



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

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação em Oncologia**

*FILIPÉ VICENTE DOS SANTOS BUENO*

IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *PTPN11* NAS NEOPLASIAS MIELOIDES  
PEDIÁTRICAS

**Orientadora:** Dr.<sup>a</sup> Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira

**RIO DE JANEIRO  
2018**



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

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação em Oncologia**

*FILIPE VICENTE DOS SANTOS BUENO*

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *PTPN11* NAS NEOPLASIAS MIELOIDES  
PEDIÁTRICAS**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Oncologia

**Orientadora:** Dr.<sup>a</sup> Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira

**RIO DE JANEIRO  
2018**

Bibliotecária Responsável: Nanci Simão da Rocha – CRB7/ 4235

B928i Bueno, Filipe Vicente dos Santos.

Identificações de mutações no gene PTPN11 nas neoplasias mieloides pediátricas/  
Filipe Vicente dos Santos Bueno. – Rio de Janeiro, 2018.  
101f.: il.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar  
Gomes da Silva, 2018

Orientadora: Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira

1. Neoplasias. 2. Pediatria. 3. Células mieloides. 4. Proteína Tirosina Fosfatase  
Não Receptora Tipo 11. I. Pombo-de-Oliveira, Maria do Socorro(Orient.). II.  
Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD: 616.994



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

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação em Oncologia**

***FILIPE VICENTE DOS SANTOS BUENO***

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *PTPN11* NAS NEOPLASIAS  
MIELOIDES PEDIÁTRICAS**

**ORIENTADORA: Dr.<sup>a</sup> Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira**

**Aprovada em: 19/06/2018**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Sheila Coelho Soares Lima (INCA)  
**Prof. Dr.** Teresa de Souza Fernandez (INCA)  
**Prof. Dr.** Luiz Fernando Lopes (Hospital de Câncer de Barretos)  
**Prof. Dr.** Etel Rodrigues Pereira Gimba (INCA) – Suplente I  
**Prof. Dr.** Ana Maria Rossini Teixeira (UERJ) – Suplente II

**RIO DE JANEIRO  
2018**

*Aos meus pais, Alair e Marluce.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Instituto Nacional de Câncer, pela oportunidade de entrar na carreira científica;

À toda minha família, minha mãe Marluce Vicente, meu pai Alair Bueno e minha irmã Amanda, pelo apoio e carinho nesta etapa tão importante na minha vida;

À Dra. Maria S. Pombo-de-Oliveira, pela orientação, pelos ensinamentos científicos e por ter acreditado no meu potencial;

À Doutoranda Francianne Gomes Andrade, que sempre esteve ao meu lado transmitindo todo seu conhecimento de biologia molecular, pela paciência de ensinar e tirar as dúvidas, pela amizade construída durante os 4 anos que estou no laboratório;

À Dra. Eugênia Terra Granado e Dra Elda Pereira Noronha, pelo auxílio nas análises de imunofenotipagem;

À Ingrid Sardou Cezar, pela ajuda nas técnicas de FISH e RT-PCR;

Ao Alython Araujo Chung Filho, pelo auxílio na técnica de HRM

À toda equipe do Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricos, que contribuíram para realização desta pesquisa;

À todas as agências de fomento, que auxiliaram no desenvolvimento deste estudo;

A todos os médicos colaboradores da rede, pelo envio das amostras;

A todos os meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado acreditando nos meus sonhos.



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

## **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

### **IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *PTPN11* NAS NEOPLASIAS MIELOIDES PEDIÁTRICAS**

**RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Filipe Vicente dos Santos Bueno

**Introdução:** Mutações no gene *PTPN11* são identificadas em doenças mieloproliferativas (DMP) e leucemia mielóide aguda (LMA) e estão associadas com a ativação inapropriada da via RAS/MAPK em células mieloides. O diagnóstico diferencial entre DMP e LMA na infância é um desafio e, para isso, considera-se a idade, porcentagem de blastos, citogenética, ausência da fusão gênica *BCR-ABL1*, mutações no *PTPN11* e a monossomia do cromossomo 7 (-7). **Objetivos:** O foco deste estudo foi identificar mutações genéticas na via RAS/MAPK, com ênfase no *PTPN11*, a fim de distinguir mutações somáticas e constitutivas. Comparar o perfil mutacional do *PTPN11* nas LMAs pediátricas e outras neoplasias mieloides. **Metodologia:** Uma série de 412 casos de neoplasias mieloides <19 anos de idade foi incluído no estudo [LMA (n, 357); leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) (n, 14); leucemia mielóide crônica (LMC) (n, 30) e síndrome mielodisplásica (SMD) (n, 11)]. A identificação de fusões gênicas *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFb-MYH11*, *PML-RARa*, *BCR-ABL1*, rearranjos do *KMT2A* (*r-KMT2A*) e mono 7 foi realizada através de FISH, RT-PCR, e/ou RT-PCR multiplex. As mutações em *FLT3-D835* (éxon 20), duplicações em *tandem* (ITD) no *FLT3* (éxons 11/12), *RAS* (éxon 1) e *KIT* (éxons 8/17) foram analisadas por PCR e sequenciamento. Mutações nos éxons 3 e 13 do gene *PTPN11* foram detectadas pela técnica de HRM e confirmados por sequenciamento direto. Os cálculos das frequências e análises univariadas foram realizados utilizando os testes  $\chi^2$  e exato de Fisher. As estimativas de sobrevida global (SG) foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier e pelo teste de Log-Rank. **Resultados:** A maioria dos casos de DMP e LMA foram >11 anos de idade (46,8%), comparado com os casos com idade  $\leq 2$  anos (17,5%) e >2-10 anos de idade (35,7%). O subtipo morfológico mielomonocítico (LMA-M4) foi predominante (23,3%). Entre os casos de LMA, *RUNX1-RUNX1T1* foi majoritariamente encontrada entre os pacientes com idade entre 2-10 anos (51,2%; mediana da idade= 8,6;  $p=0,027$ ). O *r-KMT2A* foi predominante em crianças com a idade  $\leq 2$  anos (59,0%; mediana da idade= 1,4;  $p<0,0001$ ). Com relação às mutações em genes da via RAS/MAPK, alterações no gene *FLT3* foram mais frequentes nas crianças  $\geq 11$  anos de idade (64,1%; mediana= 11,4;  $p<0,0001$ ). Mutações no éxon 3 do gene *PTPN11* foram identificadas nos códons D61, A72, E76 e H85 em 8,0% (28/339) dos casos de neoplasias mieloides. A monossomia do 7 foi detectada em três casos (11,5%), que também apresentaram alterações no *PTPN11*. Mutações no *PTPN11* conferiram uma menor SG em 5 anos em pacientes com LMA (mediana 3,3; IC95% 0,2-6,4;  $p<0,001$ ). **Conclusão:** Mutações no gene *PTPN11* são amplamente identificadas em diferentes malignidades hematopoiéticas e podem auxiliar no conhecimento do perfil genético e biológico das neoplasias mieloides no Brasil.

**Palavras-chave:** 1. Neoplasia mielóide 2. Pediátrica 3. Mutações 4. *PTPN11*



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

## **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

### **The identification of *PTPN11* mutations in pediatric myeloid neoplasms**

ABSTRACT

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Filipe Vicente dos Santos Bueno

**Introduction:** *PTPN11* mutations are identified in myeloproliferative diseases (MPD) and acute myeloid leukemia (AML) and are associated with the inappropriate activation of the RAS/MAPK pathway in myeloid cells. The variables that should be taken into account in the diagnosis to distinguish between MPD and AML include age, percentage of blasts, absence of *BCR-ABL1* gene fusion, *PTPN11* mutations and chromosome 7 monosomy. The distinction between MPD and AML in childhood is a challenge. **Aims:** The focus of this study was to identify genetic mutations in the RAS/MAPK pathway, with an emphasis on *PTPN11*, in order to distinguish somatic and constitutive mutations. To compare the mutational profile of *PTPN11* in pediatric AML and other MPD. **Methods:** A series of 412 myeloid neoplasms (MN) is the subject of this study [AML (n, 357); leukemia myelomonocytic juvenile (JMML) (n, 14); leukemia myeloid chronic (CML) (n, 30) and (myelodysplastic syndrome MDS) (n, 11)]. The identification of AML gene fusions (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFb-MYH11*, *PML-RAR $\alpha$* , *BCR-ABL1* and *KMT2A* rearrangements [*KMT2A-r*]) for characterization of AML was performed using FISH, and/or RT-PCR, or multiplex RT-PCR techniques. The *FLT3-D835* (exon 20), *FLT3-ITD* (exons 11/12), *RAS* (exon 1) and *KIT* (exons 8/17) genes were screened by PCR/direct sequencing. *PTPN11* mutations (exons 3/13) were detected by the HRM technique and confirmed by sequencing. Frequency calculations and univariate analyses were performed using the  $\chi^2$  and Fisher exact tests. Estimates of overall survival (OS) were performed using the Kaplan-Meier method and Log-Rank test. **Results:** The majority of MPD and AML cases were aged  $\geq 11$  years-old (46.8%), compared to cases aged  $\leq 2$  years-old (17.5%) and  $> 2-10$  years-old (35.7%). AML-M4 subtype was the most frequent (24.0%). Regarding AML cases, *RUNX1-RUNX1T1* was found among patients aged 2-10 years (51.2%;  $p=0.027$ ). The *KMT2A-r* was frequent in cases  $\leq 2$  years-old (59.0%;  $p<0.0001$ ). *FLT3* mutations were prevalent in children  $\geq 11$  years of age with AML (64.1%;  $p<0.0001$ ). *PTPN11* mutations in exon 3 were identified in codons D61, A72, E76 and H85 in 8.0% (28/339) of the cases of MN. Chromosome 7 monosomy was detected in three cases (11.5%) with concurrent *PTPN11* mutations. *PTPN11* mutations conferred a poor OS in 5 years in patients with AML (median=3.3, 95% CI 0.2-6.4,  $p<0.001$ ). **Conclusion:** *PTPN11* mutations were identified in different hematopoietic malignancies and may contribute for the knowledge regarding the genetic and biological profile of MN in Brazil.



## ÍNDICE

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. NEOPLASIAS MIELOIDES .....	1
1.2. VIAS DE SINALIZAÇÃO FREQUENTEMENTE ALTERADAS NAS NEOPLASIAS MIELOIDES.....	5
1.2.1 Via RAS-MAPK.....	8
1.3. NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS .....	14
1.3.1. LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA .....	14
1.3.2. LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA JUVENIL.....	16
1.3.3. SÍNDROME MIELODISPLÁSICA .....	19
1.4. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.....	21
1.4.1 MARCADORES GENÉTICOS DE DIAGNÓSTICO .....	22
2. JUSTIFICATIVA .....	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivo principal.....	27
3.2. Objetivos secundários.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
4.1. PACIENTES E AMOSTRAS .....	28
4.2. MÉTODOS .....	30
4.2.1. Caracterização inicial das neoplasias mieloides.....	30
4.2.2. Testes Moleculares.....	31
4.2.3. Purificação do RNA .....	31
4.2.4. RT-PCR para amplificação do gene GAPDH .....	32
4.2.5. Extração de DNA .....	32
4.2.6. Identificação das fusões gênicas .....	33
4.2.7. Identificação das mutações no gene RAS .....	34
4.2.8. Identificação de mutações no gene PTPN11 .....	35
4.2.9. High resolution Melting .....	36
4.2.10. Identificação de mutações no gene FLT3.....	37
4.2.11. Identificação de mutações no gene <i>KIT</i> .....	38
4.2.12. Reação de sequenciamento.....	39

4.2.13. Análise das sequências .....	40
4.2.14. Hibridização in situ Fluorescente (FISH) para identificação de monossomia do cromossomo 7 .....	41
4.2.15. Análises estatísticas.....	42
4.2.16. Revisão sistemática .....	42
5. RESULTADOS .....	44
5.1. Análise descritiva dos casos de NM pediátricas .....	44
5.2 Alterações moleculares nas NM pediátricas .....	47
5.3. Identificação do status do gene <i>PTPN11</i> .....	50
5.4. Detecção da monossomia do 7 pela técnica de FISH.....	59
5.5. Sobrevida Global dos casos de NM pediátricas .....	60
5.6. Revisão de literatura.....	63
6. DISCUSSÃO.....	65
7. CONCLUSÕES.....	71
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72
9. ANEXOS.....	82
Anexo 1. Artigo publicado com resultados das LMAs pediátricas com mutações em <i>PTPN11</i> anteriores a 2010. ....	82
Anexo 2. Instituições participantes do projeto com o envio de amostras dos casos de NM pediátrica	94
Anexo 3. Ficha de encaminhamento dos pacientes preenchida através do sistema online do PHOP-INCA.....	95
Anexo 4. Ficha de coleta de dados para os casos com mutação no <i>PTPN11</i> .....	97
Anexo.5.Aprovação do comitê de ética.....	98
Anexo 6. Tabela 1. Sequências dos primers utilizados para a identificação das alterações de LMA <i>RUNX1-RUNX1T1</i> , <i>CBFβ-MYH11</i> , <i>PML-RARα</i> e <i>KMT2A-r</i> .....	100
Anexo 7. Tabela 2. Primers que foram utilizados para o sequenciamento dos genes <i>RAS</i> , <i>PTPN11</i> , <i>FLT3</i> e <i>KIT</i> .....	101

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Fatores de risco associados às NM pediátricas.....	5
Tabela 5.1. Características demográficas e classificação dos casos de LMA e DMP pediátrica.....	45
Tabela 5.2. Distribuição da frequência de fusões gênicas e alterações moleculares nas LMAs, LMCs e LMMJs de acordo com a idade, sexo e leucometria; mediana idade e leucometria.....	49
Tabela 5.3. Caracterização clínico-laboratorial dos casos com mutação do <i>PTPN11</i> .....	54
Tabela 5.4. Características laboratoriais dos casos com mutações no <i>PTPN11</i> .....	55
Tabela 5.5. Análise univariada dos parâmetros de sobrevida global dos casos de LMA e DMP.....	61
Tabela 5.6. Estudos de série de casos selecionados para revisão sistemática.....	64
Anexo 2. Instituições participantes do projeto com o envio de amostras dos casos de NM pediátrica.....	94
Anexo 6. Tabela 1. Sequências dos primers utilizados para a identificação das alterações de LMA <i>RUNX1-RUNX1T1</i> , <i>CBFβ-MYH11</i> , <i>PML-RARα</i> e <i>KMT2A-r</i> .....	100
Anexo 7. Tabela 1. Primers que foram utilizados para o sequenciamento dos genes <i>RAS</i> , <i>PTPN11</i> , <i>FLT3</i> e <i>KIT</i> .....	101

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Principais vias de sinalização intracelular desreguladas nas NMs.....	7
Figura 1.2. Receptores tirosina quinase, ciclo GDP-GTP de RAS e a via RAS/MAPK.....	10
Figura 1.3. Representação esquemática do gene <i>PTPN11</i> e a estrutura da proteína tirosina-fosfatase SHP-2.....	11
Figura 1.4. Mutações em SHP-2 estão associadas às NM.....	13
Figura 1.5. Regiões de quebra identificadas na fusão <i>BCR-ABL1</i> e a estrutura da proteína traduzida pela fusão.....	15
Figura 1.6. Frequência das anormalidades citogenéticas e mutações somáticas nos genes <i>PTPN11</i> , <i>KRAS/NRAS</i> e <i>NF1</i> em pacientes com LMMJ.....	17
Figura 1.7. Função da proteína de fusão AML1-ETO (RUNX1/RUNX1T1) e sua interação com C/EBP $\alpha$ .....	23
Figura 1.8. Representação esquemática da <i>in(16)/CBFB/MYH11</i> .....	24
Figura 4.1. Fluxograma do estudo com algoritmo de testes realizados.....	27
Figura 4.1A. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR após amplificação dos códons 12 e 13 do gene <i>KRAS</i> .....	35
Figura 4.1B. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR após amplificação dos códons 12 e 13 do gene <i>NRAS</i> .....	35
Figura 4.2. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR após amplificação do éxon 3 do gene <i>PTPN11</i> .....	36
Figura 4.3. Detecção das mutações do gene <i>FLT3</i> D835.....	38
Figura 4.4. Detecção da duplicação em tandem (ITD) do gene <i>FLT3</i> .....	38
Figura 4.5. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR após amplificação dos éxons 8 (A) e 17 (B) do gene <i>KIT</i> .....	39
Figura 4.6. As imagens de FISH em interfase mostram os sinais das sondas específicas para a detecção da monossomia do 7.....	41
Figura 4.7. Fluxograma dos estudos selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos para revisão sistemática.....	43
Figura 5.1. Faixa etária dos casos de NM estratificadas em $\leq 2$ anos, $>2-10$ anos e $>11$ anos.....	46
Figura 5.2. Gráficos da diferença de fluorescência de amostras selvagens ( <i>Wild type</i> ) e de amostras sugestivo de mutação encaminhadas para o sequenciamento direto.....	50
Figura 5.3. Características clínico-laboratoriais e aspectos moleculares dos casos de LMA com mutações no <i>PTPN11</i> .....	52

Figura 5.4. Características clínico-laboratoriais e aspectos moleculares dos casos de LMMJ.....	53
Figura 5.5. Parte da sequência do éxon 3 do gene <i>PTPN11</i> dos casos mutados.....	57
Figura 5.6. Regiões <i>hotspot</i> das mutações no gene <i>PTPN11</i> .....	56
Figura 5.7. As imagens de FISH em interfase mostram os sinais das sondas específicas para a detecção da monossomia do 7.....	59
Figura 5.8. Análise de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier dos casos de NMs pediátricos.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

*ABL1- C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase*  
aMPO- anti-mieloperoxidase  
APC- Aloficocianina  
APC-H7- Aloficocianina-H  
APL- Leucemia promielocítica aguda  
AR- Anemia refratária  
*ARAF- V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog*  
AREB -Anemia refratária com excesso de blastos  
AREB-1- Anemia refratária com excesso de blastos tipo 1  
AREB-2- Anemia refratária com excesso de blastos tipo 2  
AREB-T- Anemia refratária com excesso de blastos em transformação  
ARSA- Anemia refratária com sideroblastos em anel  
ASRA- Anemia refratária com sideroblastos em anel  
*ASXL1- Additional sex combs like transcriptional regulator 1*  
ATP – Trifosfato de adenosina  
ATRA- *All-trans retinoic acid*  
*BCOR- BCL6 corepressor*  
BCR- *Breakpoint cluster region*  
bp- Pares de bases  
*BRAF- V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*  
C/EBP $\alpha$ - *CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$*   
CBF- Fator de ligação ao núcleo  
*CBFb- Core-binding factor, beta subunit*  
*CBL- Casitas B-lineage Lymphoma*  
CD- Grupo de diferenciação  
cDNA- Ácido desoxirribonucleico complementar  
*CEBPA- CCAAT enhancer binding protein alpha*  
c-FMS- receptor para fator estimulante de colônias de macrófagos  
CID-O3- Terceira Classificação Internacional de Doenças para Oncologia  
CN- Controle negativo  
COSMIC- *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*  
*CRAF- Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase*  
CRDM- Citopenia refratária com displasia multilinear  
CRI- Citopenia refratária na infância

CTH- Células-tronco hematopoiéticas  
DEPC- Dietil pirocarbonato  
DHPLC- Cromatografia líquida de alta resolução  
DIT- Duplicação *in tandem*  
DMP- Doença mieloproliferativa  
DMSO- Dimetilsulfóxido  
DNA- Ácido desoxirribonucleico  
*DNMT3A- DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A*  
dNTP- Desoxirribonucleotídeos fosfados  
EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético  
*EPS15- Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15*  
*ERK - Extracellular signal-regulated kinase*  
EtBr-Brometo de etídio  
*ETV6- ETS variant 6*  
*EZH2- Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*  
FAB- Franco-Américo-Britânico  
FGFR- Receptores do fator de crescimento de fibroblastos  
*FGFR1- Fibroblast growth factor receptor 1*  
FISH- Hibridização in situ fluorescente  
FITC- Isotiocianato de fluoresceína  
FRS- Fator de crescimento de substratos de fibroblastos  
GAP- Proteína ativadora de GTPase  
GAPDH- gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase  
*GATA2 -GATA binding protein 2*  
GEF- Fator de troca de nucleotídeos guanina  
GM-CSF- Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos  
GRB2- Proteína ligada ao receptor para fator de crescimento proteína  
GTP- Guanosina trifosfato  
HbF- Hemoglobina fetal  
HLA-DR- Antígeno leucocitário humano  
HOX- Homeobox  
HRM- High resolution Melting  
IC- Intervalos de confiança  
*IDH1- Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1*  
*IDH2- Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2*

Intra- Intracitoplasmático;  
IPSS- *International Prognostic Score System*  
JAK- Janus-quinases  
JAK/STAT- Janus-quinases/transdutor de sinal e ativador de transcrição  
Kb- Kilobases  
KCl- Cloreto de potássio  
Kda- Kilodalton  
KIT- Homólogo do oncogene viral do sarcoma felino 4  
KMT2A- *Lysine methyltransferase 2A*  
KRAS- *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*  
LA- Leucemia aguda  
LDI-PCR- Invertido de longa distância  
LLA-B- Leucemia linfoblástica aguda de células B  
LMA- Leucemia mieloide aguda  
LMC- Leucemia mieloide crônica  
LMCJ- Leucemia mielóide crônica juvenil  
LMMC- Leucemia mielomonocítica crônica  
LMMJ- Leucemia mielomonocítica juvenil  
MgCl<sub>2</sub>-Cloreto de magnésio  
min- Minutos  
MLL - *Mixed-lineage leukemia*  
MLLT10 (AF10) - *Mixed-lineage leukemia translocated to 3*  
MLLT3 (AF9) - *Mixed-lineage leukemia translocated to 3*  
MLLT4 (AF6) - *Mixed-lineage leukemia translocated to 4*  
mM- millimolar  
MO- Medula óssea  
MYH11- *Myosin heavy chain 11*  
NF1- Neurofibromatose tipo 1  
NGS- Sequenciamento de Nova Geração  
NIPBL- *NIPBL, cohesin loading factor*  
nm- Nanômetros  
nM- Nanomolar  
NM- Neoplasia mieloide  
NMP- Neoplasia mieloproliferativa  
NR- Neutropenia refratária



*NRAS- Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*  
N-SH2- Domínio N-terminal homólogo a Src 2  
OMS- Organização Mundial da Saúde  
PCM1- Pericentriolar material 1  
PCR-Reação em cadeia da polimerase  
*PDGFRA- Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha*  
*PDGFRB- Platelet Derived Growth Factor Receptor beta*  
PDGFR-Receptore tirosina do fator de crescimento derivado de plaquetas  
PE- Ficoeritrina  
PE-CY7- Ficoeritrina-cianina 7  
PerCP-CY5.5- Proteína Clorofila Peridininina  
PI3K/AKT- fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase  
*PML- Gene da leucemia promielocítica*  
pSG- Probabilidade de sobrevida global  
PTP- Domínio tirosinofosfatase  
*PTPN11- Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*  
*RAD21- RAD21 cohesin complex component*  
*RAF- Oncogene viral v-raf-leukemia*  
*RARECARE- Surveillance of Rare Cancers in Europe*  
RAR $\alpha$ - Receptor alfa do ácido retinóico  
RAS/MAPK- Proteína-quinase ativada por mitógeno  
RBD- Domínio de ligação a RAS  
Rho- *Rhodopsin*  
*r-KMT2A- Rearranjos do gene KMT2A*  
RNA-Ácido ribonucleico  
Rpm-Rotações por minuto  
RTK- Receptor tirosina quinase  
RT-PCR- Transcrição reversa seguida por PCR  
*RUNX1- Runt related transcription factor 1*  
*RUNX1T1- Runt-related transcription factor 1; translocated to, 1*  
SD- Síndrome de Down  
seg- Segundos  
*SF3B1- Splicing factor 3b subunit 1*  
*SF3B1- Splicing factor 3b subunit 1*  
SG- Sobrevida global

SH1- Src Homologia 1  
SH2- Src Homologia 2  
SHP-1-Tirosina fosfatase 1  
SHP-2 - *Src homology phosphatase-2*  
SHP-2- Proteína tirosina fosfatase 2  
SHPs-Tirosina fosfatases  
SIRP $\alpha$ - Sinal regulatório de proteína  $\alpha$   
*SMC1A- Structural maintenance of chromosomes 1A*  
*SMC3- Structural maintenance of chromosomes 3*  
SMD- Síndrome mielodisplásica  
SN- Síndrome de Noonan  
SOS- *Son of sevenless homolog*  
SP- Sangue periférico  
*SRSF2- Serine and arginine rich splicing factor*  
SRSF2- Serine and arginine rich splicing factor 2  
*SRSF2- Serine and arginine rich splicing factor 2*  
*STAG2 - Stromal antigen 2*  
STAT- Transdutor de sinal e ativador de transcrição  
*STAT5- Signal transducer and activator of transcription 5*  
TCTH- Transplante de células-tronco hematopoéticas  
*TET2- Tet methylcytosine dioxygenase 2*  
TK- Tirosina quinase  
TKD- Domínio da tirosina quinase  
TKI- Inibidor de tirosina quinase  
TR- Trombocitopenia refratária  
TyK2- Tirosina quinase 2  
*U2AF1- U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1*  
*U2AF35-U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1*  
WHO- *The World Health Organization*  
*ZRSR2- Zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2*  
 $\mu$ g- Micrograma  
 $\mu$ L- Microlitros  
 $\mu$ M- Micromolar

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. NEOPLASIAS MIELOIDES

O processo de formação dos componentes celulares do sangue a partir das células-tronco hematopoiéticas (CTH) é denominado hematopoiese. Este processo ocorre durante o período fetal e na fase adulta para produzir e restabelecer o tecido hematopoiético (ORKIN, 2000). As CTHs residem em microambientes específicos na cavidade da medula óssea (MO), que incluem os nichos endosteal e vasculares. Neste microambiente, as células tronco recebem sinais de mediadores químicos instrutivos que mantêm sua sobrevivência (LIN, 2002). Ainda, o nicho orchestra dinamicamente o comportamento das CTHs, mantendo um equilíbrio entre quiescência, auto-renovação e diferenciação (FUCHS; TUMBAR; GUASCH, 2004; MORRISON; SPRADLING, 2008).

As CTHs podem sofrer dois tipos de divisões celulares: i) assimétrica, em que cada CTH se divide dando origem a duas células filhas, sendo uma célula diferenciada e uma CTH filha, permitindo manter um número constante de células-tronco, que geralmente é suficiente para homeostase; ii) simétrica, em que cada célula-tronco dá origem a duas células-tronco filhas, aumentando em número e ocorrendo, geralmente, em leões teciduais e em condições de perda células diferenciadas (GATTAZZO; URCIUOLO; BONALDO, 2014).

As CTHs têm o potencial de diferenciar-se em várias células progenitoras que eventualmente se comprometem com uma linhagem específica ao longo da vida (ORKIN, 2000). As células progenitoras são diferentes das CTHs, pois apresentam capacidade proliferativa e de diferenciação limitada. Além do mais, os marcadores de superfície específicos identificados são diferentemente expressos em ambas células (ORKIN, 2000).

No sistema hematopoiético, as CTHs dão origem às células progenitoras mieloides e linfoides. Os progenitores mieloides originam as células maduras conhecidas como megacariócitos, eritrócitos, granulócitos e macrófagos; e os de origem linfoide, os linfócitos T, B e as células NK (WEISSMAN, 2000; CHHABRA *et al.*, 2016).

A ocorrência de alterações moleculares, tais como translocações cromossômicas que geram fusões gênicas e a presença de mutações em genes que participam de vias de sinalização celular, contribui para a modificação das funções celulares das CTHs ou de seus progenitores, podendo levar ao desenvolvimento de neoplasias hematológicas. As neoplasias mieloides (NM) são um grupo de doenças clonais de CTH da MO, que resultam do descontrole proliferativo e maturativo em uma ou mais séries da linhagem mioelide (VARDIMAN JW, THIELE J, 2008). Dentre as principais NM pediátricas, estão a leucemia mioelide crônica (LMC), a leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), a síndrome mielodisplásica (SMD) e a leucemia mioelide aguda (LMA).

Nos países desenvolvidos, as LMMJs e LMCs são mais raras na infância e correspondem a 1-2% de todas as leucemias nesta fase, com uma taxa de sobrevida de 24-54% em 5 anos para as LMMJs e 44% para as LMCs (YOSHIMI; KOJIMA; NAOTO, 2010; HIJIYA *et al.*, 2016). Da mesma forma, as SMDs ocorrem com menor frequência em crianças (5%), com uma taxa de sobrevida em 5 anos de 29% (CHATTERJEE; CHOUDHRY, 2013; VISSER *et al.*, 2012). Em relação à leucemia aguda (LA), a LMA corresponde a 15-20% das leucemias agudas pediátricas, equivalendo a 30% de todas as mortes relacionadas à doença (MESHINCHI; SMITH; ARCECI, 2003; PUI *et al.*, 2011).

Na Europa, um estudo epidemiológico que utilizou dados recolhidos pela *Surveillance of Rare Cancers in Europe* (RARECARE) de 64 registros de câncer de base populacional europeus avaliou a incidência de pacientes com NM diagnosticados entre 1995-2002. Em termos gerais, as NM apresentaram uma taxa de incidência de 1 por 100.000 casos diagnosticados com idade entre 0-14 anos. A LMA e LMC apresentaram menores taxas de incidência, correspondendo de 0,7 e 0,1 por 100.000 casos com idade entre 0-14 anos, respectivamente. As taxas de incidência para os casos de SMDs foram identificadas a partir da faixa etária entre 25-64 anos (0,4 por 100.000) e acima dos 65 anos (8,2 por 100.000) (VISSER *et al.*, 2012).

Nos Estados Unidos, durante os anos de 2003 a 2008, as SMDs apresentaram variações nas taxas de incidência de 4,1 para 4,6 casos por 100.000 pessoas. Uma taxa de incidência de 0,2 foi observada em crianças com idade menor que um ano, diminuindo para 0,1 durante as idades entre 1-4 anos e mantendo essa taxa até os 20-24 anos. O maior pico de incidência é observado em idosos com idade  $\geq 85$  anos, com uma taxa de 49,7 casos por 100.000 pessoas (XIAOMEI, 2012).

As LMMJs ocorrem com uma incidência estimada de 1,2 casos por milhão/ano, com uma mediana de idade ao diagnóstico de 2 anos (CHANG; DVORAK; LOH, 2014). No Reino Unido, a taxa de incidência é de 0,69 baseado na média da população com idade entre 0-14 anos. (PASSMORE *et al.*, 2003).

As LMAs pediátricas apresentam uma taxa de incidência de 7 casos por milhão de crianças com idade  $\leq 15$  anos (CREUTZIG *et al.*, 1987; HOWLADER *et al.*, 2011). O pico de incidência da doença acontece no primeiro ano de vida e diminui até a idade de quatro anos, quando volta a aumentar e permanece relativamente constante ao longo dos anos da infância e início da idade adulta (DORES *et al.*, 2012). Em crianças com idade  $\leq 1$  ano, a taxa de incidência da LMA é de 18,4 casos por milhão, declinando para 4,3 casos por milhão para as idades de 5-9 anos e aumentando a 7,7 casos por milhão de crianças com idades entre 10-14 anos (HOWLADER *et al.*, 2009; DORES *et al.*, 2012).

No Brasil, as taxas de incidência dos casos de NMs variam de acordo com as regiões geográficas (REIS *et al.*, 2011). Em Manaus, na Região Norte, as NMs apresentam a maior taxa média de incidência (56,6 casos por milhão). A capital Fortaleza apresenta uma frequência de 26% (taxa de incidência de 12,8 para meninos e 9,7 para meninas), Goiânia 33% (taxa de incidência de 14,3 para meninos e 35,0 para meninas) e João Pessoa 30% (taxa de incidência de 6,4 para meninos e 13,4 para meninas) (REIS *et al.*, 2011). Em Recife, a taxa de incidência é de 7,1 por milhão para as NMs com uma taxa de sobrevivência global (SG) de 37,8% (LINS *et al.*, 2017). Diante disto, é importante compreender os fatores etiológicos associados aos casos de NM em crianças.

O aumento da incidência de NM em Goiana, João Pessoa e Fortaleza, no geral, poderia ser explicada pelo efeito causado por exposição a fatores de riscos ambientais. Sexo, idade, cor da pele, etnia/raça, alterações moleculares (rearranjos cromossômicos) e suscetibilidade genética são variáveis importantes para a caracterização da NM. Embora os mecanismos pelos quais os fatores de risco exerçam efeitos sobre a biologia da NM seja complexo, as evidências sugerem que a combinação desses fatores contribui para o desfecho clínico dos pacientes. Especula-se que as diferenças biológicas entre as NMs são o reflexo da interação genética-ambiental que interferem nos processos celulares (proliferação, diferenciação e apoptose).

Estudos epidemiológicos indicam que exposições a fatores físicos e químicos no ambiente da criança, incluindo radiação ionizante, tabagismo parental, pesticidas, fumaça do trânsito, tinta e produtos químicos domésticos podem desempenhar um papel no desenvolvimento de alguns subtipos de leucemia e linfoma em adultos e crianças (GREAVES, 2002). Infecções virais (como vírus *Epstein Barr*) e bacterianas (*Helicobacter pylori*) durante o desenvolvimento da primeira infância estão ligadas ao aumento das taxas de LA infantil (ALIBEK *et al.*, 2013). Além disso, durante o período pré-natal, a exposição da mãe a certas substâncias cancerígenas pode ser prejudicial para o feto, criando uma janela de vulnerabilidade fetal para o desenvolvimento de NM (WIEMELS, 2012).

