



MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*

SUELLEN VALADARES MOURA

**PROGNÓSTICO DE CRIANÇAS COM SÍNDROME DE DOWN E LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA OU MIELOPOESE ANORMAL TRANSITÓRIA**

Orientadora: Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Co-orientador: Luiz Claudio Santos Thuler

RIO DE JANEIRO - RJ

2014



MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*

SUELLEN VALADARES MOURA

**PROGNÓSTICO DE CRIANÇAS COM SÍNDROME DE DOWN E LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA OU MIELOPOESE ANORMAL TRANSITÓRIA**

Dissertação mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA, como requisito necessário à obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientadora: Maria do Socorro Pombo de Oliveira.

Co-orientador: Luiz Claudio Santos Thuler

RIO DE JANEIRO - RJ

2014

M929p Moura, Suellen Valadares.
Prognóstico de crianças com síndrome de Down e
leucemia mielóide aguda ou mielopoese anormal transitória./
Suellen Valadares Moura. – Rio de Janeiro, 2014.
147p.; il.; tab.

Dissertação (Mestrado em Oncologia)– Instituto Nacional
de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2014.

Orientador (a): Maria do Socorro Pombo de Oliveira.

Co-orientador: Luiz Claudio Santos Thuler.

1. Síndrome Down. 2. Mielopoese Anormal Transitória. 3.
Leucemia Mielóide Aguda. 4. Prognóstico. 5. Fator de
Transcrição *GATA1*. I. Oliveira, Maria do Socorro Pombo
de (Orient.). II. Thuler, Luiz Claudio Santos (Co-orient.). III.
Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV.
Título.

CDD 616.99419



MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*

SUELLEN VALADARES MOURA

**PROGNÓSTICO DE CRIANÇAS COM SÍNDROME DE DOWN E LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA OU MIELOPOESE ANORMAL TRANSITÓRIA**

Orientadora: Maria do Socorro Pombo de Oliveira.

Co-orientador: Luiz Claudio Santos Thuler

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Raul C. Ribeiro (ST. JUDE HOSPITAL)

Prof. Dra. Sima Esther Ferman (INCA)

Prof. Dra. Anke Bergmann (UNISUAM)

Prof. Dra. Sheila Coelho Soares Lima (INCA)

RIO DE JANEIRO - RJ

2014

Ao Pai, Filho e Espírito Santo.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional do Câncer, responsável pela minha formação em *latto sensu* (residência multiprofissional em oncologia) e *stricto sensu*. Nesses quatros anos o INCA tem me proporcionado estrutura de qualidade e grandes oportunidades;

Ao Ministério da Saúde e às agências de fomento, que financiaram o projeto e tornaram possível sua realização;

À Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira, pela oportunidade, confiança, ensinamentos, orientação;

Ào Dr. Luiz Claudio Thuler, pelos ensinamentos contribuíram para minha formação e dedicação;

Aos amigos do Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricas, pelos ensinamentos e atenção. Em especial a Fran, Elda e Tálita,

À Dra. Mariana Emerenciano, pelos ensinamentos, confiança, sugestões, e dedicação na análise da mutação do gene *GATA1*;

À Alessandra Faro, Bruno Aguiar e Camilla Andrade, sempre prontos a me ajudar, e pela contribuição com as análises moleculares.

A Dra. Marcelí e Rejane, pelo cuidado, confiança, ensinamentos e dedicação;

Aos médicos e instituições parceiras, pela dedicação e colaboração com esta pesquisa;

À minha família, especialmente a minha mãe, Suzinete Valadares, e avó, Adelaide Valadares, pelo amor incondicional, incentivo e pela compreensão com a minha ausência;

As minhas amigas, Mariana F, Adriana, Maria Eunice, Rebeca, Mariana C, Talytha, Vanessa, e meus pastores Eddie e Daniela, pelo amor, carinho, cuidado, incentivo, direcionamento e orações.



MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*

RESUMO

Introdução: Crianças com síndrome de Down (SD) apresentam elevada frequência de mielopoese anormal transitória (TAM) e leucemia megacarioblástica aguda (LMA-M7). A TAM é exclusiva em neonatos com SD, e tem um importante potencial para transformação leucêmica. TAM e LMA-M7 carregam mutações somáticas no éxon 2 do GATA1 resultando na exclusiva expressão da proteína truncada (GATA1s). O objetivo principal desta pesquisa foi analisar os fatores associados ao prognóstico de crianças ≤ 4 anos de idade com SD diagnosticadas com TAM ou LMA atendidas em instituições oncológicas brasileiras. **Material e método:** foi realizado um estudo retrospectivo, de coorte, de crianças com TAM ou LMA. O fluxo de trabalho seguiu as seguintes etapas: 1º) seleção dos casos com SD e suspeita clínica de leucemia; 2º) re-análise para confirmação diagnóstica; 3º) seleção dos casos confirmados de TAM e LM-SD; 4º) Rastreamento de mutações GATA1 (éxon2) por sequenciamento direto e classificação da mutação: I- perda da primeira metionina; II- erro de splicing; III- códon de terminação precoce (PTC 1, antes da Met-84, e PTC 2 após Met-84); 5º) Detecção dos transcritos alternativos por transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e análises densiométricas por meio do programa Quantity-One (Version 4.5.2; Bio-Rad Laboratories); Finalmente, 6º) Análise e interpretação dos dados considerando os objetivos do estudo por meio do pacote estatístico SPSS18, Chicago. **Resultados:** Foram incluídos nesta análise 97 casos, 63 diagnosticados com LMA, destes, 31 tiveram histórico de TAM prévia, e 34 diagnosticados com TAM. Mutações no *GATA1* foram encontradas em 77,8% dos casos. Foi observado que o tipo de mutação afeta a quantidade de expressão dos transcritos. Os tipos II e PTC1-3' apresentaram maiores níveis, enquanto que PTC 1-5' e PTC 2 menores níveis de expressão. A mutação do tipo PTC 1-5' nos pacientes com TAM está associada com progressão para LM-DS ($p=0,002$) e mutações tipo II e PTC1-3' estão associadas com o menor tempo até a remissão ($p=0,047$). Remissão clínica inicial em 78,3% dos casos e recorrência de leucemia em 11,1% foram observadas nos casos que receberam tratamento quimioterápico sistêmico de acordo com protocolos vigentes em cada instituição. Morte precoce (≤ 6 meses do diagnóstico) ocorreu em 29,9% dos casos, principalmente na fase de indução de remissão (39,0%) devido às comorbidades consequentes da aplasia severa (septicemia em 73,2% dos casos). A taxa de letalidade nas crianças com TAM foi inferior à da LMA ($p=0,012$), enquanto a sobrevida em 60 meses para TAM foi de 73,3% e para LMA de 44,4% ($p=0,057$). Os resultados contribuíram para melhor compreensão do perfil das leucemias na SD no Brasil, e indicam a importância da identificação da mutação no gene *GATA1* como fator preditivo na progressão leucêmica e no prognóstico de crianças com SD.

Palavras-Chave: Síndrome de Down; mielopoese anormal transitória; leucemia mieloide aguda; prognóstico; *GATA1*.



MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*

ABSTRACT

Introduction: Children with Down syndrome (DS) have a high frequency of transient abnormal myelopoiesis (TAM) and acute megakaryoblastic leukemia (AML-M7). TAM is unique in neonates with Down syndrome, and has an important potential for leukemic transformation. TAM and AML-M7 carry somatic mutations in exon 2 of *GATA1* resulting in exclusive expression of a truncated protein (GATA1s). The main objective of this research was to analyze the factors associated with the prognosis of children ≤ 4 years of age with DS diagnosed with AML or TAM served in Brazilian oncological institutions. **Material and method:** was performed a retrospective study, in a cohort of children with TAM or AML. The workflow followed the following steps: 1°) selection of cases with DS and clinical suspicion of leukemia; 2°) re-analysis for diagnostic confirmation; 3°) selection of confirmed cases of TAM and AML; 4°) *GATA1* mutation screening (exon2) by direct sequencing and classification of mutation: I- loss of the first methionine; II- splicing errors; III- premature termination codon (PTC 1, before the Met-84, and PTC 2 after the Met-84); 5°) detection of alternative transcripts by Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and densitometry analysis using the program Quantity-One (Version 4.5.2; Bio-Rad Laboratories); Finally, 6°) Analysis and interpretation of data considering the objectives of the study using statistical packages (SPSS18, Chicago). **Results:** 97 cases, 63 diagnosed with AML, of these, 31 had a history of prior TAM, and 34 diagnosed with TAM were included in this analysis. *GATA1* mutations were found in 77.8% of cases. It was observed that the type of mutation affects the amount of expression of transcripts, types II and PTC 1-3' had higher levels, whereas PTC 1-5' and PTC 2 lower levels of expression. Mutation of the PTC 1-5' in patients with TAM is associated with progression to ML-DS ($p=0.002$) and mutation type II and PTC1-3' are associated with shorter time to remission ($p=0.047$). Initial clinical remission in 78.3% of cases and recurrence of leukemia was observed in 11.1% cases who received systemic chemotherapy according to AML protocols prevailing in each institution for treatment. Early death (≤ 6 months of diagnosis) occurred in 29.9% of cases, mainly in induction of remission (39.0%) due to the consequent comorbidities of severe aplasia (sepsis in 73.2% of cases). The fatality rate in infants with TAM was less than AML ($p=0.012$), and survival at 60 months for TAM was 73.3% and for AML 44.4 % ($p=0.057$). The results contributed to a better understanding of the profile of leukemia in DS in Brazil, and indicate the importance of identifying the mutation in the *GATA1* gene as a predictive factor in leukemic progression and prognosis of children with DS.

Key-words: Down syndrome; transient abnormal myelopoiesis; acute myeloid leukemia; prognostic; *GATA1*.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 HEMATOPOESE COM ENFÂSE NA MEGACARIOPOESE	3
2.2 SÍNDROME DE DOWN E EPIDEMIOLOGIA DAS LEUCEMIAS AGUDAS	6
2.3 PROLIFERAÇÕES MIELOIDES RELACIONADAS COM A SÍNDROME DE DOWN.....	8
2.3.1 Leucemia Mieloide Aguda (LMA).....	8
2.3.2 Síndrome mielodisplásica (SMD).....	11
2.3.3 Mielopoese anormal transitória (TAM).....	12
2.4 ASPECTOS DO DIAGNÓSTICO: CARACTERÍSTICAS COMUNS E DISTINTAS ENTRE TAM E LMA-M7	14
2.5 GATA1 E MECANISMOS PARA A LEUCEMOGÊNSE NA SÍNDROME DE DOWN.....	15
2.5.1 Estrutura e função do GATA1	15
2.5.2 Mutações no gene GATA1 na TAM e LMA-M7.....	18
2.5.3 Mutações no GATA1 ocorrem intra-útero	20
2.5.4 Mecanismo para desenvolvimento da TAM ou LMA-M7.....	20
2.6 MODALIDADES TERAPÊUTICAS E PROGNÓSTICO.....	22
2.6.1 Descrição sumária dos protocolos de tratamento de leucemias mielóide na SD	24
3. JUSTIFICATIVA.....	28
4. OBJETIVOS.....	30
4.1 OBJETIVO PRINCIPAL	30
4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	30
5. METODOLOGIA	31
5.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O TIPO DE PESQUISA.....	31
5.2 POPULAÇÃO.....	31
5.2.1 Sujeitos	31
5.2.2 Fonte de informação	31
5.2.3 Critérios de inclusão	32
5.2.4 Critérios de exclusão.....	32
5.2.5 Casuística.....	32
5.3 VARIÁVEIS	34
5.3.1 Variáveis dependentes.....	34
5.3.2 Variáveis independentes.....	34
5.3.3 Variáveis de controle	34
5.4 ANÁLISE MOLECULAR DO GENE GATA1	34
5.4.1 Purificação de DNA	35
5.4.2 Análise mutacional do gene GATA1	36
5.4.3 Sequenciamento direto (método Sanger)	37

5.4.4 Purificação do RNA e síntese do DNA complementar	38
5.4.5 Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR).....	40
5.4.6 Quantificação dos transcritos alternativos	40
5.5 MÉTODO ESTATÍSTICO	41
5.6 COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	41
6. RESULTADOS.....	42
6.1. ANÁLISES DESCRITIVA.....	42
6.1.1. Procedência dos casos de acordo com região	43
6.1.2. Características demográficas e clínicas	43
6.1.3. Características biológicas e imunofenotípicas	44
6.1.4. Alterações moleculares	46
6.1.5. Tratamento quimioterápico e evolução da doença	50
6.2. ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO.....	53
6.2.1 Comparação entre as duas categorias diagnósticas.....	53
6.2.2 Análises dos casos de acordo com a evolução da LM-SD	56
6.2.3 Análise dos casos de acordo com os tipos de mutação	58
6.2.4 Análises dos casos de acordo com a letalidade	59
6.2.5 Análises dos casos de acordo com a sobrevivência	63
7. DISCUSSÃO	68
8. CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	80
ANEXOS	93
PUBLICAÇÃO.....	98
APÊNDICES.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Classificação FAB (Franco-Americano-Britânica) das leucemias mieloides agudas	10
Tabela 5.1. Sequência de iniciadores utilizados nas amplificações do éxon 2 do <i>GATA1</i>	36
Tabela 6.1. Características demográficas e clínicas de crianças diagnosticadas com TAM ou LMA	44
Tabela 6.2. Características biológicas e imunofenotípicas crianças diagnosticadas com TAM ou LMA.	45
Tabela 6.3. Características relacionadas ao tratamento quimioterápico e evolução da doença de crianças diagnosticadas com TAM ou LMA	51
Tabela 6.4. Toxicidade durante a fase de indução e intensificação de crianças diagnosticadas com LMA e submetidas ao tratamento quimioterápico sistêmico	52
Tabela 6.5. Fatores associados ao diagnóstico de crianças com TAM <i>versus</i> LMA	54
Tabela 6.6. Fatores associados à evolução para LM-SD	57
Tabela 6.7. Fatores associados ao tipo de mutação e níveis de expressão dos transcritos gênicos do <i>GATA1</i>	58
Tabela 6.8. Fatores associados ao óbito de 31 crianças diagnosticadas com TAM	60
Tabela 6.9. Fatores associados ao óbito de 62 crianças diagnosticadas com LMA	61
Tabela 6.10. Análise de sobrevida em 5 anos de 62 crianças diagnosticadas com LMA.	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema sumário da diferenciação das células hematopoéticas e os principais genes envolvidos na diferenciação das células mieloides e linfoides com destaque para a família <i>GATA</i>	4
Figura 2.2. Diferenciação megacariocítica e os principais genes envolvidos	5
Figura 2.3. Morfologia de células leucêmicas	11
Figura 2.4. Representação esquemática do gene <i>GATA1</i> e suas proteínas.....	17
Figura 2.5. Representação esquemática da localização da mutação <i>GATA1</i> , e formação da proteína truncada <i>GATA-1s</i>	18
Figura 2.6. Representação esquemática do mecanismo para leucemogênese da SD	21
Figura 5.1. Casuística de crianças com de síndrome de Down e distúrbios hematológicos que foram encaminhados para diagnóstico de leucemias e pesquisas.....	33
Figura 5.2. Representação esquemática do algoritmo de testes	35
Figura 5.3. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para visualização da região amplificada do <i>GATA1</i>	37
Figura 5.4. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para visualização da região amplificada do <i>GAPDH</i>	39
Figura 6.1. Frequência de casos de TAM ou LMA por ano encaminhados ao Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricos, CPq	42
Figura 6.2. Frequência de casos de TAM ou LMA por região do Brasil	43
Figura 6.3. Ilustração das posições e tipos de mutações do <i>GATA1</i> em 52 casos com TAM ou LMA.	47
Figura 6.4. Frequência do tipo de mutações do <i>GATA1</i> de acordo com a localização de 45 casos com TAM ou LMA.....	48
Figura 6.5. Ilustração do RT-PCR de células blásticas de TAM ou LMA com <i>GATA1</i> mutado.	40
Figura 6.6. Análise de sobrevivência em 5 anos dos casos.	63
Figura 6.7. Análise de sobrevivência em 5 anos de casos de TAM ou LMA.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AD - domínio de ativação N-terminal

AGM - aorta-gonada-mesonefron

ARA-C - Citarabina

ARA-U - metabolito inativo da ARA-C

CDA - citidina deaminase

CF - dedo de zinco C-terminal

CFU-MK - unidade formadora de colônia de megacariócitos

CTH - célula-tronco hematopoética

CHP - célula hematopoética pluripotente

dCTP - dinucleotídeo citosina trifosfato

dHPLC - cromatografia líquida desnaturante de alta performance

DNA - ácido desoxirribonucléico

Fli1 - *friend leukemia integration 1*

FOG1 - *friend of GATA1*

FAB - Franco-Americano-Britânico

GATA - *GATA binding protein*

GBTLI - Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância

G-CSF - fator de crescimento de colônia de granulócitos

GM-CSF - fator crescimento de colônias de macrófagos

HPP-CFU-MK - alto potencial proliferativo de unidade formadora de colônias de megacariócitos

HR - *hazard ratio*

IL-3- interleucina-3

KB – kilobase

KD - kilodalton

LA - leucemia aguda

LLA - leucemia linfóide aguda

LMA - leucemia mieloide aguda

LMA-M7 ou LMAk - leucemia megacarioblástica Aguda

LM-SD – leucemia mielóide da síndrome de Down

Mk - Megacariócito

MO - medula óssea
MPO - Mieloperoxidase
NF- dedo de zinco N-terminal
NF-E2 - fator nuclear eritróide 2
OR - *Odds ratio*
OMS - Organização Mundial da Saúde
PCR - reação em cadeia da polimerase
PM - Peso molecular
POG – *Pediatric Oncology Group*
RCBP – Registro de câncer de base populacional
RNA - ácido ribonucleico
rpm - rotações por minuto
RR - risco relativo
RT-PCR - Transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase
RUNX1 *AML1 - acute myeloid leukemia 1*
SD - síndrome de Down
SG - Sobrevida global
SMD - síndrome mielodisplásica
SMP - Síndromes mieloproliferativas
SP - sangue periférico
SLE - Sobrevida livre de eventos
SNC - Sistema nervoso central
TAM - mielopoese anormal transitória
TPO – trombopoetina

1. INTRODUÇÃO

Os fatores etiológicos para o desenvolvimento de neoplasias malignas na infância têm sido alvo de vários estudos epidemiológicos, observacionais e moleculares. Entre os fatores genéticos já associados aos mecanismos da leucemogênese, a síndrome de Down (SD) tem sido um dos mais explorados com resultados consensuais nas associações de risco para a etiologia da leucemia na infância (ROBSON, 1992; HITZLER; ZIPURSKY, 2005).

