6 | 23 | M | Hepatosplenomegaly | 4.6 | 42.4 | 57.0 | +/- | M7 | AML-M7 MYST3-CREBPP | Alive |
| 7 | 10 | M | Hepatosplenomegaly Chloroma | 10.7 | 35.0 | 229.0 | + | M2 | AML-M2 | Alive |
| 8 | 13 | M | Hepatosplenomegaly | 6.2 | 61.6 | 45.0 | + | M5 | AML-M5 | Alive |
| 9 | 22 | M | Hepatosplenomegaly CNS ^{POS} | 5.0 | 25.9 | 31.0 | + | M7 | AML-M7 | Deceased |
| 10 | 12 | M | Hepatosplenomegaly | 5.5 | 45.0 | 100.0 | + | M5 | AML-M5 | Deceased |
| 11 | 11 | F | Hepatosplenomegaly | 7.0 | 8.5 | 20.0 | + | M7 | AML-M7 | Deceased |

F: female; M: male; (*), Hemoph: hemophagocytosis (range: 5–27% blasts with phagocytosis); Hb: hemoglobin concentration; i-AML: infant acute myeloid leukemia; Mo: months; FAB: French–American–British classification; NOS: not otherwise specified; Plat: platelet count; WBC: white blood cell count.

probe combinations RP11-231D20/RP11-108L9 and RP11-387O21/RP11-461A8 on chromosomes 8 and 16 respectively, were observed as four different signals: two red and two green distinct signals consistent with normal chromosomes (Figure 2A). Second, a single fusion pattern was observed (one fusion, one red and one green) considered as a random co-localized signal (Figure 2B). Lastly, a dual fusion signal was found in 15–37% of the interphase nuclei analyzed which was consistent with a breakpoint in MYST3 and CREBPP (Figure 2C).

The RT-PCR technique was performed in 55 samples; seven samples were from i-AML with hemophagocytosis (Table 3) and 48 samples from i-AML without hemophagocytosis. The RT-PCR pattern was different to expected (~1000 bp) in one case, with a ~900 bp product observed (#1). In five cases (#3, #5, #6, #7 and #10), RT-PCR was negative for type I and II transcripts. Despite accurate mapping of the translocation breakpoints, attempts to amplify the transcripts, as well as the CREBPP-MYST3 were not successful. In four cases (#2, #4, #8 and #9), RT-PCR was not performed due to lack of

suitable biological material. Discrepancies were observed in three cases (#3, #5 and #6) in which dual fusion signals were found in 15–18% and 34% of the interphase nuclei analyzed and RT-PCR results were negative. In all the i-AML cases without hemophagocytosis, the RT-PCR results were negative (Figure 3).

As shown in Table 3, the diagnosis of the MYST3-CREBPP fusion gene was based on the FISH results only or combined with the RT-PCR results. Five cases were diagnosed as AML-MYST3-CREBPP and clinical laboratorial features are summarized: they presented hepatosplenomegaly, skin lesions and/or localized chloroma; hematological tests revealed FAB AML-M2, M4, M5, or M7; the presence of hemophagocytosis by blast cells varied from 5 to 25%. The immunophenotyping profile showed cells positive for the CD34, CD33/CD13/CD14/CD11b/CD14/CD15, CD64, CD56 antigens; in three patients, the blast cells were positive for CD61/CD41a/CD42b/CD56; karyotyping was successful in four cases; one case (#1) revealed a 46, XX, der (16), t(16;?) (p13;?)