Doenças congênitas, tais como anemia de Fanconi e síndrome de Shwachman-Diamond, são fatores conhecidos por aumentar risco para SMD, bem como a exposição ocupacional ao benzeno e a quimioterapia para uma doença maligna anterior (MA, 2012). Os pacientes com SMD que têm história de tratamento de mieloma, linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin são considerados SMD "secundárias" ou "relacionadas à terapia", e tendem a apresentar um prognóstico muito ruim (TEFFERI; VARDIMAN, 2009).

Síndromes genéticas tais como a síndrome de Noonan (SN) e a neurofibromatose tipo 1 (NF1) predisõem para o desenvolvimento de NM. NF1 é uma desordem genética autossômica dominante que afeta 1/2000-1/4500 indivíduos (YOSHIMI; KOJIMA; NAOTO,

2010). O gene *NF1*, associado a essa síndrome, codifica uma proteína multifuncional chamada de neurofibromina que está envolvida na regulação de muitas vias de sinalização celular.

Os sinais clínicos em crianças com NF1 incluem neurofibromas, manchas café com leite, sardas axilares ou inguinais, nódulos Lisch, glioma óptico e lesões ósseas (DEBELLA; SZUDEK; FRIEDMAN, 2000). O diagnóstico de NF1 em lactentes é muito dificultoso, pois nem sempre as crianças nessa idade apresentam sinais clínicos evidentes. Em aproximadamente 99% das crianças com NF1, as manchas café com leite são visíveis no primeiro ano de idade, podendo surgir outros sinais clínicos tardiamente. De 4-10% das crianças com LMMJ podem ter o diagnóstico clínico de NF1 (NIEMEYER *et al.*, 1997).

A SN é caracterizada por dimorfismos faciais típicos, retardo do crescimento e cardiopatia congênita. Indivíduos com SN podem desenvolver transtornos mieloproliferativos semelhantes a LMMJ que, frequentemente, ocorrem em crianças muito novas e regredem de forma espontânea (TARTAGLIA; ZAMPINO; GELB, 2010).

Outras síndromes genéticas, como a síndrome de Down (SD), podem predispor ao desenvolvimento de LMA em crianças com idade < 2 anos. Pacientes com SD apresentam mutações no gene *GATA-1* sendo muito comum em neonatos e lactentes (WECHSLER *et al.*, 2002). *GATA-1* é um fator de transcrição de ligação ao DNA, codificado no cromossomo X. A proteína tem um importante papel no crescimento e maturação de células eritróides e megacariócitos. No entanto, mutações levam à introdução de um códon de parada na sequência que codifica o domínio de ativação amino-terminal. Essas mutações impedem a síntese de *GATA-1* de comprimento total, mas não a síntese de uma variante mais curta, e subsequentemente, resulta no aumento da proliferação de células eritróides e megacariócitos.

Na Tabela 1.1, estão representados as principais síndromes germinativas e os fatores de riscos associadas ao desenvolvimento das NM.

Tabela 1.1 Fatores de risco associados às NM pediátricas

Síndromes germinativas	Exposições químicas	A exposição física	Quimioterapia
Síndrome de Down	Benzeno	Raios- X	Agentes alquilantes
Síndrome de Bloom	Medicamento metronidazol		Inibidores da topoisomerase-II
Ataxia telangiectasia	Pesticidas		Antraciclinas
Síndrome de Shwachman-Diamond	Tabagismo		Taxanos
Anemia de Fanconi	Álcool		
Síndrome de Noonan			
Neutropenia congênita grave			
Distúrbio de plaqueta familiar			
Disqueratose congênita			

A SN e NF1 pertencem às RASopatias, que são um grupo definido de síndromes genéticas causadas por mutações em genes que codificam componentes reguladores da via RAS/MAPK (AOKI *et al.*, 2016). Estudos moleculares revelaram que 70% das mutações germinativas identificadas em pacientes com SN estão presentes em genes da via RAS/MAPK. Estas síndromes apresentam características fenotípicas sobrepostas cujo diagnóstico diferencial se baseia na identificação dos genes envolvidos e na revisão clínica. Embora mutações germinativas na via RAS/MAPK estejam associadas a síndromes, mutações somáticas estão mais fortemente relacionadas ao surgimento de neoplasias mieloides.

## 1.2. VIAS DE SINALIZAÇÃO FREQUENTEMENTE ALTERADAS NAS NEOPLASIAS MIELOIDES

A proliferação e a sobrevivência de CTH é controlada por uma complexa rede de sinalização, formada por receptores tirosina quinase (RTK), membros da família RAS, a cascata RAF/MEK/ERK (MAPKKK; proteína quinase ativada por mitógeno), ERK (quinase regulada por sinal extracelular), quinases da família Janus-quinases (JAKs), transdutor de sinal e ativador de transcrição (STATs) e a via PI3K/AKT (fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase). Estas vias de sinalização também desempenham outras funções importantes como o controle do ciclo celular e regulação da apoptose, e em cascatas de sinalização intracelular, tais como a via PI3K/AKT, JAK/STAT e RAS/MAPK (Figura 1.5). (SCHOLL; GILLILAND; FRÖHLING, 2008; THOMAS *et al.*, 2015).

O mecanismo de ativação da via PI3K/AKT se inicia pelo recrutamento da proteína PI3K para membrana, pela ligação direta a resíduos consenso de fosfotirosina de receptores

de fator de crescimento ou através de domínios SH2 na subunidade do adaptador levando, posteriormente, à ativação alostérica da subunidade catalítica. A ativação resulta na produção do segundo mensageiro fosfatidilinositol-3, 4, 5- trifosfato (PIP3). O produto lipídico de PI3K, PIP3, recruta um subgrupo de proteínas de sinalização com domínios de homologia da *pleckstrin* (PH) para a membrana, incluindo PDK1 e AKT. Uma vez ativada, AKT medeia a ativação e inibição de vários alvos, resultando em sobrevivência celular, crescimento e proliferação (Figura 1.1) (FRESNO VARA *et al.*, 2004).

A via JAK/STAT é regulada por quatro proteínas JAKs conhecidas (JAK1, JAK2, JAK3 e TyK2) que ficam associadas aos receptores de citocinas. A ativação do receptor pela ligação de citocinas leva à dimerização, causando aproximação de duas JAKs para que possam fazer a transfosforilação, aumentando a atividade de seus domínios de tirosina-quinase. Então, os resíduos de tirosina dos receptores são fosforilados pelas JAKs formando, assim, sítios de ancoragem para as proteínas STATs. Quando estimuladas, as STATs são recrutadas por meio da interação entre os domínios SH2 (Src Homologia 1). Posteriormente, as STATs se autofosforilam, desligando-se do receptor e dimerizando-se por meio da interação com os domínios SH2 recíprocos. Finalmente, as STATs se deslocam para o núcleo e se ligam ao DNA, em regiões de elementos responsivos a STAT5 (Figura 1.1) (CHEN; STAUDT; GREEN, 2012; THOMAS *et al.*, 2015).



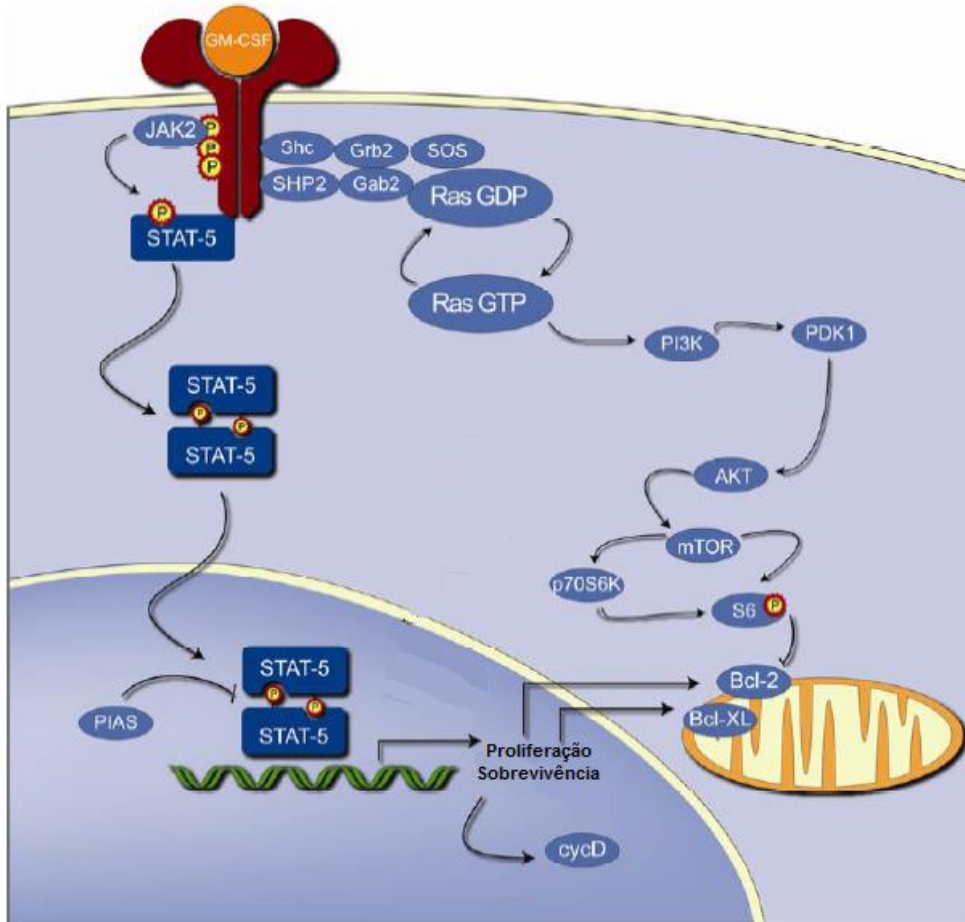


Figura 1.1. Principais vias de sinalização intracelular desreguladas nas NMs. As vias PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT e RAS/RAF/MEK/MAPK são as principais alteradas. Fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K) é um lipídeo citoplasmático e uma proteína quinase recrutada para a membrana por receptores ativado por fatores de crescimento. A PI3K fosforila o grupo hidroxila 3' dos fosfoinosítídeos para produzir fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que é um segundo mensageiro que sinaliza através da AKT para ativar várias enzimas, quinases e fatores de transcrição, incluindo alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR). A fosforilação das JAKs e os receptores geram locais de ancoragem para os STATs que estão no citosol e são recrutados para o complexo ativo. Após a fosforilação das STATs, estas proteínas se desligam do receptor e dimerizando-se. Posteriormente se deslocam para o núcleo e se ligam a sequências específicas no DNA palindrômico em regiões promotoras de genes alvo para ativar sua transcrição. A via RAS/MPAK é mais detalhada abaixo (KOTECHA *et al.*, 2009)

### 1.2.1 Via RAS-MAPK

A via RAS/MAPK (proteína-quinase ativada por mitógeno) é essencial na regulação do ciclo celular, na diferenciação, no crescimento e na senescência celular. Os receptores tirosina quinase (RTK) são proteínas transmembrana que apresentam um domínio de ligação extracelular e um domínio intracelular catalítico com atividade quinase, além de uma estrutura bilobar, sendo um lóbulo N-terminal que se liga ao ATP e ao magnésio, e um lóbulo C-terminal contendo uma alça de ativação (Figura 1.2A) (VAN ETTEN *et al.*, 2003).

Os receptores de citocinas e de fatores de crescimento apresentam domínios intracelulares tirosina quinase (TK), subunidades catalíticas e sítios de fosforilação de tirosil. Estes incluem o receptor c-FMS (receptor para fator estimulante de colônias de macrófagos), o receptor FLT3 (tirosina quinase 3 semelhante a Fms), KIT (homólogo do oncogene viral do sarcoma felino 4), receptores tirosina do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) -alfa e -beta, receptores do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR) -1 e -3, entre outros (VAN ETTEN, 1999).

Em células normais e na ausência de ligante, os RTKs não são fosforilados e se encontram na forma de monômeros, mantendo a conformação dos seus domínios quinase inativa. Em alguns RTKs, a região justamembrana citoplasmática contribui para a inibição de interação direta com o domínio quinase (GRIFFITH *et al.*, 2004).

A interação do ligante com o domínio extracelular do RTK resulta na oligomerização do receptor, interrupção da interação justamembrana autoinibitória e consequente autofosforilação do domínio TK, aumentando a atividade catalítica da enzima e criando locais de ligação para proteínas de sinalização citoplasmática, através do recrutamento dessas proteínas para a membrana e posterior ativação de múltiplas vias de sinalização (SCHLESSINGER, 2000).

A transmissão do sinal do RTK para o núcleo ocorre, principalmente, através de uma sequência de fosforilação de várias proteínas intracelulares tradutoras de sinal. Proteínas RAS são GTPases pequenas ligadas a nucleotídeos de guanosina que correspondem a um ponto inicial crítico da sinalização no interior da célula. Os genes *RAS* são uma família que incluem *HRAS*, *NRAS* e *KRAS*. RAS é ativado através do receptor TK, receptores acoplados a proteína G, receptores de citocinas e receptores da matriz extracelular.

RAS ligado ao GDP é ativado por um fator de troca de nucleotídeo de guanosina (GEF), que induz a liberação do GDP e, assim, permite a ligação de GTP. Essa interação induz uma mudança conformacional na proteína RAS, que permite ligar-se a efetores através de seus domínios de ligação a RAS (RBDs). O estado ativo de RAS é acelerada até  $10^5$  vezes

pela ligação de uma proteína ativadora da GTPase (GAP), porém, o estado ativo é limitado pela atividade intrínseca e lenta das GTPases, permitindo, novamente, a ligação de RAS ao GDP, retornando a proteína ao seu estado inativo (Figura 1.2B) (AHEARN *et al.*, 2012).

A ativação através do RTK ocorre com a ligação de um fator de crescimento ao receptor causando a autofosforilação do RTK, promovendo a ativação de moléculas adaptadoras, como a proteína tirosina fosfatase 2 (SHP-2) e a proteína ligada ao receptor para fator de crescimento (GRB2). A GRB2 se liga à proteína SOS (*son of sevenless homolog*) que, por sua vez, é recrutada para a membrana plasmática. As proteínas SOS pertencem ao grupo das GEFs que aumentam a taxa de troca de nucleotídeos de RAS de GDP por GTP. Quando ativada, RAS leva à ativação de RAF (*oncogene viral v-raf-leukemia*) (ARAF, BRAF, e/ou CRAF). RAF fosforila e ativa MEK1 e/ou MEK2 (MAPK quinase) que, por sua vez, fosforilam e ativam ERK1/ERK2. ERK1/2 são os efetores finais e exercem a sua função através da interação com componentes nucleares, fatores de transcrição, proteínas de membrana e proteínas quinases que controlam as funções celulares vitais, incluindo a progressão do ciclo celular, a diferenciação e o controle do crescimento da célula (Figura 1.2C) (BOS, 1989; AHEARN *et al.*, 2012).

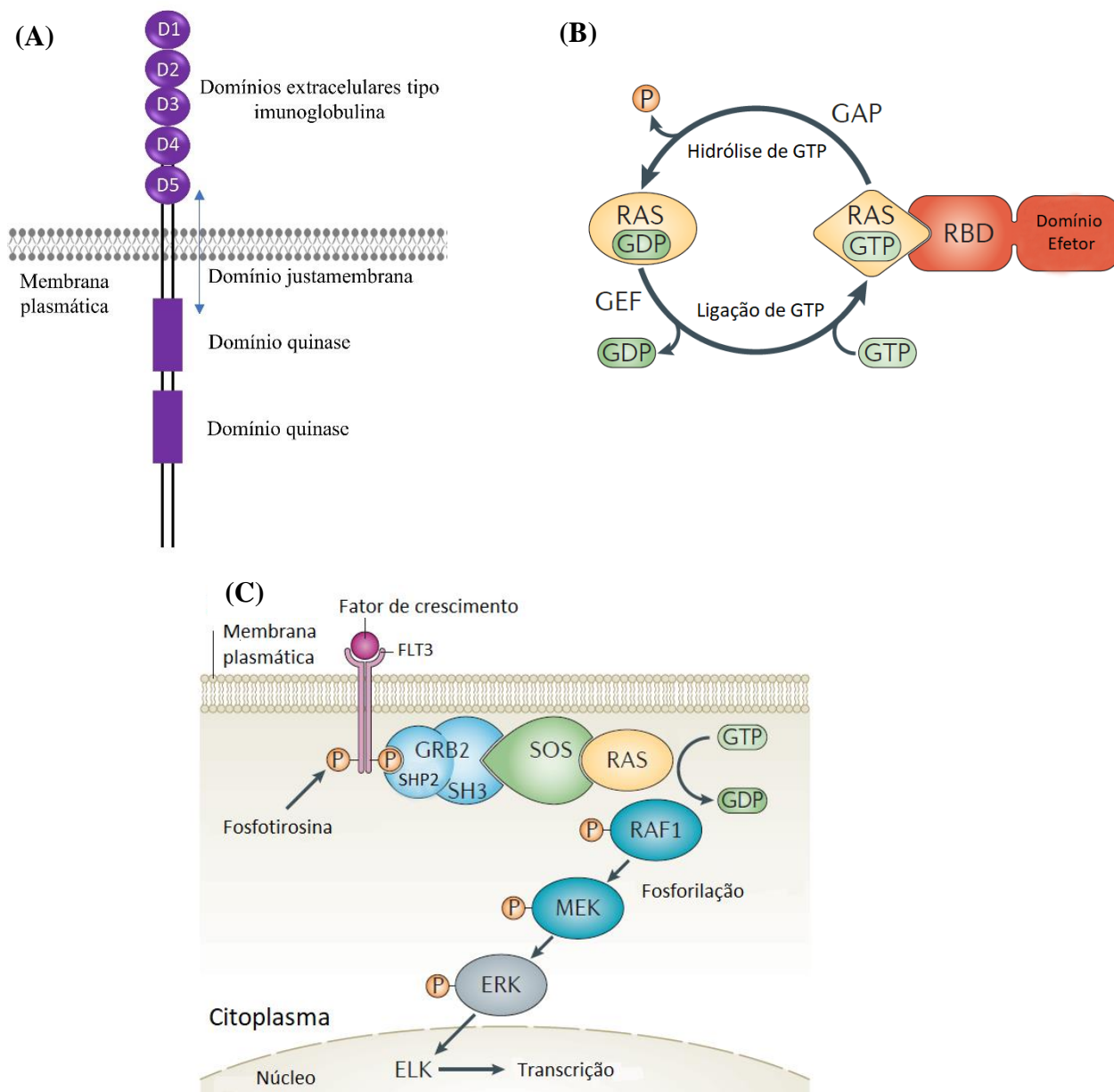


Figura 1.2. Receptores tirosina quinase, ciclo GDP-GTP de RAS e a via RAS/MAPK. **(A)** O receptor tirosina quinase apresenta cinco domínios extracelulares tipo imunoglobulina (D1-D5) responsáveis pela interação com o ligante, um domínio transmembrana, um domínio justamembrana e dois domínios tirosina-quinase intracelulares (RULINA; SPIRIN; PRASSOLOV, 2010). **(B)** As proteínas RAS variam entre a forma ligada a GTP (ativa) e a forma ligada a GDP (inativa). **(C)**. 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 (SHP2) e a proteína ligada ao receptor para fator de crescimento (GRB2)] e estimulando fatores de troca de nucleotídeos guanosina (como SOS). SOS deixa as proteínas 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. Reproduzido de AHEARN *et al.*, 2012.

Mutações em genes que codificam RTKs, como no *FLT3*, são frequentemente identificadas nas NMs que levam à desregulação da via RAS/MAPK. Dois tipos de mutações são descritas no gene *FLT3*: as duplicações *in tandem* (ITD) no domínio justamembrana e as mutações pontuais ou pequenas deleções/inserções que afetam os códon Asp835 ou Ile836 no domínio da tirosina quinase (TKD) (NAKAO *et al.*, 1996; YAMAMOTO *et al.*, 2001). Ambas resultam na atividade constitutiva do RTK, estimulando a proliferação de CTH (GILLIAND & GRIFFIN, 2002). A forma mais comum de mutação no *FLT3* é a DIT nos éxons 14 e 15, que ocorrem em 15-35% das LMAs (NAKAO *et al.*, 1996; MESHINCHI *et al.*, 2006).

A sinalização do RTK é modulada pelas proteínas tirosina fosfatases (SHPs), e alterações na função dessas proteínas podem resultar em um mecanismo oncogênico (MOHI; NEEL, 2007). A atividade oncogênica da SHP é melhor caracterizada pela SHP-2 (*Src Homology region 2-domain Phosphatase 2*) e mutações de ativação são encontradas nas LAs, sendo menos frequentes em outras neoplasias (MOHI; NEEL, 2007) Nas vias de sinalização dos RTKs, SHP-2 é necessária para a ativação completa da via MAPK/ERK.

A superexpressão e a ativação constitutiva da SHP-2 são alterações comuns de vários tipos de LA e estão relacionados à capacidade proliferativa dos blastos leucêmicos (BO *et al.*, 2005). A proteína tirosina-fosfatase SHP-2 é codificada pelo gene *PTPN11*, localizado na região cromossômica 12q24. O *PTPN11* possui 15 éxons, os éxons 2 e 3 codificam o domínio N-SH2, os éxons 4 e 5 o domínio C-SH2, os éxons de 6 a 13, o domínio tirosinofosfatase (PTP), e os éxons 14 e 15 codificam a região carboxi-terminal (MATOZAKI *et al.*, 2009) (Figura 1.3).

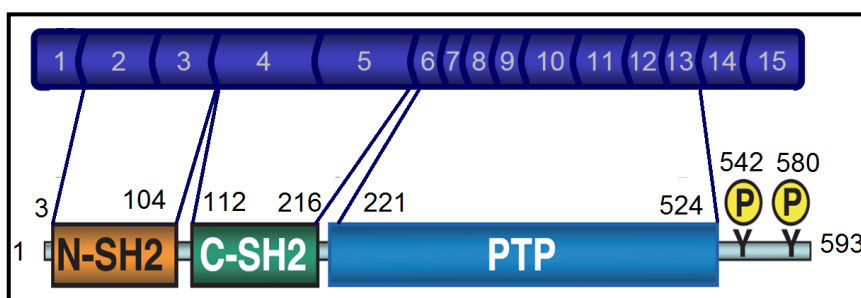


Figura 1.3. Representação esquemática do gene *PTPN11* e a estrutura da proteína tirosina-fosfatase SHP-2. A proteína possui dois domínios SH2 em *tandem* (N-SH2 e C-SH2), um único domínio de proteína tirosina fosfatase (PTP) e uma cauda hidrofóbica COOH-terminal que inclui locais de fosforilação de tirosina (MATOZAKI *et al.*, 2009).

SHP-2 se caracteriza por apresentar dois domínios SH2 (N-SH2 e C-SH2), pelos quais ela reconhece e se liga a sítios de tirosina fosforilados de receptores ou de proteínas adaptadoras (TARTAGLIA *et al.*, 2006)

A exposição das células a estímulos extracelulares leva à ativação de SHP-2 em resposta a RTKs-fosforilados, a receptores de fatores de crescimento (como o fator de crescimento derivado de plaquetas [PDGF]), em resposta ao receptor de substratos de insulina [IRSs], a ligantes de proteínas associadas a GRB2 [GABS], ao fator de crescimento de substratos de fibroblastos [FRS] ou ao sinal regulatório de proteína  $\alpha$  [SIRP $\alpha$ ; também conhecido como substratos SHP-1, SHPS-1]. Tais interações são importantes para o recrutamento de SHP-2 para locais próximos à membrana plasmática onde se localizam os potenciais substratos (MATOZAKI *et al.*, 2009).

A proteína SHP-2 modula as moléculas de adesão celular induzidas por vias de sinalização intracelular e desempenha um papel importante na migração e na motilidade celular para controlar a atividade da proteína Rho (YU *et al.*, 1998).

Além da atividade tirosina fosfatase, SHP-2 pode agir como proteína adaptadora através da fosforilação das tirosinas Y546 e Y584 na sua porção amino terminal, o que permite a formação de um sítio de acoplamento para outras moléculas que possuam domínios SH2. Ambas as funções, molécula adaptadora e tirosina fosfatase, são relevantes e podem ter efeito direto positivo ou negativo nas cascatas de sinalização (STONE; JACK, 1994; MOHI; NEEL, 2007).

O *PTPN11* é necessário para o desenvolvimento celular hematopoiético e participa da transdução de sinal de citocinas como GM-CSF e IL-3 (interleucina-3) (KRATZ *et al.*, 2005). Além disto, SHP-2 modula as moléculas de adesão celular induzidas por vias de sinalização intracelular e verificou-se que desempenha um papel importante na migração e na motilidade celular (YU *et al.*, 1998; KRATZ *et al.*, 2005).

Mutações nos éxons 3 e 13 no gene *PTPN11* são identificadas nas leucemias, porém, alterações no éxon 3 são as mais frequentes nas LMAs e DMP pediátricas (TARTAGLIA *et al.*, 2002; TARTAGLIA *et al.*, 2003; LOH *et al.*, 2004). Essas alterações aumentam a atividade catalítica de SHP-2 por diminuírem ou eliminarem a interação dos domínios N-SH2 e PTP que mantêm a SHP-2 em seu estado inativo. Assim, alterações nesse gene podem levar à perda dos mecanismos de controle de proliferação celular.

A SHP-2 está inativa quando há interação dos domínios N-SH2 e C-SH2; quando o *PTPN11* encontra-se mutado, essas interações são alteradas e a atividade da fosfatase passa a ser superregulada, permitindo que haja uma ativação inapropriada da cascata RAS/MAPK (YAMAMOTO *et al.*, 2006) (Figura 1.4).

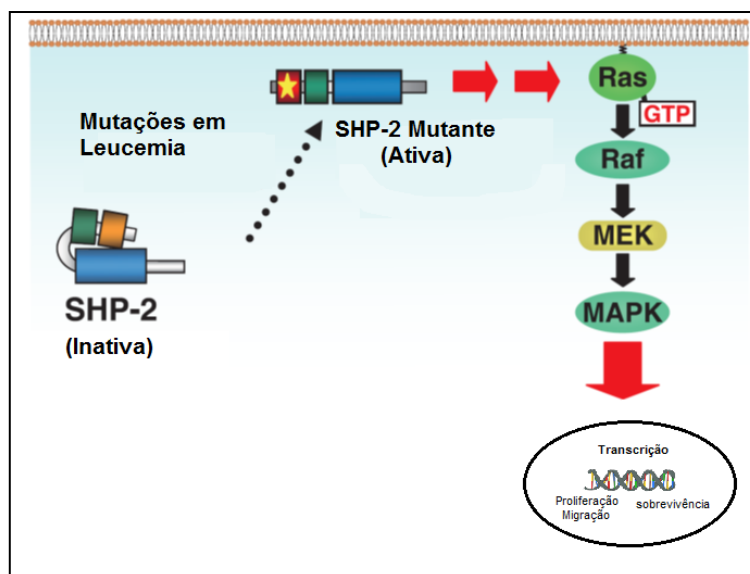


Figura 1.4. Mutações em SHP-2 estão associadas às NM. A SHP-2 está inativa quando os domínios N-SH2 e C-SH2 estão ligados ao domínio PTP. Alterações em N-SH2 leva a perda da interação autoinibitória da atividade de PTP, mantendo a proteína constitutivamente ativa. Reproduzido de MATOZAKI *et al.*, 2009.

Modelos murinos mutados *PTPN11*<sup>D61G/+</sup> desenvolvem doenças mieloproliferativas e esplenomegalia (ARAKI *et al.*, 2004). Essas alterações estão associadas às leucemias e são potentes na transformação de células da MO em camundongos (MOHI *et al.*, 2005).

Mutações no *PTPN11* ocorrem em cerca de 50% dos indivíduos portadores da Síndrome de Noonan (SN), em 35% dos pacientes com LMMJs, em 7% na leucemia linfoblástica aguda e em cerca de 5% nas LMAs pediátricas (TARTAGLIA *et al.*, 2003; TARTAGLIA *et al.*, 2004). Alterações esporádicas no *PTPN11* são raramente identificadas na LMA em adultos e nos tumores sólidos (NOMDEDÉU *et al.*, 2005; TIRES-ALJ *et al.*, 2004).

### 1.3. NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

#### 1.3.1. LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

A LMC é caracterizada pela translocação recíproca t(9;22)(q34;q11.2), que resulta na fusão dos genes *ABL1* [9q34] e *BCR* [22q11], produzindo o rearranjo gênico *BCR-ABL* (ROWLEY, 1973). A região dos pontos de quebra dos genes *BCR* e *ABL1* são altamente variáveis, porém, a recombinação envolve a fusão dos íntrons 1, 13/14 ou do éxon 19 do *BCR*, com uma região de 140 kb do *ABL1* entre os éxons 1b e 2 (SCORE *et al.*, 2010). Descrito como p210<sup>BCR-ABL</sup>, a fusão do éxon 13 do *BCR* com o éxon 2 do *ABL1* (e13a2) ou éxon 14 do *BCR* com o éxon 2 do *ABL1* representam a maior parte dos transcritos das LMCs, resultando numa proteína híbrida de 210 kDa (M-BCR). A isoforma p210<sup>BCR-ABL</sup> é, eventualmente, encontrada nas LMAs. A fusão *BCR-ABL* também gera um transcrito menor (m-BCR), que é referido como p190<sup>BCR-ABL</sup> (e1a2) e codifica uma proteína híbrida de 190 kDa. A isoforma p190<sup>BCR-ABL</sup> é comumente encontrada nas leucemias linfoblásticas agudas de células B (LLA-B) e, ocasionalmente, nas LMAs, sendo rara nas LMCs (VAN DONGEN *et al.*, 1999; KANG *et al.*, 2016).

A proteína BCR-ABL1 possui domínios originados de ambos os genes. Os domínios da proteína BCR incluem um domínio *coiled-coil* N-terminal (CC, contendo de 1-63 aminoácidos), um domínio quinase Ser/Thr que contém uma região de reconhecimento (tirosina fosforilada 177, Y177) para a proteína adaptada ao receptor do fator de crescimento da proteína adaptadora 2 (GRB2) (VAN ETTEN, 2000; HE *et al.*, 2012; MILLION), e um domínio quinase de genes homólogos da família do fator de troca de nucleotídeo de guanina (Rho/GEF), que possui de 298-413 aminoácidos. Em relação à estrutura proteica de ABL1, estão incluídos os domínios SH1 e SH2, um domínio rico em prolina e domínios de ligação a DNA e actina (KANG *et al.*, 2016) (Figura 1.5).



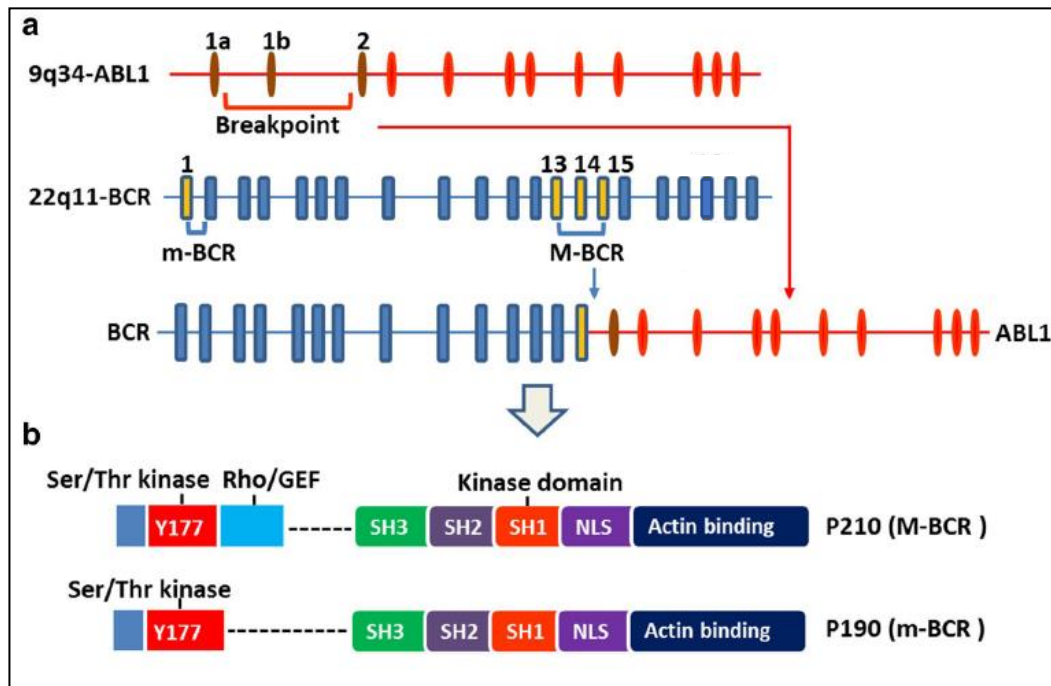


Figura 1.5. Regiões de quebra identificadas na fusão *BCR-ABL1* e a estrutura da proteína traduzida pela fusão. **a.** A fusão *BCR-ABL1* é formada pelo gene *BCR* localizado na região 22q11 com o gene *ABL1* localizado na região 9q34. Os pontos de quebra da translocação envolvem o íntron 13 ou 14 do *BCR*, chamado de maior ponto de quebra (M-BCR), ou íntron 1 do *BCR*, chamado de principal ponto de menor quebra (m-BCR). O gene *ABL1* é afetado por quebras nos éxons 1b e 2. **b.** A proteína BCR-ABL1 possui o domínio quinase Ser/Thr e o domínio Rho/GEF do BCR; os domínios SH, NLS e domínios de ligação de actina de ABL1. As duas isoformas que são geradas pela quebra (p210 e p190) são mostradas.