As leucemias representam 97% dos cânceres em crianças com SD com idade inferior a 15 anos (HASLE; CLEMMENSEN; MIKKELSEN, 2000). Crianças com SD têm risco elevado entre 10 a 20 vezes para desenvolver leucemia linfóide aguda (LLA) ou leucemia mieloide aguda (LMA) (LANGE, 2000; HASLE, 2001). A taxa de incidência para os subtipos morfológicos varia com a idade, sendo a maior naquelas com idade ≤ 4 anos, principalmente para a LMA (LANGE *et al.*, 1998). Em particular, a leucemia megacarioblástica aguda (LMA-M7), rara na população pediátrica geral, apresenta risco aumentado de 500 vezes nessa população (ZIPURSKY *et al.*, 1994; LANGE *et al.*, 1998). Além disso, essas crianças têm risco aumentado para desenvolver síndrome mielodisplásica (SMD) e mielopose anormal transitória (TAM), ambas consideradas como condições pré-leucêmicas (ZIPURSKY *et al.*, 1994; HASLE, 1995; VYAS; ROBERTS, 2006).

Grande avanço foi obtido ao longo das duas últimas décadas no conhecimento da leucemia na SD. Os estudos realizados na tentativa de entender os mecanismos da leucemogênese são unânimes nos postulados de que a base para o desenvolvimento dessa malignidade é a presença constitucional de um cromossomo 21 extra associado com eventos genômicos somáticos adicionais, como mutações no gene *GATA1* (MALINGE; IZRAELI; CRISPINO, 2009).

Análises clínicas e epidemiológicas focadas em crianças com SD demonstraram que a LMA corresponde a 15% dos casos, enquanto que a LLA corresponde a 2% das leucemias agudas (LA). As leucemias nessa população apresentam características clínicas, epidemiológicas e moleculares distintas, e existe uma melhor resposta ao tratamento quimioterápico e bom prognóstico, mesmo com baixas doses de quimioterapia. Destaca-se

que, quando se considera somente as crianças com LMA-M7, encontra-se taxa de cura de aproximadamente 80% (KOJIMA *et al.*, 1993; LANGE *et al.*, 1998; CREUTZIG *et al.*, 2005; VYAS; ROBERTS, 2006).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HEMATOPOESE COM ENFÂSE NA MEGACARIOPOESE

A hematopoese é um processo altamente dinâmico que compreende a produção, diferenciação, maturação e morte celular de elementos do sangue. Este processo gera mais de nove tipos celulares diferentes a partir da célula-tronco hematopoética (CTH) ou célula hematopoética pluripotente (CHP), dividido entre linhagem linfoide (linfócitos T e B, células *natural killer* e dendríticas linfoides); e linhagem eritro-mieloide (macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, eritrócitos) (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

Tem início durante a vida intra-uterina, perfazendo três períodos anatômicos: mesoblástico, hepático e mieloide. Durante as primeiras semanas da gestação, ou seja, na hematopoese embrionária, o saco vitelino é o principal sítio hematopoético. Na parede destas estruturas, ocorre a primeira onda de diferenciação das células sanguíneas, se destacando uma atividade proliferativa de eritrócitos nucleados e macrófagos primitivos (MULLER *et al.*, 1994 e CHOI *et al.*, 1998). Na hematopoese definitiva, a região denominada aorta-gonadameson (AGM) é o sítio de início da hematopoese, capaz de gerar células adultas eritróides, mielóides e linfóides (LÉCUYER; HOANG, 2004). Entre a sexta semana e aproximadamente 6 a 7 meses de vida fetal, o fígado e o baço são os principais sítios hematopoéticos e continuam a produzir células sanguíneas até aproximadamente 15 dias após o nascimento. A medula óssea (MO) assume a produção celular durante a gestação entre o sexto e sétimo mês, sendo o sítio hematopoético mais importante nesse período da vida fetal, como também na infância e vida adulta (HOFFBRAND; MOSS, 2013).

O sistema hematopoético apresenta uma hierarquia bem definida. Na medula óssea, as células pluripotentes dão origem a progenitores multipotentes mieloide e linfoide, e então a precursores de diversas linhagens (OGAWA, 1993). O processo de hematopoese envolve uma complexa interação entre os processos genéticos intrínsecos das células sanguíneas e do seu ambiente (ORKIN; ZON, 2002). Porém, para que este processo ocorra, é necessário um microambiente adequado com controle gênico intenso desde o desenvolvimento embrionário à hematopoese adulta.

Entre os genes envolvidos neste controle, tem-se os genes da família homeobox *Hox* que são reguladores transcricionais que atuam na CHP estimulando a proliferação e a diferenciação, assim como, exercem funções no desenvolvimento embrionário hematopoético, *GATA1*, *2* e *3* (*GATA binding protein*), seu cofator *FOG1* (*Friend of GATA1*), *RUNX1* e *Fli1* (*Friend leukemia integration 1*), e *Pu-1* (membro da família de fatores transcricionais *Ets*), que interagem com *GATA1* e apresenta papel na diferenciação final da linhagem eritróide e megacariocítica e regula a linhagem granulocítica e monocítica, *RUNX1* (Figura 2.1) (NUTT *et al.*, 2005).

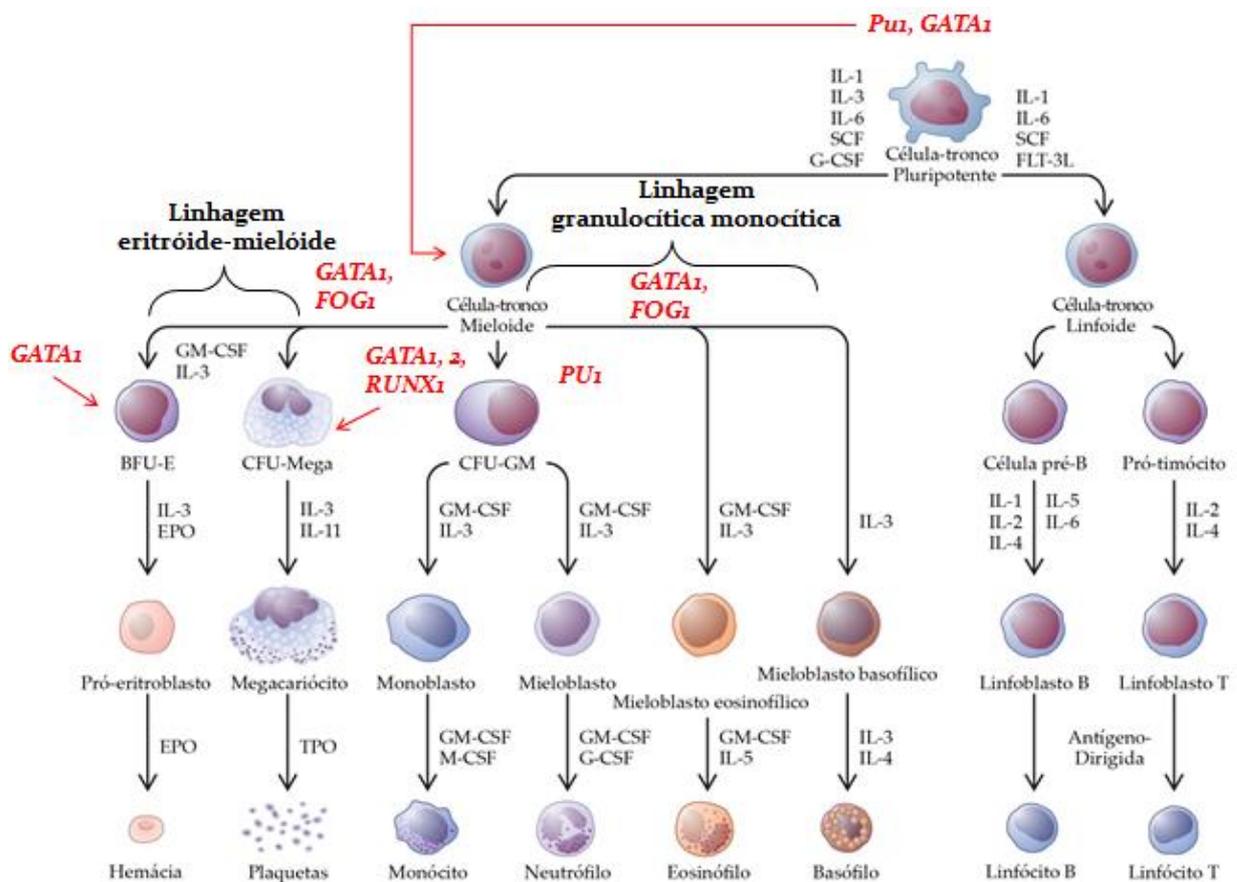


Figura 2.1. Esquema sumário da diferenciação das células hematopoéticas e os principais genes envolvidos na diferenciação das células mieloides e linfoides com destaque para a família GATA (CRISPINO, 2005; NUTT *et al.*, 2005).

Ambos, *GATA1* e *FOG1*, atuam na diferenciação em etapa muito imatura das células eritróides e mielóides, na proliferação e manutenção celular destas linhagens controlando o estágio final de maturação dos megacariócitos (Mk) (Figura 2.2) (CRISPINO, 2005).

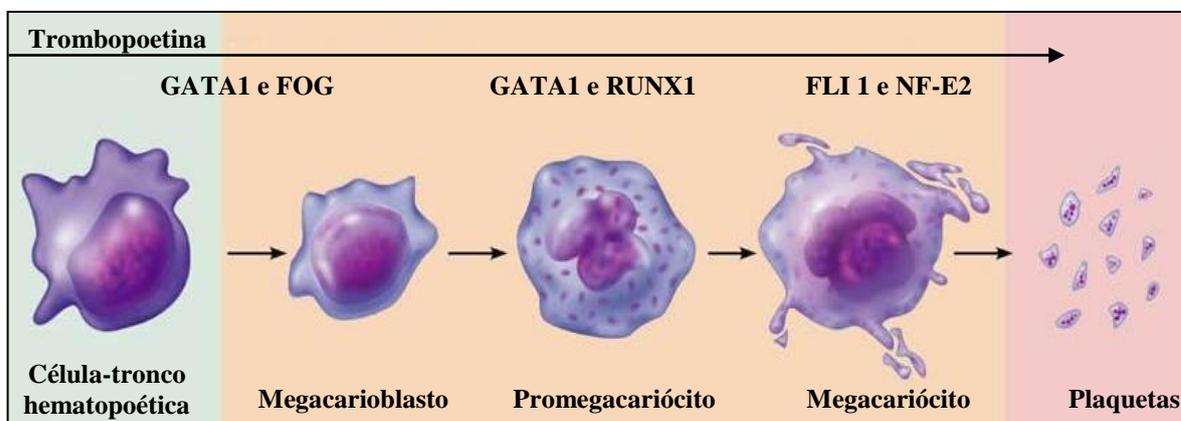


Figura 2.2. Diferenciação megacariocítica e os principais genes envolvidos (CRISPINO, 2005).

Embora algumas citocinas tenham sido associadas com o processo de megacariopoese (KIRITO; KAUSHANSK, 2006), a trombopoetina (TPO) é claramente o principal regulador fisiológico deste processo, sendo o primeiro fator de crescimento da linhagem eritro-mielóide, com papel central na maturação e proliferação dos Mk com o aumento da estimulação do tamanho celular, ploidia e formação do processo pró-plaquetário (KAUSHANSK, 2005). A TPO foi clonada e identificada como fator que é um ligante do receptor de citocina Mpl (c-mpl) que irá elevar a produção de plaquetas (BARTLEY, 1994), sendo expressa principalmente no fígado e, em menor quantidade, nos rins, células do estroma da medula óssea e outros órgãos. Além disso, foi mostrado que a TPO afeta todos os aspectos da formação de plaquetária, começando com a sobrevivência e entrada no ciclo celular de CHP (SITNICKA *et al.*, 1996).

Durante o desenvolvimento dos Mk a TPO é responsável por estimular a expressão na superfície celular de proteínas características, incluindo CD61/41 (GPIIb/IIIa) e CD42 (GPIB), bem como induzir endomitose. Embora muitas das funções da TPO no desenvolvimento Mk são o resultado da sinergia com outras citocinas, a TPO isoladamente foi demonstrada ser a citocina responsável para a reorganização do citoplasma e formação de

demarcação de membranas, que permite a liberação de plaquetas (KAUSHANSKY *et al.*, 1994).

Várias outras citocinas, incluindo a interleucina-3 (IL-3), o fator crescimento de colônias de macrófagos (GM-CSF) e de fator de crescimento de colônia de granulócitos (G-CSF), demonstraram ser importantes para a megacariopese normal. A IL-3 foi demonstrada atuar sobre as CHP por meio da fase de CFU-MK (unidade formadora de colônia de megacariócitos), além agir em sinergia com a TPO para produzir colônias de várias linhagens hematopoiéticas. O efeito de GM-CSF também foi observado, principalmente na unidade formadora de Mk e populações de Mk imaturos (ROBINSON; MCGRATH; QUESENBERRY, 1987). Em sinergia com fator de células estaminais (SCF), GM-CSF mostrou aumentar proliferação e expansão tanto de progenitores primários, como em linhagem de Mk. Enquanto que o G-CSF atua na linhagem granulocítica, além de ser um estimulador de progenitores de medula óssea de várias linhagens hematopoiéticas. O G-CSF, em combinação com TPO, mostrou desencadear a entrada de CHP no ciclo celular e a formação de colônias, bem como estimular a produção de progenitores HPP-CFU-MK (alto potencial proliferativo de unidade formadora de colônias de megacariócitos) em camundongos mielossuprimidos (GROSSMANN *et al.*, 1996).

Diante disso, se torna claro, que qualquer desregulação dentro do sistema hematopoético pode levar a uma incontável proliferação, sem a apropriada diferenciação, podendo resultar em leucemia. Dentro desse contexto podemos citar mutações no gene *GATA1* que interferem na diferenciação normal da linhagem megacariocítica.

2.2 SÍNDROME DE DOWN E EPIDEMIOLOGIA DAS LEUCEMIAS AGUDAS

A síndrome de Down (SD) é a mais comum anormalidade cromossômica congênita com prevalência de aproximadamente 1 caso a cada 1.000 nascidos vivos. É decorrente da trissomia do cromossomo 21 em aproximadamente 95% dos casos, causada por erros na divisão celular, como não disjunção meiótica (MERRICK, 2000; ROIZEN; PATTERSON, 2003).

A associação da SD com a trissomia do cromossomo 21 foi descrita na década de 50 (LEJEUNE; GAUTIER; TURPIN, 1959). O risco para nascimento de uma criança com SD foi associado com a idade materna (≥ 35 anos de idade). Recentemente a translocação Robertsoniana foi descrita como um fator de suscetibilidade genética para ocorrência de SD em filhos dos portadores desta alteração genética silenciosa (PATTERSON, 2007). Estudos revelam que 95% indivíduos com trissomia 21 herdaram o cromossomo extra da mãe, sugerindo que a não disjunção meiótica ocorre no óvulo. Os demais casos de SD têm como origem translocação cromossômica (aproximadamente 4%) entre o braço longo do cromossomo 21 e outro cromossomo acrocêntrico, e mosaïcismo (aproximadamente 1%) que é uma mistura de células com 46 e 47 cromossomos. (PENROSE, 1933; KAZAURA; LIE; SKJAERVEN 2006).