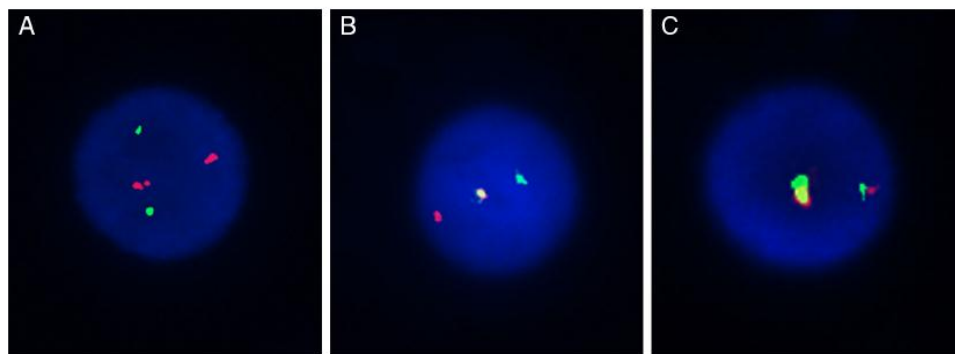


Figure 2 – FISH pattern of MYST3-CREBPP probes. Three types of hybridization patterns were observed: two red and two green signals (A); a single fusion pattern, with one red and one green signal remaining (B); and a dual fusion signal (C).

Table 3 – Immunophenotyping, cytogenetic, fluorescence in situ hybridization (FISH) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of infant acute myeloid leukemia cases with hemophagocytosis.

| Case | Immunophenotype | Cytogenetics | FISH (%) | RT-PCR ^a | Conclusion |
|------|--|---|----------|---------------------|---------------------------|
| 1. | CD33/CD13/CD14/CD11b ^{pos} | 46, XX, der(16) t(16;?) (p13;?) ³⁵ | 37 | Type-I | MYST3-CREBPP |
| 2. | CD34/CD33/CD13/CD4 ^{pos} /CD14 ^{neg} | 46, XY ¹⁰ | 9 | NT | – |
| 3. | CD33CD33/CD13/CD14/CD11b ^{neg} | NT | 18 | NEG | MYST3-CREBPP |
| 4. | CD33/CD13/CD7/CD117/CD56 ^{pos} | NT | 10 | NT | MYST3-CREBPP |
| 5. | CD34/CD33/CD13/CD14 ^{pos} /CD15/CD16 ^{pos} | NT | 34 | NEG | MYST3-CREBPP |
| 6. | CD34/CD33/CD13 ^{pos} CD61/CD41a/CD42b/CD56 ^{pos} | NT | 15 | NEG | MYST3-CREBPP |
| 7. | CD34/CD33/CD13/CD117 ^{pos} | NT | 6 | NEG | – |
| 8. | CD34/CD33/CD13/CD117/CD14 ^{neg} | 45, XY, t(8;8)(q21;1p25) ¹⁰ | 8 | NT | – |
| 9. | CD34/CD33/CD13, CD56 ^{pos} , CD61 ^{neg} | 46, XY, 16H+ ¹² | 6 | NT | – |
| 10. | NT | NT | 9 | NEG | – |
| 11. | CD42/CD61 | NT | 9 | Type-I | Undetermined ^a |

–: Considered negative; NT: not tested; NEG: Negative.

^a Undetermined because the FISH cut-off values were calculated as $6 \pm 3\%$ of fusion gene signals, and discordant result with the RT-PCR, the type-I fragment length was not as expected.

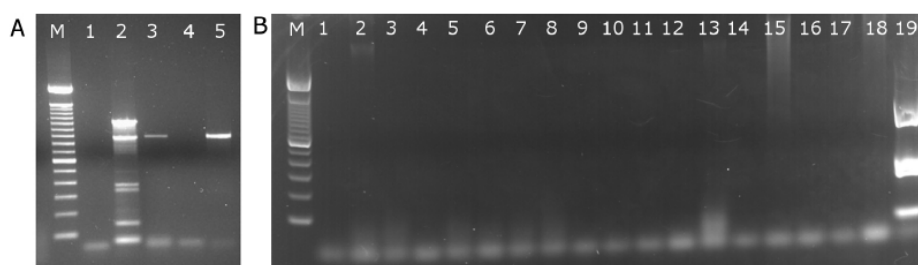


Figure 3 – Agarose gel images of RT-PCR for MYST3-CREBPP fusion genes. Gel A, shows positive reactions for the MYST3-CREBPP fusion gene. Samples 2 (A) and 19 (B) are the positive controls in each reaction. Sample 1 (A and B) is the negative control (H₂O only). Samples 3 and 5 (A) are from patients #1 and #11. In gel B, all samples are negative for the MYST3-CREBPP fusion gene; M: standard marker (100 base pairs)

without identified partners on the short arm of chromosome 16.