As LMCs foram categorizadas pela OMS dentro do grupo das NMP quando apresentarem a alteração *BCR-ABL1* [t(9;22)(q34.1;q11.2)] e, quando não apresentarem a fusão *BCR-ABL1* (LMCs atípicas ou LMCs *BCR-ABL1*-), são agrupadas juntamente com as LMMJs como SMD/NPM. Sua inclusão nesse último subgrupo se justifica por apresentarem características clínicas, laboratoriais e morfológicas que se sobrepõem entre SMD e NPM (VARDIMAN JW, THIELE J, 2008; ARBER *et al.*, 2016). As LMCs típicas apresentam três fases evolutivas: fase crônica, caracterizada por hiperplasia medular e capacidade de maturação das células mieloides, tem suas manifestações no SP com <5% blastos, responde facilmente às terapias convencionais; fase acelerada, apresenta 20% ou mais de basófilos no SP, presença de 10%-19% blastos no SP e/ou MO, e resistente à terapia medicamentosa; fase blástica ou aguda, caracterizada pela presença de >20% blastos no SP e/ou MO, infiltrado extramedular de células blásticas, resistência a terapia convencional (O'BRIEN *et al.*, 2009).

A introdução de terapias alvos, como os inibidores de tirosina quinase (TKIs), visando a inibição da proteína quimérica BCR-ABL, teve um grande impacto na sobrevivência de pacientes com LMC. No entanto, alguns pacientes ainda resistem a esses tratamentos através de mecanismos dependentes ou independentes de BCR-ABL e, como resultado, têm um risco aumentado de progressão para uma fase acelerada ou fase blástica da doença (HEHLMANN, 2012).

Além disso, estudos genômicos em LMC demonstram que mais de 51% dos pacientes carregam mutações somáticas em genes modificadores de cromatina (*ASXL1*) e envolvidos na metilação do DNA (*TET2* e *DNMT3A*) (KIM *et al.*, 2017).

### 1.3.2. LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA JUVENIL

A LMMJ, anteriormente chamada de leucemia mieloide crônica juvenil (LMCJ), é classificada como uma doença mieloproliferativa/mielodisplásica (DMP/SMD) pela OMS e representa menos de 3% de todas as neoplasias hematológicas da infância (HASLE *et al.*, 1999). Estudos moleculares mostram que a desregulação da via RAS/MAPK desempenha um papel fundamental na patogênese das LMMJs. Mutações somáticas nos genes *RAS* (*KRAS* e *NRAS*), *PTPN11* e *NF1* que participam dessa via são detectadas em 70-80% dos pacientes com LMMJ, permitindo que um diagnóstico molecular seja feito na maioria dos casos (Figura 1.2) (YOSHIMI; KOJIMA; NAOTO, 2010). As características clínicas mais comuns em crianças com LMMJ são esplenomegalia e hepatomegalia, juntamente com linfadenopatia, palidez e erupção cutânea. No SP, são comumente achados leucocitose com monocitose e precursores mieloides/eritróides, anemia e trombocitopenia. Além disso, a porcentagem mediana de blastos no SP é inferior a 2% e raramente excede 20%. Pacientes comumente apresentam hemoglobina fetal (HbF) elevada no diagnóstico (NIEMEYER *et al.*, 1997).

Análises citogenéticas demonstraram a monossomia do cromossomo 7 em 24-33% dos pacientes com LMMJ, outras anormalidades cromossômicas em 10-27%, e um cariótipo normal em 40-60% dos casos (NIEMEYER *et al.*, 1997) (Figura 1.6).

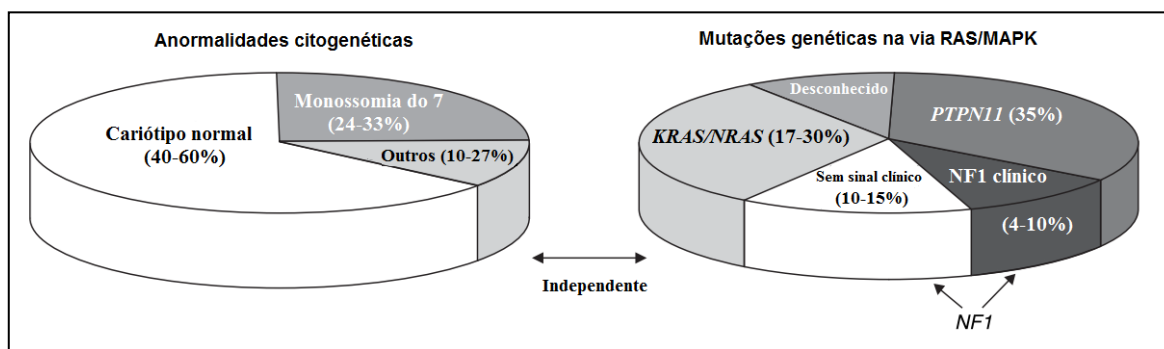


Figura 1.6. Frequência das anormalidades citogenéticas e mutações somáticas nos genes *PTPN11*, *KRAS/NRAS* e *NF1* em pacientes com LMMJ. A monossomia do cromossomo 7 e mutações em *PTPN11*, *KRAS/NRAS* e *NF1* são independentes (YOSHIMI; KOJIMA; NAOTO, 2010).

Estudos anteriores demonstraram que progenitores mielóides das LMMJs apresentam hipersensibilidade seletiva ao fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), que é induzida pela ativação desregulada da via de sinalização RAS-MAPK. A hipersensibilidade a GM-CSF é avaliada por ensaio de colônia *in vitro* a partir de células CD34+ em meio semi-sólido. As células CD34 + mostram uma resposta de crescimento exagerada à baixa concentração de GM-CSF, diferente das células controle que não demonstram respostas a esse estímulo. Em pacientes com LMMJ, o número de colônias é aumentado e o tamanho de cada colônia é maior do que em indivíduos normais (TANAKA *et al.*, 2008). Outro importante evento de sinalização pós-ativação do receptor de GM-CSF é a ativação da via JAK/STAT. A proteína JAK2 transfosforila a cadeia  $\beta$  do receptor de GM-CSF, que cria locais de encaixe para adaptadores e moléculas de transmissão, resultando em ativação de RAS e de efetores, incluindo ERK e S6 (IRISH *et al.*, 2004; RANE; REDDY, 2002).

A OMS preconiza 3 critérios de diagnósticos para as LMMJs que são: I. contagem de monócitos no SP  $\geq 1 \times 10^9/L$ , porcentagem de blastos no SP e MO  $< 20\%$ , esplenomegalia, ausência do cromossomo Philadelphia (*BCR/ABL1*); II. Identificação das mutações somáticas nos genes *PTPN11*, *KRAS* ou *NRAS*, diagnóstico clínico de *NF1* ou mutações em *NF1*, mutações germinativas em *CBL* e perda de heterozigose de *CBL*; III. para os casos sem alterações genéticas, devem ser pesquisados a monossomia do 7, aumento da hemoglobina fetal pela idade, precursores mielóides e eritróides no esfregaço de SP, hipersensibilidade a GM-CSF em ensaios de colônia e hiperfosforilação de STAT5 (ARBER *et al.*, 2016).

Em relação ao tratamento das LMMJs, o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é abordagem terapêutica firmemente utilizada, resultando na sobrevida global a longo prazo em muitos pacientes (DVORAK CC; LOH, 2011). No entanto, crianças que não recebem o tratamento apresentam um tempo médio de sobrevida de apenas 10-12 meses

(NIEMEYER *et al.*, 1997; LOCATELLI; NIEMEYER, 2015). A causa do óbito é devido à insuficiência respiratória ocasionado pela infiltração pulmonar de células leucêmicas. Os fatores de riscos clínicos incluem idade no diagnóstico, contagem de plaquetas e porcentagem de HbF ajustada para a idade do paciente como principais variáveis prognósticas (LOCATELLI; NIEMEYER, 2015). O TCTH é recomendado impreterivelmente para pacientes com mutações somáticas no *PTPN11*, *KRAS* e *NRAS* (Quadro 1.1). Crianças com mutações germinativas em *CBL* apresentam regressão espontânea da doença (DVORAK; LOH, 2011). Nos últimos anos, foi relatado o uso de 5-azacitidina, um agente hipometilante, capaz de reverter a desregulação epigenética em células malignas nas LMMJs. A utilização do azacitidina demonstrou ser bem-sucedida em crianças com mutações em *KRAS* e monossomia do 7 (NIEMEYER *et al.*, 2009).

Quadro 1.1 Indicação para TCTH em grupos genéticos de LMMJ

	<i>PTPN11</i>	<i>KRAS</i>	<i>NRAS</i>	<i>NFI</i>	<i>CBL</i>
Mutações germinativas	Síndrome de Noonan  “Observar e esperar”  (Quimioterapia leve)	Síndrome de Noonan  “Observar e esperar”  (Quimioterapia leve)	Síndrome de Noonan  “Observar e esperar”  (Quimioterapia leve)	Neurofibromatose tipo 1    TCTH	<i>CBL</i>  “Observar e esperar”  TCTH se ocorrer progressão da doença
Mutações somáticas	TCTH	TCTH	TCTH	-	-

TCTH, transplante de células-tronco hematopoiéticas;  
Quadro adaptado de LOCATELLI e NIEMEYER 2015.

### 1.3.3. SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

As SMDs são um grupo heterogêneo de doenças hematológicas, que resultam em produção ineficaz por defeitos de maturação (displasia) em CTH e presença de citopenias no SP ou MO. As displasias podem ou não apresentar aumento do número de mieloblastos (os quais sempre devem estar abaixo de 20%) no SP ou MO, e tem o risco aumentado de evolução para LMA (PEDERSEN-BJERGAARD; ANDERSEN; CHRISTIANSEN, 2000).

Em 1982, a SMD foi inicialmente classificada pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) baseando-se na presença de displasias em pelo menos uma das linhagens de células mieloides (eritróide, granulocítica ou megacariocítica) na MO e no SP. Além disso, é preconizada a contagem de monócitos no SP e o percentual de sideroblastos em anel na MO. O grupo FAB categorizou inicialmente as SMD de acordo com a porcentagem de mieloblastos em quatro subtipos: anemia refratária (AR) [ $< 15\%$  sideroblastos em anel], anemia refratária com sideroblastos em anel (ASRA) [ $\geq 15\%$  sideroblastos em anel], anemia refratária com excesso de blastos (AREB) [5-20%] e anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-T) [21-30% ou presença de bastonetes de Auer]. Frequentemente, pacientes com aumento do número de blastos no SP ou MO (como nas AREB) evolui terminalmente para LMA. No entanto, pacientes com SMD sem blastos aumentados e com displasia em uma única linhagem (como em AR e ARSA) raramente evoluem para LMA. A leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) foi também incluída dentro das SMDs (BENNETT *et al.*, 1982). Para muitos especialistas em SMD, a LMMC sempre pareceu fora de lugar em comparação com as outras quatro entidades de SMD. Embora os pacientes com LMMC tenham notoriamente características morfológicas semelhantes a SMD, as LMMCs apresentam também algumas características de NM.

Em 1997, foi criado o IPSS (*International Prognostic Score System*) que classificava a SMD primária considerando o percentual de blastos, a presença e tipo de anomalia citogenética e o número de citopenias, estratificando quatro subgrupos de risco com relação à sobrevida global e transformação leucêmica (GREENBERG *et al.*, 1997).

Em 2001, as SMDs foram classificadas pela OMS em 7 subtipos através da avaliação do número de linhagens displásicas, presença de sideroblastos em anel e alterações citogenéticas como a deleção isolada do braço longo de cromossomo 5 [del(5q)] (VARDIMAN; HARRIS; BRUNNING, 2002). A LMMC passa a ser classificada dentro do grupo das neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas. Essa classificação foi revisada em 2008, incluindo os seguintes subtipos: citopenias refratárias com displasia em uma linhagem: AR, neutropenia refratária (NR), trombocitopenia refratária (TR); ARSA ; citopenia refratária

com displasia multilinear (CRDM); anemia refratária com excesso de blastos tipo 1 (AREB-1); anemia refratária com excesso de blastos tipo 2 (AREB-2); SMD associada à síndrome do 5q; SMD inclassificadas (VARDIMAN JW, THIELE J, 2008).

A OMS criou uma categoria provisória de SMD em crianças, chamada de citopenia refratária na infância (CRI). Para crianças que apresentam 2-19% de blastos no SP e 5-19% de blastos na MO, é utilizado o mesmo critério de AREB, como nos adultos, porém sem a divisão em AREB-1 e AREB-2. No entanto, crianças com porcentagem de blastos entre 20-30% no SP ou MO, sem presença de displasia e de alterações cromossômicas, devem ser classificadas dentro do grupo das SMDs em progressão, mas não de LMA.

As SMDs podem ser de origem primária, onde sua causa é idiopática, ou de origem secundária, causada por danos ao DNA devido à exposição a quimioterápicos (PEDERSEN-BJERGAARD; ANDERSEN; CHRISTIANSEN, 2000; GILLILAND; GRIBBEN, 2002). O prognóstico das SMDs pediátricas é geralmente ruim, uma vez que quimioterapias citotóxicas como as utilizadas para o tratamento das LAs não são bem-sucedidas, deixando, assim, apenas o TCTH como uma modalidade terapêutica (GLAUBACH; ROBINSON; COREY, 2014). Variantes germinativas em diferentes fatores de transcrição, como *GATA2*, *RUNX1*, *ETV6* e *CEBPA*, podem levar à SMD/LMA familiar. Quanto às anormalidades citogenéticas, a mais comumente identificada é a monossomia do cromossomo 7, que ocorre em 30% dos pacientes. Outras anormalidades, tais como as trissomias dos cromossomos 8 e 21 (que podem ser constitutivas, mosaicas ou somáticas) e a perda de parte do cromossomo 20 (por exemplo, -20q) são menos recorrentes. As crianças com SMD que apresentam um cariótipo complexo são estratificadas dentro do grupo de alto risco (GÖHRING *et al.*, 2010). Mutações em genes que regulam a metilação do DNA (*DNMT3A*, *IDH1/IDH2* e *TET2*), a modificação da cromatina (*EZH2* e *ASXL1*) e a maquinaria de *splicing* (*U2AF35*, *ZRSR2*, *SRSF2* e *SF3B1*) têm sido identificadas em pacientes adultos com SMD. No entanto, essas mutações são eventos raros nas SMDs, tanto as de origem primária quanto secundária (GÖHRING *et al.*, 2010).

Mutações somáticas em genes envolvidos na via RAS/MAPK são comuns em crianças com AREB (45%), principalmente nos genes *PTPN11* e *NRAS*. A monossomia do 7 está associada com mutações nesta via, correspondendo a 71% dos casos diagnosticados com SMD (SCHWARTZ *et al.*, 2017).

#### 1.4. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Mutações somáticas em diferentes genes têm sido associadas à patogênese das LMAs pediátricas e têm fornecido informações importantes sobre os mecanismos de leucemogênese, sendo verdadeiros biomarcadores de prognóstico (WARD; BRAUN; SHANNON, 2012).

Estudos experimentais sugerem um modelo de cooperação para leucemogênese das LMAs, denominado modelo de “dois eventos”. Neste modelo, uma classe de mutação chamada mutação do tipo I (como as que acontecem nos genes *FLT3*, *PTPN11*, *NRAS* e *KIT*) conferem vantagem proliferativa e de sobrevivência para os blastos leucêmicos. Essas alterações, em geral, estão associadas às mutações do tipo II, representadas pelas fusões gênicas (*RUNX1-RUNX1T1*, rearranjos do gene *KMT2A* [*r-KMT2A*] e *CBF $\beta$ -MYH11*), que bloqueiam a diferenciação mieloide e mantêm a capacidade de auto renovação dos blastos (RENNEVILLE *et al.*, 2008).

Mutações em genes envolvidos na desregulação da via RAS/MAPK são frequentes nas LMAs pediátricas (SCHUBBERT; SHANNON; BOLLAG, 2007). Alterações no oncogene *RAS* são encontrados com uma frequência de ~25% nas NM pediátricas (WARD; BRAUN; SHANNON, 2012). As isoformas *NRAS* e *KRAS* são as mais comumente alteradas, sendo mutações em *NRAS* predominantes (SCHUBBERT; SHANNON; BOLLAG, 2007). O éxon 1 de ambos os genes são frequentemente alterados, sendo as alterações G12D, G12C e G12S detectadas no códon 12 e as alterações G13C, G13R e G13D encontradas no códon 13. Todas as mutações são substituições de bases que levam a mudanças nos aminoácidos codificados (LIANG *et al.*, 2006). As substituições nos resíduos G12 e G13 impedem a formação de ligações van der Waals entre RAS e GAP, resultando no aumento da hidrólise de GTP. A consequência dessas substituições é a persistência do estado ativo de GTP e, como resultado, a ativação constante de diversas vias efetoras dependentes de RAS (PYLAYEVA-GUPTA; GRABOCKA; BAR-SAGI, 2011).

Nos últimos anos, através do desenvolvimento das plataformas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), estudos genômicos de larga escala têm identificado novas mutações categorizadas como de classe III, e o modelo dos “dois eventos” não seria mais adequado (SHIH *et al.*, 2012). Mutações em genes que participam da metilação do DNA (*DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* e *TET2*), modificação da cromatina (*ASXL1*, *BCOR*, *BCORL1*, *EZH2*) do complexo coesina (*NIPBL*, *RAD21*, *SMC1A*, *SMC3* e *STAG2*) e *spliceosome* (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* e *ZRSR2*) apresentam uma frequência de 8%, 9%, 5% e 3%, respectivamente (MARCEAU-RENAUT *et al.*, 2018).

Portanto, é provável que novos modelos para o desenvolvimento da LMA irão tornar-

se cada vez mais complexos à medida que novas mutações são detectadas e o seu papel na leucemogênese é avaliado (CONWAY O'BRIEN; PRIDEAUX; CHEVASSUT, 2014)

#### 1.4.1 MARCADORES GENÉTICOS DE DIAGNÓSTICO

As translocações cromossômicas são a classe mais comum de alterações genéticas encontradas em neoplasias hematológicas (KÜPPERS, 2005). Uma translocação é caracterizada por uma recombinação ilegítima ou justaposta de dois genes normalmente separados e, no geral, envolve dois fatores de transcrição (DASH; GILLILAND, 2001; GREAVES; WIEMELS, 2003).

Algumas translocações formam fusões gênicas que desregulam o crescimento celular, levando ao surgimento de neoplasias (BUNTING; NUSSENZWEIG, 2013). Em geral, as translocações recíprocas nas LAs envolvem genes que codificam fatores de transcrição. Esses fatores de transcrição são conservados evolutivamente e são importantes para a hematopoiese normal. Os principais fatores de transcrição associados ao desenvolvimento das LAs incluem o fator de ligação ao núcleo (CBF), os membros da família do receptor alfa do ácido retinóico (RAR $\alpha$ ), os fatores da família homeobox (HOX) e os membros da família ETS (transformação específica E26) de fatores de transcrição (TENEN *et al.*, 1997).

A LMA que apresenta alterações no complexo de transcrição CBF inclui a LMA com as translocações cromossômicas t(8;21)(q22;q22) e inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22), que geram as fusões gênicas *RUNX1-RUNX1T1* e *CBFB-MYH11*, respectivamente. A LMA-CBF está entre os subtipos citogenéticos mais comuns de LMA representando aproximadamente 25% dos pacientes pediátricos (SCHOCH *et al.*, 2004). A t(8;21)(q22;q22), envolvendo o gene *RUNX1* (*AML1*) no cromossomo 21q22 e o gene *RUNX1T1* (*ETO*) no cromossomo 8q22 representa 10-15% das LMAs pediátricas (BALGOBIND *et al.*, 2011). Nessa alteração, a maior parte da região codificante do gene *RUNX1T1* é fusionada com a região amino terminal de *RUNX1*, que contém o domínio Runt de ligação ao DNA (DUPLOYEZ *et al.*, 2016). O produto de fusão *RUNX1-RUNX1T1* codifica uma proteína quimérica que é um inibidor dominante negativo da proteína *RUNX1* selvagem. A fusão *RUNX1-RUNX1T1* tem demonstrado desregular *CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$*  (*C/EBP $\alpha$* ), que é um fator de transcrição crítico do desenvolvimento mieloide, direcionando a diferenciação mieloide de granulócitos e monócitos (Figura 1.7) (WESTENDORF *et al.*, 1998). A atividade de *C/EBP $\alpha$*  é modulada por várias serina/treonina quinases, seu gene é ativado por *RUNX1* e fatores de transcrição adicionais (ALAN D. FRIEDMAN, 2015).



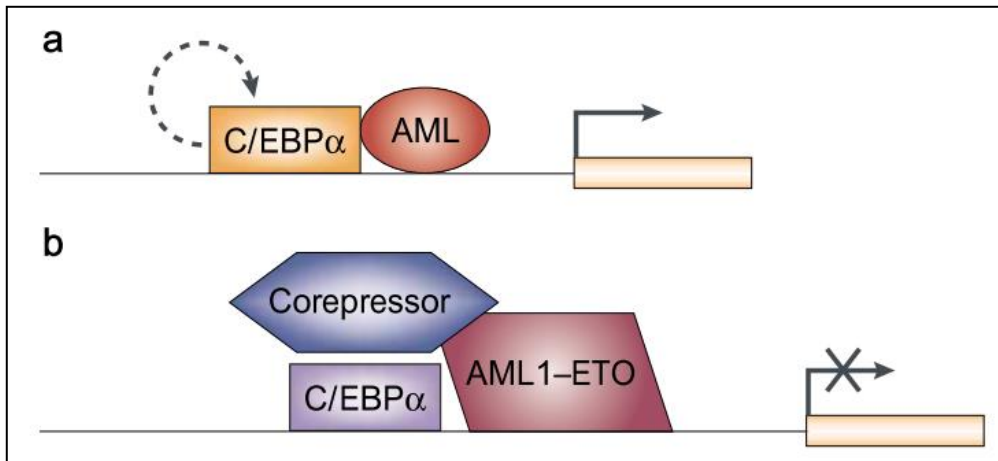


Figura 1.7. Função da proteína de fusão AML1-ETO (RUNX1/RUNX1T1) e sua interação com C/EBP $\alpha$ . **a.** C/EBP $\alpha$  coopera com AML1 em células normais para ativar a transcrição de genes específicos na diferenciação de granulócitos. Além do mais, o promotor C/EBP $\alpha$  pode se autorregular. **b.** A proteína de fusão AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1) se liga aos sítios de AML1 e pode inibir C/EBP $\alpha$  recrutando co-repressores (TENEN, 2003).

A inversão do cromossomo 16 resulta na quebra e reunião das bandas 16p13.1 e 16q22 (Figura 1.8). A inv(16) gera a fusão gênica *CBFB-MYH11* que apresenta afinidade aumentada pela proteína RUNX1 e inibe a atividade normal do complexo *CBF $\alpha$ /CBF $\beta$* , levando à desregulação da transcrição de genes que participam dos processos de hematopoiese (VAN DER KOLK *et al.*, 2000). Entre eles, incluem-se a interleucina 3 (IL-3), o GM-CSF, receptores de citocinas, como o receptor do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), e genes que participam da maturação de linfócitos T e B (DASH; GILLILAND, 2001). A inv(16) é um rearranjo cromossômico comumente identificado em pacientes com LMA-M4 eosinofílica. Estes pacientes geralmente tem altas taxas de resposta à quimioterapia e relativamente um bom prognóstico (SCHIFFER *et al.*, 1989).

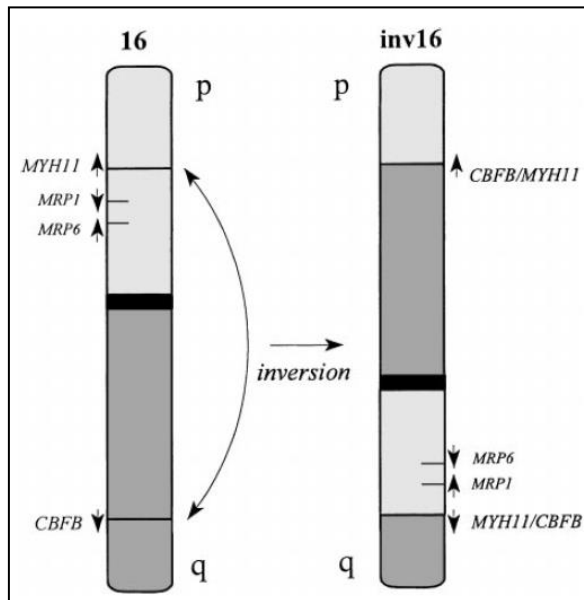


Figura 1.8. Representação esquemática da *in(16)/CBFB/MYH11*. Os genes *CBFB* e *MYH11* são transcritos na direção centromérica para telomérica. O gene *CBFB* fica localizado na região 16q22 na extremidade 5' e, o gene *MYH11*, localizado na região 16p13 da extremidade 3'. A fusão gênica recíproca *CBFB/MYH11* é gerada numa frequência de 10% dos casos com LMA. No entanto, deleções abaixo do ponto de quebra na extremidade 5' nas sequências de *MYH11* é identificada em alguns casos (DE THÉ *et al.*, 1990).

O rearranjo cromossômico  $t(15;17)(q22;q21)$  é a alteração mais frequente na leucemia promielocítica aguda (APL), associada a 98% desses casos. Essa translocação resulta na fusão do receptor alfa do ácido retinóico (*RARA*), localizado na região 17q21, com o gene da leucemia promielocítica (*PML*), localizado na região 15q22 (DE THÉ *et al.*, 1990). Pacientes com APL tem a MO infiltrada por promielócitos com grânulos, que apresentam bastonete de Auer. A característica clínica mais marcante é a hemorragia causada pela coagulação intravascular disseminada, que é fatal. A maioria dos pacientes com  $t(15;17)$  são sensíveis ao ATRA (*All-trans retinoic acid*), mas podem desenvolver resistência e ser tratadas com trióxido de arsênio (DE THÉ *et al.*, 1990).

O gene *KMT2A* (ou *MLL*) codifica uma proteína com função histona metiltransferases que leva à ativação da transcrição de genes que participam nos processos de embriogênese e hematopoese. A subunidade catalítica do complexo multiproteico MLL1/MLL medeia a metilação da lisina 4 (K4) da histona H3 (H3K4me) e a acetilação da lisina 16 (K16) da histona H4 (H4K16ac). O complexo MLL1/MLL controla especificamente o H3K4me, um marcador específico que leva à ativação transcricional epigenética (LI *et al.*, 2016).

Os rearranjos envolvendo o gene *KMT2A* são frequentemente identificados nas LMAs e estão associados a um prognóstico ruim (BALGOBIND *et al.*, 2009). A heterogeneidade

dos *r-KMT2A* é refletida pela identificação de mais de 70 parceiros de fusão (ZHANG *et al.*, 2012).

A classificação da OMS (2008) categoriza a fusão gênica *MLL-MLLT3(AF9)* e recomenda que os parceiros envolvidos nas translocações com *KMT2A* sejam identificados. Frequentemente, *r-KMT2A* se apresentam através de fusões complexas. Por exemplo, as fusões *MLL-MLLT1*, *MLL-MLLT3*, *MLL-MLLT4 (AF6)*, *MLL-MLLT10 (AF10)*, *SEPT6* e *EPS15* podem ser geradas através de inversões, inserções ou translocações envolvendo outros cromossomos (VARDIMAN *et al.*, 2010).

## 2. JUSTIFICATIVA

O foco principal deste estudo foi identificar mutações em *PTPN11*, um gene que desempenha papel importante no desenvolvimento celular e na diferenciação de células hematopoiéticas (TARTAGLIA *et al.*, 2005). Estas mutações demonstram ser amplamente distribuídas nos diferentes tipos de NMs pediátricas, no entanto, a incorporação da identificação deste marcador na caracterização de NM ainda é pouco realizada no Brasil. Dessa forma, mutações no *PTPN11* que podem auxiliar na caracterização e no diagnóstico final das NMs foram a motivação desta pesquisa.

Recentemente, nós já descrevemos a história e a evolução das LMAs pediátricas no Brasil, demonstrando que estas mutações são biomarcadores-chave para estudos moleculares, ensaios clínicos e epidemiológicos. Os resultados preliminares do *PTPN11*, de outros casos antes de 2010, demonstraram uma frequência 10,4% de mutações numa série de 703 casos de LMA *de novo* pediátrica. Mutações em *PTPN11* estavam associadas à sobrevida global adversa (ANDRADE *et al.*, 2016). O artigo com os resultados do *PTPN11* está no anexo 1.

O conhecimento do perfil genético e biológico das NMs no Brasil será um grande avanço para o entendimento dos processos leucemogênicos da doença. Um estudo mais aprofundado dessas alterações pode contribuir para compreensão da etiopatogênese das LMAs e DMPs, fornecendo novos marcadores de diagnóstico independentes que poderão contribuir para o prognóstico.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo principal

- Identificar mutações na via RAS/MAPK, com ênfase em *PTPN11*, a fim de distinguir mutações somáticas e germinativas nas LMAs e em outras neoplasias mieloides pediátricas.

#### 3.2 Objetivos secundários

- Comparar o perfil mutacional do *PTPN11* nas LMAs pediátricas e outras neoplasias mieloides.
- Explorar a associação entre as mutações do *PTPN11* e os diferentes subtipos morfológicos, características clínico-demográficas e moleculares dos pacientes pediátricos com LMA, LMC, LMMJ e SMD.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. PACIENTES E AMOSTRAS

Uma série de 412 casos de NM diagnosticados de forma consecutivos e incidentes no período de 2010-2017 foram incluídos no estudo. Amostras de aspirado de MO e SP foram enviadas para caracterização diagnóstica provenientes de centros de tratamento de diversas regiões do Brasil (Lista em anexo 2).

Crítérios de Inclusão: amostras de MO e SP de crianças e adolescentes com idade <19 anos, diagnosticadas clinicamente e morfológicamente como LMA, LMC, LMMJ e SMD; sem tratamento prévio. Crítérios de Exclusão: pacientes com SD (Figura 4.1).

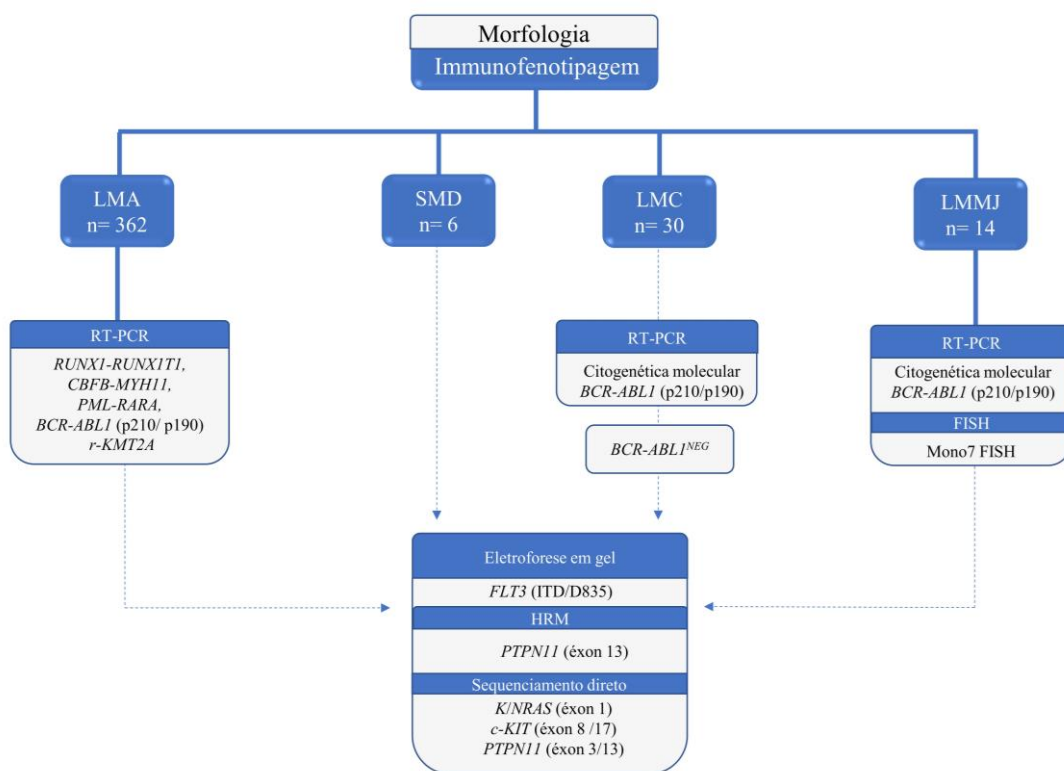


Figura 4.1. Fluxograma do estudo com algoritmo de testes realizados. O SP e aspirados de MO de amostras entre 2010-2017 foram coletados em EDTA ao diagnóstico. Uma série de 412 casos de neoplasias mieloides <19 de idade foram incluídos neste estudo [LMA (n, 362); LMMJ (n, 14); LMC (n, 30) e SMD (n, 6)].

As informações demográficas e clínicas foram enviadas no momento do envio das amostras, e preenchidas por meio de uma ficha clínica no sistema online (<https://imunomolecular.inca.gov.br>) como descrita no anexo 3. Posteriormente, informações adicionais foram obtidas através de uma outra ficha clínica para avaliação dos casos com mutação no *PTPN11* contendo variáveis importantes, tais como: contagem de monócitos no SP, contagem de células precursoras mieloides ou eritróides em esfregaço de SP, percentual de mieloblastos na MO e no SP, níveis de HbF, fenótipo de síndrome genéticas, protocolo de tratamento, informações sobre recidiva e estado vital no momento do último seguimento do paciente (Anexo 4).

#### Ética em pesquisa:

Foram utilizadas amostras em que os responsáveis legais das crianças concordaram com a participação no estudo através da assinatura do “Termo de consentimento livre e esclarecido”. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA, intitulado “Alterações imuno-moleculares nas leucemias mieloides agudas pediátricas: interação entre mutações somáticas e fatores de risco etiopatológicos”, aprovado em 18/02/2013, sob o número de protocolo #186.688. Uma cópia da carta do CEP encontra-se no anexo 5.