O diagnóstico da SD é feito pelo exame do cariótipo (estudos dos cromossomos), o que pode ser iniciado durante a gestação ou após o nascimento (ROIZEN; PATTERSON, 2003). Durante o período gestacional a ultrassom morfológica fetal tem sido utilizada para avaliar a translucência nugal e pode sugerir a presença da síndrome, que só é confirmada pelos exames citogenéticos de amniocentese e amostra do viló corial.

Indivíduos portadores desta síndrome além de apresentarem características fenotípicas inerentes como hipotonia, baixa estatura, braquicefalia, apresentam também distúrbios cardíacos, auditivos, oftalmológicos, endócrinos e hematológicos importantes que precisam de monitoramento (ROIZEN; PATTERSON, 2003). Entre as alterações hematológicas tem-se a TAM, SMD, leucemias agudas (LAs) e imunodeficiências com propensão a infecções de repetição ao longo da vida (WEBB; ROBERTS; VYAS, 2007).

Em relação às LAs, crianças com SD apresentam risco 10 vezes maior que crianças sem SD para desenvolver LLA ou LMA (LANGE, 2000). Esta associação foi reconhecida há mais de 70 anos (BREWSTER; CANNON, 1930; KRIVIT; GOOD, 1957), e desde então muitos estudos foram desenvolvidos para confirmá-la, e bem como para caracterizar a etiopatogênese e tratamento das leucemias nessa população (ROWLEY, 1981; ROBISON *et al.*, 1984; LANGE *et al.*, 1998; HASLE; CLEMMENSEN; MIKKELSEN, 2000; AHMED *et al.*, 2004; MALINGE; IZRAELI; CRISPINO, 2009). Isto tornou a SD como um dos poucos fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento das leucemias infantis (ROBSON, 1992).

É relatado um alto risco de leucemia em crianças com idade ≤ 4 anos, em contraste com os tumores sólidos que são menos frequentes em todos os grupos etários com a ocasional ocorrência de retinoblastoma e tumores de células germinativas (HASLE; CLEMMENSEN; MIKKELSEN, 2000).

As leucemias agudas representam 97% dos cânceres em crianças com SD com idade inferior a 15 anos (HASLE; CLEMMENSEN; MIKKELSEN, 2000). A taxa de incidência para os casos de LLA ou LMA varia com a idade, sendo a LMA maior naquelas crianças com SD e idade inferior a 4 anos (LANGE *et al.*, 1998).

Um estudo epidemiológico de coorte sobre riscos de leucemias e tumores sólidos em crianças com SD na Dinamarca demonstrou que em crianças e adolescentes (≤ 15 anos de idade), a proporção de LLA é de 1,7 e LMA é de 6,5. Estes dados contrastam com a relação de LLA e LMA na população sem SD. No entanto, em crianças ≤ 5 anos, as taxas de incidência padronizadas para LMA são quatro vezes maiores do que para LLA. Estes resultados foram gerados do Registro Dinamarquês de Citogenética, que coleta informações sobre crianças nascidas vivas com anormalidades constitucionais em todo o país, e tem seguimento das crianças ao longo de 27 anos. (HASLE; CLEMMENSEN; MIKKELSEN, 2000). Além disso, a leucemia megacarioblástica aguda apresenta um risco aumentado de 500 vezes em crianças com SD (ZIPURSKY *et al.*, 1994; LANGE *et al.*, 1998).

2.3 PROLIFERAÇÕES MIELOIDES RELACIONADAS COM A SÍNDROME DE DOWN

2.3.1 *Leucemia Mieloide Aguda (LMA)*

A LMA é uma doença caracterizada pela proliferação clonal de células progenitoras do tecido hematopoético na linhagem mieloide, ocasionando alteração na proliferação e diferenciação celular normal, dando origem a células incapazes de se diferenciar e com proliferação descontrolada (HOFFBRAND; MOSS, 2013).

O diagnóstico de LMA é realizado baseado nas classificações FAB (Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico) (BENNETT *et al.*, 1985) e WHO (*World Health*

Organization) (BOROWITZ; CHAN, 2008). Os aspectos morfológicos são categorizados pelo grupo FAB. Os aspectos clínicos laboratoriais, morfológicos, citoquímicos, além da imunofenotipagem, citogenética e molecular são categorizados pela classificação WHO 2008. Conforme a classificação FAB, a LMA é caracterizada como entidade que possuem 30% ou mais de blastos na medula óssea (BENNETT *et al.*, 1985), enquanto a classificação WHO 2008 considera para a classificação da leucemia 20% de blastos, ao invés de 30% (VARDIMAN *et al.*, 2009).

A classificação morfológica pela FAB diferencia a LMA em indiferenciada, LMA minimamente diferenciada, leucemia aguda com diferenciação mieloide, leucemia promielocítica aguda, leucemia aguda com diferenciação mielomonocítica, monoblástica, eritroblástica ou megacariobástica (BENNETT *et al.*, 1991) (Tabela 2.1). A análise morfológica revela a porcentagem de blastos indiferenciados, granulados ou atípicos e a presença de estruturas intracelulares, como bastonetes de Auer e presença de mielodisplasia. As reações citoquímicas podem confirmar o comprometimento com a linhagem mieloide [pela marcação MPO-positiva] e a diferenciação monoblástica (pela marcação esterase não específica-positiva). Na presença de morfologia e citoquímica ambíguas, a técnica de imunofenotipagem permite a definição da linhagem comprometida (CREUTIZIG *et al.*, 2012).

Tabela 2.1 Classificação FAB (Franco-Americano-Britânica) das leucemias mieloides agudas

M0: leucemia indiferenciada - MPO+ por método imunológico ou ultra-estrutural; CD13+ ou CD33+ ou CD11b+;

M1: leucemia mieloide aguda sem diferenciação - MPO+ em mais de 3% de blastos; blastos mais de 90% das células nucleadas da MO;

M2: leucemia mieloide aguda com diferenciação - Blastos entre 30 e 80% das células nucleadas da MO; componente monocítico < 20%

M3: leucemia promielocítica - Predomínio de promielócitos anormais;

M4: leucemia mielomonocítica - Blastos entre 30 e 80% das células nucleadas da MO; componente monocitário na MO entre 20 e 80%; >5000monócitos/mm³ no SP;

M5: leucemia monocítica (M5a:leucemia monocítica sem diferenciação ou M5b:leucemia monocítica com diferenciação) - Componente monocítico >80% das células não eritróides;

M6: Eritroleucemia - Eritroblastos >50% das células nucleadas da MO Blastos >20% das células não eritróides;

M7: leucemia megacariocítica – CD41+/CD61+/CD42+ por imunofenotipagem.

A leucemia megacarioblástica aguda (LMAK, FAB-M7) é um subtipo raro na poluição sem SD que corresponde a menos de 5% dos casos de LMA, no entanto é a mais comum leucemia mieloide em crianças com SD, com uma frequência de aproximadamente 90% dos casos. Hoje a LMA-M7 da SD é reconhecida como entidade biológica distinta com características próprias, associação com mielodisplasia e megacariopose anormal, sendo classificada como leucemia mielóide da SD (LM-SD). Este subtipo de LMA precisa ser confirmado por imunofenotipagem, embora a morfologia possa mostrar essas características (Figura 2.3) (BENNETT *et al.*, 1991). A presença de mielofibrose frequentemente associada com LMA-M7, e consequentes problemas na coleta da amostra pode levar a uma subestimação da presença blastos na morfologia e imunofenotipagem, sendo necessária nova coleta da MO, incluindo biópsia (CREUTIZIG *et al.*, 2012). A LMA-M7, em 20-60% dos casos, é precedida por um período prolongado de citopenia (geralmente meses a anos), caracterizada principalmente por trombocitopenia e acompanhada por displasias na MO, correspondendo à fase de SMD, que precede o aparecimento de LM-SD. Esta fase inicial de SMD não está presente neste subtipo de leucemia em crianças sem SD (ZIPURSKY *et al.*, 1994, LANGE *et al.*, 1998).

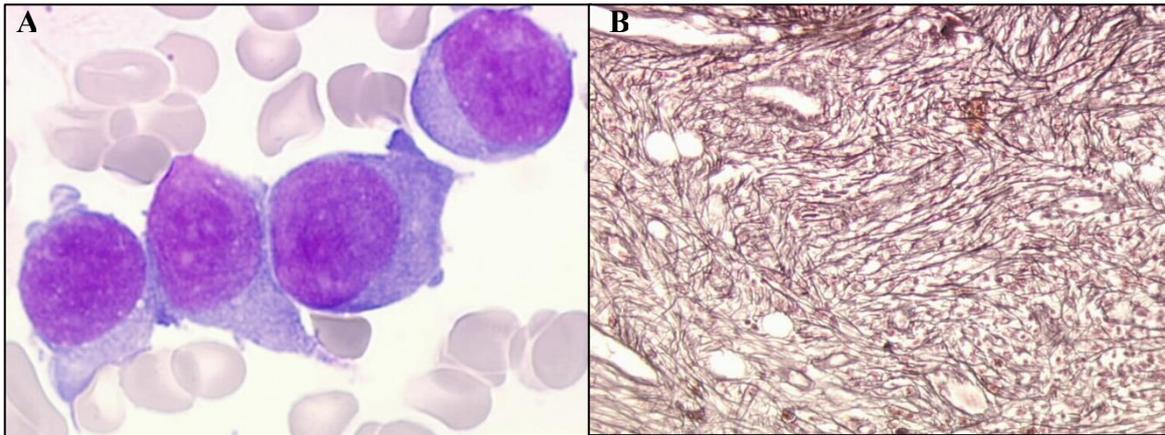


Figura 2.3. Morfologia de células leucêmicas. A, Blastos de leucemia megacarioblástica (LMA-M7) na medula óssea; B, fibra de reticulina na medula óssea (Imagens gentilmente cedidas pela professora Marie Thérèse Daniel do Hospital Saint-Louis, Paris, França).

Os sinais e sintomas iniciais da leucemia são geralmente inespecíficos, como fadiga e mal-estar devido à anemia e febre devido à liberação de pirógenos pelas células leucêmicas e pelas células de defesa, ou por infecções (principalmente bacterianas) devido à neutropenia. Além de perda de peso e sangramentos, que geralmente se manifesta por petéquias, equimoses e hemorragia de mucosa devido à plaquetopenia. Isto reflete insuficiência da hematopoese por infiltração da MO ou outros órgãos pelas células leucêmicas. É comum infiltração em órgãos como fígado e baço, sendo menos frequente em linfonodos e pele. O comprometimento do sistema nervoso central (SNC) é incomum (CREUTIZIG *et al.*, 2012).

2.3.2 Síndrome mielodisplásica (SMD)

As SMD representam um grupo heterogêneo de doenças clonais hematopoéticas de espectro clínico variável. Apresentam em comum, graus variáveis de citopenias no sangue, como anemia, leucopenia e trombocitopenia, além de displasia celular em pelo menos duas linhagens hematopoéticas e predisposição para transformação leucêmica, geralmente do tipo mieloide aguda. As SMD podem ser de origem primária (*de novo*) ou secundária ao tratamento quimioterápico/radioterápico (GREENBERG, 2006).

Para a análise diagnóstica, a definição de SMD é limitada para $\leq 20\%$ de blastos leucêmicos na amostra da medula óssea (MO). Atualmente, a classificação para as SMD podem ser realizadas baseadas na classificação FAB ou WHO 2008. Os aspectos morfológicos são categorizados pela classificação FAB, considerando significativas displasias em pelo menos duas linhagens hematopoéticas, no sangue periférico (SP) e/ou MO, a presença ou ausência de sideroblastos em anel, percentual de blastos e a presença de bastonetes de Auer. As SMD pela FAB são divididas em quatro (cinco) subgrupos: Anemia refratária (AR); Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA); Anemia refratária com excesso de blastos (AREB); Anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-T); e Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) (GREENBERG, 2006). Conforme a WHO 2008, as SMD são divididas em seis subgrupos: Anemia refratária (AR); Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA); Citopenia refratária com displasia multilinear; Anemia refratária com excesso de blastos (AREB); Síndrome mielodisplásica associada com anormalidade cromossômica isolada del (5q); e Síndrome mielodisplásica inclassificável (VARDIMAN *et al.*, 2009).

Em crianças, diferentemente de adultos, a SMD é caracterizada pela predominância dos subtipos morfológicos mais agressivos clinicamente. As crianças com SD têm risco estimado de 175 para desenvolver SMD (HASLE *et al.*, 1995), e as diferenças biológicas e clínicas observadas nos indivíduos sem SD e com LMA ou SMD não são observadas nos indivíduos com a SD. Desta forma, estas doenças na SD são vistas como entidade única tanto na biologia como na clínica e passaram, portanto, a ser descritas como LM-SD (VARDIMAN *et al.*, 2009).

2.3.3 Mielopoese anormal transitória (TAM)

A TAM (inglês, *transient abnormal myelopoiesis*), também conhecida como TMD (*transient myeloproliferative disorder*), ou leucemia transitória (LT) é caracterizada pela proliferação clonal de blastos mieloides com característica megacarioblástica ou eritroblástica. Esta desordem é exclusiva de crianças com SD, e está presente durante a vida fetal ou período neonatal (CREUTZIG *et al.*, 1990). A forma eritroblástica é raramente descrita.

Os neonatos com SD tem um alto risco de desenvolver a TAM (CREUTZIG *et al.*, 1990), e embora não se conheça a sua real incidência, é estimado que 5% a 10% de todos os neonatos exibam esta desordem (PINE *et al.*, 2007). Na maioria dos pacientes, esta desordem é autolimitada e pode desaparecer em até 3 meses de vida, com casos descritos por prolongar-se em até 7 meses (HAYASHI *et al.*, 1988; KHAN; MALINGE; CRISPINO, 2011). Em adição, TAM tem um importante potencial para transformação em LMA-M7, 13% a 33% dos pacientes com TAM evoluem para LM-SD nos primeiros 4 anos de vida (HOMANS; VERISSIMO; VLACHA, 1993; HASLE, 2001). Portanto, a TAM é considerada uma condição clonal pré-leucêmica. Além disso, estudos anteriores reportam que 11% a 17% das crianças com esta desordem podem evoluir para morte precoce (6 a 9 meses após o diagnóstico ou manifestação clínica) devido a apresentações clínicas graves e com complicações potencialmente letais peri e pós-natal (HOMANS; VERISSIMO; VLACHA, 1993; MASSEY *et al.*, 2006). Assim, esta desordem se configura como um importante problema clínico.

A TAM apresenta características morfológicas, genéticas e imunológicas semelhantes às LMA, porém o curso da doença é diferente. A maioria dos indivíduos afetados não apresentam sintomas (GAMIS *et al.*, 2011). O quadro é caracterizado pela presença de células blásticas no SP (VARDIMAN *et al.*, 2009). O percentual de blastos e a severidade do quadro clínico são variáveis, assim como, a presença de trombocitopenia, anemia, hepatoesplenomegalia. A hepatomegalia é o sinal clínico mais frequente e está associada à infiltração dos órgãos (58%) (GAMIS *et al.*, 2011). O diagnóstico de TAM não é atribuído pelas características clínicas e hematológicas dos neonatos, pois não são exclusivas para TAM (ROBERTS *et al.*, 2013). O exame morfológico apresenta excesso de células blásticas, frequentemente com aparência de megacarioblasto, núcleo volumoso, nucléolos evidentes, e citoplasma basofílico com projeções citoplasmáticas que caracterizam a LMA-M7. A imunofenotipagem mostra marcadores como CD41, CD42, CD61 (megacariocíticos) (KURAHASHI; HARA, 1992).

Inicialmente, o diagnóstico da TAM ocorria após a remissão espontânea gradativa em 6 meses e sem tratamento específico (HAYASHI *et al.*, 1988). Entretanto, ainda existe uma necessidade de se caracterizar com maior precisão o diagnóstico clínico, hematológico e molecular da TAM para redução de subdiagnóstico (ROBERTS *et al.*, 2013). Estudos

retrospectivos realizados para caracterizar a TAM utilizaram diferentes critérios para definição clínica e hematológica desta desordem. Nesses estudos, foi observada apresentação clínica variável, e em alguns casos não é observado sintomatologia. As manifestações podem ocorrer durante a vida fetal com quadro de hidropisia e anemia, mas em sua maioria ocorrem após o nascimento. Além disso, órgãos como fígado, baço e coração (miocárdio) também podem ser infiltrados pelas células leucêmicas. Após o nascimento esses neonatos podem cursar com alterações clínicas fatais, como derrame pleural, pericárdico ou ascite, insuficiência respiratória, disfunção hepática com icterícia, e até mesmo uma insuficiência hepática devido à fibrose (MASSEY *et al.*, 2006; KLUSMANN *et al.*, 2008; MURAMATSU *et al.*, 2008; GAMIS *et al.*, 2011).