None of the eleven AML cases presented with the RUNX1-RUNX1T1, CBFb-MYH11, BCR-ABL1, MLL-AFF1, MLL-MLLT1, KRAS, FLT3 or c-KIT mutations.

The patients received AML treatment according to the BFM AML-2004 protocol and only one out of five patients with the AML MYST3-CREBPP fusion gene is still alive.

Discussion

Chromosomal abnormalities in childhood AML are frequent; the MYST3-CREBPP rearrangement, however, is not.^{1,17} Here, we report for the first time the presence of MYST3-CREBPP rearrangement in five out of eleven (36.4%) AML cases with hemophagocytosis found in a Brazilian i-AML cohort. The morphological observation of hemophagocytosis was an important variable for the selection criteria to investigate the MYST3-CREBPP fusion gene. Clinically, these cases appear to have distinct disease manifestations with skin nodules, CNS involvement and chloroma.^{1,5,18} As pointed out by Hatano et al., other chromosomal abnormalities in AML, such as t(16;21)(p11;q22), karyotypes involving the 8p11 breakpoint, t(8;19)(p11;q32), complex rearrangements and other chromosomal translocations are associated with the presence of

hemophagocytosis by blast cells.¹⁹ This supports our data showing an absence of the MYST3-CREBPP fusion gene in four cases in this study. According to the literature, in the majority of patients described with myelomonocytic morphology, the presence of CD56 cellular expression predicts an association with hemophagocytosis and involvement of the leukemia cutis.^{1,5,19-22}

The technique used to identify this chromosomal alteration was FISH because conventional karyotyping was not always available. Failure to obtain mitosis was a pitfall. Multi-color karyotyping technologies such as multicolor-FISH would certainly elucidate such subtle chromosomal rearrangements if mitosis were successfully obtained. Based on hematological signs, we chose to carry out the FISH method followed by RT-PCR as a laboratorial strategy to search for the MYST3-CREBPP fusion gene. The FISH analysis showed a fusion signal above the cutoff value for the specific MYST3 and CREBPP probes on interphase nuclei, suggesting the presence of a MYST3-CREBPP fusion chimera in five cases. This finding indicates a possible generation of MYST3-CREBPP, since both chromosome regions represented by the clones that contain the MYST3 and CREBPP genes appeared co-localized. In one case, RT-PCR for the type I fusion transcript followed by direct sequencing showed a ~900 pb transcript probably related to an unspecific amplification. In the other four cases, no amplicon was observed. Type I (MYST3 exon 16-CREBPP exon 3) is the most common form in

adults with MYST3-CREBBP AML.^{16,23} Low expression or instability of the chimeric transcripts²⁴ and RNA degradation might explain the absence of amplification by RT-PCR.

Recently, Panagopoulos et al. described an AML with hemophagocytosis and with two translocations with breakpoints that suggest other candidate genes different to MYST3 and CREBBP.²⁵ They studied the patients' leukemic cells not only by karyotyping, FISH and RT-PCR, but also using the modern RNA-seq technique and programs that are specific for fusion genes. Interestingly, the techniques initially failed to detect the biologically important MYST3-CREBBP fusion, although it was manually retrievable from the raw sequencing data, suggesting that additional information about clinical, morphological, and molecular cytogenetic features should be taken into account when searching for newly described crucial fusion genes in typical hematologic malignancies.²⁵

One important point should be discussed is related to AML-MYST3-CREBBP and the differential diagnosis of a hemophagocytic syndrome such as HLH, which is a severe hyperinflammatory condition with clinical symptoms that include fever, cytopenias, hepatosplenomegaly, and hemophagocytosis.²⁶ However, this hemophagocytosis in BM is morphological in benign macrophages. HLH, when occurring in young children, is associated with inherited genetic defects and diagnostic criteria combine both biological features, including natural killer cell activity and high-soluble interleukin-2-receptor levels.²⁷