#### Tratamento:

Os pacientes de LMA receberam um tratamento uniforme de acordo com protocolo BFM-AML2004. O tratamento consistiu em dois regimes de indução de quimioterapia intensiva utilizando citarabina, idarubicina e etoposídeo. Os pacientes de alto risco foram selecionados para receber transplante de TCTH (ARBER *et al.*, 2016). Os pacientes com LMMJ foram tratados ou direcionados para o transplante de TCTH. Os pacientes diagnosticados com LMC foram tratados com inibidores tirosina quinase (imatinibe e desatinibe).

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Caracterização inicial das neoplasias mieloides

A caracterização dos casos incluídos no estudo foi estabelecida através da revisão do material enviado quanto aos aspectos morfológicos e imunofenotípicos. Análise adicional por citometria de fluxo foi realizada para complementação seguindo um algoritmo de testes elaborado a partir dos painéis de anticorpos monoclonais utilizados no diagnóstico de NM (Quadros 4.1 e 4.2).

Quadro 4.1. Painel de triagem inicial

Tubo	FITC	PE	PerCP-CY5.5	PE-CY7	APC	APC-H7
1	-	-	-	-	-	-
2	MPO intra	CD79a intra + CD22 intra	CD45	-	CD3 intra	-
3	CD7	CD19	CD45	-	CD34	-

Painel de triagem para identificar o tipo de linhagem celular através anticorpos de membrana e intracitoplasmáticos. Tubo 1 controle; CD= grupo de diferenciação; intra= intracitoplasmático; FITC= *Isotiocianato de fluoresceína*; PE= *Ficoeritrina*; PerCP-CY5.5= *Proteína Clorofila Peridinina*; PE-CY7= *Ficoeritrina-cianina 7*; APC= *Aloficocianina*; APC-H7= *Aloficocianina-H*; aMPO= *anti-mieloperoxidase*.

Após a triagem, as amostras em que os marcadores específicos foram positivos para linhagem mielóide, foi realizada nova marcação com o painel de anticorpos para LMA para identificar subtipo imunofenotípico (Quadro 4.2).

Quadro 4.2. Painel para as neoplasias mieloides

Tubo	FITC	PE	PerCP-CY5.5	PE-CY7	APC	APC-H7
1	CD15	HLA-DR	CD45	CD117	CD34	CD19
2	CD16	CD13	CD45	CD10	CD11b	-
3	CD35	CD64	CD45	-	CD34	CD38
4	CD65	NG2	CD45	-	CD123	CD9
5	CD42a+CD61	CD41	CD45	CD117	CD7	-
6	CD14	CD33	CD45	-	-	-

Painel para leucemias mieloides agudas pediátricas. CD= grupo de diferenciação; c=citoplasmático; intra= intracitoplasmáticos; FITC= *Isotiocianato*; PE= *Ficoeritrina*; PerCP-CY5.5= *Proteína Clorofila Peridinina*; PE-CY7= *Ficoeritrina-cianina 7*; APC= *Aloficocianina*; APC-H7= *Aloficocianina-H*; HLA-DR= *Antígeno leucocitário humano*.



Em casos suspeitos de LMA M6, foi acrescentado o painel no Quadro 4.3.

Quadro 4.3 : Painel para LMA M6

Tubo	FITC	PE	PerCP-CY5.5	PE-CY7	APC	APC-H7
7	CD36	CD235a	CD45	CD117	CD34	-

Painel para LMA M6. CD= grupo de diferenciação; intra= intracitoplasmático; FITC= *Isotiocianato*; PE= *Ficoeritrina*; PerCP-CY5.5= *Proteína Clorofila Peridinina*; PE-CY7= *Ficoeritrina-cianina 7*; APC= *Aloficocianina*; APC-H7= *Aloficocianina-H*; HLA-DR= *Antígeno leucocitário humano*.

#### 4.2.2. Testes Moleculares

Para estabelecer a otimização das técnicas moleculares, amostras de SP de doador anônimo foram utilizadas antes das investigações nas amostras dos pacientes. As amostras de MO em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foram processadas para exclusão de hemácias por lise osmótica utilizando-se a solução de lise de hemácias. Após a lise, um *pellet* contendo  $1 \times 10^6$  células foi armazenado no reagente Trizol™ (Invitrogen, CA, USA) a  $-20^\circ\text{C}$  ou em dimetilsulfóxido (DMSO) a  $-80^\circ\text{C}$  para extração do RNA e pesquisa da identificação das fusões gênicas (*RUNX1-RUNX1T1*, *BCR-ABL1*, *CBFb-MYH11*, *PML-RARa* e *r-KMT2A*).

#### 4.2.3. Purificação do RNA

A extração do RNA foi realizada pelo kit comercial Real Genomics™ DNA/RNA Purification, conforme protocolo padrão estabelecido pelo fabricante, e/ou a partir de amostras armazenadas em Trizol™ (Invitrogen, CA, USA).

Após a extração, o RNA foi quantificado no espectrofotômetro (NanoDrop1000, Wilmington, DE, USA) para avaliar absorvância no comprimento de onda a 260nm. Posteriormente, foi utilizado um volume de 3 µg de RNA e adicionado 0,8 µL da enzima DNase (1U/µl, Promega, Madison, WI, USA). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 15 min. Após a incubação, foi adicionado 1 µL de EDTA e, em seguida, as amostras foram incubadas por  $65^\circ\text{C}$  por 15 min no banho seco. Após a incubação, as amostras foram resfriadas no gelo por 1 min. Foi acrescentado 1 µL de oligonucleotídeos de timina (Oligo dT) e as amostras foram incubadas a  $70^\circ\text{C}$  por 10 min no banho seco, com posterior direcionamento para a síntese de cDNA. Nessa etapa, foi adicionado 1 µL da enzima transcriptase reversa SuperScript II (5U/mL, Invitrogen, CA, USA), 4 µL de tampão 5x (50mM KCl; 20mM Tris-HCl, pH 8,4) (Invitrogen, CA, USA), 0,6µL de H<sub>2</sub>O DEPC, 2,4 µL

de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) a 2,4 mM (Invitrogen, CA, USA) e 1  $\mu L$  de desoxirribonucleotídeos fosfados (dNTP) a 10  $\mu M$  (Invitrogen, CA, USA). Seguiram-se incubações a 25°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°C por 15 min. No final da reação, adicionou-se 30  $\mu L$  de água DEPC.

#### 4.2.4. RT-PCR para amplificação do gene *GAPDH*

Após a síntese, a integridade dos cDNAs foi avaliada por meio da amplificação do gene constitutivo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) pela transcrição reversa seguida por PCR (RT-PCR).

Para amplificar o gene *GAPDH*, foram utilizados 3,5 $\mu L$  de cDNA, para um volume final de 20 $\mu L$ . O *mix* de reagentes continha 1x solução de tampão (50mM KCl; 20nM Tris-HCl, pH 8,4) (Invitrogen, CA, USA),  $MgCl_2$  a 2,5mM (Invitrogen, CA, USA), 10mM dNTPs (Qiagen, USA), 10 $\mu M$  *primers*, 1U de Taq-DNA polimerase (Invitrogen, CA, USA) e água estéril para completar o volume. A reação foi realizada num termocilador PCR-System 9700, seguindo os ciclos: 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. Após a reação, os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed™ (Biotum, CA, USA).

#### 4.2.5. Extração de DNA

Para a extração de DNA por Trizol™ (Invitrogen, CA, USA), as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 3 min. Posteriormente, adicionou-se 300 $\mu l$  de etanol absoluto (100%) e incubou-se por 3 min à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 8 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e deixado apenas o precipitado. Adicionou-se 1000 $\mu l$  de solução de citrato de sódio 0,1 M em etanol 10% e incubou-se por 30 min à temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas à 12500 rpm por 8 min a 4°C. Essa etapa foi repetida duas vezes para lavar o precipitado. Após as duas lavagens, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1500  $\mu l$  de etanol a 75%, incubado à temperatura ambiente por 15 min e misturado por inversão periodicamente. Depois, centrifugou-se a 12000 rpm por 8 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi dissolvido em H<sub>2</sub>O Milli-Q® e incubado por 6min no banho seco a 68°C. Após a incubação, o material insolúvel foi removido por

centrifugação a 12000rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5ml. O DNA foi quantificado por meio de leitura em espectrofotômetro (NanoDrop1000, Wilmington, DE, USA), num comprimento de onda de 260/280 nm.

#### 4.2.6. Identificação das fusões gênicas

As fusões gênicas (*PML-RAR $\alpha$* , *RUNX1-RUNXIT1*, *CBF $\beta$ -MYH11* e *BCR-ABL1*) foram identificadas utilizando a técnica de FISH e RT-PCR. Os parceiros de fusão do gene *KMT2A* foram encontrados por meio da técnica de FISH e RT-PCR *multiplex*.

Para a identificação da presença da fusão gênica *PML-RAR $\alpha$* , foi realizada o FISH utilizando-se a sonda *PML-RAR $\alpha$*  Translocation Probe, Dual Fusion, (Cytogen, Cambridge, UK), seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante.

Nas análises de FISH, o padrão de sinal em cariótipos normais, ou seja, sem a presença da fusão, eram dois sinais verdes e dois vermelhos. O padrão com a translocação, eram um sinal vermelho e um verde justapostos, originando um sinal colocalizado, que pode aparecer, ainda, como um sinal amarelo. Além disso, dois sinais separados eram visíveis, um verde e um vermelho, localizados nos cromossomos não afetados. Esses padrões são identificados nas fusões *PML-RAR $\alpha$* , *RUNX1-RUNXIT1*, *CBF $\beta$ -MYH11*.

Para a identificação do transcrito de fusão *PML-RAR $\alpha$*  foi realizada técnica de *nested* PCR utilizando 3  $\mu$ L de cDNA. Ao cDNA, adicionou-se um *mix* de reagentes contendo as seguintes concentrações: *primers* a 200 nM, dNTPs a 2,5  $\mu$ M, solução tampão 1x (50mM KCl; 20mM Tris-HCl, pH 8,4; Invitrogen, CA, USA), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U de Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA) e água estéril para completar o volume de 50  $\mu$ 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, 72°C por 1 min. As reações de PCR foram realizadas no termociclador PCR-System 9700 (Gene Amp®, Applied Biosystems, EUA). Posteriormente, uma segunda reação foi realizada utilizando 1  $\mu$ L dos produtos amplificados da primeira reação e *primers* diferentes para aumentar a especificidade da reação (VAN DONGEN *et al.*, 1999). As seguintes concentrações utilizadas foram: *primers* 200nM, dNTPs 5 mM, solução tampão 1x (Invitrogen, Brasil), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U de Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen, Brasil) e água estéril para completar o volume, com as condições de ciclagem: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 66°C por 30 seg, 72°C por 1 min. Os produtos amplificados nas duas as reações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 3,0% corado com GelRed™ (Biotium, CA, USA).

A técnica de RT-PCR para identificação das fusões gênicas *RUNX1-RUNX1T1*, *CBF $\beta$ -MYH11* e *BCR-ABL1* foi realizada de acordo com o descrito por VAN DONGEN *et al.* (1999). Para uma solução com volume final de 25  $\mu$ L, utilizou-se 3 $\mu$ L de cDNA. Ao cDNA, foi adicionada um *mix* contendo as seguintes quantidades: *primers* 200nM, dNTPs 200  $\mu$ M, solução tampão 1x (50mM KCl; 20nM Tris-HCl, pH 8,4; Invitrogen, USA), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA) e água estéril para completar o volume. Foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem: 95°C por 30 seg, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 65°C por 1 min, 72°C por 1 min. As reações de PCR foram realizadas no termociclador PCR-System 9700 (Gene Amp®, Applied Biosystems, EUA). Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Biotum, USA).

A técnica de RT-PCR *multiplex* foi realizada para identificar os parceiros de fusão mais frequentes do gene *KMT2A* (*MLLT3*, *MLLT4*, *AFF1*, *MLLT10*, *MLLT1*, *PTD*) por meio de *primers* específicos para diferentes pontos de quebra. Posteriormente, os casos que não foi possível identificar os parceiros de fusão do *KMT2A* e para identificação da região BCR, as amostras foram encaminhadas para realização da técnica de PCR invertido de longa distância (LDI-PCR). Este método permite a identificação de parceiros de fusão raros e sequências de fusão específicas (MEYER *et al.*, 2004, 2017). Todos os *primers* senso e anti-senso das fusões gênicas e do r-*KMT2A* estão descritos na Tabela 1 em anexo.

#### 4.2.7. Identificação das mutações no gene *RAS*

Os códons 12 e 13 (éxon 1) dos genes *KRAS* e *NRAS* foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os *primers* senso e anti-senso descritos por BORNHOLDT *et al.* (2008) e LIANG *et al.* (2006), respectivamente (Tabela 1 no anexo 5).

Na reação de PCR, foram utilizados 100-200 ng de DNA, 0,5  $\mu$ M dos *primers*, 0,2mM de dNTPs, solução tampão 1x (50mM KCl; 20nM Tris-HCl, pH 8,4) (Invitrogen, CA, USA), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, CA, USA), para um volume final de 50 $\mu$ L. As condições de ciclagem para o gene *KRAS* foram: 94°C por 30 seg a desnaturação inicial; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg; 1 min a 60°C o anelamento; extensão de 30 seg a 72°C e uma extensão final de 72°C por 10 min. Para o gene *NRAS*, foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem: 94°C por 5 min a desnaturação inicial, 40 ciclos 94°C por 1 min, 57°C por 1 min, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 10 min (LIANG *et al.* 2006). As reações foram realizadas em um termociclador

PCR-System 9700 (Geneamp®, Applied Biosystems, CA, USA). Os produtos de PCR amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2% corados com GelRed™ (Biotium CA, USA), conforme ilustrados nas Figuras 4.1A e 4.1B.

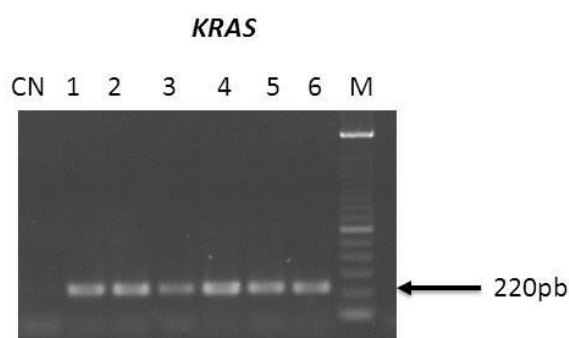


Figura 4.1A. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR após amplificação dos códons 12 e 13 do gene *KRAS*. Legenda: M, marcador de peso molecular de 100 pb; CN, controle negativo; 1-6 amostras.

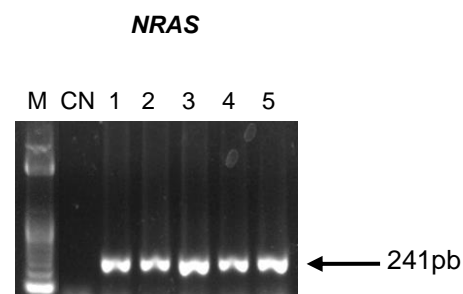


Figura 4.1B. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR após amplificação dos códons 12 e 13 do gene *NRAS*. Legenda: M, marcador de peso molecular de 100 pb; CN, controle negativo; 1-5 amostras.

#### 4.2.8. Identificação de mutações no gene *PTPN11*

O éxon 3 do *PTPN11* foi amplificado por PCR. Foram utilizados 250ng de DNA, 0,2  $\mu$ M do *primer*, 1mM de dNTPs, solução tampão 1x (50mM KCl; 20nM Tris-HCl, pH 8,4) (Invitrogen, CA, USA), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, CA, USA), para um volume final de 50 $\mu$ l. O éxon 3 foi amplificado utilizando *primers* senso e anti-senso descritos na Tabela 1 em anexo (TARTAGLIA *et al.*, 2002). Utilizou-se o termociclador automático PCR Instrument System 9700 (Gene Amp®, AppliedBiosystems, EUA). O tamanho dos produtos de PCR esperados era de 384 bp. As amostras seguiram a ciclagem de 94°C por 8 min para a desnaturação inicial, 33 ciclos de 94°C por 45 seg, 60 °C por 30 seg e 72°C por 45 seg, com extensão final de 72°C por 10 min. As amostras amplificadas foram visualizadas em gel de agarose a 1,5%, corado com GelRed™ (Biotium CA, USA) (Figura 4.2).

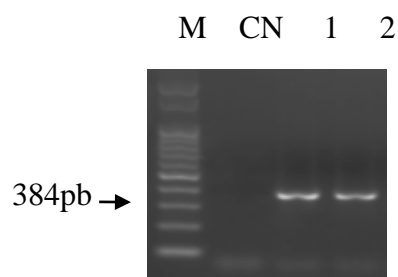


Figura 4.2. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR após amplificação do éxon 3 do gene *PTPN11*. Legenda: M, marcador de peso molecular de 100 pb; CN, controle negativo; 1-2, amostras.

#### 4.2.9. High resolution Melting

O éxon 13 do *PTPN11* foi, inicialmente, rastreado pela técnica de *High Resolution Melting* (HRM) como forma rápida de rastreamento de mutações. As variações esperadas eram c.1508G >C (p.Gly503Ala), c.1508G >T (p.Gly503Val), c.1507G>C (p.Gly503Arg), c.1504T G (p.Ser502Ala) e c.1505C>T (p.Ser502Leu). Mutações no éxon 3 foram somente identificadas por sequenciamento direto. Os *primers* do éxon 13 do *PTPN11* foram desenhados utilizando a ferramenta PrimerQuest tool IDT ([www.idtdna.com/PrimerQuest/](http://www.idtdna.com/PrimerQuest/)) e os limites de especificidade foram ajustados utilizando software Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) que amplificava um produto de 250 pb. As sequências dos *primers* estão descritos na Tabela 1 no anexo 5. O *mix* de reagentes consistia em um volume final de 15 µl, contendo 1x HRM PCR Master Mix (QIAGEN® Hilden, DE), 0,7 µM de cada *primer* e 20ng de DNA. As condições de ciclagem foram 5 min a 95° C para ativar a enzima HotStarTaq Plus DNA Polimerase e para desnaturação de DNA, seguidos de 45x de 95°C por 10 seg (desnaturação), 55°C por 30 seg (anelamento), 72°C por 10 seg (extensão) e uma última etapa de 65°-95°C por 1 seg.

As reações do HRM foram realizadas no Rotor-Gene Q and Rotor-Gene 6000 (QIAGEN® Hilden, DE) utilizando o HRM PCR Master Mix (QIAGEN® Hilden, DE). As curvas de *melting* das amostras foram, automaticamente, normalizadas e analisadas por comparação direta pelo Software LightCycler® 480, versão 1.5 (Roche Group). No momento das análises, as regiões de normalização para as curvas de *melting* foram estabelecidas para faixa principal o início foi de 80,3°C e o final de 80,8°C. Para as faixas de *trailing* o início foi estabelecido para 83,4°C e o final para 84°C. Todas as amostras de pacientes com curvas que diferiram em forma e/ou temperatura de fusão foram consideradas como potenciais variantes. Os resultados foram confirmados por sequenciamento direto.

#### 4.2.10. Identificação de mutações no gene *FLT3*

As mutações no gene *FLT3* foram pesquisadas através de amplificação do éxon 20 por PCR. Foram utilizados *primers* senso e anti-senso descritos por NAKAO *et al.* (1996). Na Tabela 1 no anexo 5, estão representadas as sequências dos *primers* utilizados.

Para uma solução final de 50µl, contendo 250ng de DNA, foram adicionados ao *mix* de reagentes 0,15µM dos primers, 0,2mM de dNTPs, solução tampão 1x (50mM KCl; 20nM Tris-HCl, pH 8,4; Invitrogen, CA, USA), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 5% de DMSO e 1U de Taq-polimerase (Invitrogen, CA, USA). Os ciclos utilizados para a reação de PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 7 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 61°C por 30 seg, extensão a 72°C por 45 seg e uma extensão final de 72°C por 10 min. Após a reação de PCR, os produtos foram visualizados em gel de 2% agarose corados com GelRed™ (Biotium, CA, USA) por meio da técnica de eletroforese. Posteriormente, os produtos amplificados foram digeridos com a enzima de restrição EcoRV (Promega, CA, USA) no termociclador automático PCR Instrument System 9700 (Gene Amp®, AppliedBiosystems, EUA), em reação *overnight* a 37°C. Os produtos da digestão foram visualizados em eletroforese de gel de agarose a 3% corados com GelRed™ (Biotium CA, USA) conforme, ilustrado na Figura 4.3.

A duplicação em *tandem* (ITD) do *FLT3* foi detectada pela amplificação dos éxons 11 e 12, utilizando *primers* senso e anti-senso descritos na Tabela 1 no anexo 5 (NAKAO *et al.* 1996). Para uma solução final de 50µl contendo 100ng de DNA, foram adicionados 50 pmol dos primers, 0,2mM de dNTPs, solução tampão 1x (50mM KCl; 20nM Tris-HCl, pH 8,4; Invitrogen, CA, USA), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> e 1U de Taq-polimerase (Invitrogen, CA, USA). As condições de ciclagem utilizadas para realização da técnica de PCR foram: a desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, o anelamento a 56°C por 1 min, extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 3% corado com 0,5 µg/mL de EtBr conforme ilustrado na Figura 4.4.

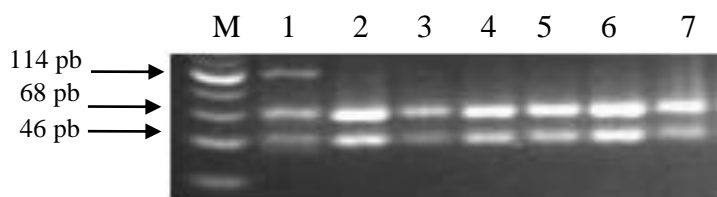


Figura 4.3. Detecção das mutações do gene *FLT3* D835. Corrida em gel de agarose após digestão com a enzima *EcoRV*. Em casos sem mutação a enzima de restrição *EcoRV* se a sítios específicos no DNA gerando dois fragmentos de tamanhos diferentes, de 68pb e de 46pb. Por outro lado, nos casos com mutação, a enzima não atua em um dos alelos, permanecendo visível a banda de 114pb. Legenda: M, marcador de peso moelcular de 50 pb; CN, controle negativo; 1-7 amostras.

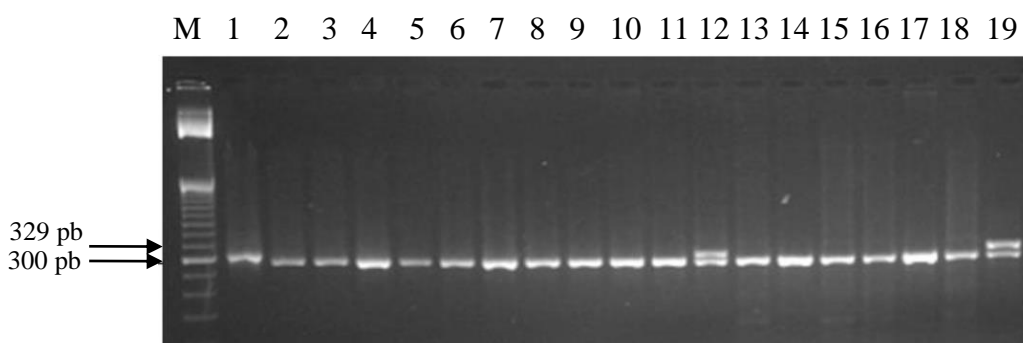


Figura 4.4. Detecção da duplicação em tandem (ITD) do gene *FLT3*. Mutações são detectadas quando são visualizadas duas bandas no gel (amostra 12 e 19). Amostras selvagens apresentam apenas uma banda no gel (1-11, 13-18). Legenda: M, marcador de peso moelcular de 100 pb.

#### 4.2.11. Identificação de mutações no gene *KIT*

Os éxons 8 e 17 do *KIT* foram amplificados pela técnica de PCR convencional utilizando *primers* senso e anti-senso com as sequências descritos na Tabela 1 no anexo 5. Para um volume final de 50µL, foram adicionados 200-500ng de DNA, 0,2µM dos primers, 0,2mM de dNTP, HiFi PCR Buffer 1x (50mM KCl, 20 nM Tris-HCl pH 8,4; Invitrogen, CA, USA), 1,5mM de sulfato de magnésio, DMSO a 10%, 1U de Taq-polimerase HiFi (Invitrogen, CA, USA). As condições de ciclagem utilizadas para a técnica de PCR foram: 94°C por 1 min para a desnaturação inicial, seguido por 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg, 68°C por 1 min, e uma extensão final de 68°C por 3 min.

Posteriormente, os produtos foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corados com GelRed™ (Biotium, CA, USA) (Figura 4.5) e visualizadas com auxílio da luz ultravioleta. Os produtos amplificados foram direcionados para a técnica de sequenciamento.



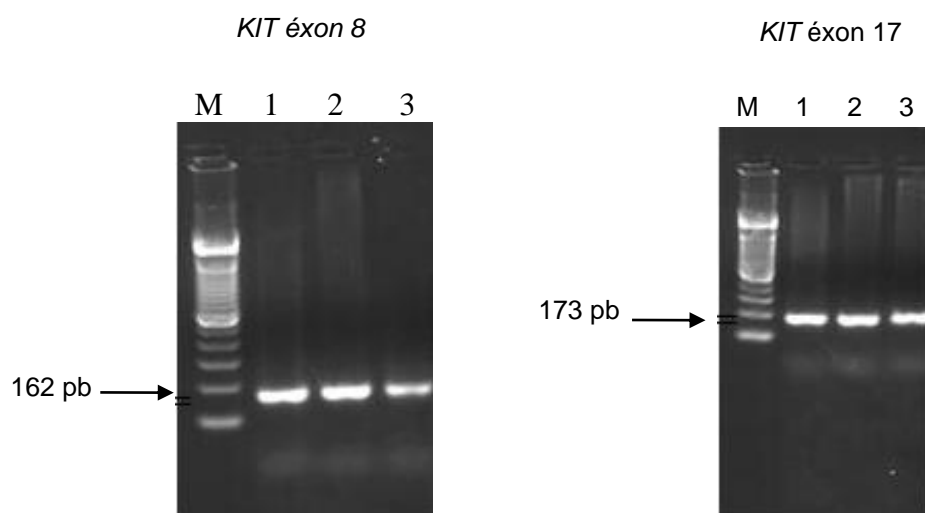


Figura 4.5. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR após amplificação dos éxons 8 (A) e 17 (B) do gene *KIT*. Legenda: M, marcador de peso molecular de 100 pb; 1-3 amostras de casos de LMA pediátrica.

#### 4.2.12. Reação de sequenciamento

Após a reação de PCR, os produtos foram purificados pelo kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, UK). Foram utilizados 30  $\mu\text{L}$  do produto de PCR para a realização da etapa de purificação. Os produtos foram transferidos para eppendorfs novos de 1,5 mL. Em seguida adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  do *Capture buffer type 3* em cada amostra. Rapidamente os produtos foram vortexados e o *mix* foi transferido para uma coluna montada com o tubo coletor. Em seguida as colunas foram centrifugadas em 13.000 rpm por 30 seg e o líquido passado para o tubo coletor foi descartado. Após a centrifugação, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  do *Wash buffer type 1* nas amostras e as colunas foram novamente centrifugadas em 13.000 rpm por 30 seg. O líquido retido no tubo coletor foi descartado e mais uma etapa de centrifugação em 13.000 rpm por 1 min foi realizada. Posteriormente, as colunas foram transferidas para um novo tubo de 1,5 mL e adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  do *Elution buffer type 4* esperando-se 1 min. Por último, as colunas foram centrifugadas em 13.000 rpm por 1 min e as amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após a purificação, os produtos foram visualizados em um gel de 1,5% de agarose corados com GelRed<sup>TM</sup> com auxílio do *Low Mass DNA Ladder* e as bandas foram quantificadas de acordo com sua intensidade.

O sequenciamento foi realizado em uma placa de 96 poços com o volume final de 10  $\mu\text{L}$ , com o auxílio do reagente *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1* (Applied Biosystems, CA, USA) utilizando os mesmos *primers* das reações de PCR. As placas foram submetidas às reações utilizando a seguinte ciclagem básica no termociclador Veriti®

Thermal Cycler (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA), seguindo as seguintes condições de ciclagem: 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.

Após a reação de sequenciamento, as placas foram precipitadas utilizando o protocolo de isopropanol 75% e etanol 75%. Foi realizada uma breve centrifugação (*spin*), adicionou-se 30 µL de isopropanol 75% nos poços e a placa foi vortexada por 10 min. A placa foi incubada, por 15 min ao abrigo da luz e, posteriormente, centrifugada a 4.000 rpm, por 45 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado vertendo-se as placas sobre papel-toalha, através de movimentos circulares. Foram adicionados 50 µL de etanol 75% e a placa foi novamente centrifugada a 4°C/4.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e as placas, aquecidas a 60°C por 10 min, ao abrigo da luz. Depois, foram adicionados 10µL de formamida em cada poço da placa. As placas foram direcionadas para o sequenciador automático de DNA (Genetic Analyzer ABI/Hitachi 3500 [Applied Biosystems]).

O sequenciamento direto realizado nas amostras que apresentaram diferenças nas curvas de *melting* no *HRM* para detecção de mutações no éxon 13 do gene *PTPN11* seguiram as mesmas etapas descritas acima, passando pela purificação, reação de sequenciamento, precipitação e leitura das bases no sequenciador automático.

#### 4.2.13. Análise das sequências

As análises dos eletroferogramas das sequências foram realizadas através dos programas Chromas versão 2.32 (Technelysium, South Brisbane, AUS) e MutationSurveyer® (Softgenetics, PA, USA) onde foi comparado com as sequências dos genes (*KRAS* NG\_007524.1; *NRAS* NG\_007572.1; *KIT* NG\_007456.1; *PTPN11* NG\_007459) disponível National Center for Biotechnology Information (NCBI).

#### 4.2.14. Hibridização in situ Fluorescente (FISH) para identificação de monossomia do cromossomo 7

Antes da realização da técnica de FISH,  $5 \times 10^6$  as amostras do aspirado de MO em heparina foram incubadas com 4 mL de meio RPMI e 1 mL de soro fetal bovino (SFB; Invitrogen, CA, USA) por 24 horas na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após o término da incubação de 24h, foi adicionado 25 µL de colchicina (Sigma Aldrich, MO, USA) e com nova incubação na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por 1h. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 1500 rpm, sobrenadante foi retirado e foram adicionados 5 mL da solução de cloreto de potássio (KCl) a 0,075 M. Depois os tubos foram incubados a 37°C por 17 min, e centrifugados por 5 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi retirado e foram adicionadas 5 ml de solução fixadora (3 metanol:1 ácido acético). As amostras foram mantidas a 4°C por 20 min e centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Esta última foi repetida três vezes e as amostras foram ressuspensas em 2 ml de solução fixadora.

A técnica de FISH foi realizada para identificar a -7/-7q, a partir da sonda comercial Vysis D7S486/CEP FISH Probe Kit. O ensaio é composto da sonda centromérica (7p11.1-q11.1) *SpectrumGreen* (sinal verde) e outra sonda *SpectrumOrange* (sinal laranja) na banda 7q31. A hibridização foi realizada em amostra de MO, segundo protocolo do fabricante.

Conforme exemplificado na figura 4.6, três padrões de sinais eram esperados. O primeiro sinal são dois verdes e dois vermelhos, que correspondia ao padrão normal. O segundo padrão, dois verdes e um vermelho que correspondia apenas à perda da região 31 do braço longo do cromossomo 7 (-7q). O terceiro padrão corresponde a um sinal verde e um vermelho, representando a perda total de um dos cromossomos 7 (-7).

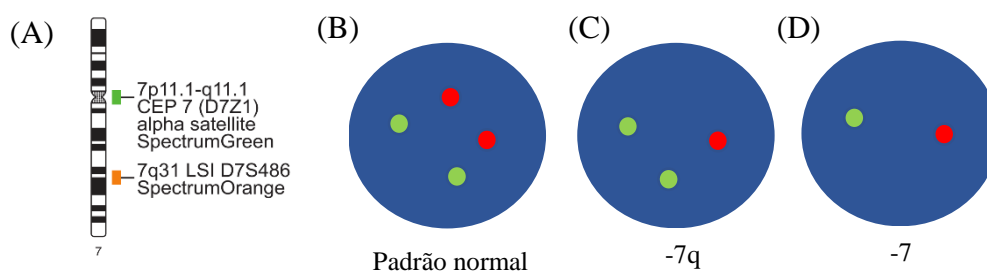


Figura 4.6. As imagens de FISH em interfase mostram os sinais das sondas específicas para a detecção da monossomia do 7. (A) esquematização das sondas comerciais específicas para a região centromérica (SpectrumGreen) e região 7q31 (SpectrumOrange) para o cromossomo 7. (B) Padrão normal mostrando dois sinais verdes e dois vermelhos. (C) Primeiro alterado mostrando dois sinais verdes e 1 vermelho indicando a perda da região 31 do braço longo do cromossomo 7. (D) Segundo padrão alterado mostrando 1 sinal verde e um vermelho indicando ausência de um dos pares do cromossomo 7.

#### 4.2.15. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do programa SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2004). Para a avaliação estatística das frequências e das associações entre os dados clínicos e a presença ou ausência das mutações, foram utilizados o teste de qui quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher. A associação entre as alterações rastreadas e as variáveis selecionadas foi considerada significativa quando o  $p < 0,05$ . As análises de SG e estimativas das distribuições de SG foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e apresentadas com intervalos de confiança (IC) de 95%, calculados e comparados através do teste de Log-Rank. A SG foi definida com o tempo de entrada no estudo até a morte por qualquer causa ou com pacientes sobreviventes censurados na data do último seguimento.