2.4 ASPECTOS DO DIAGNÓSTICO: CARACTERÍSTICAS COMUNS E DISTINTAS ENTRE TAM E LMA-M7

A suspeita e diagnóstico da TAM e LMA-M7 são realizados a partir dos sinais e sintomas clínicos já descritos acima. Em todos os casos a caracterização morfológica, imunofenotípica e molecular se fazem imprescindíveis. Para isto, são realizados exames como hemograma, avaliação morfológica de sangue periférico e aspirado de medula óssea e em alguns casos a biópsia de medula. O hemograma mostra anemia e leucocitose e plaquetopenia. A morfologia apresenta displasia, com blastos de tamanhos variáveis, megacariócitos anormais, citoplasma geralmente agranular, podendo apresentar protusões. A MO frequentemente apresenta aumento das fibras de reticulina, e comumente o aspirado de MO é de difícil ou impossível obtenção. É nestes casos que o diagnóstico deve ser baseado na biópsia de medula óssea, propiciando o aumento da visualização do número de blastos e, às vezes, de megacariócitos. Isso diminui o risco de erros de diagnóstico (BENNET *et al.*, 1991; CREUTIZIG *et al.*, 2012).

A idade no início da doença é diferente nos casos de TAM (≤ 3 meses) e LMA (>3 meses). Nas alterações clínicas, a fibrose e disfunção hepáticas são vistas em neonatos com TAM, já a fibrose de MO (mielofibrose) é característica na LMA-M7. Isto mostra que a doença segue as fases da hematopoese, pois a primeira doença surge no fígado fetal, enquanto a segunda na MO. Outro ponto importante na diferenciação entre as duas doenças, é que a

TAM apresenta remissão espontânea, enquanto a LMA-M7 é letal e necessita de tratamento quimioterápico para a eliminação da doença (WEBB; ROBERTS; VYAS, 2007).

Os blastos leucêmicos de ambos os diagnósticos apresentam semelhanças na citologia, morfologia, citoquímica e expressão do antígeno de superfície celular. A imunofenotipagem mostra similaridade para TAM e LMA-M7 em relação à expressão celular de blastos positivos para CD41, CD42 e CD61, glicoforina A e muitas vezes CD7 e CD36 (LANGEBRAKE; CREUTZIG; REINHARDT, 2005; MASSEY *et al.*, 2006; WEBB; ROBERTS; VYAS, 2007), exceto pela expressão reduzida para CD34 positivo nas células blásticas de pacientes com LMA-M7, o que indica que a TAM é uma doença mais imatura comparada com a LMA-M7 (LANGEBRAKE; CREUTZIG; REINHARDT, 2005).

Na análise cromossomal, a trissomia do 21 é a única anormalidade na maioria dos casos de TAM (HAYASHI *et al.*, 1988), em contraste, nos casos LMA-M7 são encontradas frequentes alterações numéricas além da trissomia do 21, como cópias adicionais no cromossomo 8 ou 21 (GAMIS *et al.*, 2003; RAINIS *et al.*, 2003). As alterações no cariótipo restritas aos clones malignos desaparecem durante a remissão hematológica, porém na recidiva da doença reaparecem com a mesma alteração inicial ou com novas alterações (MASSEY *et al.*, 2006; HITZLER; ZIPURSKY, 2005; IZRAELI *et al.*, 2007). Mutação no gene *GATA1* tem sido encontrada na mesma proporção para TAM e LMA-M7 (YOSHIDA *et al.*, 2013).

2.5 *GATA1* E MECANISMOS PARA A LEUCEMOGÊNSE NA SÍNDROME DE DOWN

2.5.1 *Estrutura e função do GATA1*

O gene *GATA1* (*globin transcription factor 1*), localizado na região X p11.23 (cromossomo X), teve sua função originalmente descrita em 1989 como a habilidade de se ligar a regiões promotoras do gene da globina (TSAI *et al.*, 1989). Atualmente, sabe-se que este gene é membro da família de fatores de transcrição GATA (TSAI *et al.*, 1989; SHIMIZU; YAMAMOTO, 2005).

A família de proteínas GATA é composta por 6 membros divididos em dois subgrupos tecido-específico com o perfil de expressão e estrutura gênicas distintas. GATA1, GATA2 e GATA3 são expressos principalmente em linhagem hematopoética: GATA1 é expresso principalmente em células eritróides e megacariócitos efetivas; GATA2 é abundante em células-tronco hematopoéticas, células progenitoras (TSAI *et al.*, 1989; YAMAMOTO *et al.*, 1990); GATA3 é expressa em linhagem de células-T, principalmente durante o desenvolvimento de células T do tipo Th2 (ZHENG; FLAVELL, 1997; SUZIKI *et al.*, 2011). As proteínas GATA 4, 5 e GATA 6 estão associados à linhagem endodermal, porém esta associação com a camada germinativa não é bem estabelecida (LOWRY, 2000; DUCAN, 2008; SHIMIZU *et al.*, 2008).

GATA1 e GATA2, de fato, possuem papel-chave no controle da proliferação e diferenciação das células hematopoéticas. Defeitos decorrentes de mutações nestes genes têm sido suspeitos como possíveis contribuições para alterações hematopoiéticas, incluindo leucemia (SHIMIZU *et al.*, 2008; DICKINSON *et al.*, 2014).

O gene *GATA1* se estende por aproximadamente 7 kilobase (Kb), possui 6 éxons e transcreve um ORF (*open reading frame*) de 1.239 nucleotídeos a partir do éxon 2. Este gene traduz duas proteínas, sendo uma proteína maior constituída de 413 aminoácidos e com peso molecular de aproximadamente 50 kD (kilodalton) e, outra menor, como uma isoforma alternativa de 330 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 40 kD, denominadas de GATA-1 e GATA-1s, respectivamente (Figura 2.4) (MARTIN; ORKIN, 1990).

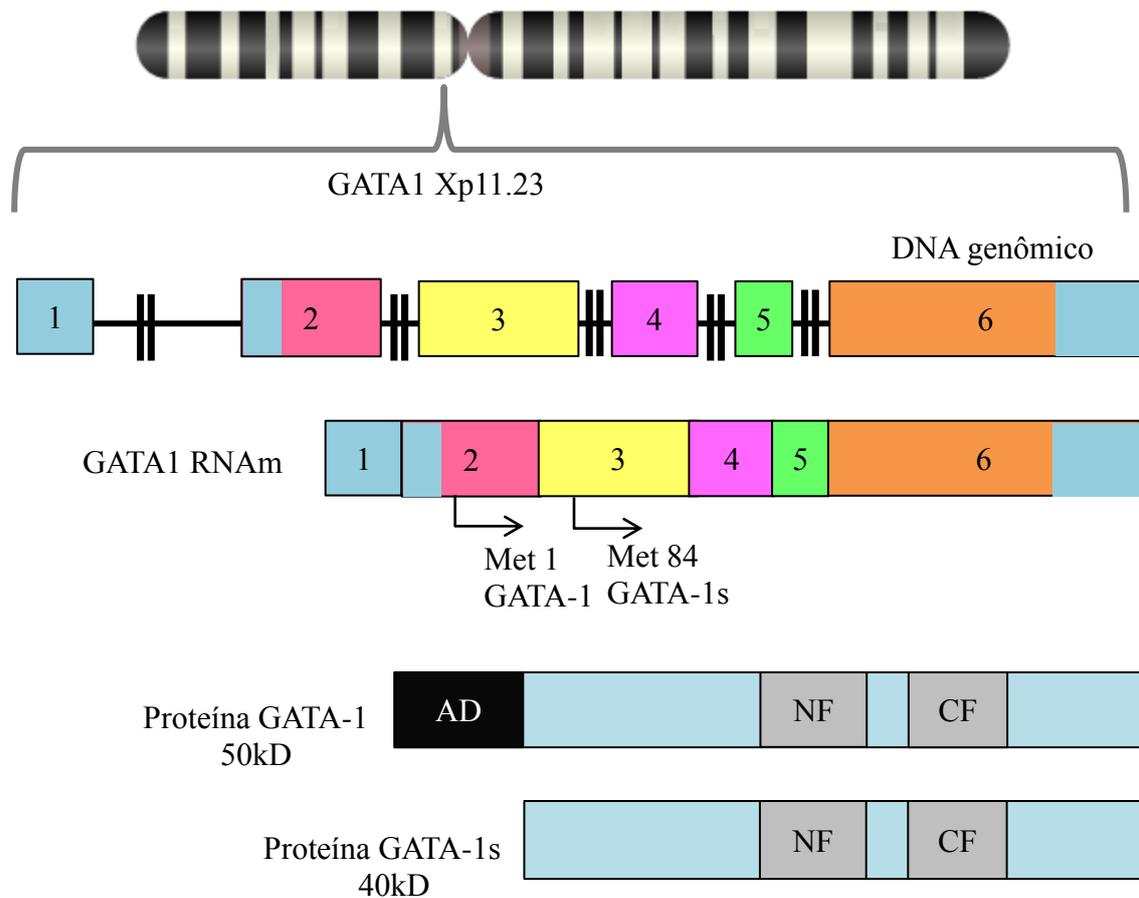


Figura 2.4. Representação esquemática do gene *GATA1* e suas proteínas. Este gene é constituído por 6 éxons e está localizado na região Xp11.23 (cromossomo X). A área colorida em azul no éxon 1, 2 e 6 corresponde à região não-codificante; GATA-1, proteína maior, é traduzida a partir do RNA mensageiro (RNAm) a partir do códon da metionina 1; GATA-1s, proteína menor, a partir do códon da metionina situada no início do éxon 3. AD, N-terminal de transativação; NF, dedo de zinco N-terminal; CF, dedo de zinco C-terminal (SANKARAN *et al.*, 2012).

Fisiologicamente GATA-1 é traduzida a partir do RNA mensageiro (RNAm) do gene *GATA1* a partir do códon da metionina 1 (Met1) no éxon 2 (primeiro éxon codificante), enquanto a proteína GATA-1s a partir do códon da metionina 84 (Met84) situada no início do éxon 3. A proteína GATA-1, apresenta tanto ligantes de DNA quanto atividade de transativação dentro de três domínios funcionais: um domínio N-terminal de transativação

(AD, *transactivation domain*) e dois domínios com motivo estrutural do tipo dedo de zinco (*zinc fingers*). Entre eles, um domínio dedo de zinco N-terminal (NF, *N-terminal zinc finger*) e um C-terminal (CF, *C-terminal zinc finger*). O domínio dedo de zinco CF é responsável pela ligação de alta afinidade ao DNA, enquanto o NF estabiliza essa interação e contribui para interações com cofatores como o *FOG1* (TSANG *et al.*, 1997). Este cofator, juntamente com NF-E2, FLI1, GFI1B, desempenha papel central no controle na transcrição de megacariócitos (CRISPINO, 2005; HITZLER e ZIPURSKY, 2005). Já a proteína GATA-1s, possui os dois domínios com motivo estrutural do tipo dedo de zinco, sendo caracterizada pela ausência do éxon 2 e do domínio de ativação AD, mas mantém a habilidade de ligação ao DNA e interação com o FOG1 (CALLIGARIS *et al.*, 1995; WECHSLER *et al.*, 2002; RAINIS *et al.*, 2003).

2.5.2 Mutações no gene *GATA1* na TAM e LMA-M7

Mutações no éxon 2 do *GATA1* invariavelmente impedem a formação da proteína GATA-1, produzindo apenas a isoforma GATA-1s como consequência da tradução alternativa ou do *splicing* alternativo do éxon 2 (WECHSLER *et al.*, 2002; RAINIS *et al.*, 2003) (Figura 2.5). Esta proteína truncada é funcionalmente relevante durante a transformação leucêmica.

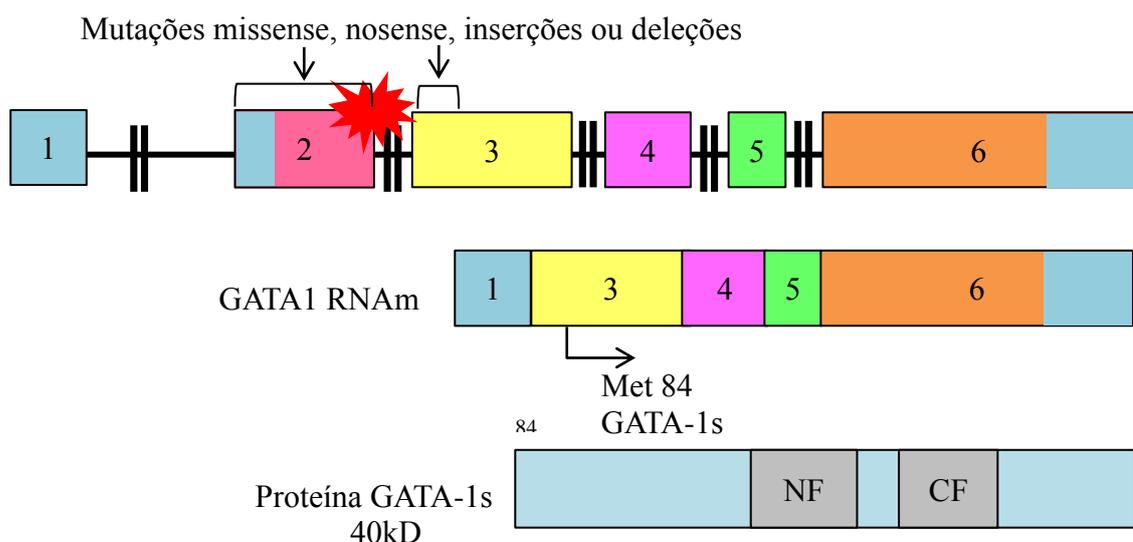


Figura 2.5. Representação esquemática da localização da mutação *GATA1*, e formação da proteína truncada GATA-1s (SANKARAN *et al.*, 2012).

Wechsler *et al.* (2002) ao analisar uma coorte de 75 indivíduos com e sem SD nas leucemias de linhagem linfóide e mieloide observou que mutações no gene *GATA1* afetam exclusivamente células da LMA-M7 em indivíduos com SD. Posterior a esses achados, outros estudos reportaram mutações iniciais nos pacientes com SD e TAM ou LMA-M7 (HITZLER *et al.*, 2003; RAINIS *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; CABELOF *et al.*, 2009). Entre esses estudos, Magalhaes *et al.* (2006) e Amorim *et al.*, (2009) demonstraram um total de 21 mutações somáticas em diferentes regiões do *GATA1* ao analisar amostras de sangue periférico e aspirado de MO de crianças, sendo algumas mutações recorrentes em outros estudos (MAGALHAES *et al.*, 2006; AMORIM *et al.*, 2009).

Nestes estudos, as técnicas para rastreamento foram realizadas por cromatografia líquida desnaturante de alta performance (dHPLC), que se baseia nas variações de heteroduplex e homoduplex dos fragmentos de DNA, e sequenciamento direto. Ambas incapazes de identificar mutações em amostras com baixo percentual de células blásticas (AMORIM *et al.*, 2009). Recentemente, Roberts *et al.* (2013) analisou mutação do *GATA1* comparando as técnicas de rastreamento por dHPLC e sequenciamento direto em 200 neonatos com SD, e observaram a frequência de mutação em 8,5% (n=17) dos casos com blastos >10% por dHPLC e sequenciamento direto (método Sanger), e por meio do sequenciamento de nova geração (SNG) observou que 18 de 88 (20,4%) pacientes que não haviam sido detectados pelas técnicas anteriores apresentaram mutação no *GATA1*.

Ao analisar a frequência de mutação nos casos de TAM e LMA, Yoshida *et al.* (2013) encontrou mutação em todos os pacientes, Alford *et al.* (2011) encontrou uma frequência 88,1% na série de TAM e 85,4% em LMA-M7. As mutações no *GATA1* são variadas e podem ser do tipo mutações de sentido errôneo (*missense*), sem sentido (*nonsense*), deleções e inserções. Favorecem a introdução de um códon de parada prematura *frameshift* (mudança na matriz ou quadro de leitura) como tradução alternativa a partir do éxon 3, como também pela perda do éxon 2 por *splicing* alternativo. Estudos recentes mostraram que as mutações mais frequentes em pacientes com TAM ou LMA-M7 são mutações com inserções, deleções e duplicações no éxon 2 com frequência de 100% (WECHSLER *et al.*, 2002), 74% (CABELOF *et al.*, 2009) e 78% (ALFORD *et al.*, 2011) para ambos os diagnósticos. Mutações pontuais foram detectadas em 21% em TAM e 22% em LM-SD. Mutações por substituição são raras (1%) e exclusivamente encontradas em TAM (ALFORD *et al.*, 2011). A maioria (97%)

dessas mutações está localizada no éxon 2 e, em contrapartida, mutações no íntron 1 ou 2 e éxon 3 do *GATA1* são raras (RAINIS *et al.*, 2003; ALFORD *et al.*, 2011).