AML cases younger than two years old with hemophagocytosis should be investigated for the presence of the MYST3-CREBBP and other chromosomal alterations. In the I-BFM AML study group, more than 50% of the MYST3-CREBBP cases were found in infants and the frequency of congenital cases was significantly higher.⁵ One of our cases described herein was congenital leukemia. Some authors consider that congenital AML-MYST3-CREBBP may be a self-limiting disease reaching spontaneous remission. A 'watch-and-wait' policy should be considered in congenital patients with mild clinical symptoms provided that close long-term monitoring is used.^{5,28-30} However, cases from our cohort suffered from aggressive disease with dismal outcomes. Interestingly, the genomic landscape of childhood AML-MYST3-CREBBP has a specific signature clustered close to AML with *MLL* rearrangements.^{5,31,32} The similarity consists in the characteristic pattern of up-regulation of *HOXA9*, *HOXA10*, and cofactor *MEIS1* and down-regulation of other *homeobox* family genes.³² The high frequency of AML-MYST3-CREBBP in infants (≤ 24 months) and congenital cases support the hypothesis that leukemia occurs during the *in utero* life and as in the *MLL* rearrangements model they should be explored for a better understanding of AML leukemogenesis.

Conflict of interests

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank the physicians' part of the Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia (BCSGIAL)

from different Brazilian regions for supporting the project by sending general and clinical data of i-AML.

The authors are grateful to Dr. Tarsis Paiva Vieira for FISH technical support, Bruno de Almeida Lopes for image edition and Dr. Gerhard Fuka for critical and English revision of the manuscript. The authors are also in debt to Dr. Oskar Haas from Anna Kinderspital, Medical University Vienna, Vienna, Austria who kindly provided the AML-MYST3-CREBBP sample to use as positive controls.

MSPO was supported by FAPERJ (#E-26/101.562/2010).

REFERENCES

- Bacher U, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T, Schoch C. Population-based age-specific incidences of cytogenetic subgroups of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2005;90(11):1502-10.
- Haferlach T, Kohlmann A, Klein HU, Ruckert C, Dugas M, Williams PM, et al. AML with translocation t(8;16)(p11;p13) demonstrates unique cytomorphological, cytogenetic, molecular and prognostic features. *Leukemia*. 2009;23(5):934-43.
- Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, et al. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes Dev*. 2006;20(10):1321-30.
- Borrow J, Stanton VP Jr, Andresen JM, Becher R, Behm FG, Chaganti RS, et al. The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet*. 1996;14(1):33-41.
- Coenen EA, Zwaan CM, Reinhardt D, Harrison CJ, Haas OA, de Haas V, et al. Pediatric acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13), a distinct clinical and biological entity: a collaborative study by the International-Berlin-Frankfurt-Munster AML-study group. *Blood*. 2013;122(15):2704-13.
- Gervais C, Murati A, Helias C, Struski S, Eischen A, Lippert E, et al. Acute myeloid leukemia with 8p11 (MYST3) rearrangement: an integrated cytological, cytogenetic and molecular study by the groupe francophone de cytogénétique hématologique. *Leukemia*. 2008;22(8):1567-75.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
- Delavigne K, Bérard E, Bertoli S, Corre J, Duchayne E, Demur C, et al. Hemophagocytic syndrome in patients with acute myeloid leukemia undergoing intensive chemotherapy. *Haematologica*. 2014;99(3):474-80.
- Pombo-de-Oliveira MS, Koifman S, Vasconcelos GM, Emerenciano M, de Oliveira Novaes C. Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2009;42(2):121-5.
- Shaffer LG, Tommerup N. *ISCN 2005 - an international system of human cytogenetic nomenclature*. Switzerland: S. Karger; 2005.
- van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999;13(12):1901-28.
- Jansen MW, Corral L, van der Velden VH, Panzer-Grümayer R, Schrappe M, Schrauder A, et al. Immunobiological diversity in