#### 4.2.16. Revisão sistemática

Uma revisão sistemática foi realizada com o objetivo principal de reunir evidências sobre o gene *PTPN11* e agregar resultados relevantes para a formação do conhecimento no impacto das mutações do *PTPN11* na história natural das LMAs e DMP. O PRISMA foi a ferramenta utilizada na lista de verificação da condução da revisão sistemática. Para estabelecer a questão de pesquisa, o modelo PICO, de acordo com as diretrizes PRISMA utilizadas ([www.prisma-statement.org](http://www.prisma-statement.org)) e lista de verificação.

Os critérios de inclusão para a revisão foram: (1) artigos originais (2) pacientes pediátricos (com menos de 21 anos de idade); (3) estudos que relatam doenças mieloproliferativas associadas ao *PTPN11*; (4) descrição de estudos epidemiológicos, séries de casos, relatos de casos e estudos genômicos; (5) artigos escritos em português, inglês e espanhol. Os critérios de exclusão: (1) Cartas ao editor; (2) estudos que incluíam adultos entre os casos, (3) estudos que não abordavam o gene *PTPN11*.

A busca foi realizada em quatro bases de dados eletrônicas: (1) MEDLINE (1966-presente); (2) EMBASE (1974-presente); (3) LILACS (1982-presente); e (4) Scopus (1995-presente). As listas de referência de artigos selecionados foram conferidas para recuperar estudos que não foram encontrados pela estratégia de busca. A revisão incluiu 26 publicações de estudos, as quais foram classificadas em três grupos: Relato de caso (n = 11), Série de casos (n = 12) e Coorte (n = 3). Nossos resultados foram comparados com os 12 estudos de série de casos selecionados (Figura 4.7)

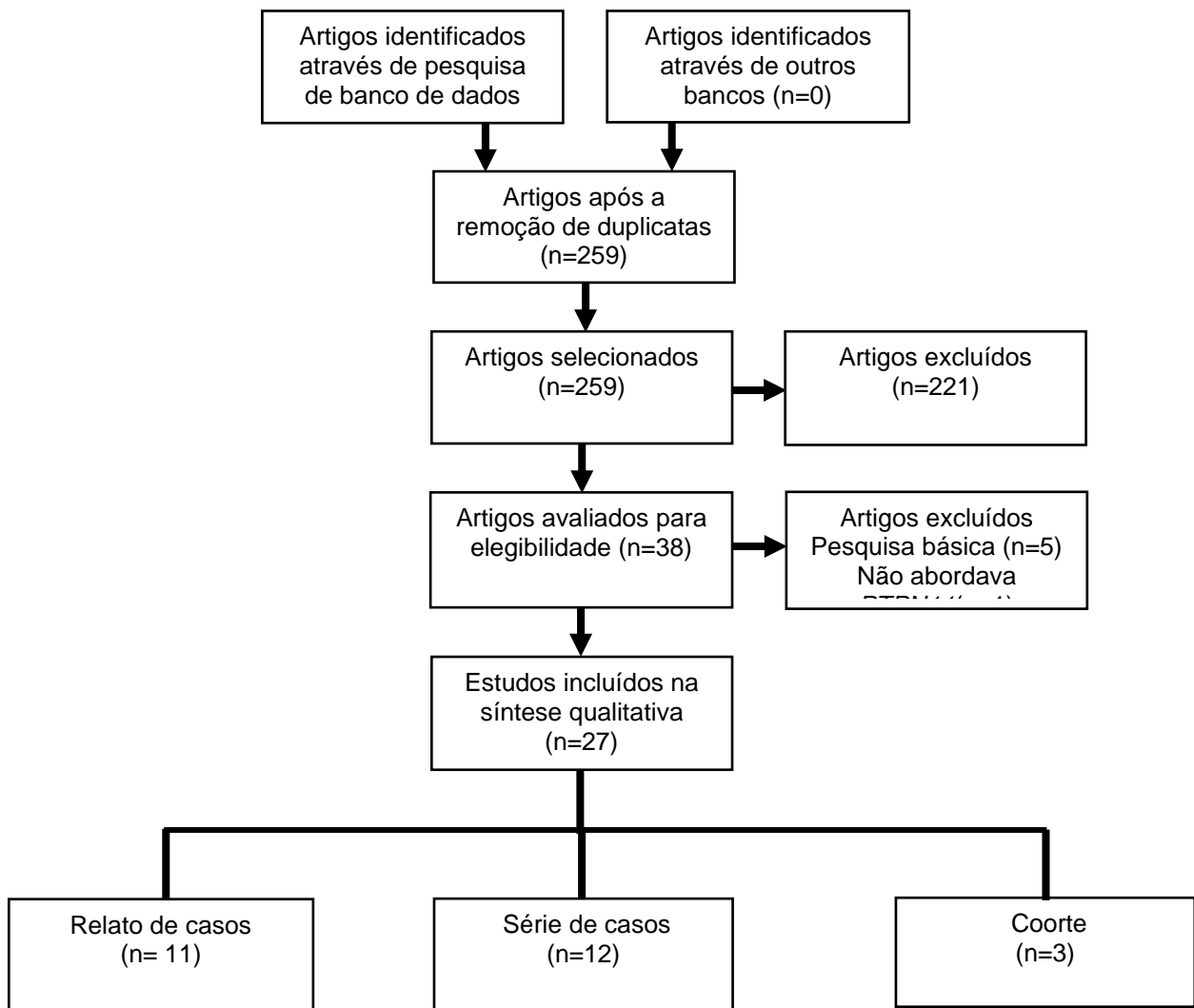


Figura 4.7. Fluxograma dos estudos selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos para revisão sistemática. A busca dos artigos foi realizada em três bancos de dados: MEDLINE, EMBASE e LILACS. Após a identificação e exclusão das duplicatas, os artigos foram selecionados e avaliados por 5 revisores. Os estudos que incluíam pacientes adultos e que não abordavam o *PTPN11* foram excluídos. Ao todo, a revisão incluiu 26 estudos que foram divididos em três grupos: Relato de caso (n = 11), Série de casos (n = 12) e Coorte (n = 3).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise descritiva dos casos de NM pediátricas

As características demográficas, clínicas e os subtipos imunofenotípicos e moleculares de acordo com a classificação WHO e Terceira Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O3) estão representadas na Tabela 5.1. As idades dos casos foram estratificadas em  $\leq 2$  anos,  $>2-10$  anos e  $>11$  anos, visto que as características das NM diferem de acordo com as faixas etárias. Dos 412 casos analisados de LMA e DMP, 72 casos (17,5%) em crianças com idade  $\leq 2$  anos, (35,7%) 147 casos entre 2 e 10 anos, e 193 casos (46,8%) foram diagnosticados em crianças e adolescentes com idade superior a 11 anos (Tabela 5.1). Separando os subtipos de NM, foi observado que a maior parte dos casos de LMA e LMC eram adolescentes com frequências de 44,5% e 90,0%, respectivamente. No entanto, as LMMJs e SMDs foram mais frequentes entre as faixas etárias de 2-10 anos, apresentando uma frequência de 42,9% e 81,8%, respectivamente (Figura 5.1).

Tabela 5.1. Características demográficas e classificação dos casos de LMA e DMP pediátrica, Brasil, 2010-2017

	n <sup>+</sup> /n total (%)
Faixa etária (anos)	
≤2	72/412 (17,5)
>2-10	147/412 (35,7)
>11	193/412 (46,8)
Sexo	
Masculino	212/412 (51,5)
Feminino	200/412 (48,5)
Cor da pele	
Branca	173/412 (42,0)
Não Branca	239/412 (58,0)
Regiões Geográficas	
Nordeste	163/410 (39,6)
Centro Oeste	121/410 (29,4)
Sudeste	101/410 (24,5)
Sul	23/410 (5,9)
Norte	2/410 (0,5)
Leucometria (x10 <sup>9</sup> /l)	
≤50	258/411 (62,8)
>50	153/411 (37,2)
* Classificação WHO e CID-O3	
LMA minimamente diferenciada (M0) 9872/3	19/399 (4,7)
LMA sem maturação (M1) 9873/3	17/399 (4,2)
LMA com maturação (M2) 9874/3	47/399 (11,8)
Leucemia promielocítica aguda (M3) 9866/3	81/399 (20,3)
Leucemia mielomonocítica aguda (M4) 9867/3	96/399 (24,0)
Leucemia monoblástica/monocítica (M5) 9891/3	52/399(13,0)
Leucemia eritróide aguda (M6) 9840/3	5/399 (1,2)
Leucemia megacarioblástica aguda (M7) 9910/3	26/399 (6,5)
Leucemia sem especificação-NOS 9861/3	18/399 (4,5)
Leucemia mieloide crônica LMC 9875/3	17/399 (4,2)
Leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) 9946/3	14/399 (3,5)
Síndrome mielodisplásica SMD 9895/3	6/399 (1,5)

LMA, leucemia mieloide aguda; n<sup>+</sup>= número de casos positivos  
 \*De acordo com *World Health Organization* (WHO) e 3<sup>a</sup> Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O3)

Em relação ao sexo e cor da pele das crianças, 51,5% eram do sexo masculino e 58% a cor da pele definida pelos pais como não branca. A maioria dos casos eram provenientes do Nordeste (39,6%), seguida de Centro Oeste (29,4%), Sudeste (24,5%), Sul (5,9%) e Norte (0,5%) do Brasil. A maioria dos casos apresentava contagem leucocitária inferior a  $50 \times 10^9/L$  (62,8%). Entre as LMAs, o subtipo morfológico mielomonocítico (M4) foi predominante (23,3%). Casos que não foram definidos quanto ao subtipo representaram 4,6% das LMAs (Tabela 5.1). No geral, as LMCs apresentaram uma frequência de 7,3%, as LMMJs 3,4% e as SMDs 2,7%.

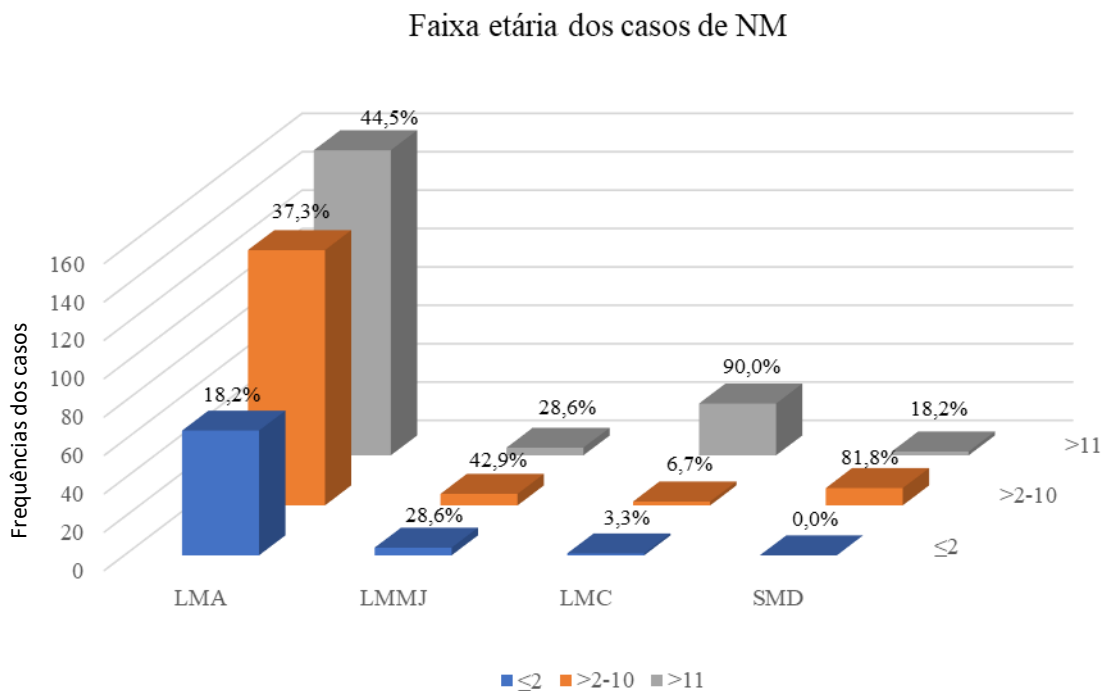


Figura 5.1. Faixa etária dos casos de NM estratificadas em  $\leq 2$  anos,  $>2-10$  anos e  $>11$  anos. LMA, leucemia mieloide aguda; LMMJ, leucemia mielomonocítica aguda; LMC, leucemia mieloide aguda; SMD, síndrome mielodisplásica.



## 5.2 Alterações moleculares nas NM pediátricas

Conforme demonstrado na Tabela 5.2, as distribuições das frequências das alterações moleculares foram analisadas de acordo com as faixas etárias pré-estabelecidas e sexo dos casos de LMA, LMC e LMMJ.

De acordo com a OMS, as fusões gênicas (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11* e *PML-RARα*) e os rearranjos cromossômicos dos genes *KMT2A*, frequentes nas LMAs, auxiliam na estratificação de grupos de risco citogenéticos, podendo ser divididos em: prognóstico favorável, prognóstico intermediário e mau prognóstico. Além disso, as frequências destas alterações variam de acordo com a idade, sexo e leucometria dos pacientes diagnosticados com LMA.

Em nossas análises, os casos com *r-KMT2A* foram predominantes em crianças com idade menor que 2 anos (59,0%; mediana de idade=1,4;  $p<0,0001$ ), enquanto LMA com *RUNX1-RUNX1T1* foram mais frequentes em crianças com idade entre 2 a 10 anos (51,2%; mediana=8,6;  $p=0,027$ ) e com leucometria menor que  $50 \times 10^9/L$  (80,5%; mediana=18,4;  $p=0,035$ ), mas não houve diferença estatística em relação ao sexo ( $p=0,217$ ). A maior parte dos casos com a presença da fusão gênica *CBFβ-MYH11* apresentaram leucometria  $>50 \times 10^9/L$  (72,2%; mediana de leucometria=73,4;  $p<0,0001$ ). As fusões gênicas *CBFβ-MYH11*, *PML-RARα* não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação à idade e ao sexo. No entanto, a maior parte dos casos com *PML-RARα* apresentaram leucometria  $<50 \times 10^9/L$  (74,5%, mediana=9,5;  $p=0,030$ ). A monossomia do 7 foi detectada em 1 caso (5,6%) diagnosticado com LMA-M0.

Em relação às alterações em genes da via RAS/MAPK, mutações em *KRAS* e *NRAS* foram encontradas em 2,9% e 7,5% dos casos respectivamente, porém sem significância estatística em relação à idade, sexo e leucometria. Os casos com *FLT3* mutado foram mais frequentes em crianças com idades superiores a 10 anos (64,1%; mediana de idade=11,4;  $p<0,0001$ ) e com leucometria  $>50 \times 10^9/L$  (43,8%; mediana=362;  $p=0,037$ ), sem diferenças entre meninos e meninas ( $p=0,53$ ). Em nossas análises, mutações em *KIT* foram encontradas numa frequência de 7,8% (15/193), mas não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre a idade ( $p=0,225$ ), sexo ( $p=0,174$ ) e leucometria ( $p=0,416$ ) nos casos de LMA pediátrica. Mutações no gene *PTPN11* apresentaram uma frequência de 7,0% dos casos de LMA pediátrica sendo predominante em crianças do sexo masculino (72,7%;  $p=0,032$ ) como representado na Tabela 5.2.

A detecção da fusão gênica *BCR-ABL1* foi realizada nas amostras de MO e/ou SP de 30 casos enviados para o PHOP com suspeita de LMC. A fusão *BCR-ABL1* foi identificada

em 17 pacientes (56,6%), porém não houve associação estatisticamente significativa em relação a idade ( $p=0,330$ ), sexo ( $p=0,279$ ) e leucometria ( $p=0,215$ ).

Em relação aos casos de LMMJ, a monossomia do 7 foi detectada em dois casos (25,0%), mas sem associação estatística com a idade ( $p=0,5133$ ), sexo ( $p=0,357$ ) e leucometria ( $p=0,750$ ). Mutações em *KRAS* e *NRAS* foram identificadas em dois casos (10,0%), porém sem significância estatística com relação às categorias analisadas (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Distribuição da frequência de fusões gênicas e alterações moleculares nas LMAs, LMCs e LMMJs de acordo com a idade, sexo e leucometria; mediana idade e leucometria

Alteração Molecular *	Frequência n/total (%)	Mediana (mín-máx)	Faixa etária (anos)			p	Sexo			Mediana (mín-máx)	Leucometria (x10 <sup>9</sup> /l)		
			≤2 n (%)	>2-10 n (%)	≥11 n (%)		Masculino n (%)	Feminino n (%)	p		≤50	>50	p
<b>LMA</b>	362/412 (87,8)												
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	41/307 (13,3)	8,6 (1,3-20,6)	2 (4,9)	21 (51,2)	18 (43,9)	<b>0,027</b>	23 (56,1)	18 (43,9)	0,217	18,4 (3,2-136)	33 (80,5)	8 (19,5)	<b>0,035</b>
<i>CBFβ-MYH11</i>	18/299 (6,0)	9,45 (1,2-17,8)	2 (11,1)	7 (38,9)	9 (50,0)	0,584	6 (33,3)	12 (66,7)	0,132	73,4 (2,1-373)	5 (27,8)	13 (72,2)	<b>&lt;0,0001</b>
<i>t-KMT2A</i>	39/226 (17,2)	1,4 (0,0-21,1)	23 (59,0)	9 (23,1)	7 (17,9)	<b>&lt;0,0001</b>	16 (41,0)	23 (59,0)	0,327	35,6 (0,9-251)	22 (57,9)	16 (42,1)	0,128
<i>PML-RARα</i>	55/104 (52,8)	11,2 (1,4-17,9)	2 (3,6)	21 (38,2)	32 (58,2)	0,491	29 (52,7)	26 (47,3)	0,509	9,5 (1,4-190)	41 (74,5)	14 (25,5)	0,030
Monossomia do 7	1/18 (5,6)	<sup>b</sup>	0 (0,00)	0 (100)	0 (0,0)	0,435	1 (100,0)	0 (0,0)	0,722	<sup>b</sup>	1 (100)	0 (0,0)	0,722
<i>FLT3</i>	64/286 (22,4)	11,4 (1,0-21)	1 (1,6)	22 (34,4)	41 (64,1)	<b>&lt;0,0001</b>	32 (50,0)	32 (50,0)	0,531	362 (0,9-540)	36 (36,0)	28 (43,8)	<b>0,037</b>
<i>KRAS</i>	10/337 (2,9)	13,5 (1,7-15,8)	1 (10,0)	4 (40,0)	5 (50,0)	0,838	5 (50,0)	5 (50,0)	0,621	20,9 (1,0-204)	6 (60,0)	4 (40,0)	0,465
<i>NRAS</i>	24/319 (7,5)	9,9 (0,7-19)	5 (20,8)	8 (33,3)	11 (45,8)	0,782	10 (41,7)	14 (58,3)	0,247	22,1 (8,0-340)	13 (54,2)	11 (45,8)	0,163
<i>KIT</i>	15/193 (7,8)	5,4 (1,3-16,3)	2 (13,3)	9 (60,0)	4 (26,7)	0,225	9 (60,0)	6 (40,0)	0,174	32,9 (4,4-167)	11 (73,3)	4 (26,7)	0,416
<i>PTPN11</i>	22/316 (7,0)	10 (2-18)	2 (9,1)	8 (36,4)	12 (54,5)	0,592	16 (72,7)	6 (27,3)	<b>0,032</b>	22,0 (2,3-374)	15 (68,2)	7 (31,8)	0,540
<b>LMC</b>	17/412(4,1)												
<i>BCR-ABL1</i>	17/30 (56,6)	15,4 (1,6-20)	1 (5,9)	2 (11,8)	14 (82,4)	0,330	7 (41,2)	10 (58,8)	0,279	294 (4,7-435)	3 (17,6)	14 (82,4)	0,215
<b>LMMJ</b>	14/412 (3,4)												
Monossomia do 7	2/8 (25,0)	13 (1-4)	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	0,5133	2 (100,0)	0 (0,0)	0,357	88,7 (38-55)	0 (0,0)	2 (100)	0,750
<i>KRAS</i>	1/10 (10,0)	14 (13-14)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100)	0,108	1 (100)	0 (0,0)	0,600	3,6 (18-204)	1 (100)	0 (0,0)	0,200
<i>NRAS</i>	1/10 (10,0)	<sup>b</sup>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100)	0,274	1 (100)	0 (0,0)	0,500	<sup>b</sup>	0 (0,0)	1 (100)	0,900
<i>PTPN11</i>	6/14 (42,8)	12 (0-15)	3 (50,0)	2 (33,3)	1 (16,7)	0,217	4 (66,7)	2 (33,3)	0,262	188 (22-386)	0 (0,0)	6 (100)	0,163

<sup>a</sup> O número total de casos analisados reflete a disponibilidade de material biológico para testes moleculares; ITD, duplicações *em tandem*; TKD, domínio da tirosina quinase; máx, máximo; mín, mínimo; n, número de casos. <sup>b</sup> Mediana não calculada

### 5.3. Identificação do status do gene *PTPN11*

As mutações no gene *PTPN11* foram rastreadas pela técnica de HRM e por sequenciamento direto. De acordo com a literatura, os éxons 3 e 13 são as regiões *hotspot* de mutações em casos de NM. Dessa forma, realizamos nossas análises investigando esses dois éxons do gene *PTPN11*. O método de HRM foi aplicado inicialmente para rastrear o éxon 13, onde foram selecionados 200 casos que não haviam anteriormente apresentado mutações no éxon 3 do *PTPN11* pela técnica de sequenciamento direto. A Figura 5.2 representa os resultados das curvas de HRM do éxon 13 do *PTPN11*. As curvas em azul foram consideradas selvagens (*Wild Type*) pois apresentavam semelhanças com as curvas controle. As curvas com padrões variantes em 50 amostras foram direcionadas para o sequenciamento direto. No entanto, nenhuma alteração foi encontrada nas sequências do éxon 13 do *PTPN11*.

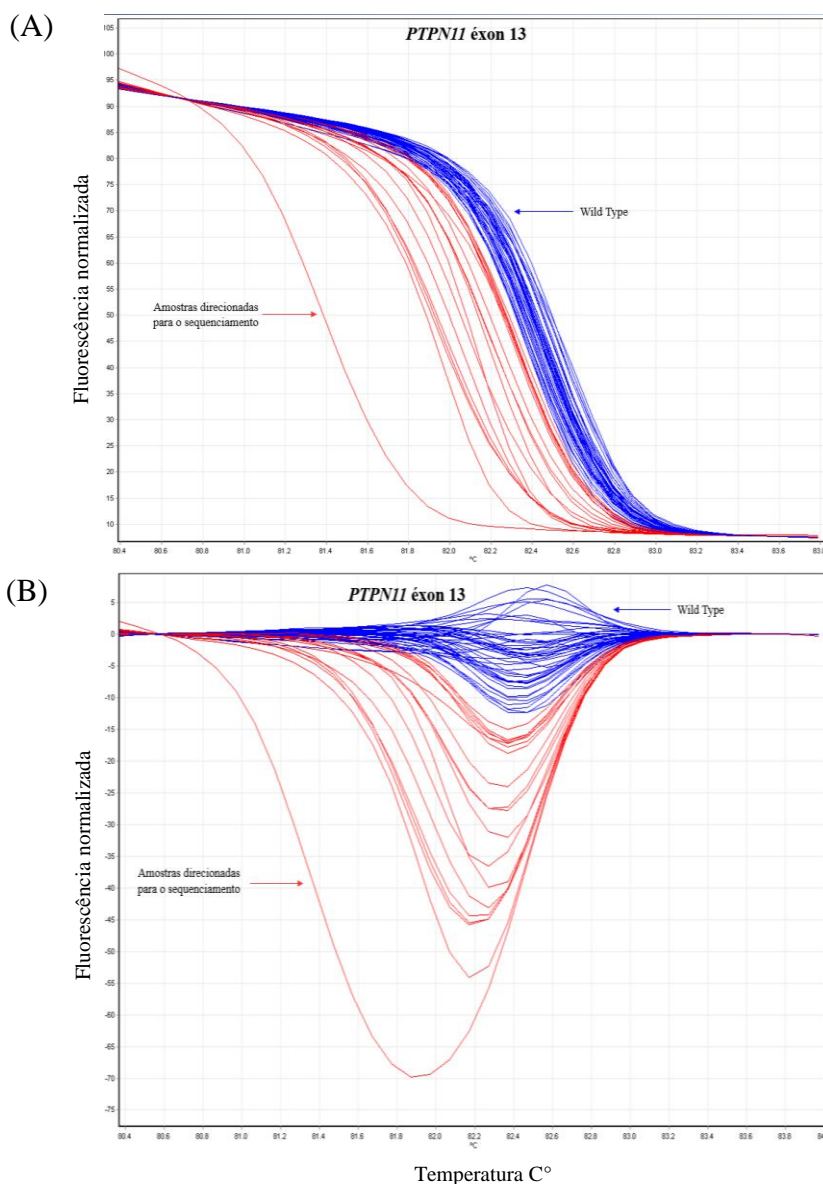


Figura 5.2. Gráficos da diferença de fluorescência de amostras selvagens (*Wild type*) e de amostras sugestivo de mutação encaminhadas para o sequenciamento direto

Em relação às análises estatísticas, as frequências de mutações no *PTPN11* nos diferentes tipos de NM foram observados em 7% do total de casos de LMA (22/316) e 42,8% nas LMMJs (6/14). No entanto, as alterações em *PTPN11* foram ausentes nos pacientes com SMD.

Com relação às características clínico-laboratoriais e moleculares dos casos de LMA com mutação no *PTPN11*, a maior parte dos casos apresentaram porcentagem de blastos na MO e/ou SP menor que 20% (63,0%). O subtipo morfológico LMA-M4 (36,0%) foi o mais predominante com mutações no *PTPN11*. As fusões gênicas *PML-RAR $\alpha$*  e *RUNX1-RUNX1T1* estiveram presentes em 36,0% e 3,0% dos casos mutados, respectivamente; os *r-KMT2A* em 11,0% destes (Figura 5.3).

Em relação aos casos diagnosticados com LMMJ, a maior parte eram crianças com idade >2-10 anos (75,0%), sendo 50% do sexo masculino e feminino e majoritariamente com leucometria  $>50 \times 10^9/L$  (79,0%). Dentre estes, um paciente apresentou níveis elevados de hemoglobina fetal. Mutações no *PTPN11* apresentaram uma frequência de 43,0% afetando principalmente os códons A72, H85, D61 e E76 (Figura 5.4).

Para observar as frequências e associações entre os casos mutados para o *PTPN11* e selvagens foi realizada uma análise estatística para comparar com as características clínico-laboratoriais e moleculares dos pacientes. Um predomínio no sexo masculino continuou sendo observado (71,4;  $p=0,026$ ) e no subtipo morfológico LMA-M4 (35,7;  $p<0,0001$ ) com significância estatística. No entanto, não foi observado associação estatisticamente significativa em relação às outras características laboratoriais, nas mutações do tipo II e outras alterações nos genes da via RAS/MAPK (Tabela 5.3).

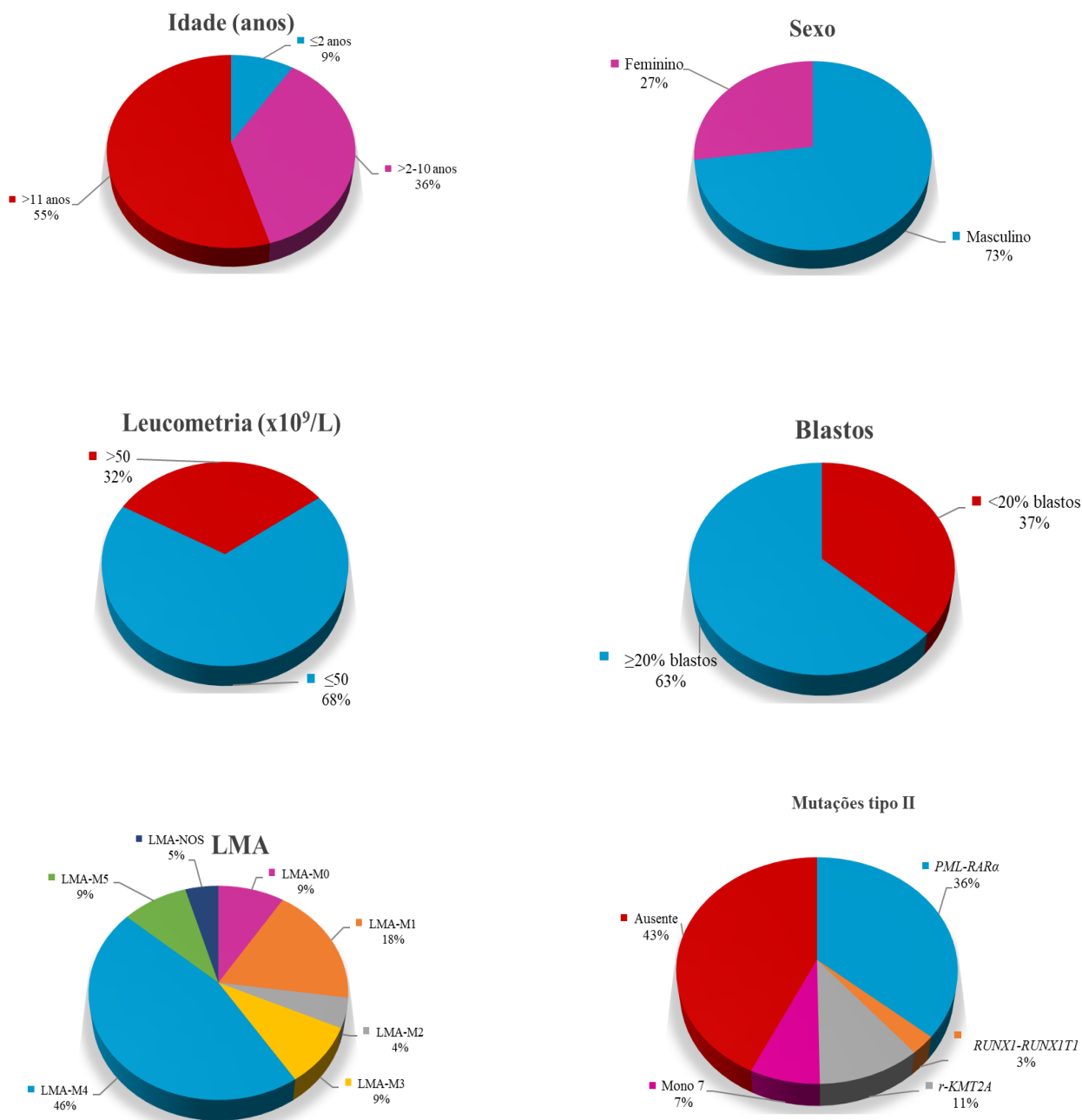


Figura 5.3. Características clínico-laboratoriais e aspectos moleculares dos casos de LMA com mutações no *PTPN11*

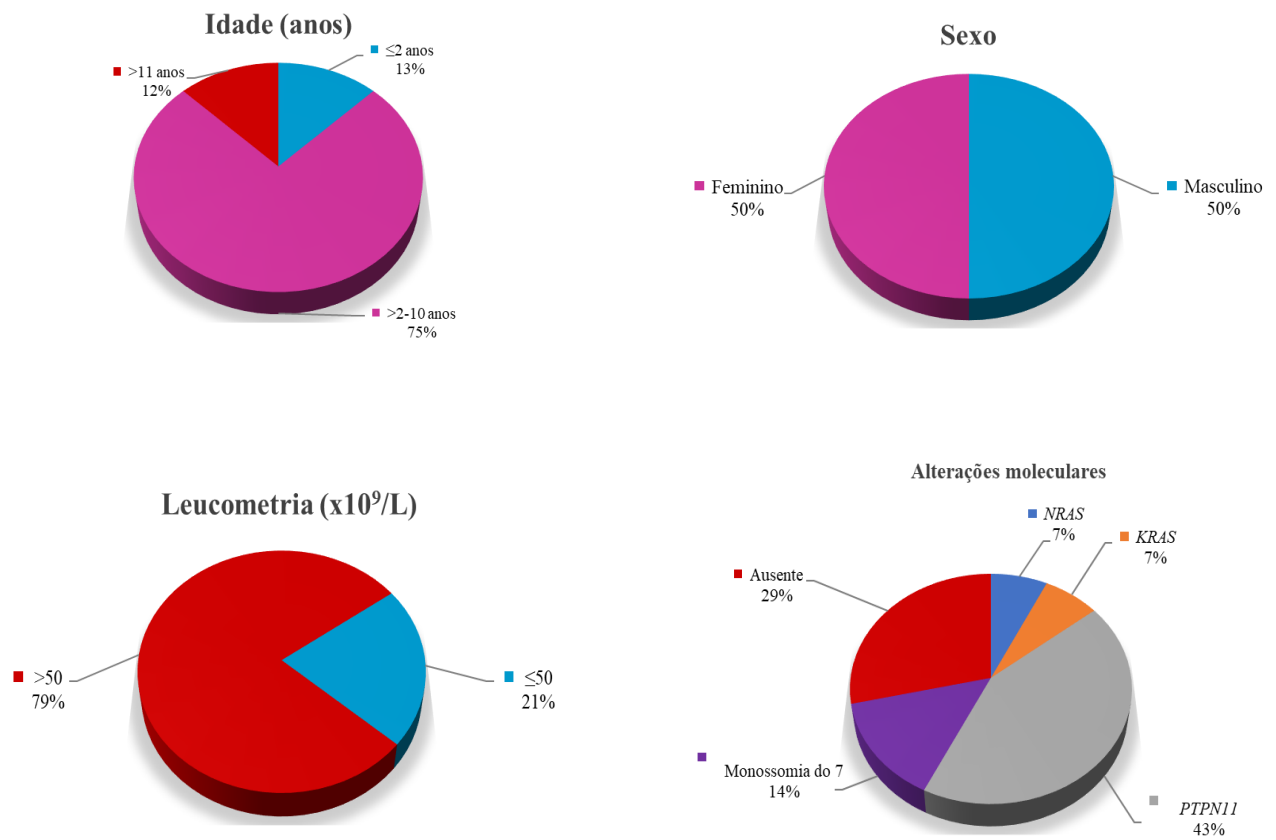


Figura 5.4. Características clínico-laboratoriais e aspectos moleculares dos casos de LMMJ

Tabela 5.3. Caracterização clínico-laboratorial dos casos com mutação do *PTPN11*.