2.5.3 Mutações no *GATA1* ocorrem intra-útero

Na tentativa de entender os mecanismos de patogênese desta doença neonatal, foi sugerido que este distúrbio se inicia durante a hematopoese fetal. Entre as evidências para esta afirmativa tem-se: 1) as mutações no *GATA1* não têm sido detectadas em estágio de remissão para TAM ou LMA-M7, indicando que as mutações são somáticas e restritas aos clones leucêmicos (RAINIS *et al.*, 2003; AHMED *et al.*, 2004); 2) presença de infiltração hepática por células fetais hematopoéticas anormais, os distúrbios de adesão celular nas células progenitoras e fibrose medular decorrentes do aumento de megacarioblastos (HITZLER; ZIPURSKY, 2005); 3) indivíduos com SD e TAM apresentam fibrose hepática com alta expressão do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e *transforming growth factor-beta 1* (TGF-1) nas células blásticas e no fígado. É sabido que TGF-1 causa o aumento da síntese de componentes da matriz extracelular e, desta forma, surge a hipótese de que a alta expressão de PDGF e TGF-1 apresenta maior taxa de síntese de matriz extracelular podendo ter um efeito sinérgico no desenvolvimento da fibrose hepática do indivíduo TAM com SD (HATTORI *et al.*, 2001); 4) Mutações encontradas na TAM foram idênticas às mutações encontradas em blastos leucêmicos na LMA-M7, provando que as mutações da LMA-M7 são originadas da TAM (RAINIS *et al.*, 2003); 5) gêmeos idênticos (monozigóticos) com trissomia do 21 e LMA-M7 apresentaram a mesma mutação do *GATA1* (delCC 239-330) nas células blásticas (RAINIS *et al.*, 2003). Devido à idêntica mutação nos gemelares, os autores sugerem que a mutação surgiu em um dos gêmeos durante a vida fetal e que as células pré-leucêmicas foram transferidas para o outro irmão por meio de anastomose placentária.

2.5.4 Mecanismo para desenvolvimento da TAM ou LMA-M7

Diversos estudos demonstram que seja quantitativamente ou qualitativamente a disfunção do *GATA1* um pré-requisito para leucemogênese, porém este sozinho não é suficiente para a leucemogênese (SHIMIZU; ENGEL; YAMAMOTO, 2008). Além disso, a população de blastos de TAM e LMA-M7 na SD carregam tipos simples de mutações *GATA1* indicando que subclones latentes de blastos de TAM transformam-se em LMA-M7 num

processo de malignização no qual é necessário um segundo fator inserido no contexto da trissomia 21 (Figura 2.6) (MUNDSCHAU; CRISPINO, 2006). Um fato que corrobora este achado é que a probabilidade de uma criança com SD desenvolver TAM e não evoluir para LMA-M7 é de 70%. Além disso, existem casos de LMA-M7 sem TAM prévia. Isto leva a hipótese que se faz necessário outro evento juntamente com a mutação no *GATA1* para que leve ao desenvolvimento e proliferação de megacarioblastos. Várias tentativas para identificar quais interações e mecanismos de ações entre eventos genéticos adicionais nas vias da patogênese da LMA-M7 vem sendo exploradas. Mutações em *RUNX1* e *JAK2* foram identificadas e atribuídas como *hit* adicional às mutações do *GATA1* para o desenvolvimento da LMA-M7 (MALINGE; IZRAELI; CRISPINO, 2009; YOSHIDA *et al.*, 2013).

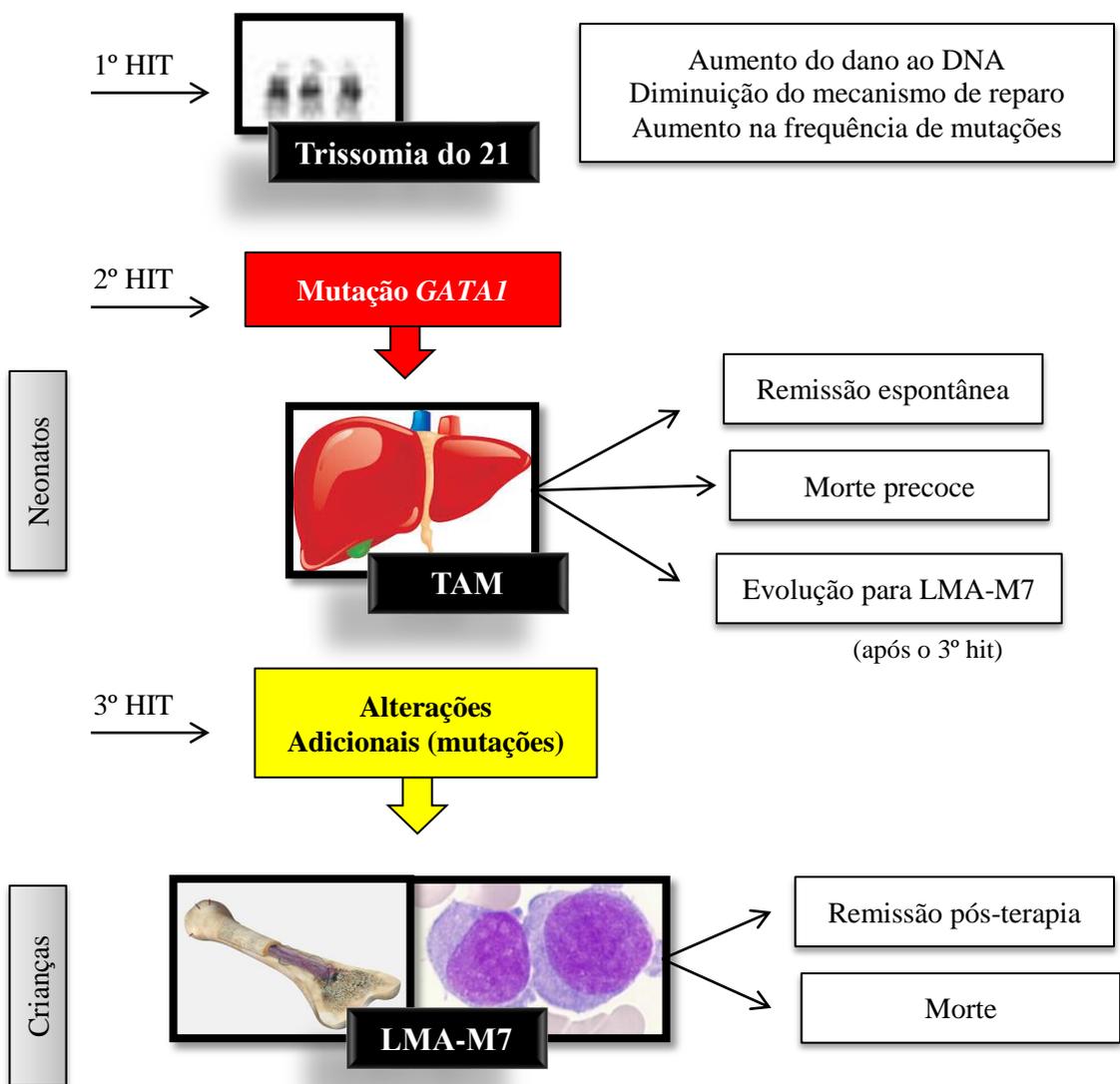


Figura 2.6. Representação esquemática do mecanismo para leucemogênese da SD (GURBUXANI; VYAS; CRISPINO *et al.*, 2004).

O gene *RUNX1*, também conhecido como *AML1*, é um fator de transcrição hematopoiético e está localizado na região cromossômica 21q22.3, conhecida como “região crítica da SD”. Algumas linhas de evidências sugerem que ele coopera com o *GATA1* na diferenciação dos megacariócitos e que está envolvido na etiopatogênese da LMA-M7 (ELAGIB *et al.*, 2003; GURBUXANI; VYAS; CRISPINO *et al.*, 2004), porém o papel do *RUNX1* na leucemogênese na SD ainda é alvo de investigação. O gene *JAK2*, localizado na região 9p24, gera a proteína pertencente à família *Janus quinasese* é essencial para a sinalização intracelular normal de receptores de fator de crescimento hematopoiético. Este gene tem sido encontrado em aproximadamente 20% dos casos de LLA em SD (KEARNEY *et al.*, 2009; MALINGE; IZRAELI; CRISPINO, 2009).

2.6 MODALIDADES TERAPÊUTICAS E PROGNÓSTICO

Crianças com SD e LMA-M7 apresentam características biológicas únicas e melhores índices de resposta terapêutica com protocolos de tratamento para LMA em SD e maior sobrevida livre de eventos (SLE) do que crianças com LMA sem SD (GAMIS *et al.*, 2003; CREUTZIG *et al.*, 2005). Os primeiros estudos que revelaram altas taxas de SLE e resposta ao tratamento para LMA foram conduzidos na década de 90 (RAVINDRANATH *et al.*, 1992; KOJIMA *et al.*, 1993; LANGE *et al.*, 1998; CRAZE *et al.*, 1999).

Devido ao aumento da toxicidade à terapia observada nessas crianças, foi proposta redução na dose de agentes quimioterápicos e, mesmo com essa redução, foi observado aumento na SLE. Com isso, o *Children's Cancer Group* (CCG) propôs um protocolo terapêutico com drogas e dosagens específicas para crianças com SD e LMA (LANGE, 1998). Desde então, alguns estudos foram realizados com intuito de analisar este padrão de resposta ao tratamento reduzido de agentes quimioterápicos nestas crianças. Entre eles, um estudo internacional realizado na Alemanha, Áustria, Suíça e República Tcheca, com grupo composto por 118 pacientes, relatou alta taxa de cura para os pacientes com SD submetidos ao protocolo de tratamento LMA-BFM (*Berlin–Frankfurt–Munster*) 93 e LMA-BFM 98, mesmo com redução da intensidade das doses de citarabina (ARA-C) e das antraciclinas (CREUTZIG *et al.*, 2005).

Além deste, recentemente o Grupo de Oncologia Infantil (*Children's Oncology Group*–COG, *United States*) conduziu um estudo (COG A2971) prospectivo, multi-institucional e de fase III, que objetivou reduzir a morbimortalidade em crianças com LMA. Eles analisaram 132 pacientes com SD (91 com LMA e 41 SMD), no período entre 1999-2003. Esta análise foi baseada em um estudo prévio conduzido pelo CCG, o CCG 2891 (LANGE *et al.*, 1998), com algumas modificações no protocolo e seus resultados foram comparados. Neste estudo, eles eliminaram do tratamento o etoposídeo e a dexametasona do regime padrão de indução, e removeram três meses de quimioterapia sistêmica da manutenção, deixando apenas três doses intratecais (IT) de citarabina, como terapia de manutenção. O tratamento consistiu em quatro ciclos padrão de terapia de indução, um curso de terapia de intensificação, e três adicionais doses IT de citarabina administradas semanalmente como terapia de manutenção. E mesmo com as alterações no protocolo, foi relatada uma taxa remissão de 92,7%, SLE em 5 anos de 79% e sobrevida global (SG) de 84%, sendo estes resultados similares aos encontrados no CCG 2891. Além disso, 74% das crianças (≤ 4 anos de idade) tiveram boa resposta no dia 14 do primeiro ciclo na terapia de indução, apresentando $<5\%$ de blastos na avaliação morfológica (SORRELL *et al.*, 2012).

O transplante de medula óssea (TMO) com infusão de células-tronco hematopoéticas e condicionamento mieloablativo, está associado à toxicidade excessiva sem ganho terapêutico adicional, não sendo, portanto, indicado na criança com SD em primeira remissão (LANGE *et al.*, 1998). Além disso, as informações sobre TMO alogênicos (doador aparentado ou não aparentado) são escassas e conflitantes. Diante disso, Hitzler *et al.* (2003) revisitou 21 pacientes com SD e LMA e 80 não SD que foram transplantados entre 2000 e 2009. Neste estudo, os autores observaram uma probabilidade de sobrevida em 3 anos de somente 19% nos casos com SD. Na análise multivariada ajustada para o intervalo entre o diagnóstico e transplante, os riscos de recidiva (HR 2,84, $p < 0,001$; 62% *versus* 37%) e mortalidade relacionada ao transplante (HR 2,52, $p = 0,04$, 24% *versus* 15%) foram significativamente maiores para LMA-SD em comparação aos não SD com LMA. Risco geral de mortalidade (HR 2,86, $p < 0,001$; 21% *vs* 52%) foi significativamente maior para LMA-SD.

2.6.1 Descrição sumária dos protocolos de tratamento de leucemias mielóide na SD

Tendo em vista as características dos pacientes com SD e leucemia, as estratégias principais dos protocolos específicos para estes pacientes são as mesmas, como redução das taxas de recaída e mortalidade relacionada à terapia; redução das toxicidades relacionada a altas doses de quimioterápicos, como mucosite intensa, infecções por mielossupressão prolongada e cardiotoxicidade aumentada, aumento de SLE e SG, como também melhora na qualidade de vida. No Brasil, os protocolos terapêuticos mais utilizados para o tratamento das LLA são os do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância (GBTLI) e do grupo alemão BFM modificado. Porém nas LMAs ainda não existe consenso nacional para tratamento em indivíduos sem ou com SD. Os protocolos utilizados com frequência para tratamento da LMA na SD são o LMA-BFM (CREUTZIG *et al.*, 2005) e mais recentemente o *POG 9421* (O'BRIEN, *et al.*, 2008).

O LMA-BFM modificado para SD consiste em 4 períodos, sendo uma fase de indução, duas de consolidação, uma de intensificação e uma de manutenção. A fase de indução (AIE) consiste no uso de citarabina 100mg/m²/d (dias 1 e 8), idarrubicina 8mg/m²/d (dias 3 e 5), etoposídeo (VP-16) 150mg/m²(dias 6 a 8) e citarabina intratecal (IT) com dose calculada conforme a idade (dias 1 e 8); A 1ª fase de consolidação (AI) consiste no uso de citarabina 500mg/m²/d (dias 1 a 4), idarrubicina 5mg/m²/d (dias 3 e 5) e citarabina IT com dose calculada conforme a idade (dias 1 e 8); A 2ª fase de consolidação (haM) utiliza alta dose de citarabina 1g/m² (dias 1 a 3), mitoxantrone 10mg/m²/d (dias 3 e 4) e citarabina IT com dose calculada conforme a idade (dias 1 e 6); A fase de intensificação (HAE) também utiliza alta dose de citarabina 3g/m² (dias 1 a 3), etoposídeo (VP-16) 125mg/m²(dias 2 a 5) e citarabina IT com dose calculada conforme a idade (dia 1); e por fim, a terapia de manutenção (durante 1 ano) com tioguanina 40mg/m² (por 1 ano), citarabina 40mg/m² subcutânea (SC) (dias 1 a 4 por 4 semanas) (CREUTZIG *et al.*, 2005).

Entre as diferenças no protocolo para as crianças sem SD *versus* com SD tem-se: não realização da 2ª fase de indução (haM) com alta dose de citarabina 3g/m² (dias 1 a 3), mitoxantrone 10mg/m²/d (dias 3 e 4) e citarabina IT com dose calculada conforme a idade (dia 1); redução da dose de idarrubicina da fase AIE (de 12 para 8mg) e redução na administração (de 3 para 2 dias); redução da dose de idarrubicina da fase AI (de 7 para 5mg);

e, durante a terapia de manutenção, não é realizada a citarabina IT com dose calculada conforme a idade (1 vez por semana, durante 4 semanas), como também irradiação do SNC (CREUTZIG *et al.*, 2005).

O *POG Study 9421* modificado para SD consiste em 2 períodos, sendo duas fases de indução e três de consolidação. A 1ª fase de indução (*standart DAT*) consiste no uso de citarabina 100mg/m²/d (dias 1 a 7), daunoblastina 45mg/m²/d (dias 1 a 3), tioguanina 100mg/m² via oral (dias 1 a 7) e citarabina IT com dose calculada conforme a idade (dia 1); 2ª fase de indução (*standart DAT*) com 1000mg/m²/d de 12/12 horas (dias 1 a 5); 1ª e 3ª fase de consolidação com mitoxantrone 7mg/m²/d (dias 1 a 4), etoposídeo 100mg/m²/d (dias 1 a 5) e citarabina IT com dose calculada conforme a idade (dia 1); 2ª fase de consolidação com citarabina 1000mg/m²/d (dias 1 a 5). Entre as diferenças no protocolo tem-se: na 1ª fase de indução a daunoblastina foi reduzida de 45 para 25 mg e na 1ª e 3ª fases de consolidação o mitoxantrone de 10 para 7mg (O'BRIEN, *et al.*, 2008).