- infant acute lymphoblastic leukemia is related to the occurrence and type of MLL gene rearrangement. *Leukemia*. 2007;21(4):633-41.
13. Schmidt HH, Strehl S, Thaler D, Strunk D, Sill H, Linkesch W, et al. RT-PCR and FISH analysis of acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13) and chimeric MOZ and CBP transcripts: breakpoint cluster region and clinical implications. *Leukemia*. 2004;18(6):1115-21.
 14. Bornholdt J, Hansen J, Steiniche T, Dictor M, Antonsen A, Wolff H, et al. K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure. *BMC Cancer*. 2008;8:53-63.
 15. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodaera Y, Miyawaki S, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001;97(8):2434-9.
 16. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10(12):1911-8.
 17. Rubnitz JE, Inaba H. Childhood acute myeloid leukemia. *Br J Haematol*. 2012;159(3):259-76.
 18. Catovsky D, Matutes E. The classification of acute leukemia. *Leukemia*. 1992;6 Suppl. 2:1-6.
 19. Hatano K, Nagai T, Matsuyama T, Sakaguchi Y, Fujiwara S, Oh I, et al. Leukemia cells directly phagocytose blood cells in AML-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis: a case report and review of the literature. *Acta Haematol*. 2015;133(1):98-100.
 20. Jekarl DW, Kim M, Lim J, Kim Y, Han K, Lee AW, et al. CD56 antigen expression and hemophagocytosis of leukemic cells in acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22). *Int J Hematol*. 2010;92(2):306-13.
 21. Byrd JC, Edenfield WJ, Shields DJ, Dawson NA. Extramedullary myeloid cell tumors in acute nonlymphocytic leukemia: a clinical review. *J Clin Oncol*. 1995;13(7):1800-16.
 22. Kuwabara H, Nagai M, Yamaoka G, Ohnishi H, Kawakami K. Specific skin manifestations in CD56 positive acute myeloid leukemia. *J Cutan Pathol*. 1999;26(1):1-5.
 23. Rozman M, Camos M, Colomer D, Villamor N, Esteve J, Costa D, et al. Type I MOZ/CBP (MYST3/CREBBP) is the most common chimeric transcript in acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13) translocation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;40(2):140-5.
 24. Giles RH, Dauwerse JG, Higgins C, Petrij F, Wessels JW, Beverstock GC, et al. Detection of CBP rearrangements in acute myelogenous leukemia with t(8;16). *Leukemia*. 1997;11(12):2087-96.
 25. Panagopoulos I, Torkildsen S, Gorunova L, Tierens A, Tjønnfjord GE, Heim S. Comparison between karyotyping-FISH-reverse transcription PCR and RNA-sequencing-fusion gene identification programs in the detection of KAT6A-CREBBP in acute myeloid leukemia. *PLoS ONE*. 2014;9(5):e96570.
 26. Janka GE. Hemophagocytic syndromes. *Blood Rev*. 2007;21(5):245-53.
 27. Henter JI, Horne A, Aricó M, Egeler RM, Filipovich AH, Imashuku S, et al. HLH-2004: diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;48(2):124-31.
 28. Wong KF, Yuen HL, Siu LL, Pang A, Kwong YL. t(8;16)(p11;p13) predisposes to a transient but potentially recurring neonatal leukemia. *Hum Pathol*. 2008;39(11):1702-7.
 29. Terui K, Sato T, Sasaki S, Kudo K, Kamio T, Ito E. Two novel variants of MOZ-CBP fusion transcripts in spontaneously remitted infant leukemia with t(1;16;8)(p13;p13;p11), a new variant of t(8;16)(p11;p13). *Haematologica*. 2008;93(10):1591-3.
 30. Sainati L, Bolcato S, Cocito MG, Zanesco L, Basso G, Montaldi A, et al. Transient acute monoblastic leukemia with reciprocal (8;16)(p11;p13) translocation. *Pediatr Hematol Oncol*. 1996;13(2):151-7.
 31. Camós M, Esteve J, Jares P, Colomer D, Rozman M, Villamor N, et al. Gene expression profiling of acute myeloid leukemia with translocation t(8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement reveals a distinctive signature with a specific pattern of HOX gene expression. *Cancer Res*. 2006;66(14):6947-54.
 32. Serravalle S, Melchionda F, Astolfi A, Libri V, Masetti R, Pession A. A novel specific signature of pediatric MOZ-CBP acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2010;34(11):e292-3.