	<i>PTPN11</i> -mutado n(%)	<i>PTPN11</i> -selvagem n(%)	<i>p</i>
Idade (anos)			0,953
	≤2	5 (17,9)	49 (15,8)
	>2-10	10 (35,7)	117 (37,6)
	≥11	13 (46,4)	145 (46,6)
Sexo			0,026
	Masculino	20 (71,4)	157 (50,5)
	Feminino	8 (28,6)	154 (49,5)
Leucometria (x10 <sup>9</sup> /L)			0,163
	≤50	15 (53,6)	201 (64,8)
	>50	13 (46,4)	109 (35,2)
Blastos			0,917
	<20 %	10 (37,0)	120 (39,9)
	≥20 %	17 (63,0)	181 (60,1)
Neoplasias mieloides			<0,0001
LMA minimamente diferenciada (M0)	2 (7,1)	15 (4,8)	
LMA sem maturação (M1)	3 (10,7)	10 (3,2)	
LMA com maturação (M2)	1 (3,6)	42 (13,5)	
Leucemia promielocítica aguda (M3)	2 (7,1)	72 (23,5)	
Leucemia mielomonocítica aguda (M4)	10 (35,7)	75 (24,1)	
Leucemia monoblástica/monocítica (M5)	2 (7,1)	42 (13,5)	
Leucemia megacarioblástica aguda (M7)	1 (3,6)	16 (5,1)	
Leucemia sem especificação-NOS	1 (3,6)	17 (5,4)	
LMC	0 (0,0)	9 (2,9)	
LMMJ	6 (21,4)	4 (1,3)	
SMD/LMA	0 (0,0)	9 (2,9)	
Mutações tipo II			
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	1 (5,0)	34 (13,5)	0,238
<i>CBFβ-MYH11</i>	0 (0,0)	16 (6,6)	0,290
<i>t-KMT2A</i>	2 (20,0)	34 (18,2)	0,575
<i>PML-RARα</i>	2 (66,7)	47 (51,6)	0,532
<i>BCR-ABL1</i>	0 (0,0)	1 (3,8)	0,839
Monossomia do 7	3 (13,6)	0 (0,0)	0,761
Outras alterações da via RAS/MAPK			
<i>KRAS</i>	1 (3,6)	9 (3,0)	0,592
<i>NRAS</i>	1 (3,8)	25 (8,6)	0,349
<i>FLT3</i>	2 (11,1)	58 (24,1)	0,167
<i>KIT</i>	0 (0,0)	15 (9,0)	0,438

LMA, leucemia mieloide aguda; LMMJ, leucemia mielomonocítica juvenil; LMC, leucemia mieloide crônica; SMD, síndrome mielodisplásica; n= número de casos.



Três casos com mutação no *PTPN11* carregavam alterações concomitantemente nos éxons 1 dos genes *RAS* e no éxon 11/12 do gene *FLT3-ITD*. Em *NRAS*, a mutação afetava o códon 12 gerada pela troca do nucleotídeo guanina por timina, e levando à substituição do aminoácido glicina (G) por uma valina (V) (c.G>T p.G12V). A mutação em *KRAS* afetava o códon 12, correspondendo à troca do nucleotídeo guanina por adenina, levando à substituição de uma glicina (G) por um aspartato (D) (c.35 G>A p.G12D) conforme mostrado na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Características laboratoriais dos casos com mutações no *PTPN11*

ID	Neoplasias Mieloides	Idade (meses)	Sex	Mutações Tipo II	Mutações no <i>PTPN11</i>	Outras alterações da via RAS/MAPK
123/10	LMA-M0	85	M	Ausente	c.216 C>T p.A72V	<i>NRAS</i> c. G>T p.G12V
364/10	LMA -M1	130	M	Ausente	c.226 G>A p.E76K	Ausente
395/10	LMA -M1	45	M	Ausente	c.255C>T p.H85H	Ausente
554/10	LMA -M4	164	M	Ausente	c.255C>T p.H85H	Ausente
585/10	LMA -M4	205	M	Ausente	c.227A>C p.A76V	Ausente
071/11	LMA -M4	202	M	Ausente	c.255C>T p.H85H	Ausente
218/11	LMA -M4	171	M	Ausente	c.227A>C p.E76A	Ausente
303/11	LMA -M4	95	F	Ausente	c.255C>T p.H85H	Ausente
456/11	LMA -M4	83	M	Ausente	c.216 C>T p.A72V	Ausente
497/11	LMA -M4	41	M	Ausente	c.226G>A p.E76K	Ausente
260/12	LMA -M5	162	M	Ausente	c.255C>T p.H85H	<i>KRAS</i> c.35 G>A p.G12D
480/12	LMA-NOS	21	F	Ausente	c.255C>T p.H85H	Ausente
323/13	LMA -M4	50	M	Ausente	c.181G>T p.D61Y	Ausente
377/13	LMA -M3	136	F	<i>PML-RARα</i>	c.255C>T p.H85H	Ausente
002/14	LMA -M4	127	M	<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	c.255C>T p.H85H	Ausente
146/15	LMA -M1	168	M	<i>r-KMT2A</i>	c.223 G>A p.E76k	Ausente
250/15	LMA -M0	185	F	<i>r-KMT2A</i>	c.255C>T p.H85H	<i>FLT3-ITD</i>
301/15	LMA -M4	193	M	Ausente	c.182A>C p.D61A	Ausente
479/15	LMA-M5	90	F	Ausente	c.182 A>T p.D61V	Ausente
153/10	LMMJ			Ausente	c.214 G>A p.A72T c.255C>T p.H85H	Ausente
		44	M			
043/13	LMMJ	183	F	NA	c.255C>T p.H85H	Ausente
042/14	LMMJ	46	F	Ausente	c.181 G>T p.D61Y	Ausente
001/16	LMMJ	6	M	NA	c.226 G>A p.E76K	Ausente
344/16	LMMJ	5	M	NA	c.226 G>A p.E76LK	Ausente
205/16	LMA-M2	211	F	Ausente	c.215 C>A p.A72D	Ausente
024/17	LMA -M0	105	M	Ausente	c.214G>A p.A72T	Ausente
308/17	LMA -M3	20	M	<i>PML-RARα</i>	c.255C>T p.H85H	Ausente
353/17	LMMJ	14	M	NA	c.214 G>A p.A72T	Ausente

ID, identificação; M, masculino; F, feminino; NA, não se aplica; LMA, leucemia mieloide aguda; LMC, leucemia mieloide crônica; LMMJ, leucemia mielomonocítica juvenil

Baseado nas informações secundárias enviadas pelos médicos nenhum paciente apresentou fenótipo de síndrome genética. Portanto, assumimos que estas mutações no *PTPN11* têm origem somática. No entanto, um caso #479/15 do sexo feminino, 7 anos, diagnosticada com LMA-M5 apresentou a mutação c.182 A>T p.D61V no diagnóstico e na amostra subsequente na recaída.

A maior parte das mutações identificadas no gene *PTPN11* eram substituição de bases (missense) localizadas nos códons D61, A72 e E76, que codificam parte do domínio N-SH2 da proteína tirosina fosfatase. As sequências foram comparadas utilizando-se como referência a sequência genômica do gene (NG\_007459.1; NM\_002834.3; NP\_002825.3 disponível no NCBI. A alteração silenciosa na H85 foi a mais frequente sendo identificada em 11 casos. As outras alterações identificadas neste estudo foram: c.216 C>T p.A72V, c.226 G>A p.E76K, c.227A>C p.A76V, c.227A>C p.E76A, c.181G>T p.D61Y, c.182A>C p.D61A, c.182 A>T p.D61V, c.214 G>A p.A72T, c.226 G>A p.E76K, c.226 G>A p.E76LK, c.215 C>A p.A72D e c.214G>A p.A72T. Parte das sequências do éxon 3 dos casos mutados está exemplificada na figura 5.5.

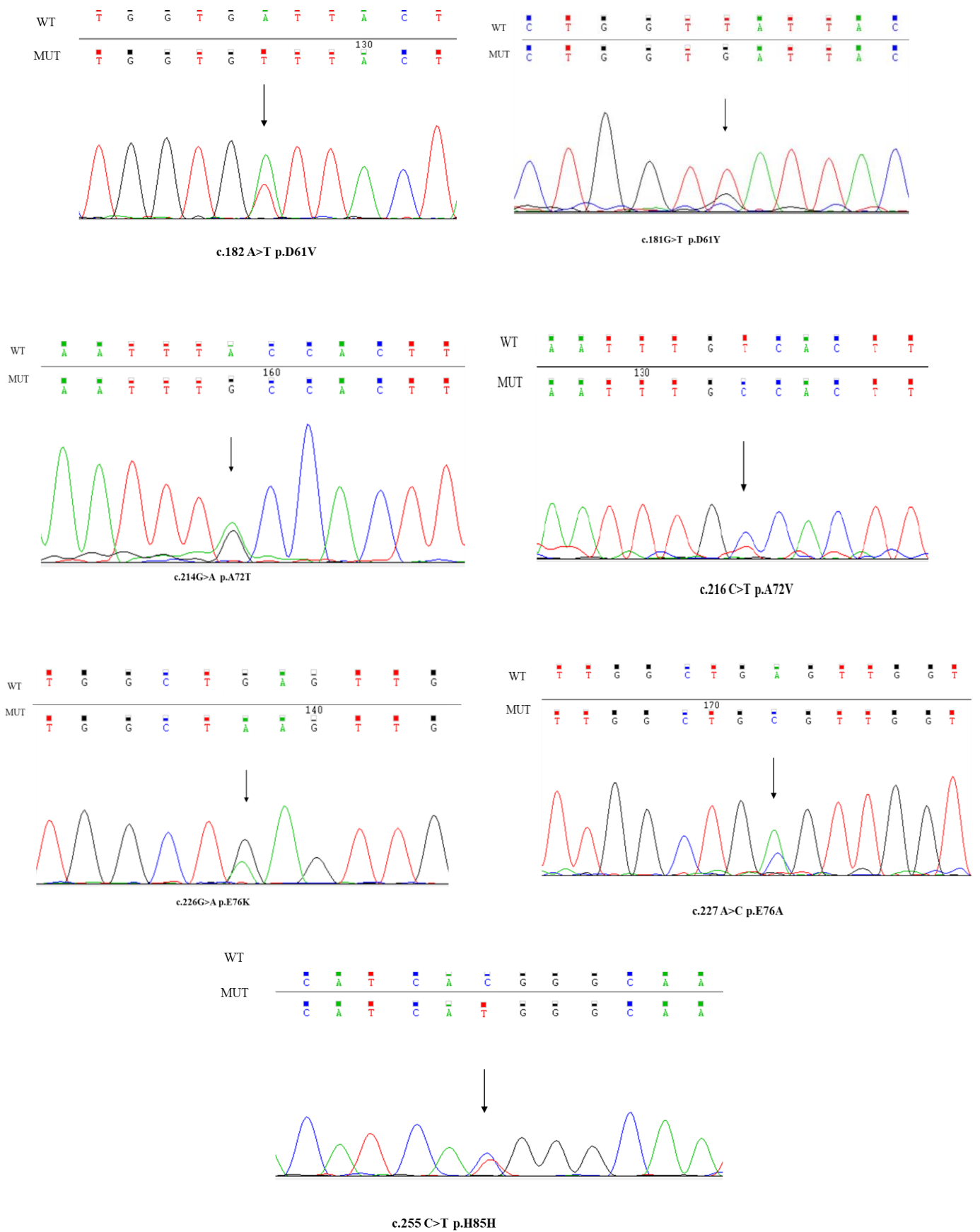


Figura 5.5. Parte da sequência do éxon 3 do gene *PTPN11* dos casos mutados

De acordo com a literatura, outros éxons tais como 2, 4, 8 e 12 podem sofrer alterações, porém mutações nestes éxons estão mais presentes na SN. Na Figura 5.6, está esquematizada a estrutura da proteína tirosina-fosfatase SHP-2 e dos éxons do gene *PTPN11*. Na parte superior, estão representadas as mutações no éxon 3 identificadas em nossa série de casos [28/412 (6,8%)]; na parte inferior, as principais mutações descritas na literatura em malignidades hematopoiéticas provenientes da base de dados COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*).

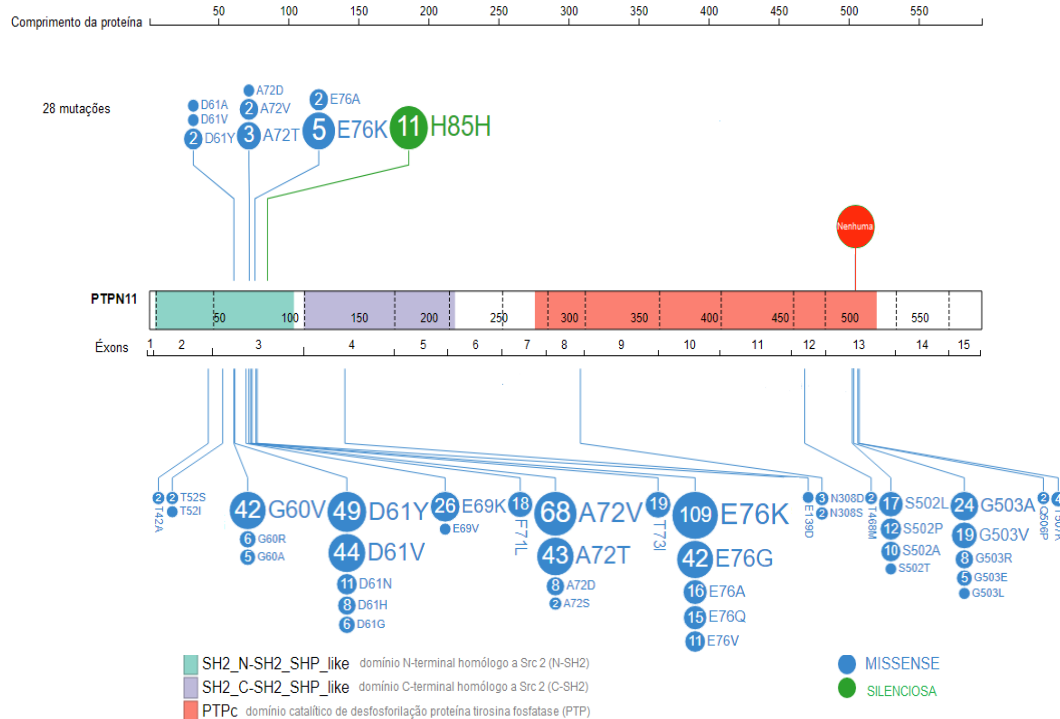


Figura 5.6. Regiões *hotspot* das mutações no gene *PTPN11*. A Figura foi gerada pelo portal de dados PeCan do Hospital St. Jude, que integra informações de banco de mutações como o COSMIC. Na parte inferior, estão representadas as mutações descritas na literatura que afetam outros éxons. Na nossa série de casos, a ocorrência de 28 dos 412 casos testados (7,0%) foi observada apenas no éxon 3, sendo recorrente nos códonos D61, A72, E76 e H85, que codificam parte do domínio N-terminal homólogo a Src 2 (N-SH2) da proteína tirosina fosfatase. Nenhuma mutação foi detectada no éxon 13, que codifica o final do domínio catalítico de desfosforilação proteína tirosina fosfatase (PTP). Na figura acima, cada número mostrado nos círculos corresponde ao número de estudos que identificaram a mesma mutação; as cores correspondem ao tipo de mutação, sendo azul as mutações missenses e verdes, as mutações silenciosas. Por exemplo, a mutação somática E76K foi detectada em 109 estudos diferentes na literatura.

#### 5.4. Detecção da monossomia do 7 pela técnica de FISH

Seguindo o algoritmo de testes estabelecido para a caracterização das NM, os casos de LMMJ ou qualquer outra neoplasia mieloide com mutações no *PTPN11* foram direcionados para pesquisa da monossomia do 7, conforme recomendado pela OMS. No total de 30 casos selecionados, três pacientes apresentaram FISH positivo conforme a figura 5.7.

O primeiro caso (#001/16), um menino de 6 meses com LMMJ e com mutação no *PTPN11* que afetava o códon 76 gerada pela troca do nucleotídeo guanina por uma adenina, levando à substituição do aminoácido glutamato (E) por uma lisina (K); o segundo caso (#123/10), um menino de 7 anos, com LMA-M0, apresentando concomitantemente mutação em *NRAS* (c.G>T p.G12V) e em *PTPN11* localizada no códon 72 correspondente à substituição da base citosina por uma timina que gera a troca do aminoácido alanina (A) por uma valina (V) (c.216 C>T A72V); o terceiro caso (#153/10), um menino de 3 anos com diagnóstico inicial de LMC com *BCR-ABL1*<sup>neg</sup> apresentou duas mutações no *PTPN11*, sendo a primeira alteração silenciosa da histidina 85 e a segunda localizada no códon 72 gerada pela troca do nucleotídeo guanina por adenina, e levando à substituição do aminoácido alanina (A) por uma treonina (T). A presença destas mutações e monossomia do 7, com *BCR-ABL1*<sup>neg</sup> nos levou ao diagnóstico de LMMJ.

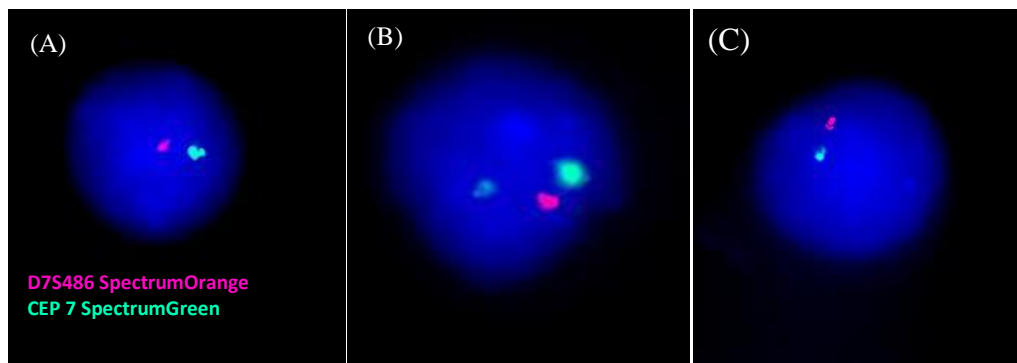


Figura 5.7. As imagens de FISH em intérfase mostram os sinais das sondas específicas para a detecção da monossomia do 7. (A) Caso 001/16, sexo masculino, 6 meses de idade, diagnosticado com LMMJ, foi detectada a mutação c.226 G>A (E76K) no *PTPN11*. (B), Caso 123/10, 7 anos de idade, sexo masculino, diagnosticado com LMA-M0, apresentou as mutações c.G>T (G12V) em *NRAS* e c.216 C>T (A72V) no *PTPN11*. (C), Caso 153/10, 3 anos de idade, sexo masculino, com inicial diagnóstico de LMC-*BCR-ABL1* negativo, identificação de duas mutações no *PTPN11* (c.214 G>A [A72T] e c.255C>T [H85H]) mutações levou ao diagnóstico como JMML, leucemia mielomonocítica juvenil.

## 5.5. Sobrevida Global dos casos de NM pediátricas

As análises univariadas calculando probabilidade de SG (pSG) em 5 anos nos casos de LMA e DMP, excluindo os casos de leucemia promielocítica aguda (M3), LMA/SMD e LMC com *BCR-ABL1* positivo, e o impacto das mutações tipo I e II no desfecho clínico estão mostrados na Tabela 5.5.

Em nosso estudo, o tempo estabelecido para as análises de SG dos casos de LMMJ foi de 18 meses, uma vez que, de acordo com a literatura o tempo médio de sobrevida das crianças que não receberam TCTH é de apenas 10 a 18 meses (LOCATELLI; NIEMEYER, 2015). De acordo com nossas análises, os casos de LMMJ não apresentaram nenhum evento (óbito), portanto, todos sobreviveram (Figura 5.8B)

Com relação às LMAs, a pSG em 5 anos foi menor com uma frequência de 33,2% e erro padrão de 4,4%. As LMCs apresentaram uma pSG de 65,5% e erro padrão de 16,7.

A análise de SG entre as regiões geográficas demonstrou que os casos provenientes da região Sul apresentaram um melhor desfecho, com pSG de 80,0% e erro padrão de 12,6%, mas a mediana não foi alcançada. Os casos da região Centro-Oeste tiveram o pior desfecho com pSG de 11,0% e erro padrão de 8,4%, com mediana de 6,1 meses (IC de 95% 6,1-11,6 meses;  $p=0,010$ ). A idade, o sexo e a leucometria não apresentaram associação estatisticamente significativa de acordo com a análise de sobrevida. Os casos com a cor da pele branca tiveram maior SG, com mediana de 41,6 meses (IC de 95% 11,0-71,3 meses;  $p=0,024$ ).

Nas mutações do tipo I, não houve significância estatística em relação aos genes *FLT3* ( $p=0,727$ ), *KRAS* ( $p=0,722$ ), *NRAS* ( $p=0,197$ ) e *KIT* ( $p=0,650$ ). Em relação à ocorrência concomitante entre cada alteração dos genes *K-NRAS*, *FLT3*, *KIT* e *PTPN11* nos casos de NM, não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p=0,250$ ) (Tabela 5.5). Os casos de LMA e DMP com mutação no gene *PTPN11* apresentaram um pior prognóstico, com a mediana de SG em 5 anos de 16,1 meses (intervalo de confiança de 95% 1,6-8,4 meses;  $p<0,006$ ) em comparação com casos sem mutação que apresentaram uma SG de 33,1 (intervalo de confiança de 95% 0,2-6,4 meses) (tabela 5.5).

Tabela 5.5. Análise univariada dos parâmetros de sobrevida global dos casos de LMA e DMP

Análise univariada				
	N (N de eventos)	pSG-5 anos, (SE)	Mediana <sup>¶</sup> , (95% IC)	p <sup>†</sup>
Neoplasias mieloides <sup>*</sup>				<b>0,106</b>
Leucemia mieloide aguda (LMA)	236 (109)	33,2 (4,4)	15,2 (10,3-20,6)	
Leucemia mieloide crônica (LMC)	12(3)	65,5 (16,7)	§	
Regiões Geográficas <sup>*</sup>	254 (110)			<b>0,010</b>
Nordeste	109 (46)	34,3 (6,4)	16,0 (4,2-24,9)	
Sul	14 (41)	80,0 (12,6)	§	
Sudeste	57 (21)	54,5 (7,6)	§	
Centro-Oeste	74 (41)	11,0 (8,4)	6,1 (0,6-11,6)	
Faixa etária (anos) <sup>*</sup>	260 (111)			0,203
≤2	60 (22)	35,7 (12,6)	34,1 (6,1-62,2)	
>2-10	92 (36)	33,2 (7,2)	15,4 (11,4-19,5)	
≥11	108 (53)	35,5 (5,5)	9,5 (3,8-15,1)	
Cor da pele <sup>*</sup>	260 (111)			<b>0,024</b>
Branca	103 (41)	39,9 (8,3)	41,6 (11.-71,3)	
Não Branca	157 (70)	31,1 (5,1)	10,9 (4,9-16,8)	
Sexo <sup>*</sup>	260 (111)			0,712
Masculino	131 (59)	34,6 (5,8)	15,2 (7,0-23,3)	
Feminino	129 (52)	37,5 (6,2)	3,9 (8,9-24,3)	
Leucometria (x10 <sup>9</sup> /l) <sup>*</sup>	259 (111)			0,612
≤50	165 (73)	35,9 (5,0)	15,7 (10,2-21,3)	
>50	94 (38)	35,6 (7,4)	5,3 (1,8-22,4)	
Mutações Tipo I <sup>*‡</sup>				
<i>FLT3</i>	31 (17)	27,6 (10,1)	11,2 (7,2-15,1)	0,727
<i>KRAS</i>	8 (4)	45,0 (18,8)	16,6 (8,6-24,7)	0,722
<i>NRAS</i>	19 (6)	60,3 (12,8)	§	0,197
<i>KIT</i>	12 (4)	53,0 (18,7)	§	0,650
<i>PTPN11</i>	25 (15)	16,1 (9,8)	5,0 (1,6-8,4)	<b>0,006</b>
Mutações tipo I concomitante <sup>*</sup>	67 (36)			0,250
Única mutação <sup>¥</sup>	69 (35)	38,5 (6,8)	11,0 (4,7-17,3)	
Mais de uma alteração <sup>¥</sup>	6 (5)	16,7 (15,2)	3,0 (0,0- 17,4)	

<sup>¶</sup> Média de sobrevida em meses. <sup>†</sup> *p* valores do teste log-rank indicam se as diferenças são significativas entre os subgrupos. <sup>\*</sup>Foram excluídos os casos de leucemia promielocítica aguda, LMA/SMD e LMC com *BCR-ABL1* positivo. <sup>‡</sup>Análise realizada entre grupos positivos e negativos para a alteração molecular. <sup>§</sup> Mediana não alcançada. IC, Intervalo de confiança; N, número; pSG, Probabilidade de sobrevida global; SE, Erro padrão. <sup>¥</sup> *K-NRAS*, *FLT3*, *KIT* e *PTPN11*.

Em nossas análises univariadas, as mutações no *PTPN11* demonstraram significância prognóstica nos casos de LMA pediátrica (mediana 3,3; IC95% 0,2-6,4;  $p < 0,001$ ).

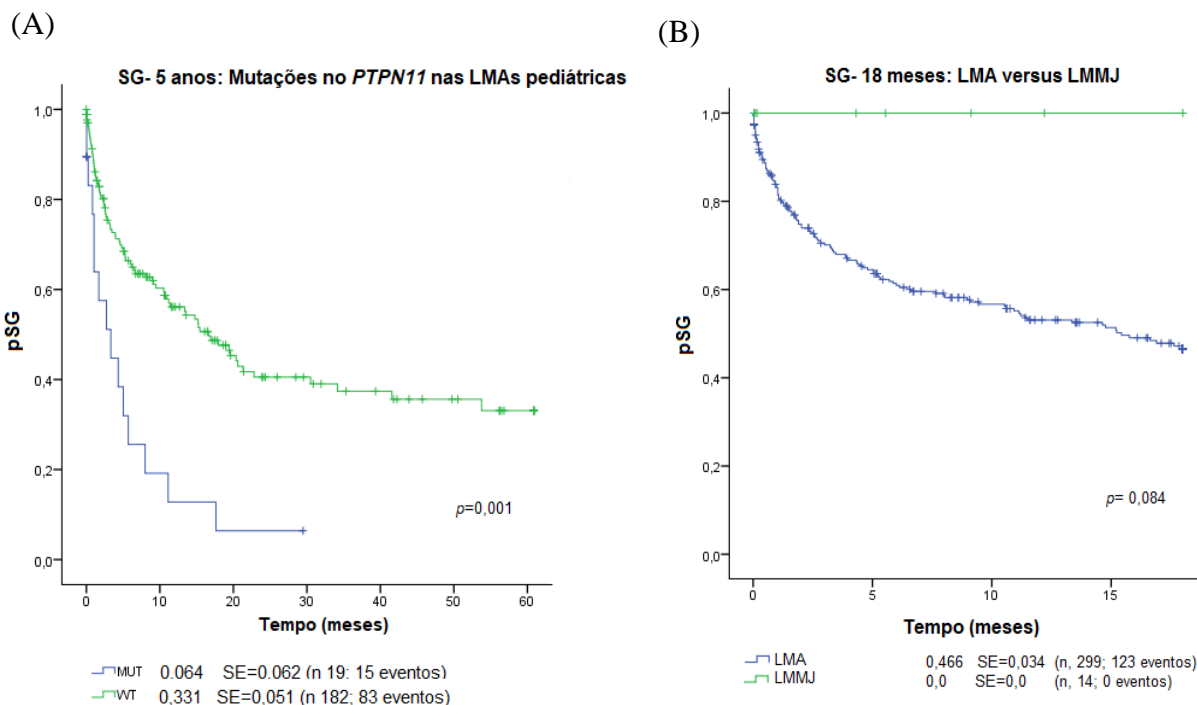


Figura 5.8. Análise de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier dos casos de NMs pediátricos. (A) A pSG em 5 anos dos casos de LMA com mutações no *PTPN11* foram analisadas para comparar os grupos mutados versus *wild type* (selvagem). Os casos com mutação no *PTPN11* demonstraram ter um desfecho pior. (B) A pSG em 18 meses de todos os casos de LMA versus LMMJ foi calculada. Pacientes com LMMJ apresentaram uma melhor sobrevida em comparação com os casos de LMA.  $p=0,084$ . Os valores foram calculados utilizando o teste de log-rank. pSG, Probabilidade de sobrevida global; SE, Erro padrão. LMA, leucemia mieloide aguda; LMMJ, leucemia mielomonocítica aguda.



## 5.6. Revisão de literatura

Neste estudo, realizamos uma revisão sistemática nas bases de dados eletrônicas MEDLINE, EMBASE, LILACS e Scopus para agregar conhecimento sobre o gene *PTPN11*. Após a seleção dos estudos através dos critérios de inclusão e exclusão, 12 artigos de série de casos foram incluídos e comparados com nossos dados. A maior parte dos estudos publicados eram do país de origem Estados Unidos (n=4), seguido da Itália (n=3), Japão (n=3), Holanda (n=1) e Coreia do Sul (n=1). Como esperado, as NMs mais frequentes com presença de mutações somáticas no *PTPN11* eram LMMJ, LMA e SMD. Mutações germinativas no *PTPN11* estavam associadas a casos de SN com relato de malignidade hematológica. Todas as mutações somáticas eram trocas de bases que afetavam principalmente os éxons 3 e 13 do *PTPN11*. Em nossas análises, as mutações encontradas no éxon 3 foram semelhantes com as relatadas nos estudos de série de casos. As alterações afetando os éxons 3 (T73I), 4 (E139D) e 8 (A922G) são mais frequentes em pacientes com SN. Mutações adicionais, como no gene *FLT3* e no regulador epigenético *ASXL1* podem ser identificadas concomitantemente em crianças com alterações no *PTPN11*. O subtipo morfológico LMA-M5 foi o mais frequente com mutações no *PTPN11* nos estudos de série de casos, diferente dos nossos achados que mostraram que mutações em *PTPN11* estavam mais associadas ao subtipo LMA-M4. Em relação aos achados de sobrevida nas séries de casos, o *PTPN11* mutado demonstrou conferir um prognóstico desfavorável em crianças não síndromicas com LMMJ e com SN. No entanto, os casos de LMMJ do nosso estudo demonstraram uma melhor sobrevida em 18 anos. Além deste estudo, nenhum artigo relatou a utilização do *PTPN11* juntamente com o diagnóstico integrado na caracterização dos casos de NM pediátrica. As descrições dos estudos de série de casos estão representadas na Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Estudos de série de casos selecionados para revisão sistemática

Região do estudo	Número de casos	Diagnóstico	Tipos de mutações no <i>PTPN11</i>	Características relevantes	Referências
Itália	145	SN-LMMJ; LMMJ SMD LMA	Éxon 3 [D61Y, D61V, Y62D, E69K, F71L, F71K, A72T, A72V, T73I, E76K, E76V, E76A, E76G e G60V] Éxon 13 [G503R e G503A]	Distribuição das mutações no <i>PTPN11</i> nas neoplasias mieloides e SN	Tartaglia et al., 2003
Itália	181	LMA	Éxon 3 [A72V and E76K] Éxon 13 [T507K]	Mutações de <i>PTPN11</i> são mais frequentes em casos de leucemia monocítica aguda (FAB-M5).	Tartaglia et al., 2004
Holanda	150	SN	Éxon 3 [T73I] Éxon 4 [E139D] Éxon 8 [A922G]	As mutações A922G no éxon 8, E139D no éxon 4 e T73I no éxon 3 são mais frequentes em SN.	Jongmans et al., 2004
EUA	226	LMMJ LMA LMC	Éxon 3 [G60R, D61V, D61N, Y63C, E69K, F71K, A72T, A72V, T73I, E76K, E76Q, E76G, G60A, D61Y, A72V, E76K, E76G] Éxon 4 [E139D] Éxon 13 [G506P]	Mutações em <i>PTPN11</i> contribuem para a leucemogênese nas LMMJs e outras malignidades mieloides (LMA, SMD and LMC)	Loh et al., 2004
EUA	278	LMA	Éxon 3 [E76G, E76K, A72V, E76Q, E69K, F71L, T73I e E76G] Éxon 13 [S502L]	Mutações em <i>PTPN11</i> estão associadas com mutações em <i>FLT3</i> em crianças com LMA-M5	Loh et al., 2004
EUA	77	LMMJ SN-DMP	Éxon 3 [T52S, G60R, G60Val, D61Y, D61V, D61G, A72T, A72V, T73I, E76K, E76G, E76M, A72G, Exon 13 [R498W, S502A, G503A, G503V e G506P]	Forte correlação genotípica/fenotípica no espectro de mutações no <i>PTPN11</i> em pacientes com LMMJ, SN/DMP e SN	Kratz & Loh ML et al., 2005
Itália	181	LMA	Éxon 3 [G60V, E69K, D61N, D61H, F71L, A72V, E76K, T507K] Éxon 13 [S502A]	Mutações nos éxons 3 e 13 do <i>PTPN11</i> são regiões hotspot em crianças com LMA-M5	Tartaglia et al., 2005
Japão	11	LMMJ	Éxon 3 [D61V, E76Q, E76G, e E76K] Éxon 13 [G503A]	<i>PTPN11</i> mutado não é encontrado em alterações cromossômicas durante terapia com 6-mercaptopurina na JMML	Matsuda et al., 2006
Japão	13	LMMJ	Éxon 3 [G60V, D61V, A72S, E76K]	Específico estudo de DRM depois de TCTH	Matsuda et al., 2009
Japão	49	LMMJ	ND	Incluindo mutações em <i>ASXL1</i>	Sugimoto et al., 2010
Coréia do Sul	22	LMMJ; LMMJ-SN	Éxon 3 [E76G, E76K, A72T, A72V] Éxon 4 [E139D] Éxon 7 [F285S] Éxon 13 [S502P and G503A]	Análises de SG sugerem uma implicação prognóstica desfavorável em mutações no <i>PTPN11</i>	Park et al., 2011
EUA	29	LMMJ	Éxon 3 [G60R, D61V, E69K, A72T, A72G, E76K, A72V, E76Q, E76K, T73I, E76G] Éxon 4 [E139D] Éxon 13 [G503A]	Estudo descreve a paisagem genômica das LMMJs	Stieglitz et al., 2015
Brasil	412	LMC LMMJ LMA SMD	Éxon 3 [E76K, H85H, A76V, E76A, A72V, D61Y, D61A, D61V, A72T]	Mutações somáticas no <i>PTPN11</i> auxiliam no diagnóstico das NMs e são um fator de prognóstico independente	Bueno et al., 2018

LMA, leucemia mieloide aguda; LMC, leucemia mieloide crônica; LMMJ, leucemia mielomonocítica juvenil; SMD, síndrome mielodisplásica; SN, síndrome de Noonan

## 6. DISCUSSÃO

Estudos citogenéticos e moleculares definem as LMAs e DMPs como doenças heterogêneas do ponto de vista celular e molecular. Considerando que translocações cromossômicas são alterações recorrentes associadas a diferentes subtipos celulares da LMA e DMP, estas alterações genéticas adquiridas cooperam com mutações em genes que codificam receptores de fatores de crescimento e proteínas que participam de cascatas de sinalização intracelular para processos de transformação neoplásica (TEFFERI; SKODA; VARDIMAN, 2009; VARDIMAN JW, THIELE J, 2008). As neoplasias mieloides tem em comum alterações genômicas que ocorrem como eventos secundários.