Gamis *et al.*, (2003) analisaram a coorte de 161 pacientes com SD diagnosticados com LMA e identificaram que o aumento da idade ao diagnóstico tem efeito significativamente negativo na resposta à terapia nessa população. Este grupo analisou a idade, sexo, raça, envolvimento hepático, esplênico e nodal, invasão de SNC, contagem de células brancas (leucócitos), percentual de blastos na MO, contagem de plaquetas, classificação morfológica e citogenética, resposta à terapia por meio do percentual de blastos na MO no dia 7 e a taxa de remissão completa após 4 ciclos. Destes, apenas a idade ao diagnóstico ($p=0,002$) e a rapidez na resposta no dia 7 ($p=0,03$) foram preditores de SLE. Porém, na análise multivariada, somente a idade foi fator preditivo de SLE ($p=0,006$). Crianças ≤ 2 anos de idade tiveram em 6 anos SLE de 86%, comparadas com aquelas > 2 anos de idade com uma SLE em 6 anos de 64% ($p=0,002$). A taxa de SLE são foi significativamente diferente de LMA para SMD, com 76% e 78% respectivamente (GAMIS *et al.*, 2003).

Klusmann *et al.* (2008) analisaram informações biológicas, citogenéticas, clínicas e terapêuticas na larga coorte de 146 pacientes com SD diagnosticados com TAM. Eles observaram em 5 anos uma SG e SLE de $85\% \pm 3\%$ e $63\% \pm 4\%$, respectivamente. Entre todas as crianças incluídas no estudo, 124 sobreviveram aos primeiros 6 meses de vida e, destas, 29 (23,4%), desenvolveram LM-SD. No total, 27 das 29 crianças foram tratadas de

acordo com os protocolos LMA-BFM 93, 98, ou 2004, com dose na intensificação adaptada e todas as crianças tiveram SLE em 5 anos de 100%. Foi observado também que as crianças com história prévia de TAM tiveram uma SLE significativamente maior ($91\% \pm 5\%$) comparada com as crianças sem TAM diagnosticadas no mesmo período ($70\% \pm 4\%$), principalmente devido à baixa taxa de recaída (0% vs $9\% \pm 3\%$). Por meio de análise multivariada, foi observado fator de proteção para morte precoce nos pacientes com TAM e remissão espontânea ($p < 0,001$) [HR, *hazard ratio* 0,01 (IC 95%, 0,00-0,06)]; e tratamento com citarabina ($p < 0,001$) [HR 0,11 (IC 95%, 0,04-0,31)].

O estudo realizado por Ge *et al.* (2005) buscou analisar, *in vitro*, blastos leucêmicos de crianças com SD de LMA-M7 e crianças sem SD e com LMA. Neste estudo, eles identificaram que os blastos leucêmicos das crianças com SD e mutações no *GATA1* apresentavam níveis intracelulares aumentados do metabólito ativo da ARA-C, conhecido como trifosfato de citarabina, em comparação com os blastos leucêmicos das crianças sem a SD. Além disso, eles identificaram que os blastos leucêmicos das crianças com SD apresentam expressão diminuída de citidina desaminase (CDA), que é uma enzima responsável pela metabolização da ARA-C. Como consequência da redução da CDA, há também redução nos níveis do metabólito inativo da ARA-C, conhecido como ARA-U, e aumento dos níveis do trifosfato de citarabina. O que resulta numa melhor ação no bloqueio da síntese do DNA, e inibição da DNA polimerase. Em contrapartida, esta exposição aumentada aos metabólitos ativos desta droga pode favorecer o aparecimento de toxicidades (GE *et al.*, 2005).

Massey *et al.* (2006) avaliaram 48 lactentes com SD e TAM diagnosticados e registrados entre o período de 1996 a 1999, com objetivo de determinar a história natural da doença, características biológicas, e características clínicas associadas com a morte precoce e subsequente desenvolvimento da leucemia. Em relação à morte precoce (< 9 meses de idade), eles observaram por meio da análise univariada a correlação de variáveis como sexo, idade gestacional, peso ao nascimento, idade ao diagnóstico, características laboratoriais e redução blastos. Eles observaram que a morte precoce (média de 90 dias) ocorreu em 8 (17%) de 47 pacientes e foi estatisticamente significativa quando correlacionada com a contagem de células brancas ao diagnóstico ($p < 0,001$), aumento de bilirrubina e enzimas hepáticas no curso da doença ($p = 0,005$) e falha da redução de blastos periféricos ($p = 0,001$). Outro fator

interessante encontrado, porém não estatisticamente significativo ($p=0,09$), foi o sexo, cujos meninos tiveram uma pior sobrevida (de 8 pacientes com morte precoce 6 de eram meninos).

Klusmann *et al.* (2008), identificaram características ao diagnóstico associadas à alta incidência cumulativa de morte por meio da análise univariada (teste de Gray), como contagem de leucócitos $>100 \times 10^9/L$ ($p=0,002$), hidropsia fetal ($p<0,001$), ascites ($p<0,001$), efusões (pleural, pericárdica, ascites ou hidropsia) ($p=0,008$), coagulopatia ($p<0,001$), diátese hemorrágica ($p<0,001$), contagem de plaquetas $>100 \times 10^9/L$ ($p=0,023$), parto prematuro ($p=0,002$), e baixo peso ao nascimento ($< 3\text{kg}$) ($p=0,021$) e, durante curso da doença, a fibrose hepática ($p<0,001$), disfunção hepática ($p=0,003$) e falha renal ($p<0,001$). As variáveis relacionadas à pior SLE foram à contagem de leucócitos ($p=0,035$), hidropsia fetal ($p<0,001$), efusões ($p<0,001$), efusão pleural ($p=0,007$), coagulopatia ($p=0,013$), diátese hemorrágica ($p=0,001$) e, durante curso da doença, disfunção hepática ($p=0,013$) e falha renal ($p<0,001$). Diferente do estudo de Massey *et al.* (2006), não encontraram diferenças ($p=0,72$) na sobrevida em 5 anos entre o grupo de meninos e meninas (SLE em 5 anos, 64% e 60%, respectivamente), como também em pacientes assintomáticos *versus* sintomáticos ($p=0,25$) ao diagnóstico (SLE em 5 anos, 76% e 64%, respectivamente).

3. JUSTIFICATIVA

As crianças com SD e LMA-M7 apresentam melhor resposta ao tratamento quimioterápico e maior SLE do que aquelas sem a síndrome, principalmente quando houve redução da dose de ARA-C e antracíclicos (CREUTZIG *et al.*, 2005; VYAS; ROBERTS, 2006). Estudos de sobrevida e letalidade por neoplasias são indispensáveis para o planejamento de ações de saúde, visto que as taxas de sobrevida e letalidade em séries históricas são de alta relevância analítica. Investigações que permitam avaliar características epidemiológicas e fatores prognósticos relacionados à doença e resposta terapêutica, forneceram elementos objetivos sobre a eficácia do tratamento de leucemias em SD, aplicando os conhecimentos obtidos tanto na área da pesquisa clínica quanto na área de informação em câncer de uma forma geral. A pesquisa se fez necessária pela pequena quantidade de estudos de análise de sobrevida e possíveis fatores prognósticos relacionados em crianças com SD e LMA (LANGE *et al.*, 1998; GAMIS *et al.*, 2003; CREUTZIG *et al.*, 2005; GE *et al.*, 2005).

Cabe destacar que, até o momento esta iniciativa é decorrente da ausência de estudos realizados em SD e representa a primeira análise no Brasil. Poucos estudos foram realizados sobre LMA na infância neste país (LOPES, 1990; SILVA-JUNIOR; RIBEIRO, 1993; VIANA *et al.*, 2003), e destes, nenhum específico para a população com SD. Além disso, pouco se conhece sobre os protocolos adotados pelas instituições Brasileiras no tratamento da TAM e LMA na SD. Diante disso, os resultados obtidos por meio desta análise permitirão aprimorar o delineamento de estratégias terapêuticas, no que diz respeito às diferenças entre TAM, SMD e LMA-M7 quanto às dosagens de drogas utilizadas no tratamento no Brasil.

Em relação ao avanço científico, certamente a análise destas informações levará a uma melhor compreensão sobre o papel de mutações genômicas do *GATA1* no prognóstico da LMA na SD e possibilitará a confirmação de achados já descritos em estudos anteriores.

Outro fator de interesse é a disponibilidade de informações já existentes geradas por estudos realizados pelo Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrica (PHOP), Coordenação de Pesquisa – CPq do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Rio de Janeiro – Brasil, sobre fatores etiológicos e identificação de risco com as mutações do *GATA1* iniciado há 10 anos (MAGALHAES *et al.*, 2006; AMORIM *et al.*, 2009).

Por fim, para a enfermagem em particular, ele inaugura um espaço de investigação epidemiológica e molecular com pleno potencial de articulação com a assistência, gerência e ensino. Tal afirmação baseia-se na inexistência de estudos como o proposto, tanto na produção nacional quanto na internacional desta categoria profissional. No que se refere às implicações para a prática clínica, o estudo pode subsidiar a elaboração de planos de cuidados assistenciais com ênfase na adequação da terapêutica que proporcione melhor qualidade de vida para as crianças com SD.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Analisar os fatores associados ao prognóstico de crianças com síndrome de Down diagnosticadas com TAM ou LMA atendidas em instituições brasileiras de referência oncológica.

4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Descrever o perfil clínico-epidemiológico, incluindo as diferenças entre TAM e LMA;
- Descrever a frequência e localização da mutação no éxon 2 do *GATA1* e padrão de expressão dos transcritos gênicos;
- Analisar a resposta terapêutica;
- Analisar a letalidade, sobrevida global (SG) e a sobrevida livre de evento (SLE), como os fatores associados ao prognóstico.

5. METODOLOGIA

5.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O TIPO DE PESQUISA

Foi realizado um estudo retrospectivo, de coorte, de crianças com TAM ou LMA.

5.2 POPULAÇÃO

5.2.1 *Sujeitos*

Crianças com SD, com idade ≤ 4 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico de TAM ou LMA, caracterizadas por análises morfológicas, imunofenotípicas e moleculares (BENNETT *et al.*, 1982; BENNETT *et al.*, 1985; VARDIMAN, 2010).

5.2.2 *Fonte de informação*

Originaram-se de duas fontes: 1º) informações demográficas, clínicas e marcadores diagnósticos foram extraídas do registro de dados do PHOP-CPq gerado do sistema *online* (imunomolecular.redecancer.org.br) com variáveis selecionadas para esta pesquisa conforme sumarizado no Anexo A. O PHOP fornece uma cobertura diagnóstica a crianças com hematopatias em âmbito nacional, por meio da Rede de Apoio de Atenção ao Câncer Infanto-Juvenil em caráter cooperativo para o diagnóstico de leucemias e pesquisa. As amostras de SP ou MO de crianças com distúrbios hematológicos são enviadas para análises celulares e moleculares. Ao enviar as amostras, os médicos responsáveis pelos cuidados terapêuticos preenchem este registro *online* com as informações dos pacientes. Especificamente para este estudo, as amostras foram provenientes de várias de instituições parceiras nos seguintes estados do Brasil: Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraíba, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rio

Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo (Anexo B); 2º) informações clínicas e terapêuticas adicionais, bem como o *status* ao seguimento foram coletadas diretamente com os médicos responsáveis pelo tratamento de crianças nos serviços de onco-hematologia pediátrica destas instituições, por meio de entrevista telefônica. Para as crianças cujas amostras foram provenientes de Brasília, Salvador e Rio de Janeiro, as informações foram coletadas por meio de contato físico, onde pôde-se ter o acesso total aos prontuários dos pacientes. Para isto, foi utilizado um questionário (Apêndice A e B).

5.2.3 Critérios de inclusão

Crianças com Síndrome de Down e idade ≤ 4 anos, com evidência clínica e diagnóstico confirmado de TAM ou LMA;

Casos diagnosticados e registrados no período de janeiro de 2000 a janeiro de 2014.

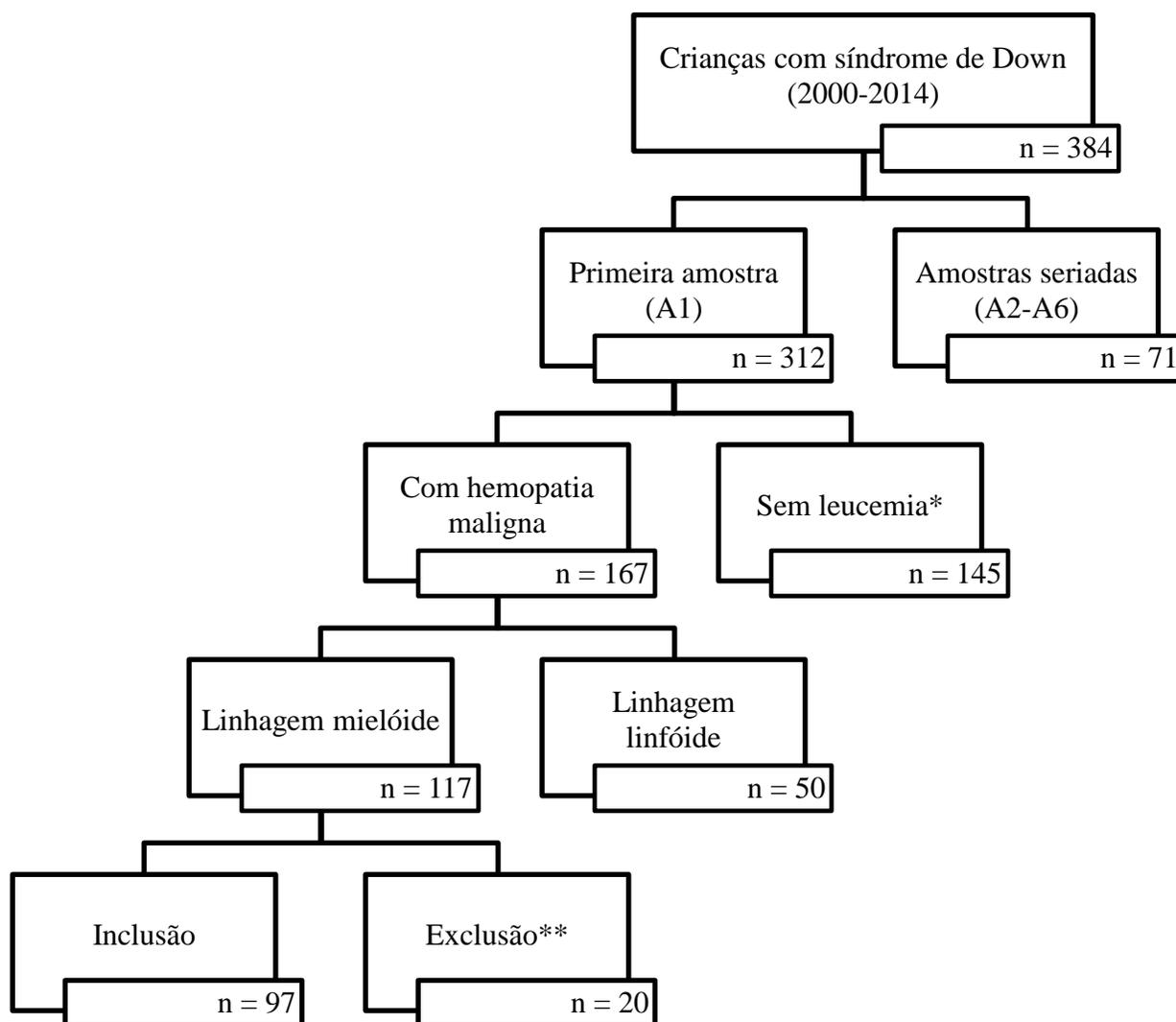
5.2.4 Critérios de exclusão

Crianças com SD sem evidência laboratorial de leucemia. Para o estudo de sobrevida foram excluídas as crianças para as quais não houve localização do prontuário ou informação de data do último seguimento ou data do óbito.

5.2.5 Casuística

Durante o período de 2000 a 2014 foram recebidas 384 amostras de pacientes com SD. Destas, 312 correspondiam à amostra inicial de cada paciente: 167 apresentavam evidências de hemopatias malignas e 145 sem evidências de leucemia. Dos pacientes com hemopatias malignas, 50 foram diagnosticados com LLA e 117 com LMA, sendo estes últimos selecionados para a pesquisa. Foi realizada busca ativa para confirmação diagnóstica e coleta de informações nas instituições de procedência das amostras e nas instituições de transferência (devido à complexidade do caso, algumas crianças foram transferidas de sua instituição de origem para outra com maior suporte terapêutico). Houve

confirmação diagnóstica e inclusão de 97 pacientes: 34 casos de TAM e 63 casos de LMA. Foram excluídos 20 casos: 7 por não localização de prontuários ou registros hospitalares e 13 por não confirmação diagnóstica de hemopatia clonal ou por apresentarem idade ≥ 5 anos (Figura 5.1).



*Estão incluídos neste grupo os casos com processos de mielodisplasia secundários a infecções comprovadas, citopenias isoladas e sem outras morbidades relacionadas hemopatias malignas. **Excluídos casos com Síndrome de Down sem confirmação de leucemia ou com idade ≥ 5 anos; n, número total de amostras/pacientes.