A via RAS/MAPK é uma das principais vias de sinalização desreguladas nas LMAs e DMPs (REUTER; MORGAN; BERGMANN, 2000). Mutações adicionais nos genes *N/KRAS*, *FLT3* e *KIT* já foram descritas como sendo comuns nas NM pediátricas (BALGOBIND *et al.*, 2011; SCHWARTZ *et al.*, 2017). Além desses genes, ressaltamos o *PTPN11*, que é regulador positivo da via de sinalização RAS/MAPK (NEEL; GU; PAO, 2003; NOGUCHI *et al.*, 1994).

O *PTPN11* codifica uma proteína citoplasmática tirosina fosfatase 2 (SHP-2) que funciona como um transdutor de sinal para receptores de fatores de crescimento que regulam a sobrevivência e diferenciação celular (TARTAGLIA *et al.*, 2006). A arquitetura da proteína SHP-2 contém dois domínios de homologia Src 2 (SH2) *em tandem* (N-SH2 e C-SH2), um único domínio PTP e uma cauda hidrofóbica terminal COOH (MATOZAKI *et al.*, 2009). Em estado basal, o domínio terminal N-SH2 da SHP-2 interage com o domínio da PTP, resultando na autoinibição da atividade da PTP. Mutações no *PTPN11* levam a mudanças conformacionais nas interações dos domínios da fosfatase tornando a SHP-2 constitutivamente ativa (MATOZAKI *et al.*, 2009). Neste estudo, os éxons 3 e 13 do *PTPN11* foram analisados nos casos de NM, mutações foram identificadas apenas no éxon 3 que codifica parte do domínio N-SH2 da proteína tirosina fosfatase. Dessa forma, alterações nesse domínio demonstram ser mais relevante para leucemogênese das NMs.

Os estudos de série de casos de NM mostram que mutações somáticas no gene *PTPN11* podem ocorrer com uma frequência de 34% nos casos de LMMJ, 10% em SMD e 5% nas LMAs pediátrica (TARTAGLIA *et al.*, 2003, 2005). No entanto, são eventos raros nas LMCs e LMAs em adultos, mostrando que as frequências das mutações variam em relação ao subtipo de NM. LOH *et al* (2004) analisaram amostras de MO de 278 pacientes pediátricos com LMA pela técnica de cromatografia líquida de alta resolução (DHPLC) e sequenciamento direto para investigar mutações no *PTPN11*. O método DHPLC é uma técnica que utiliza a formação heteroduplex entre cadeias de DNA selvagem e mutado para

identificar alterações nas sequências. Moléculas de heteroduplex são separadas das moléculas de homoduplex por cromatografia líquida de fase reversa de pares iônicos em uma matriz de coluna especial com desnaturação gradual das fitas de DNA. Estudos anteriores utilizaram esta metodologia para o rastreamento de mutações no *PTPN11* em pacientes com SN (TARTAGLIA *et al.*, 2002). No estudo dirigido por LOH *et al* (2004) mutações somáticas no *PTPN11* foram identificadas em 11 (4%) dos pacientes pediátricos com LMA. Em nossa série de casos, as mutações no *PTPN11* apresentaram uma frequência discretamente superior (7,0%) nas LMAs em relação ao estudo de LOH *et al* (2004). No entanto, em nossas análises as mutações em *PTPN11* não foram encontradas nos casos de SMD.

Diferentemente dos achados de Tartaglia *et al* (2005), o predomínio de *PTPN11* mutado na nossa coorte foi observado em LMA mielomonocítica (M4). A associação de mutações no *PTPN11* com subtipos específicos de leucemia (M4 e M5), conforme definido pela linhagem, tipo de célula e estágio de diferenciação, corrobora com a hipótese de que a SHP-2 no contexto celular tem contribuição fundamental para a expansão clonal. Podemos supor que a associação preferencial de SHP-2 com o subtipo FAB-M4 é causada pela desregulação de vias de transdução que controlam seletivamente a proliferação ou a sobrevivência de células precursoras da linhagem mielomonocítica. Uma situação semelhante é observada na LMMJ, caracterizada por proliferação excessiva de células mielomonocíticas imaturas e maduras (TARTAGLIA *et al.*, 2005).

As semelhanças moleculares entre LMMJ e a LMA com *PTPN11* mutado e/ou mutações em outros genes da via RAS/MPAK corroboram a premissa de que elas invariavelmente representam eventos secundários que cooperam com um espectro de iniciação de lesões genéticas. Já foi demonstrado que algumas destas mutações não estão presentes no diagnóstico e surgem na recaída de pacientes com LMA. Nesse contexto, Masetti *et al* (2016) realizaram um sequenciamento completo do exoma em 4 pacientes pediátricos e detectaram um ganho de mutação ativadora no *PTPN11* (p.A72V) adquirido na recaída, possivelmente associado à seleção clonal. Padrões de mutações relacionados a um aumento no sinal proliferativo dão uma vantagem significativa a um clone específico, levando à recaída, refletindo na progressão através da aquisição gradual de novas mutações e diversidade genética dentro de uma linhagem celular. Isso resulta na seleção e expansão de subclones mais adequados, juntamente com a erradicação ou a auto extinção de subclones menos aptos (MASETTI *et al.*, 2016).

Em relação à faixa etária, sexo e leucometria dos casos com mutação no *PTPN11*, Tartaglia *et al* (2005) identificaram uma frequência de 4,4% de mutações em 181 pacientes com LMA com idade entre 1 e 16 anos, porém, sem significância estatística em relação ao

sexo e leucometria. Em nossas análises, as mutações no *PTPN11* foram mais frequentes nas crianças do sexo masculino (71,4%;  $p=0,026$ ), porém não tiveram associação significativa com a idade e leucometria. De acordo com a literatura, os pacientes com mutação no *PTPN11* estão associados ao sexo masculino com contagem de leucócitos elevadas (LOH *et al.*, 2004).

Com relação às mutações tipo II, as alterações *PML-RAR $\alpha$*  e *r-KMT2A* foram identificadas na nossa série de casos com mutações no *PTPN11*, semelhante como encontrado por Balgobind *et al.*, (2011). No entanto, a fusão gênica *RUNX1-RUNX1T1* foi encontrada em um caso mutado com *PTPN11* neste estudo, diferente dos achados de BALGOBIND *et al.*, (2011) e Tartaglia *et al.*, (2005), que não encontraram essa alteração. Esses resultados reforçam a premissa de que a cooperação entre as mutações do tipo I e II é necessária para o desenvolvimento de LMA, independentemente da alteração iniciadora da patogênese.

Os éxons 3 (90%) e 13 (10%) do gene *PTPN11* são as regiões de *hotspot* de mutações somáticas para casos com LMMJ, LMA e SMD não sindrômica. Os resíduos D61, A72 e E76 do éxon 3 e S502 e G503 do éxon 13 são os mais afetados e as mutações são substituições de bases que levam a alterações na codificação de aminoácidos. Em relação aos casos sindrômicos, mutações germinativas podem ser encontradas nos éxons 2 (T42), 3 (G60, D61 e A72), 4 (E139), 7 (F285), 8 (N308) e 13 (G503) do *PTPN11*. A patogênese da SN está associada à perda de auto inibição da atividade do domínio da PTP resultante da inibição da interação intramolecular entre os domínios SH2 e PTP (MATOZAKI *et al.*, 2009). Nas LMMJs, os resíduos alterados (D61, E69, A72 e E76) parcialmente se sobrepõem, mas não são idênticos àqueles encontrados na SN. Para entender o mecanismo molecular pelo qual as mutações no *PTPN11* causam SN ou LMA pediátrica, um estudo experimental gerou camundongos *knock-in* que expressam a mutação D61G associada a SN. Aproximadamente 50% dos camundongos apresentaram letalidade embrionária, baixa estatura, anomalias craniofaciais semelhantes às da síndrome de SN e DMP. Estas observações forneceram a primeira evidência de que as mutações no *PTPN11* podem causar SN ou DMP (ARAKI *et al.*, 2004). Pacientes com SN com mutações no *PTPN11* que desenvolvem LMMJ ou DMP podem regredir espontaneamente ou evoluir para malignidade (STRULLU *et al.*, 2014).

A alteração silenciosa no resíduo H85 detectada em 11 casos neste estudo foi identificada por Tartaglia *et al* (2002) em indivíduos com SN e foi descrita como um possível polimorfismo neutro. No entanto, no banco de dados COSMIC a p.H85H é descrita como sendo uma alteração somática presente nos tecidos hematopoiéticos e linfoides. Além disso, um estudo dirigido por Hirsch *et al* (2016) descreveu a genética de hierarquização e evolução clonal das LMAs, observando a persistência das mutações na recaída e a capacidade de iniciar um repovoamento hematopoiético utilizando um painel de NGS para 122 genes alvos.

Alteração p.H85H foi detectada em quatro pacientes, porém não demonstrou uma associação significativa na variação clonal. Até o momento, poucos estudos descreveram o impacto desta alteração na biologia das NMs pediátricas, logo, uma investigação molecular é necessária para uma melhor caracterização. Dessa forma, podemos supor que existem outros mecanismos que podem estar envolvidos em conjunto com alteração na H85 como: *splicing* alternativo, alterações crípticas ou mutações em genes envolvidos na regulação epigenética.

Neste estudo, não foram identificadas mutações no éxon 13 do gene *PTPN11* pela técnica de sequenciamento direto, embora as amostras tenham apresentado variações nas curvas de *melting* no HRM. Aplicações deste método foram anteriormente utilizadas para o diagnóstico de SN, demonstrando ser uma ferramenta rápida, confiável e de baixo custo para a detecção de variantes genéticas no *PTPN11* (LO *et al.*, 2009; RODRÍGUEZ *et al.*, 2014). Por meio desta técnica, é possível identificar variações nas bases c.1510 A>G (p.M504V), c.1504T>A (p.S502T), c.1510A>G (p.M504V), c.1507G>C (p.G503R) e c.1517A>C (p.H506P) no éxon 13. Algumas limitações têm sido relacionadas à técnica, como por exemplo menor eficiência em regiões com deleções (ou inserções), detecção de variações homocigóticas (quando comparadas a heterocigotas), falta de concordância quanto ao comprimento ótimo do produto de PCR (GONZALEZ-BOSQUET *et al.*, 2011). As limitações em nossas análises podem ser devidas à utilização de diferentes métodos de extração de DNA, presença de sais nas amostras e do fenol da extração por Trizol, que não interferiram em outros testes de biologia molecular.

As alterações citogenéticas são as anormalidades mais recorrentes nos pacientes com NM que estratificam em grupos de risco preditivos de sobrevida, e que direcionam para protocolos de tratamento específico (VARDIMAN, 2010). A monossomia 7 é uma alteração cromossômica conhecida que ocorre em 25% em crianças com SMD, 24-33% nas LMMJs e 1,2% nas LMAs pediátricas (YOSHIMI; KOJIMA; NAOTO, 2010; BALGOBIND *et al.*, 2011; SCHWARTZ *et al.*, 2017). A desregulação na via RAS/MAPK está associada com deleções no cromossomo 7 (SCHWARTZ *et al.*, 2017). Mutações no *PTPN11* são detectadas em pacientes com monossomia do 7 numa frequência de 25% (STIEGLITZ *et al.*, 2015). Em nossas análises detectamos a monossomia do 7 em três casos com mutações no *PTPN11*, sendo que um destes com diagnóstico de LMA-M0 e adicional mutação em *NRAS* (G12V). Alguns clones com alterações no *PTPN11* e -7 no diagnóstico podem evoluir e ressurgir na recaída apresentando as mesmas mutações ou novas (HIRSCH *et al.*, 2016). Os mecanismos patogênicos entre a monossomia do 7 e mutações no *PTPN11* permanecem incertos, certamente estudos maiores serão necessários para confirmar essas associações.

Neste estudo, as mutações em *PTPN11* tiveram um impacto na sobrevida dos casos de LMA e DMP pediátrica demonstrando ser um fator prognóstico independente. Balgobind *et al* (2011) demonstraram que as mutações na via RAS/MAPK quando combinadas podem apresentar uma sobrevida de 68% nas LMAs pediátricas. No entanto, estudos anteriores chegaram a conclusões diferentes sobre o significado no prognóstico quanto às mutações da via RAS/MAPK nas JMMLs. Essas mutações não se apresentam como fatores de prognóstico independentes, dificultando estabelecer um algoritmo de estratificação de risco. Dessa forma, a união das mutações no diagnóstico possui relevância no desfecho. Outro fator que permanece em discussão é a sobrevida dos pacientes com mutações no *PTPN11* que receberam TCTH. Yoshida *et al.* (2009) relataram que a SG em 19 pacientes com mutação em *PTPN11* que receberam TCTH (25%) foi significativamente pior que a SG em 14 pacientes sem mutação no *PTPN11* (64%). Diferente do descrito por Yabe *et al* (2014) que mutações em *PTPN11* foram detectadas em 15 pacientes japoneses (50%), indicando um prognóstico mais favorável do que nos estudos anteriores, com uma taxa estimada de 5 anos de SG com frequências de 58,3 e 88,9% para os pacientes com *PTPN11* mutado e sem mutação, respectivamente ( $p=0,092$ ). As análises de sobrevida, de acordo com o estado da mutação, propõem que alterações no *PTPN11* podem ter más implicações prognósticas no desfecho clínico dos pacientes com LMMJ (YOSHIDA *et al.*, 2009; YABE *et al.*, 2015).

Estudos recentes demonstram que padrões de metilação no DNA de pacientes com LMMJ ajudam a prever os desfechos da doença (STIEGLITZ *et al.*, 2017). Pacientes com mutações somáticas no gene *PTPN11* e alto perfil de metilação no genoma apresentam menores taxas de sobrevida livre de evento (LIPKA *et al.*, 2017). A correlação entre o perfil de metilação do DNA com mutações no *PTPN11* tem sido investigada nos últimos anos para melhor caracterização da doença, proporcionando oportunidades para tratamento direcionado. O tratamento com agentes hipometilantes tem demonstrado induzir remissões em pacientes com LMMJ, e tem reduzido a sobrecarga de células leucêmicas antes do TCTH (LOCATELLI; NIEMEYER, 2015).

Portanto, mutações somáticas no éxon 3 do gene *PTPN11* são amplamente distribuídas nas NMs pediátricas e desempenham um papel fundamental na leucemogênese. Mutações no *PTPN11* em conjunto com outras alterações da via do RAS/MAPK (*RAS*, *FLT3* e *KIT*) e as fusões gênicas (*RUNX1-RUNX1T1*, *BCR-ABL1*, *CBFb-MYH11*, *PML-RAR $\alpha$*  e *r-KMT2A*) específicas de LMA auxiliam na caracterização e identificação dos diferentes subtipos de NMs pediátricas. Estas alterações conferem vantagem proliferativa e bloqueio da diferenciação mielóide aos blastos leucêmicos, que contribuem para o desenvolvimento da doença. As mutações no *PTPN11* tiveram um impacto significativo na sobrevida geral na

LMA e DMP pediátrica, indicando que essas alterações podem afetar diferentes malignidades hematopoiéticas.



## 7. CONCLUSÕES

- Foi possível a identificação de mutações somáticas no gene *PTPN11* em pacientes com leucemias mieloides agudas e LMMJ através do sequenciamento direto e pela técnica de HRM;
- Todas as mutações encontradas afetavam os códons D61, A72 e E76 sendo que a alteração silenciosa c.255C>T p.H85H foi a mais frequente;
- As semelhanças entre algumas formas de LMA-M4 e LMMJ fortalece a necessidade de inclusão das pesquisas de mutações do *PTPN11* nestes casos, já que existe uma maior frequência de *PTPN11* mutado em casos de LMMJ;
- Raros casos apresentaram concomitância de associações de mutações em *RAS*, *PTPN11* e *FLT3*;
- A identificação de *PTPN11* mutado associado com monossomia do 7 foram cruciais para estabelecimento do diagnóstico de LMMJ previamente diagnósticos como leucemia mieloide crônica;
- Mutações no *PTPN11* apresentaram um impacto na sobrevida global dos casos LMA e DMP pediátricas. O *PTPN11* demonstrou ser um fator de prognóstico independente.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEARN, I. M. et al. Regulating the regulator: Post-translational modification of RAS. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 1, p. 39–51, 2012.

ALAN D. FRIEDMAN. C/EBP $\alpha$  in normal and malignant myelopoiesis. **Int J Hematol**, v. 344, n. 6188, p. 1173–1178, 2015.

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, n. 8, p. 656–667, 2016.

AOKI, Y. et al. Recent advances in RASopathies. **Journal of Human Genetics**, v. 61, n. 1, p. 33–39, 2016.

ARAKI, T. et al. Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage-dependent effects of Ptpn11 mutation. **Nature Medicine**, v. 10, n. 8, p. 849–857, 2004.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2406, 2016.

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, n. 10, p. 1478–1487, 2011.

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

BO, A. et al. Tyrosine Phosphorylation Regulates Maturation of Receptor Tyrosine Kinases. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 9, p. 3690–3703, 2005.

BORNHOLDT, J. et al. K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure. **BMC Cancer**, v. 8, n. 1, p. 53, 2008.

BOS, J. L. Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. **Cancer Research**, v. 49, n. 17, p. 4682–4689, 1989.

BUNTING, S. F.; NUSSENZWEIG, A. **End-joining, translocations and cancer** **Nature Reviews Cancer**, 2013.

CHANG, T. Y.; DVORAK, C. C.; LOH, M. L. Bedside to bench in juvenile myelomonocytic leukemia: Insights into leukemogenesis from a rare pediatric leukemia. **Blood**, v. 124, n. 16, p. 2487–2497, 2014.

CHATTERJEE, T.; CHOUDHRY, V. P. Childhood myelodysplastic syndrome. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 80, n. 9, p. 764–771, 2013.

CHEN, E.; STAUDT, L. M.; GREEN, A. R. **Janus Kinase Deregulation in Leukemia and LymphomaImmunity**, 2012.

CHHABRA, A. et al. Myeloid Cell Origins, Differentiation, and Clinical Implications. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, p. 1–28, 2016.

CONWAY O'BRIEN, E.; PRIDEAUX, S.; CHEVASSUT, T. **The epigenetic landscape of acute myeloid leukemiaAdvances in Hematology**, 2014.

CREUTZIG, U. et al. Early deaths due to hemorrhage and leukostasis in childhood acute myelogenous leukemia. Associations with hyperleukocytosis and acute monocytic leukemia. **Cancer**, v. 60, n. 12, p. 3071–3079, 1987.

DASH, A.; GILLILAND, D. G. Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. **Best practice & research. Clinical haematology**, v. 14, n. 1, p. 49–64, 2001.

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, 1990.

DORES, G. M. et al. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. **Blood**, v. 119, n. 1, p. 34–43, 2012.

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

DVORAK CC; LOH, M. L. Recent advances in the pathogenesis and treatment of juvenile myelomonocytic leukaemia. **British Journal of Haematology**, 2011.

FRESNO VARA, J. Á. et al. P13K/Akt signalling pathway and cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 30, n. 2, p. 193–204, 2004.

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors: Stem cells and their

niche. **Cell**, v. 116, n. 6, p. 769–778, 2004.

GATTAZZO, F.; URCIUOLO, A.; BONALDO, P. Biochimica et Biophysica Acta Extracellular matrix : A dynamic microenvironment for stem cell niche ☆. **BBA - General Subjects**, v. 1840, n. 8, p. 2506–2519, 2014.

GILLILAND, D. G.; GRIBBEN, J. G. Evaluation of the risk of therapy-related MDS/AML after autologous stem cell transplantation. **Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 8, n. 1, p. 9–16, 2002.

GÖHRING, G. et al. Complex karyotype newly defined: The strongest prognostic factor in advanced childhood myelodysplastic syndrome. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3766–3769, 2010.

GONZALEZ-BOSQUET, J. et al. Detection of somatic mutations by high-resolution DNA melting (HRM) analysis in multiple cancers. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

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

GREENBERG, P. et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 2079–88, 1997.

GRIFFITH, J. et al. The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain. **Molecular Cell**, v. 13, n. 2, p. 169–178, 2004.

HE, Y. et al. chronic myelogenous leukemia – like disease by bcr / abl The coiled-coil domain and Tyr177 of bcr are required to induce a murine chronic myelogenous leukemia – like disease by bcr / abl. v. 99, n. 8, p. 2957–2968, 2012.

HEHLMANN, R. **How I treat CML blast crisis** **Blood**, 2012.

HIJIYA, N. et al. Pediatric chronic myeloid leukemia is a unique disease that requires a different approach. **Blood**, v. 127, n. 4, p. 392–399, 2016.

HIRSCH, P. et al. Genetic hierarchy and temporal variegation in the clonal history of acute myeloid leukaemia. **Nature Communications**, v. 7, 2016.

HOWLADER, N. et al. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations)** **National Cancer Institute Bethesda MD**. [s.l: s.n.]. Disponível em:

<[http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2009\\_pops09/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/)>.

IRISH, J. M. et al. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. **Cell**, v. 118, n. 2, p. 217–228, 2004.

KANG, Z. J. et al. The philadelphia chromosome in leukemogenesis. **Chinese Journal of Cancer**, v. 35, n. 1, p. 1–15, 2016.

KIM, T. et al. Spectrum of somatic mutation dynamics in chronic myeloid leukemia following tyrosine kinase inhibitor therapy. v. 129, n. 1, p. 38–48, 2017.

KOTTECHA, N. et al. Single Cell Profiling Identifies Aberrant STAT5 Activation in Myeloid Malignancies with Specific Clinical and Biologic Correlates. **October**, v. 14, n. 4, p. 335–343, 2009.

KRATZ, C. P. et al. Brief report The mutational spectrum of PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome / myeloproliferative disease. **Hematology**, v. 106, n. 6, p. 2183–2185, 2005.

KÜPPERS, R. **Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis** **Nature Reviews Cancer**, 2005.

LI, Y. et al. Structural basis for activity regulation of MLL family methyltransferases. **Nature**, v. 530, n. 7591, p. 447–452, 2016.

LIANG, D. C. et al. K-Ras mutations and N-Ras mutations in childhood acute leukemias with or without mixed-lineage leukemia gene rearrangements. **Cancer**, v. 106, n. 4, p. 950–956, 2006.

LIN, H. The stem-cell niche theory: lessons from flies. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 12, p. 931–940, 2002.

LINS, M. M. et al. Incidence and survival of childhood leukemia in Recife, Brazil: A population-based analysis. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 64, n. 8, p. e26391, 2017.

LIPKA, D. B. et al. RAS-pathway mutation patterns define epigenetic subclasses in juvenile myelomonocytic leukemia. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.

LO, F. S. et al. High resolution melting analysis for mutation detection for PTPN11 gene: Applications of this method for diagnosis of Noonan syndrome. **Clinica Chimica Acta**, v.

409, n. 1–2, p. 75–77, 2009.

LOCATELLI, F.; NIEMEYER, C. M. How I treat juvenile myelomonocytic leukemia. **Blood**, v. 125, n. 7, p. 1083–1090, 2015.

LOH, M. L. et al. PTPN11 mutations in pediatric patients with acute myeloid leukemia: Results from the children's cancer group. **Leukemia**, v. 18, n. 11, p. 1831–1834, 2004.

MARCEAU-RENAUT, A. et al. Molecular Profiling Defines Distinct Prognostic Subgroups in Childhood AML : A Report From the French ELAM02 Study Group. v. 1, n. October 2017, 2018.

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, 2016.

MATOZAKI, T. et al. Protein tyrosine phosphatase SHP-2: A proto-oncogene product that promotes Ras activation. **Cancer Science**, v. 100, n. 10, p. 1786–1793, 2009.

MESHINCHI, S.; SMITH, F. O.; ARCECI, R. J. Prognostic factors and risk-based therapy in pediatric acute myeloid leukemia. **Current oncology reports**, v. 5, n. 6, p. 489–97, 2003.

MEYER, C. et al. Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2004.

MEYER, C. et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. **Leukemia**, 2017.

MILLION, R. P.; VAN ETTEN, R. A. The Grb2 binding site is required for the induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice by the Bcr/Abl tyrosine kinase. **Blood**, v. 96, n. 2, p. 664–70, 2000.

MOHI, M. G. et al. Prognostic, therapeutic, and mechanistic implications of a mouse model of leukemia evoked by Shp2 (PTPN11) mutations. **Cancer Cell**, v. 7, n. 2, p. 179–191, 2005.

MOHI, M. G.; NEEL, B. G. The role of Shp2 (PTPN11) in cancer. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 17, n. 1, p. 23–30, 2007.

MORRISON, S. J.; SPRADLING, A. C. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 598–611, 2008.

- NAKAO, M. et al. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 10, p. 1911–8, 1996.
- NEEL, B. G.; GU, H.; PAO, L. **The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling** **Trends in Biochemical Sciences**, 2003.
- NIEMEYER, C. M. et al. Chronic myelomonocytic leukemia in childhood: a retrospective analysis of 110 cases. European Working Group on Myelodysplastic Syndromes in Childhood (EWOG-MDS). **Blood**, v. 89, n. 10, p. 3534–43, 1997.
- NIEMEYER, C. M. et al. **Intriguing response to azacitidine in a patient with juvenile myelomonocytic leukemia and monosomy 7** **Blood**, 2009.
- NOGUCHI, T. et al. Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in insulin-stimulated Ras activation. **Molecular and cellular biology**, v. 14, n. 10, p. 6674–82, 1994.
- NOMDEDÉU, J. et al. Low frequency of exon 3 PTPN11 mutations in adult de novo acute myeloid leukemia. Analysis of a consecutive series of 173 patients. **Haematologica**, v. 90, n. 3, p. 412–413, 2005.
- ORKIN, S. H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. **Nat Rev Genet**, v. 1, n. 1, p. 57–64, 2000.
- PASSMORE, S. J. et al. Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia in the UK: A population-based study of incidence and survival. **British Journal of Haematology**, v. 121, n. 5, p. 758–767, 2003.
- PEDERSEN-BJERGAARD, J.; ANDERSEN, M. K.; CHRISTIANSEN, D. H. Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplasia after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. **Blood**, v. 95, n. 11, p. 3273–9, 2000.
- PUI, C.-H. et al. Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 5, p. 551–565, 2011.
- PYLAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E.; BAR-SAGI, D. RAS oncogenes: Weaving a tumorigenic web. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 11, p. 761–774, 2011.
- RANE, S. G.; REDDY, E. P. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. **Oncogene**, v. 21, n. 21 REV. ISS. 2, p. 3334–3358, 2002.

- REIS, DE S. et al. Childhood Leukemia Incidence in Brazil According to Different Geographical Regions. **Pediatr Blood Cancer**, v. 1, n. 56, p. 58–64, 2011.
- RENNEVILLE, A. et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: A review of the literature. **Leukemia**, v. 22, n. 5, p. 915–931, 2008.
- REUTER, C. W.; MORGAN, M. A; BERGMANN, L. Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? **Blood**, v. 96, n. 5, p. 1655–1669, 2000.
- RODRÍGUEZ, F. A. et al. Molecular characterization of Chilean patients with a clinical diagnosis of Noonan syndrome. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 27, n. 3–4, p. 305–309, 2014.
- ROWLEY, J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, v. 243, n. 5405, p. 290–293, 1973.
- RULINA, A.; SPIRIN, P.; PRASSOLOV, V. Activated leukemic oncogenes AML1-ETO and c-kit: role in development of acute myeloid leukemia and current approaches for their inhibition. **Biochemistry**, 2010.
- S, O. et al. Chronic myelogenous leukemia: clinical practice guidelines in oncology. **Journal of National Comprehensive Cancer Network**, v. 7, n. 9, p. 984–1023, 2009.
- SCHIFFER, C. A. et al. Prognostic impact of cytogenetic abnormalities in patients with de novo acute nonlymphocytic leukemia. **Blood**, v. 73, n. 1, p. 263–70, 1989.
- SCHLESSINGER, J. **Cell signaling by receptor tyrosine kinases**Cell, 2000.
- SCHOCH, C. et al. The influence of age on prognosis of de novo acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups. **Haematologica**, v. 89, n. 9, p. 1082–1090, 2004.
- SCHOLL, C.; GILLILAND, D. G.; FRÖHLING, S. Deregulation of Signaling Pathways in Acute Myeloid Leukemia. **Seminars in Oncology**, v. 35, n. 4, p. 336–345, 2008.
- SCHUBBERT, S.; SHANNON, K.; BOLLAG, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 295–308, 2007.
- SCHWARTZ, J. R. et al. The genomic landscape of pediatric myelodysplastic syndromes.



**Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2017a.

SCHWARTZ, J. R. et al. The genomic landscape of pediatric myelodysplastic syndromes. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1557, 2017b.

SCORE, J. et al. Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation. **Leukemia**, v. 24, n. 10, p. 1742–1750, 2010.

STIEGLITZ, E. et al. The genomic landscape of juvenile myelomonocytic leukemia. **Nature Genetics**, v. 47, n. 11, p. 1326–1333, 2015.

STIEGLITZ, E. et al. Genome-wide DNA methylation is predictive of outcome in juvenile myelomonocytic leukemia. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2017.

STONE, R. L.; JACK, E. Protein-tyrosine Phosphatases. **Biochemical Chemistry**, v. 269, n. 16, p. 31323–31326, 1994.

STRULLU, M. et al. Juvenile myelomonocytic leukaemia and Noonan syndrome. **Cancer genetics**, p. 1–9, 2014.

TANAKA, M. et al. Quantification of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor hypersensitivity in juvenile myelomonocytic leukemia by 3H-thymidine assay. **Leukemia Research**, v. 32, n. 7, p. 1036–1042, 2008.

TARTAGLIA, M. et al. PTPN11 Mutations in Noonan Syndrome: Molecular Spectrum, Genotype-Phenotype Correlation, and Phenotypic Heterogeneity. **The American Journal of Human Genetics**, v. 70, n. 6, p. 1555–1563, 2002.

TARTAGLIA, M. et al. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **Nature Genetics**, v. 34, n. 2, p. 148–151, 2003.

TARTAGLIA, M. et al. Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia. **Blood**, v. 104, n. 2, p. 307–313, 2004.

TARTAGLIA, M. et al. Somatic PTPN11 mutations in childhood acute myeloid leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 129, n. 3, p. 333–339, 2005.

TARTAGLIA, M. et al. Diversity and functional consequences of germline and somatic

PTPN11 mutations in human disease. **American journal of human genetics**, v. 78, n. 2, p. 279–90, 2006.

TEFFERI, A.; SKODA, R.; VARDIMAN, J. W. Myeloproliferative neoplasms: Contemporary diagnosis using histology and genetics. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 6, n. 11, p. 627–637, 2009.

TENEN, D. G. et al. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. **Blood**, v. 90, n. 2, p. 489–519, 1997.

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

THOMAS, S. J. et al. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. **British Journal of Cancer**, v. 113, n. 3, p. 365–371, 2015.

TIRES-ALJ, M. et al. Activating mutations of the noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia. **Cancer Res.**, v. 64, p. 8816–8820, 2004.