Figura 5.1. Casuística de crianças com de síndrome de Down e distúrbios hematológicos que foram encaminhados para diagnóstico de leucemias e pesquisas, no período de 2000-2014.

5.3 VARIÁVEIS

5.3.1 Variáveis dependentes

Foram analisadas as seguintes variáveis: óbito e resposta ao tratamento.

5.3.2 Variáveis independentes

Foram analisadas as seguintes variáveis: morfologia e classificação biológica da leucemia; idade ao diagnóstico (0 a 3 meses, 4 meses a 12 meses e 13 meses a 4 anos); sexo (feminino ou masculino); raça/cor da pele (branca ou não branca); contagem total de leucócitos; percentual de blastos; hemoglobina medida em g/dL; hematócrito; contagem de plaquetas; mutação no gene *GATA1*; evolução para LM-SD; tratamento quimioterápico; protocolo terapêutico utilizado; toxicidade medicamentosa na indução e intensificação; dose cumulativa de ARA-C e antracíclicos; TMO;

5.3.3 Variáveis de controle

A descrição das variáveis controle está sumarizada no Apêndice C. Essas variáveis foram classificadas em 3 grupos: características demográficas e clínicas ao diagnóstico; características biológicas, imunofenóticas e moleculares ao diagnóstico; e características relacionadas ao tratamento e evolução da doença.

5.4 ANÁLISE MOLECULAR DO GENE GATA1

As análises para identificação de mutações do *GATA1* e perfil de expressão dos seus transcritos gênicos alternativos foram realizadas conforme o algoritmo de testes representado na Figura 5.2.

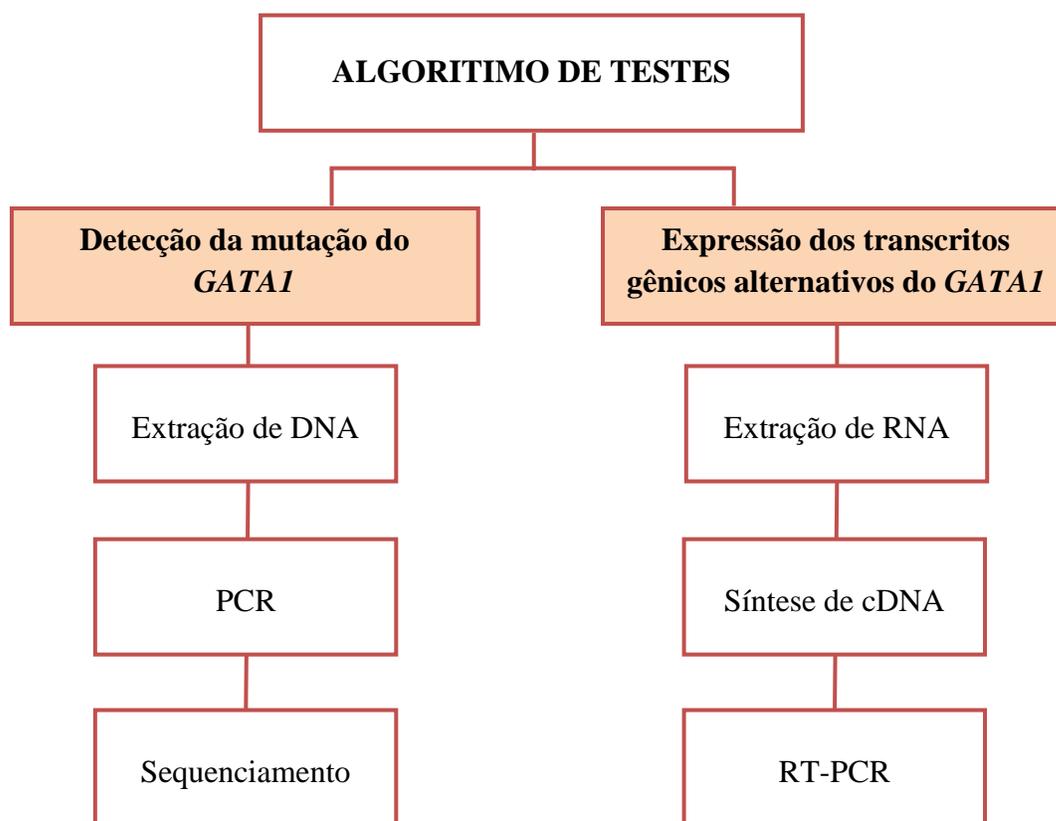


Figura 5.2. Representação esquemática do algoritmo de testes realizado no laboratório do PHOP, CPq, INCA, para rastreamento de mutações gênicas. DNA, ácido desoxirribonucléico; RNA, ácido ribonucleico; PCR, reação em cadeia da polimerase; RT-PCR, transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase.

5.4.1 Purificação de DNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi obtido a partir de células mononucleares da MO por meio do kit DNA Blood Mini (QIAGEN, Chaysworth, EUA), seguindo o protocolo do fabricante, cujo principio é baseado em uma membrana de sílica seletiva. Posteriormente, o DNA foi quantificado por meio do espectrofotômetro (*NanoDrop 1000*, Wilmington, DE, USA), com a absorvância a 260nm, e foram geradas as quantificações

pelo programa ND-1000 que acompanha o aparelho. O material foi utilizado para rastreamento das mutações no *GATA1*.

5.4.2 Análise mutacional do gene *GATA1*

A identificação de mutações no éxon 2 do *GATA1* foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), que gera um fragmento de 317pb, por meio dos iniciadores descritos na Tabela 5.1. (MAGALHAES *et al.*, 2006). Foram incluídas as informações da análise de 22 crianças testadas previamente por meio das técnicas de sequenciamento direto e dHPLC dos dois estudos epidemiológicos moleculares realizados (MAGALHAES, 2006; AMORIM *et al.*, 2009).

Tabela 5.1. Sequência de iniciadores utilizados nas amplificações do éxon 2 do *GATA1* (MAGALHAES *et al.*, 2006)

Sentido	Sequência
Senso	5' GTCCTCGCAGGTTAATCCCC 3'
Anti-senso	5' GCCAAGGATCTCCATGGCAACCC 3'

Para a reação de PCR foram utilizados 100-150ng de DNA. A solução adicionada ao DNA foi preparada para um volume final de 50µl com as seguintes quantidades: iniciadores a 0,5µM; oligonucleotídeos dATP, dTTP, dCTP e dGTP a 0,2mM finais; solução tampão 1x (50mM KCl, 20nM Tris-HCl pH 8,4) (Invitrogen, CA, USA), cloreto de magnésio (MgCl₂) a 2,5mM, (Invitrogen, CA, USA), 1U de Taq-polimerase (Taq DNA Polymerase; Invitrogen, CA, USA).

As reações de PCR foram realizadas no termociclador Veriti® Thermal Cyclor (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA), onde os perfis térmicos da reação seguiram as seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 30 seg, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, temperatura e tempo de anelamento de 60°C por 1 min, e extensão a 72°C por 30 seg; seguidas por um ciclo final de extensão a 72°C por 10 min. Depois de amplificados, os produtos da PCR foram visualizados através de gel de agarose

1,5% corado com brometo de etídio (Fig. 5.3) e, posteriormente, direcionados para o sequenciamento direto.

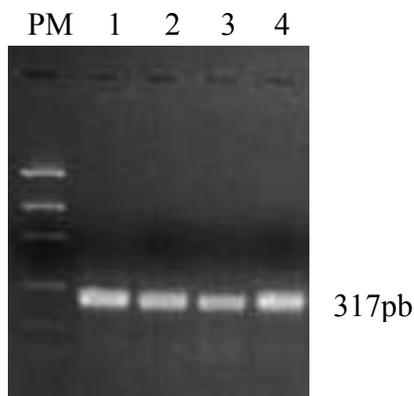


Figura 5.3. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para visualização da região amplificada do *GATA1*. (PM) Padrão de peso molecular; (1-4) amostras de casos com região esperada amplificada. Pb, pares de bases.

5.4.3 Sequenciamento direto (método Sanger)

A preparação das amostras para o sequenciamento se deu por meio da purificação dos produtos amplificados pela reação de PCR com o kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, NE, UK), de acordo com o recomendado. A quantificação destes produtos foi estimada com o auxílio do reagente Low Mass DNA Ladder (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA), conforme instruções do fabricante. As placas de sequenciamento foram preparadas com o volume final de 10 µl, utilizando como referência as quantidades e reagentes recomendados para montagem da reação de sequenciamento com o BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems, CA, USA). As placas foram submetidas às reações utilizando a seguinte ciclagem básica no termociclador Veriti[®] Thermal Cycler (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA), com os perfis térmicos: etapa inicial de desnaturação a 96°C por 1 min, 25-40 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 seg, temperatura e tempo de anelamento de 50°C por 15 seg, e extensão a 60°C por 4 min. As amostras foram precipitadas na placa de sequenciamento seguindo o protocolo utilizado na Plataforma de Sequenciamento e

Análise de Fragmentos PDTIS/Fiocruz, conforme o descrito: as placas foram centrifugadas a 600 rpm por 1 min; adicionou-se 30 μ L de isopropanol 75% (Merck KGaA, Darmstadt, DE) e as amostras foram ressuspensas, com a pipeta, de 3 a 4 vezes, para homogeneizá-las. As placas foram incubadas, por 15 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e, posteriormente, centrifugadas a 4°C e 4.000 rpm, por 45 min. O sobrenadante foi descartado vertendo-se as placas sobre papel-toalha, por meio de movimentos circulares. Foram adicionados 50 μ L de Etanol 75% (Merck KGaA, Darmstadt, DE) e seguiu-se uma nova centrifugação a 4°C/4.000 rpm, por 15 min. O sobrenadante foi, novamente, descartado e as placas aquecidas a 60°C, por 10 min, ao abrigo da luz. Foram adicionados 10 μ L de Formamida Hi-Di™ (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA) em cada poço da placa, que foi submetida a aquecimento a 95°C durante 5 min no termociclador. Após estas etapas, as amostras estavam adequadas para o processamento no sequenciador automático ABI3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). A análise das sequências geradas pelo aparelho foi realizada no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.8.0 (HALL, 1999). Em seguida, os eletroferogramas obtidos foram comparados com uma sequência referência do *GATA1* (GenBank NM_002049).

5.4.4 Purificação do RNA e síntese do DNA complementar

A purificação do ácido ribonucleico (RNA) foi realizada por meio do ensaio comercial Trizol (Invitrogen, CA, USA), conforme protocolo padrão estabelecido pelo fabricante. Após a extração, o RNA foi quantificado em um espectrofotômetro (*NanoDrop1000*, Wilmington, 44 DE, USA), avaliando-se a absorvância a 260nm, e foram geradas as quantificações dos ácidos nucleicos por meio do programa ND-1000 que acompanha o aparelho. Para cada 3 μ g de RNA, foram usados 0,8 μ l da enzima DNase (1U/ μ l; Promega, Madison, WI, USA). Após incubação à temperatura ambiente por 15 min, foi adicionado 1 μ L de EDTA (25mM) e a solução foi incubada a 65°C por 15 min. Após esse período, as amostras foram resfriadas a -20°C por 1 min. Foi adicionado 1 μ l de oligonucleotídeos ricos em timina (Oligo dT) e as amostras foram incubadas a 70 °C por 10 min. Após esta etapa, a solução foi resfriada a -20°C por 5 min. A etapa final de síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se 1 μ L da enzima transcriptase

reversa (5U/ml, Invitrogen, CA, USA), tampão 2x (50mM KCl, 20nM Tris-HCl pH 8,4) (Invitrogen, CA, USA), MgCl₂ a 2,4mM (Invitrogen, CA, USA) e dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Invitrogen, CA, USA) a 0,2mM finais, resultando em um volume final de 20µl. A solução foi incubada a 25°C por 5 min, seguida de incubação a 42°C por 60 min e, posteriormente, incubação a 70°C por 10 min.

A integridade dos cDNAs foi verificada por meio da amplificação do gene constitutivo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*). Para esta reação, 3,5µl do cDNA recém-sintetizado foram adicionados a uma solução final de 20µl com as seguintes quantidades: iniciadores a 0,2µM; dATP, dTTP, dCTP e dGTP a 0,2mM finais; solução tampão 1x (50mM KCl, 20nM Tris-HCl pH 8,4) (Invitrogen, CA, USA), MgCl₂ a 2,5mM (Invitrogen, CA, USA), 1U de Taq-polimerase (Taq DNA Polymerase; Invitrogen, CA, USA). A reação de RT-PCR foi realizada em um termociclador PCR-System 9700 (Geneamp®, Applied Biosystems, CA, USA), onde os perfis térmicos da reação seguiram as seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 1 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, temperatura e tempo de anelamento de 60°C por 30 seg, extensão a 72°C por 45 seg. Depois de amplificados, os produtos de PCR foram visualizados através de gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e, posteriormente, visualizados com o auxílio da luz ultravioleta, conforme representado na Figura 5.4.

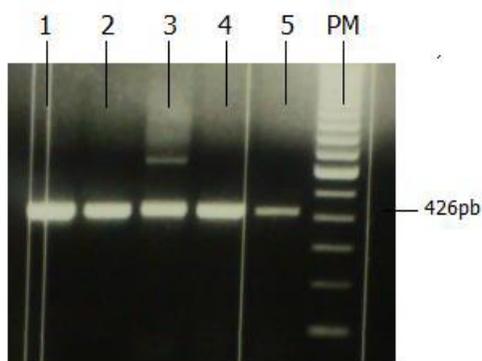


Figura 5.4. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para visualização da região amplificada do *GAPDH*. (1-5) Amostras de casos com banda amplificada; (PM) Padrão de peso molecular de 100pb. Pb. pares de bases.

5.4.5 Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR)

A detecção dos transcritos alternativos por RT-PCR foi realizada em amostras com RNA íntegro. Para esta reação, 5µl do cDNA recém-sintetizado foram adicionados a uma solução final de 20µl com as seguintes concentrações: 1,25X de solução tampão (50mM KCl, 20nM Tris-HCl pH 8,4) (Invitrogen, CA, USA), 1,9mM de MgCl₂ (Invitrogen, CA, USA), 0,25mM de dNTP, 0,4U de Taq-polimerase (Taq DNA Polymerase; Invitrogen, CA, USA), 0,75µM do iniciador GATA1 S1 e 0,75µM do iniciador GATA1 AS1 (KANEZAKI *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2003). A reação de RT-PCR foi realizada em um termociclador PCR-System 9700 (Geneamp®, Applied Biosystems, CA, USA), onde os perfis térmicos da reação seguiram as seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, temperatura e tempo de anelamento de 68°C por 30 seg, extensão a 72°C por 1min, seguida por extensão final a 72°C por 5 min. Depois de amplificados, os produtos de PCR foram visualizados através de gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e, posteriormente, visualizados com o auxílio da luz ultravioleta (imagem disponível no item 6.1.4.3, na Figura 6.4).

5.4.6 Quantificação dos transcritos alternativos

A expressão do mRNA foram calculados por meio das análises densitométricas do RT-PCR pelo programa *Scion Image* (*Scion Corporation, USA*) Foram identificados os produtos de PCR com e sem éxon 2 (Ex (+) e Ex (-), respectivamente) e calculado uma razão: Ex (-)/Ex (+), conforme Kanezaki *et al.*, 2010.

5.5 MÉTODO ESTATÍSTICO

A análise descritiva das variáveis foi realizada em duas etapas: a primeira univariada por meio da descrição de frequências; a segunda bivariada por meio das comparações dos parâmetros dos pacientes por meio do teste de qui-quadrado (X^2) ou teste exato de Fisher, conforme indicado. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados para indicar associações estatisticamente significantes. A SG e SLE foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier. A SG foi calculada a partir da data do diagnóstico até a data da morte por qualquer causa, e a SLE foi calculada a partir da data do diagnóstico até a data do último seguimento sem doença, recorrência ou morte por qualquer causa. SG e SLE foram estimadas em 5 anos e intervalos de confiança (IC) de 95% (IC95) foram calculados. As curvas de sobrevida foram comparadas pelo teste Log-rank. Os dados foram analisados por meio do pacote *Statistical package for social sciences* (SPSS Inc, Chicago, IL, USA), versão 18.0

5.6 COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - CEP-INCA, sob o número CAAE: 05882712.0.0000.5274 e número do parecer: 181.947 (ANEXO C).

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISES DESCRITIVA

Foram incluídos neste estudo 97 pacientes diagnosticados como TAM ou LMA, sendo 08 pacientes entre os anos de 2000 e 2002, 22 casos entre 2003 a 2005, 34 casos entre 2006 a 2009, 33 casos entre 2010 a 2014, conforme ilustrado na Figura 6.1. A média foi de 6,0 casos por ano. Os dois picos de frequência elevados observados na figura nos anos de 2003 a 2009 podem ser correspondentes à demanda e parcerias com instituições brasileiras especializadas em diagnóstico e tratamento em oncologia pediátrica e pelo recrutamento de casos/amostras para os estudos relacionados à identificação de mutação no gene *GATA1* no laboratório (MAGALHAES *et al.*, 2006; AMORIM *et al.*, 2009).