VAN DER KOLK, D. M. et al. Deletion of the multidrug resistance protein MRP1 gene in acute myeloid leukemia: the impact on MRP activity. **Blood**, v. 95, n. 11, p. 3514–9, 2000.

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. 1901–28, 1999.

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, n. 1–2, p. 16–20, 2010.

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

VARDIMAN JW, THIELE J, A. D. E. A. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937–952, 2008.

- VISSER, O. et al. Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 17, p. 3257–3266, 2012.
- WARD, A. F.; BRAUN, B. S.; SHANNON, K. M. Targeting oncogenic Ras signaling in hematologic malignancies. **Blood**, v. 120, n. 17, p. 3397–3406, 2012.
- WEISSMAN, I. L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1442–6, 2000.
- WESTENDORF, J. J. et al. The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 1, p. 322–33, 1998.
- XIAOMEI, M. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. **American Journal of Medicine**, v. 125, n. Supplement, p. S2-5, 2012.
- YABE, M. et al. Transplantation for juvenile myelomonocytic leukemia: a retrospective study of 30 children treated with a regimen of busulfan, fludarabine, and melphalan. **International Journal of Hematology**, v. 101, n. 2, p. 184–190, 2015.
- 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, 2001.
- YOSHIDA, N. et al. Correlation of clinical features with the mutational status of GM-CSF signaling pathway-related genes in juvenile myelomonocytic leukemia. **Pediatric Research**, v. 65, n. 3, p. 334–340, 2009.
- YOSHIMI, A.; KOJIMA, S.; NAOTO, H. Juvenile myelomonocytic leukemia. **Pediatric Drugs**, v. 12, n. 1, p. 11–21, 2010.
- YU, D. H. et al. Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 33, p. 21125–21131, 1998.
- ZHANG, Y. et al. Disordered epigenetic regulation in MLL-related leukemia. **International Journal of Hematology**, v. 96, n. 4, p. 428–437, 2012.

## 9. ANEXOS

Anexo 1. Artigo publicado com resultados das LMAs pediátricas com mutações em *PTPN11* anteriores a 2010.



Archives of Medical Research 47 (2016) 656–667

Archives  
of Medical  
Research

### ORIGINAL ARTICLE

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

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

<sup>a</sup>Pediatric Hematology-Oncology Program, Research Center, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup>Clinical 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 ( $\leq 2$  years-old;  $> 2$ –10 years old and  $\geq 11$  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](mailto: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  $\leq 19$  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 $\alpha$*  *t*(15,17)(q22;q21), *RUNX1-RUNX1T1* *t*(8,21)(q22;q22), *CBF $\beta$ -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  $\leq 21$  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

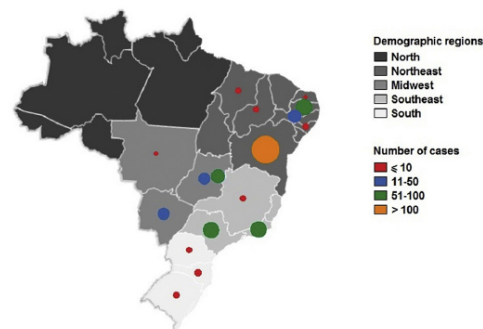


Figure 1. Brazilian map of c-AML cases sent from each geographic region. The number of cases from each collaborative institution is grouped by states and presented as proportional circles. (A color figure can be found in the online version of this article.)

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 screening 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.  $\chi^2$  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  $\leq 2$  years old, between 2 and 10 years old and  $\geq 11$  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  $\leq 2$  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 (%)	p
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 <sup>a</sup>			<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 3<sup>rd</sup> Edition; WHO, World Health Organization.

<sup>a</sup>Excluding 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 <sup>a</sup>	Age (years)				Sex				WBC count ( $\times 10^9/l$ )				
	$\leq 2$		$> 2-10$		Males		Females		$\leq 50$		$> 50$		p
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	Median (range)	n (%)	n (%)		
Type II mutations													
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	74/590 (12.9)	9 (12.2)	29 (39.2)	36 (48.6)	<0.001	44 (59.5)	30 (40.5)	0.29	20.1 (1.7–136)	58 (80.6)	14 (19.4)	0.001	
<i>CBFβ-MYH11</i>	23/376 (6.1)	4 (17.4)	6 (26.1)	13 (56.5)	0.04	10 (43.5)	13 (56.5)	0.30	111.0 (7.2–268)	6 (27.3)	16 (72.7)	<0.001	
<i>KMT2A</i> rearrangements	74/508 (24.0)	50 (67.6)	16 (21.6)	8 (10.8)	<0.001	36 (48.6)	38 (51.4)	0.19	54.1 (2.4–451)	36 (50.0)	36 (50.0)	0.004	
<i>PML-RARα</i>	63/87 <sup>b</sup> (72.4)	2 (3.2)	25 (39.7)	36 (57.1)	0.06	31 (49.2)	32 (50.8)	1.00	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)	5 (4.5)	41 (37.3)	64 (58.2)	<0.001	60 (54.5)	50 (45.5)	0.88	33.5 (0.8–800)	65 (59.1)	45 (40.9)	0.10	
<i>FLT3</i> -ITD	86/473 (18.2)	3 (3.5)	35 (40.7)	48 (55.8)	<0.001	47 (54.7)	39 (45.3)	0.88	35.6 (0.8–540)	50 (58.1)	36 (41.9)	0.10	
<i>FLT3</i> -TKD	24/473 (5.1)	2 (8.3)	6 (25.0)	16 (66.7)	0.001	13 (54.2)	11 (45.8)	0.97	25.8 (2.5–800)	15 (62.5)	9 (37.5)	0.61	
<i>KRAS</i>	30/464 (6.5)	9 (30.0)	12 (40.0)	9 (30.0)	0.73	20 (66.7)	10 (33.3)	0.14	40.4 (1–700)	16 (53.3)	14 (46.7)	0.16	
<i>NRAS</i>	44/410 (10.7)	8 (18.2)	13 (29.5)	23 (52.3)	0.27	24 (54.5)	20 (45.5)	0.91	48.5 (5.1–800)	23 (52.3)	21 (47.7)	0.07	
<i>c-KIT</i>	22/210 (10.8)	5 (22.7)	12 (54.5)	5 (22.7)	0.29	13 (59.1)	9 (40.9)	0.32	45.2 (4.5–168)	12 (57.1)	9 (42.9)	0.51	
<i>PTPN11</i>	27/260 (10.4)	5 (18.5)	13 (48.1)	9 (33.3)	0.66	18 (66.7)	3 (20.0)	0.20	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.

<sup>a</sup>The total numbers of analyzed cases reflect the availability of biological material for molecular tests.<sup>b</sup>The total of *PML-RARα* analyzed was considered among the acute promyelocytic leukemia.

*MLLT3* (20/74, 27.0%), *AFF1* (10/74, 13.5%), *MLLT10* (7/74, 9.5%), *MLLT1* (4/74, 5.4%) and *MLLT4* (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.

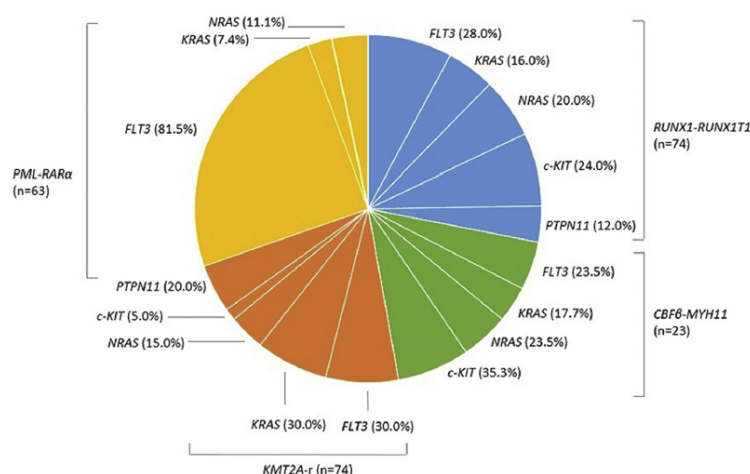
Statistical values calculated for the nine molecular alterations, including  $p$  values and OR, are shown in Supplementary Table 3. *c-KIT* mutations were more frequently observed within the core-binding factor (CBF)-AML group, including both *CBFβ-MYH11* (OR 3.1, 95% CI 1.1–9.1) and *RUNX1-RUNX1T1* (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 <sup>a</sup> (95% CI)	
Periods of analysis <sup>c</sup>	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 <sup>b</sup>	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 <sup>e</sup>	
Midwest	107 (68)	23.7 (4.9)	10.5 (3.4–17.7)	
Age range (years) <sup>b</sup>	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 <sup>c</sup>	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 <sup>b</sup>	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 <sup>9</sup> /l) <sup>b</sup>	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)	<sup>d</sup>	
Other subtypes	443 (218)	37.7 (2.8)	17.1 (12.9–21.2)	
Type II mutations <sup>c</sup>				
<i>RUNX1-RUNX1T1</i> <sup>b</sup>	329 (170)	36.9 (7.9)	16.6 (9.5–23.7)	0.53
<i>CBFβ-MYH11</i> <sup>b</sup>	318 (168)	67.9 (10.9)	<sup>d</sup>	0.02
<i>KMT2A</i> rearrangements <sup>b</sup>	260 (131)	35.0 (6.9)	10.3 (3.3–17.3)	0.25
<i>PML-RARα</i> <sup>d</sup>	545 (252)	72.8 (7.0)	<sup>d</sup>	0.003
Type I mutations <sup>bc</sup>				
<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 <sup>e</sup>	0.60
<i>NRAS</i>	334 (159)	57.8 (9.0)	<sup>d</sup>	0.13
<i>c-KIT</i>	186 (80)	58.1 (12.7)	<sup>d</sup>	0.28
<i>PTPN11</i>	206 (93)	10.4 (9.0)	4.3 (0.3–8.4)	0.003
Concomitant type I mutations <sup>b</sup>	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.

<sup>a</sup>Median survival in months.

<sup>b</sup>Excluding acute promyelocytic leukemia subtype.

<sup>c</sup>Analysis performed between groups positive and negative for the molecular alteration.

<sup>d</sup>Median not reached.

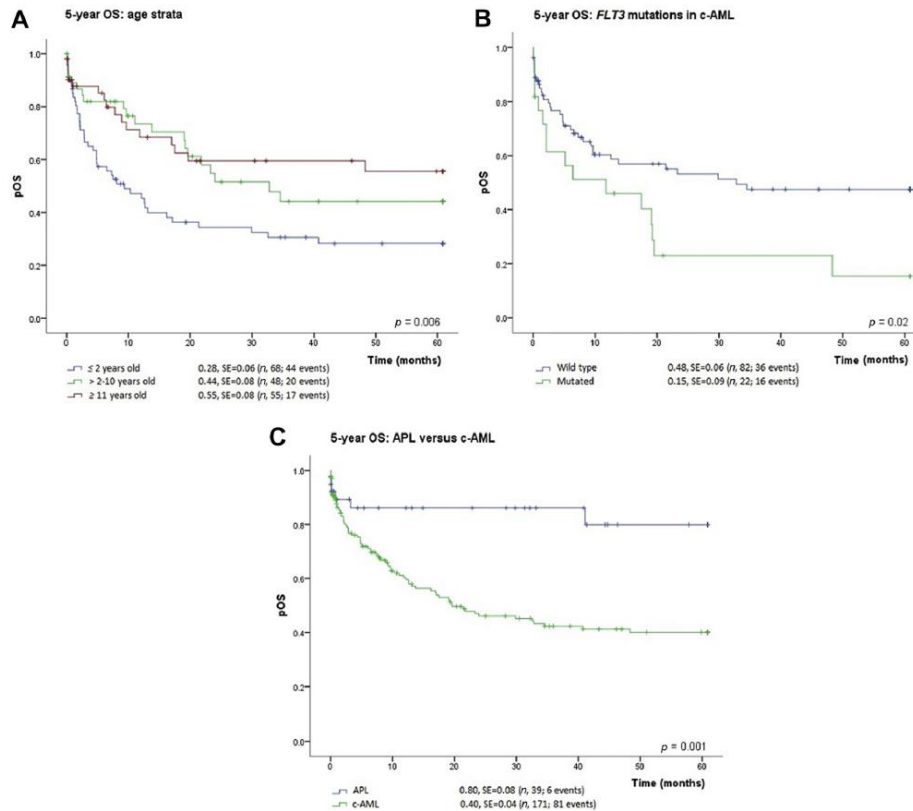
<sup>e</sup>Confidence intervals undefined.

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



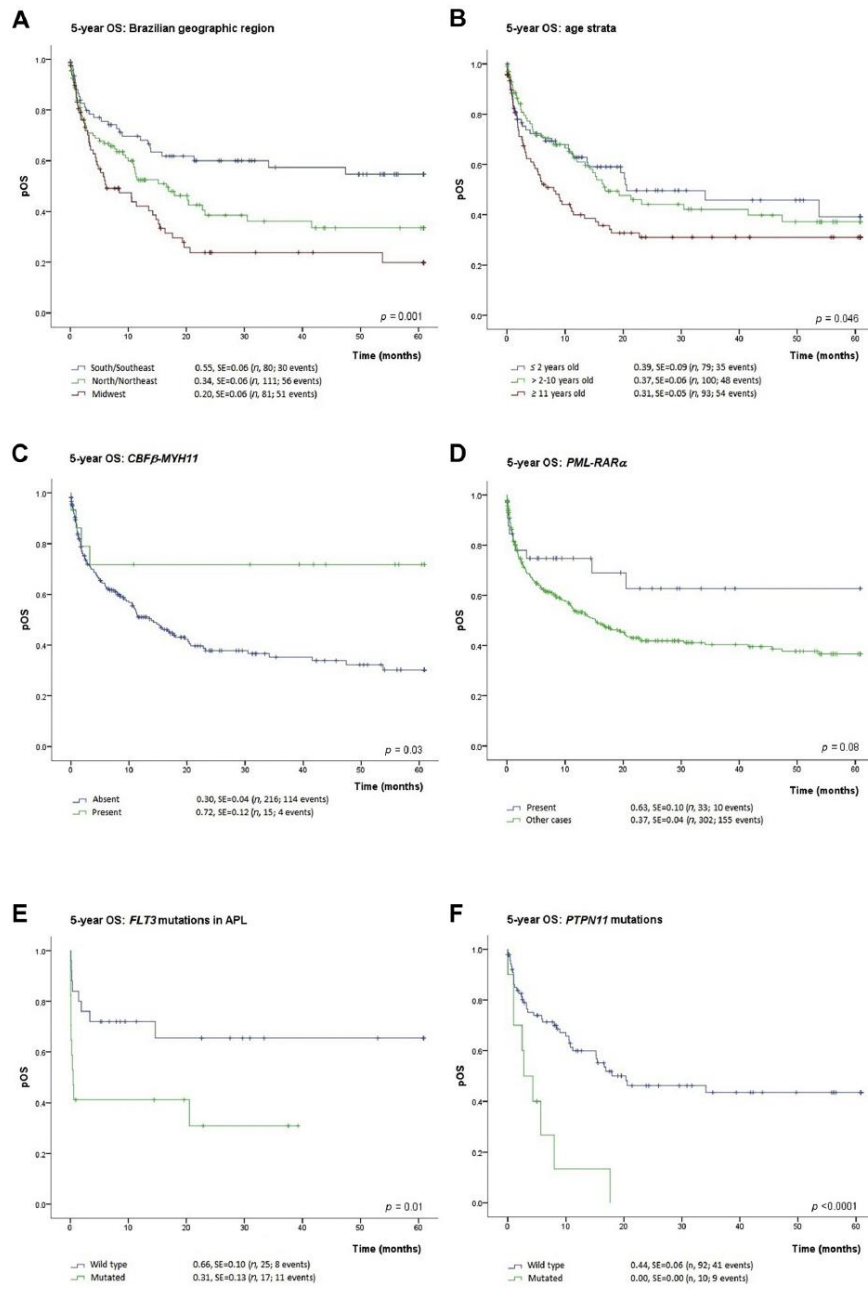
**Figure 3.** Survival analysis of the c-AML cases of the First Period (2000–2007). Kaplan-Meier estimates for the probability of overall survival (POS) for age strata (A), *FLT3* mutations in c-AML (B), and APL (C). *p* values were calculated using log-rank test. SE, standard error. (A color figure 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 $\beta$ -MYH11* and *PML-RAR $\alpha$*  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 $\beta$ -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 $\beta$ -MYH11* was associated with high WBC count. The pathogenic mechanisms of *CBF $\beta$ -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 $\alpha$*  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 *CBFβ-MYH11* (C), presence of *PML-RARα* 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  $\geq 11$  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,<sup>a</sup> Rosania Maria Basegio,<sup>b</sup> Patricia Carneiro de Brito,<sup>c</sup> Eny Guimarães Carvalho,<sup>d</sup> José Carlos Martins Cordoba,<sup>e</sup> Imarui Costa,<sup>f</sup> Virginia Maria Cóser,<sup>g</sup> Adriana Vanessa Santini Deyl,<sup>h</sup> Anna Carolina Silva Dias,<sup>c</sup> Eloisa Cartaxo Fialho,<sup>i</sup> Bruno Marcelo Rocha Freire,<sup>j</sup> Renata Silva de Carvalho Gurgel,<sup>k</sup> Maura Rosane Valério Ikoma,<sup>a</sup> Ingrid Koster,<sup>l</sup> Isis Maria Quezado Magalhães,<sup>e</sup> Ana Maria Marinho,<sup>c</sup> Renato Melaragno,<sup>m</sup> Suellen Valadares Moura,<sup>l</sup> Gustavo Ribeiro Neves,<sup>n</sup> Cláudia Teresa Oliveira,<sup>a</sup> Ilana Zalcberg Renault,<sup>l</sup> Terezinha de Jesus Marques Salles,<sup>o</sup> Denise Browsfield Silva,<sup>f</sup> Marcelo Santos Souza,<sup>b</sup> Tállita Meciany Farias Vieira,<sup>l</sup> Fernando de Almeida Werneck,<sup>p</sup> Ana Freund Winn,<sup>f</sup> and Gustavo Zamperlini<sup>q</sup>

<sup>a</sup>Hospital Amaral Carvalho, Jau, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup>Hospital Regional de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>c</sup>Hospital Araújo Jorge, Goiânia, Goiás, Brazil

<sup>d</sup>Hospital Martagão Gesteira, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>e</sup>Hospital da Criança, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>f</sup>Hospital Infantil Joana de Gusmão, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

<sup>g</sup>Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>h</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>i</sup>Hospital Napoleão Laureano, João Pessoa, Paraíba, Brazil

<sup>j</sup>Hospital Santa Isabel, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>k</sup>Hospital Universitário Alcides Carneiro, Campina Grande, Paraíba, Brazil

<sup>l</sup>Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>m</sup>Hospital Santa Marcelina, São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>n</sup>Hospital Sarina Rolin Caracante, Sorocaba, São Paulo, Brazil

<sup>o</sup>Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>p</sup>Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>q</sup>Hospital 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, Dulle 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.
- Bumeister 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.

Anexo 2. Instituições participantes do projeto com o envio de amostras dos casos de NM pediátrica

Instituição	Número de amostras enviadas
ÁGAPE INSTITUTO MÉDICO CUIABÁ - MT	4
CENTRO DE TRATAMENTO FABIANA DE MORAES, SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - SP	1
CLÍNICA CEBROM	1
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS	1
HOSPITAL DA CRIANÇA DE BRASÍLIA JOSÉ ALENCAR - HCB	2
HOSPITAL DE BASE DE BRASÍLIA - DF	2
HOSPITAL MANOEL NOVAES - SCM (ITABUNA)	22
HOSPITAL MARTAGÃO GESTEIRA. SALVADOR - BA	48
HOSPITAL SANTA IZABEL - SCM. SALVADOR - BA	20
HOSPITAL AMARAL CARVALHO, JAU - SP	40
HOSPITAL ARAÚJO JORGE - ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CANCER EM GOIAS -GO	36
HOSPITAL ARISTIDES MALTEZ - ONCO-PEDIATRIA-BA	9
HOSPITAL DA CRIANCA CONCEIÇÃO, RS	1
HOSPITAL DA CRIANCA DE BRASILIA JOSE ALENCAR-DF	1
HOSPITAL DA LAGOA-RJ	1
HOSPITAL DE APOIO - NÚCLEO DE ONCOLOGIA E HEMATOLOGIA PEDIÁTRICA - DF	43
HOSPITAL DE CLÍNICAS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - CURITIBA - PR	3
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE - RS	7
HOSPITAL DO AÇÚCAR E ÁLCOOL, MACEIÓ - AL	7
HOSPITAL DOS SERVIDORES DO ESTADO - HSE - RJ	9
HOSPITAL ESTADUAL DA CRIANÇA-BA	1
HOSPITAL INFANTIL DARCY VARGAS, SÃO PAULO - SP	7
HOSPITAL INFANTIL JOANA DE GUSMÃO	10
HOSPITAL NAPOLEÃO LAUREANO-PB	20
HOSPITAL ONCOLOGICO INFANTIL OCTAVIO LOBO-PA	1
HOSPITAL REGIONAL DE MATO GROSSO DO SUL ROSA PEDROSSIAN - CETOHI-HRMS	32
HOSPITAL SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE GOIANIA-GO	3
HOSPITAL SANTA MARCELINA, SAO PAULO - SP	9
HOSPITAL SÃO MARCOS - ASSOC PIAUIENSE DE COMBATE AO CÂNCER – APCC-PI	2
HOSPITAL SARINA ROLIN, SOROCABA - SP	27
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ALCIDES CARNEIRO, CAMPINA GRANDE - PB	28
INSTITUTO DE HEMATOLOGIA DA PARAIBA-PB	3
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA	6
SANTA CASA DE BELO HORIZONTE-MG	1



### Anexo 3. Ficha de encaminhamento dos pacientes preenchida através do sistema online do PHOP-INCA

Exames - Requisição - Incluir

enviar cancelar

VOLTAR

Tipo de Exame  Hematológico  Tumor Pediátrico

#### Dados do Paciente

Nome Paciente*	<input type="text"/>		
Nome da Mãe*	<input type="text"/>		
Identificação da Mãe*	Telefone da Mãe	<input type="text"/>	
Nome do Pai	<input type="text"/>		
Data nascimento*	<input type="text" value="dd/mm/aaaa"/>	[ buscar paciente ]	Idade Faixa etária
Data diagnóstico*	<input type="text" value="dd/mm/aaaa"/>	Sexo*	-- SEXO -- ▾ Cor* -- COR -- ▾
Registro Hospitalar	<input type="text"/>		

Síndrome Down\* Sim  Não

Outras Síndromes Genéticas\* Sim  Não

Logradouro Residência*	<input type="text"/>	Número Residência*	<input type="text"/>	Complemento Residência	<input type="text"/>
CEP Residência*	<input type="text"/>	Bairro Residência*	<input type="text"/>		
Estado Residência*	-- estado -- ▾	Município Residência*	-- município -- ▾		
Região Residência	-- regioao -- ▾				
Estado Naturalidade*	-- estado -- ▾	Município Naturalidade*	-- município -- ▾		

#### Dados da Instituição/Médico

Instituição*	-- instituições -- ▾	UF
Médico*	-- medicos -- ▾	

#### Dados Clínicos

Suspeita Diagnóstica	<input type="text"/>	
Tratamento Utilizado	<input type="text"/>	
Outras Informações Clínicas	<input type="text"/>	
Baço*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Fígado*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Linfonodos*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Tumoração*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Sistema Nervoso Central Comprometido*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Alargamento de Mediastino*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Medicamentos sendo usados pelo paciente*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Uso Prévio de Corticóide*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Tem irmã(o) gêmea(r)?*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Tem irmã(o) não gêmea(r) ou primo de 1º grau com câncer?*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>

**Dados Laboratoriais**

Leucometria\*   
Hemoglobina   
Blastos\*  %

Hematócrito  %  
Plaquetas

**Dados da Amostra**

**Amostra Enviada\***

Sangue Periférico      Anticoagulante:  EDTA       Heparina  
 Medula Óssea      Anticoagulante:  EDTA       Heparina  
 Outros

Lâminas Medula Óssea       Lâminas Sangue Periférico

**Motivo da Coleta\***

Diagnóstico       Recaída       DRM  
 Amostra da Mãe       Outros

Data da Coleta\*

Projeto

Data do Envio da Amostra\*

**Dados da Entrevista**

Entrevista com a mãe      Data da entrevista com a mãe

**Follow-up**

Data       Observação

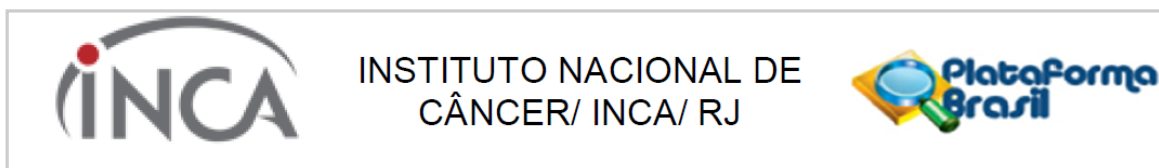
**Observação**

\*Itens de preenchimento obrigatório

[ enviar ]

Anexo 4. Ficha de coleta de dados para os casos com mutação no *PTPN11*

Estudo “Papel das mutações no gene <i>PTPN11</i> na patogênese das neoplasias mieloides pediátricas”. – versão de Janeiro, 2018.		
<b>1. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE</b>		
Número no Sistema Imunomolecular:	Data de Nascimento:	Data de Diagnóstico:
Nome:		Naturalidade:
<b>2. DIAGNÓSTICO</b>		
CONTAGEM DE MONÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO:	[ ] $\geq 1.000/\text{mm}^3$ [ ] $< 1.000/\text{mm}^3$	
PORCENTAGEM DE BLASTOS:	SANGUE PERIFÉRICO [ ] $< 20\%$ [ ] $\geq 20\%$	
	MEDULA ÓSSEA [ ] $< 20\%$ [ ] $\geq 20\%$	
CITOGENÉTICA CONVENCIONAL: SIM [ ] NÃO [ ] Caso “SIM”, Resultado:	HEMOGLOBINA FETAL [ ] $< 2\%$ [ ] $> 2\%$	
PRECURSORES MIELOIDES OU ERITRÓIDES EM ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO: SIM [ ] NÃO [ ]	Caso “SIM”, percentual:	
SÍNDROMES GENÉTICAS SIM [ ] NÃO [ ] ex: Síndrome de Noonan, Neurofibromatose tipo 1, Síndrome de LEOPARD	Caso “SIM”, Qual:	
Caso o paciente tenha síndrome genética marque as opções abaixo:		
<b>CARDIOVASCULAR:</b> Estenose valvular aórtica SIM [ ] NÃO [ ] Estenose pulmonar supra-avalvular SIM [ ] NÃO [ ] Válvula aórtica bicúspide SIM [ ] NÃO [ ] Defeito no septo atrioventricular SIM [ ] NÃO [ ] Insuficiência mitral SIM [ ] NÃO [ ]	<b>NEUROLÓGICO:</b> Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade SIM [ ] NÃO [ ] Dificuldades de aprendizagem SIM [ ] NÃO [ ] Malformação do sistema nervoso central SIM [ ] NÃO [ ] Dificuldades na fala SIM [ ] NÃO [ ] Dificuldades auditivas SIM [ ] NÃO [ ]	
<b>GASTROINTESTINAL</b> Criptorquidismo SIM [ ] NÃO [ ] Malformação renal SIM [ ] NÃO [ ]	<b>CRESCIMENTO</b> Baixa estatura SIM [ ] NÃO [ ] Baixo peso ao nascer SIM [ ] NÃO [ ]	
<b>PELE E CABELOS:</b> Manchas café-com-leite SIM [ ] NÃO [ ] Lesões de pele SIM [ ] NÃO [ ] Pouco cabelo e pescoço alado SIM [ ] NÃO [ ]	<b>OLHOS</b> Hipertelorismo SIM [ ] NÃO [ ] Nistagmo SIM [ ] NÃO [ ] Estrabismo SIM [ ] NÃO [ ] Dobra epicantal SIM [ ] NÃO [ ]	
<b>ORAL/DENTAL:</b> Dificuldade de articulação SIM [ ] NÃO [ ] Paladar alto arqueado SIM [ ] NÃO [ ] Má oclusão SIM [ ] NÃO [ ] Micrognatia SIM [ ] NÃO [ ]	<b>ESQUELÉTICO:</b> Anormalidade espinhal SIM [ ] NÃO [ ] Escoliose SIM [ ] NÃO [ ]	
<b>3. TRATAMENTO</b>		
PROTOCOLO DE TRATAMENTO UTILIZADO:		
<b>4. ACOMPANHAMENTO DO PACIENTE (Follow Up)</b>		
Recidiva: Sim [ ] Não [ ]	Data da recidiva:	
Protocolo de tratamento da recidiva:		
Estado vital:		
Vivo sem doença [ ] Data: ...../...../.....		
Vivo com doença [ ] Data: ...../...../.....		
Óbito [ ] Data: ...../...../.....		
Causa Óbito:		
<b>5. INFORMAÇÃO DE QUEM PREENCHEU ESTE FORMULÁRIO</b>		
Nome:		
Assinatura:	97	Data:



## 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 Avaliação 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)

**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

Anexo 6. Tabela 1. Sequências dos primers utilizados para a identificação das alterações de LMA *RUNX1-RUNX1*, *CBF $\beta$ -MYH11*, *PML-RAR $\alpha$*  e *KMT2A-r*

Primer	Sequência (5'-3')	
AML1-A	CTACCGCAGCCATGAAGAACC	Senso
ETO-B	AGAGGAAGGCCATTGCTGAA	Antisenso
PML-A1	CAGTGTACGCCTTCTCCATCA	Senso
PML-A2	CTGCTGGAGGCTGTGGAC	Senso
RAR $\alpha$ -B	GCTTGTAGATGCGGGGTAGA	Antisenso
PML-C1	TCAAGATGGAGTCTGAGGAGG	Senso
PML-C2	AGCGCGACTACGAGGAGAT	Senso
RAR $\alpha$ -D	CTGCTGCTCTGGGTCTCAAT	Antisenso
CBF $\beta$ -A	GCAGGCAAGGTATATTTGAAGG	Senso
MYH11-B1	TGAAGCAACTCCTGGGTGTC	Antisenso
MLL ex-7	GATGCCTCCAAAGCCTACCTG	Senso
MLL ex-9	CTCCCCGCCAAGTATCCCT	Senso
AF4 ex-6	TGGGTTACAGAACTGACATGCTGA	Antisenso
AF4 ex-11	GCTGCCATTTGTTTGTGTTGGAG	Antisenso
AF9 ex-5	GCTGCTGGTATGAATACTCCTATTAG	Antisenso
AF9 ex-6	GAGCTGGAGCTGGCAGGA	Antisenso
AF9 ex-10	CTGTGAAGCTCTACCAGTTCATCT	Antisenso
ENL ex-2	AGCTCTAACCTCACCTGGACG	Antisenso
ENL ex-6	GCTTGGAGGTCTTGCTGCTC	Antisenso
ENL ex-7	CTGGAGTTGGACGGGCTTGAC	Antisenso
AF10 ex-6	ACCAGTGGCTGCTTTGCTTTCTCT	Antisenso
AF10 ex-9	ACCAATGCAGGTGATGGTTCTGGCT	Antisenso
AF10 ex-11	TGCTGATGACTGTTGGGAGTGAGAGT	Antisenso
AF10 ex-16	TGGTGCCTGACTGAGAGAAGATCCA	Antisenso
AF6 ex-2	GCGTTTCGATTACATCTTGAGTGG	Antisenso
AF6 ex-21	GAGTCGAGAAGACAGTCCAGAGCT	Antisenso
MLL ex-4 (PTD)	ATCTTATCTCCAGATTTGGTCTCTGAT	Antisenso

Ex= éxon amplificado

Anexo 7. Tabela 2. Primers que foram utilizados para o sequenciamento dos genes *RAS*, *PTPN11*, *FLT3* e *KIT*

<b>*Gene</b>	<b>Região</b>	<b>Sequência do primer senso 5'-3'</b>	<b>Sequência do primer antisenso 5'-3'</b>	<b>Referências</b>
<i>KRAS</i>	Éxon 1	AACCTTATGTGTGACATGTTC	ATGGTCCTGCACCAGTAAT	(BORNHOLDT <i>et al.</i> , 2008)
<i>NRAS</i>	Éxon 1	GACTGAGTACAA ACTGGTGG	TGCATAACTGAATGTATACCC	(LIANG <i>et al.</i> , 2006)
<i>PTPN11</i>	Exon 3	CGACGTGGAAGATGAGATCTGA	CAGTCACAAGCCTTTGGAGTCAG	(TARTAGLIA <i>et al.</i> , 2002)
<i>PTPN11</i>	Exon 13	GGCTCTGCAGTTTCTCTTTATTC	CCAAGAGGCCTAGCAAGAG	PrimerQuest tool IDT
<i>FLT3</i> D835	Exon 20	CCGCCAGGAACGTGCTTG	CAGCCTCACATTGCCCC	(NAKAO <i>et al.</i> , 1996)
<i>FLT3</i> ITD	Exons 11/12	GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC	CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC	(NAKAO <i>et al.</i> , 1996)
<i>KIT</i>	Exon 8	GACATATGGCCATTTCTGTT	CCAAAAATAATCATCTCACC	(ANDRADE <i>et al.</i> , 2016)
<i>KIT</i>	Exon 17	TGTATTCACAGAGACTTGGC	GAAACTAAAAATCCTTTGCAGGAC	(ANDRADE <i>et al.</i> , 2016)

\*Sequências referência: *FLT3* NG\_007066.1; *KRAS* NG\_007524.1; *NRAS* NG\_007572.1; *KIT* NG\_007456.1; *PTPN11* NG\_00745