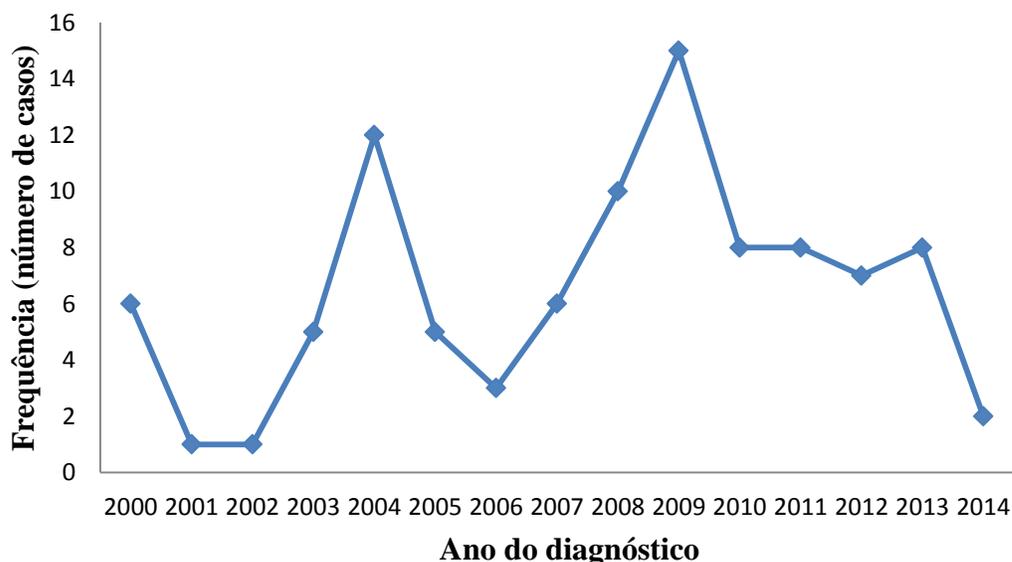


Figura 6.1. Frequência de casos de TAM ou LMA por ano encaminhados ao Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricos, CPq no período de janeiro de 2000 a janeiro de 2014.

6.1.1. Procedência dos casos de acordo com região

A maioria dos casos foi da região Sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo) com 40 casos, seguida das regiões Centro Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul) com 24 casos, Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco) com 22 casos e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) com 11 casos, conforme ilustrado na Figura 6.2.

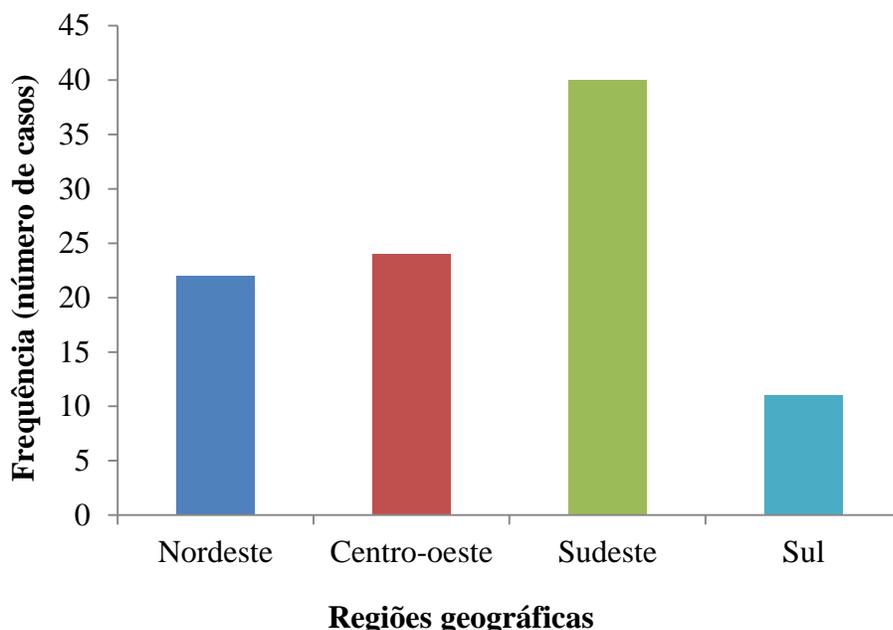


Figura 6.2. Frequência de casos de TAM ou LMA por região do Brasil, 2000-2014.

6.1.2. Características demográficas e clínicas

As características demográficas e clínicas ao diagnóstico dos casos analisados estão representadas na Tabela 6.1. Foi observada mediana de idade de 15,7 meses (aproximadamente 1 ano e 3 meses) e as idades variaram entre 0,1 e 56,9 meses. Houve predominância de 31 (35,1%) casos na faixa etária menor ou igual a 3 meses, seguida de 56 (57,7%) casos na faixa etária entre 4 e 12 meses ao diagnóstico. Em relação ao sexo, foi observado discreto predomínio de casos do sexo masculino (56,7%). Os relatos de cardiopatia congênita foram homogêneos. A maioria dos pacientes analisados (71,1%) foram declarados pelos responsáveis como sendo da raça/cor da

pele branca. Em relação às características clínicas iniciais, foram observadas maiores frequências de hepatomegalia (70,1%) e esplenomegalia (63,9%).

Tabela 6.1. Características demográficas e clínicas de 97 crianças diagnosticadas com TAM ou LMA, Brasil 2000-2014

Características	No. de pacientes (%)
Idade (meses)	
≤ 3	34 (35,1)
4 a 12	07 (07,2)
> 12	56 (57,7)
Gênero	
Masculino	55 (56,7)
Feminino	42 (43,3)
Cor da pele	
Branca	69 (71,1)
Não branca	28 (28,9)
Cardiopatía congênita	
Sim	49 (50,5)
Não	48 (49,5)
Hepatomegalia	
Sim	68 (70,1)
Não	29 (29,9)
Esplenomegalia	
Sim	62 (63,9)
Não	35 (36,1)
Linfonodomegalia	
Sim	11 (11,3)
Não	86 (88,7)
Leucemia “cutis”/cloroma	
Sim	03 (3,1)
Não	94 (96,9)

n, número total de pacientes.

6.1.3. Características biológicas e imunofenotípicas

Em relação às características laboratoriais, a contagem de células brancas (leucometria) variou entre 1,8 e 219 x10⁹/l com a mediana de 13,3 x10⁹/l; o nível de hematócrito entre 4 e 58% com mediana de 27; a hemoglobina entre 2,1 a 57,0 g/dL com mediana de 9,0; e o de plaquetas

entre 7,0 e 490 x10⁹/l com mediana de 36; a contagem absoluta de blastos variou de acordo com a mediana de 39. A análise morfológica e imunofenotípica por citometria de fluxo foi realizada em todos os casos e permitiu a classificação de acordo com os critérios FAB. Entre os subtipos de linhagem encontrados, o mais frequente (92,8%) foi o de linhagem megacarioblástica/megacariocítica (LMA-M7). As linhagens de LMA minimamente diferenciada (LMA-M0), com maturação granulocítica (LMA-M2), monocítica/monoblástica (LMA-M5) e eritroleucemia (LMA-M6) representarem 7,2% da população estudada. Conforme a classificação WHO para proliferações mieloides em SD, obteve-se uma frequência de 35,1% dos casos diagnosticados com TAM e 64,9% com LMA. Houve relato de TAM com evolução para LM-SD em 33,3% dos casos, sendo que em 8,9% não foi observada essa evolução, pois estes pacientes não foram inicialmente acompanhados pela instituição de tratamento/envio de amostra (Tabela 6.2).

Tabela 6.2. Características biológicas e imunofenotípicas de 97 crianças diagnosticadas com TAM ou LMA, Brasil 2000-2014

Características	No. de pacientes (%)
Subtipo imunofenotípico (FAB)	
M7	90 (92,8)
Outros	7 (7,2)
Diagnóstico (WHO)	
TAM	34 (35,1)
LMA (M0-M7)	63 (64,9)
Evolução para LM-SD*	
Sim	30 (33,3)
Não	52 (57,8)
Sem informação	8 (8,9)

n, número total de pacientes; LMA, leucemia mieloide aguda; TAM, mielopoese anormal transitória. *TAM com evolução para leucemia mieloide da síndrome de Down.

6.1.4. Alterações moleculares

6.1.4.1 Identificação das mutações

As mutações somáticas no gene *GATA1* foram testadas em 70 (77,8%) dos 90 pacientes com M7. Em 22,2% dos casos não puderam ser identificados por indisponibilidade ou insuficiência de amostra. Encontrado 52 (74,3%) de mutação no *GATA1* após a conclusão das análises dos sequenciamentos nos casos testados. As características das mutações somáticas no éxon 2 do gene *GATA1* estão descritas no Apêndice D. Em geral, a frequência de mutações no *GATA1* de acordo com a região gênica variou (Figura 6.3), porém 4 pacientes apresentaram a mutação c.90_91delAG, e 2 pacientes apresentaram c.201G>A (p.E67E).

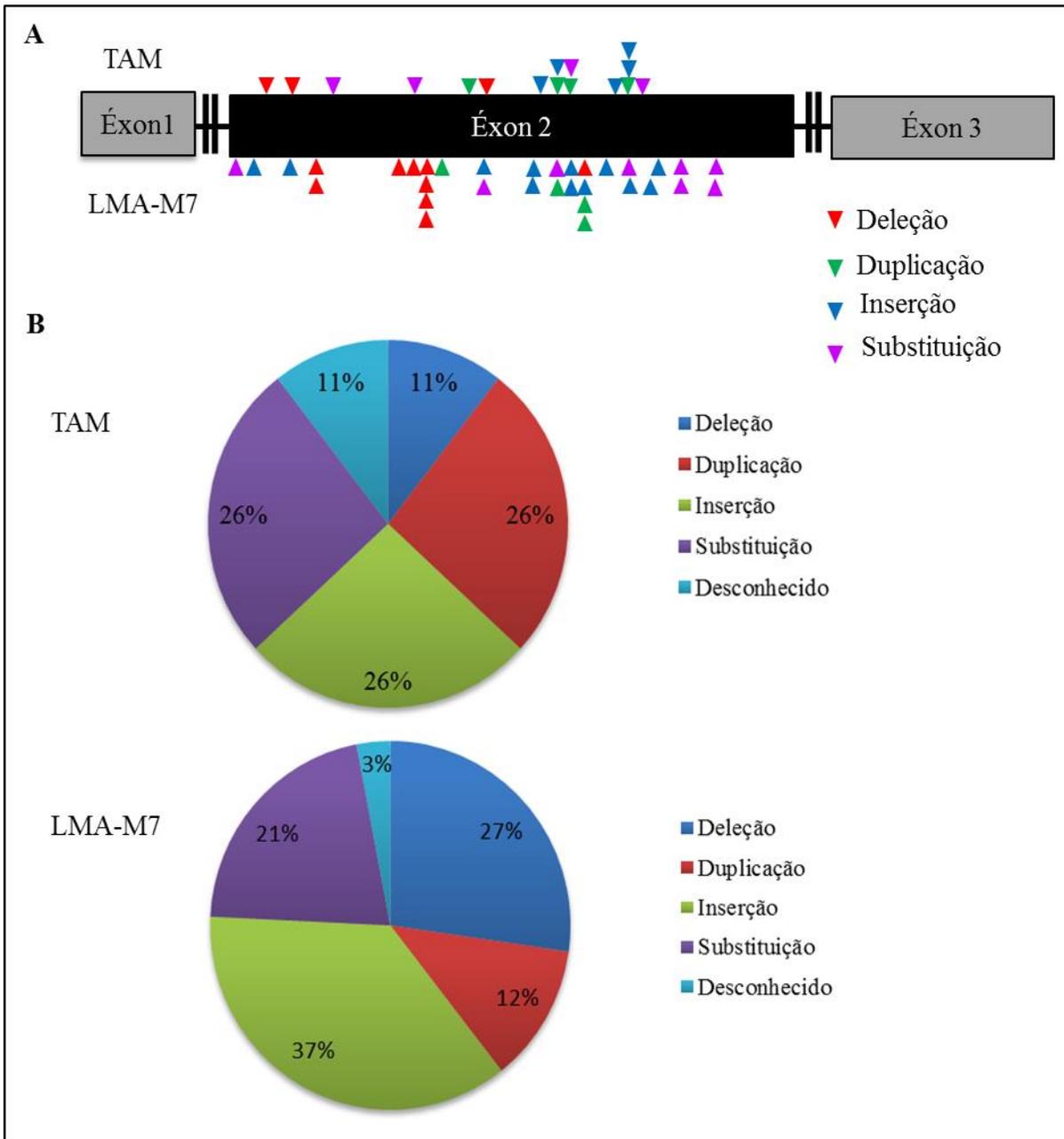


Figura 6.3. Ilustração das posições e tipos de mutações do *GATA1* em 52 casos com TAM ou LMA. A) Diagrama esquemático do *GATA1* mostrando as posições e tipos de mutações no éxon 2, sendo que cada triângulo representa um paciente; B) Frequência dos tipos de mutações em TAM e LMA-M7.

6.1.4.2 Identificação e classificação do tipo de mutação

A identificação das mutações pelo sequenciamento do éxon 2 permitiu sua classificação em três categorias de acordo com a localização: 1) Perda da primeira metionina; 2) Erro de *splicing*; 3) Códon de terminação precoce (PTC). Este último foi classificado em 02 subgrupos: a) PTC 1, antes da metionina 84 (PTC1-3' e PTC 1-5'); b) PTC 2 após a metionina 84. O tipo de mutação mais frequente foi PTC 1-5' em 23 casos, seguido do PTC 2 em 13, PTC1-3' em 5, erro de *splicing* em 3 e perda da primeira metionina em 1 (Figura 6.3). Não foi possível identificação do tipo de mutação para 7 (7,2%) casos.

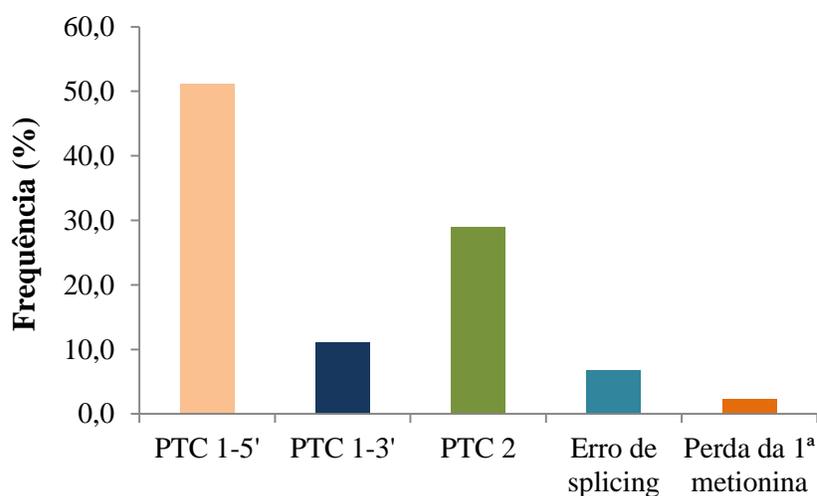


Figura 6.4. Frequência do tipo de mutações do *GATA1* de acordo com a localização de 45 casos com TAM ou LMA, Brasil 2000-2014. Excluído 7 casos, cuja localização não foi identificada.

6.1.4.3 Classificação do perfil de expressão dos transcritos gênicos do *GATA1*

Posterior à identificação do tipo de mutação conforme sua localização no éxon 2, foi realizada análise quantitativa após RT-PCR por meio de oligonucleotídeos específicos, conforme descritos no Apêndice E. Esta análise permitiu a classificação do perfil de expressão dos

transcritos gênicos do *GATA1*. Para isto, foram testadas 32 amostras. Devido à restrição de disponibilidade e acessibilidade de RNA das amostras, nem todos os 52 casos com *GATA1* mutado foram avaliados para a expressão dos transcritos.

Nesta análise, foi observado que o tipo de mutação afeta a quantidade de expressão dos transcritos (Figura 6.5). Os pacientes com erro de *splicing* e PTC1-3' apresentaram maiores níveis de expressão, enquanto PTC 1-5' e PTC 2 apresentaram menores níveis de expressão. A expressão do PTC 1-5' teve mediana de 1,0 (variou de 1-3); PTC 1-3' mediana de 10,5 (variou de 9-17); PTC 2 mediana de 3,0 (variou de 1-6); e Erro de *splicing* mediana de 11,0 (variou de 9-17). Perda da primeira metionina foi encontrada somente em um caso, mas devido à indisponibilidade de amostra não foi realizada análise para identificação do perfil de expressão.

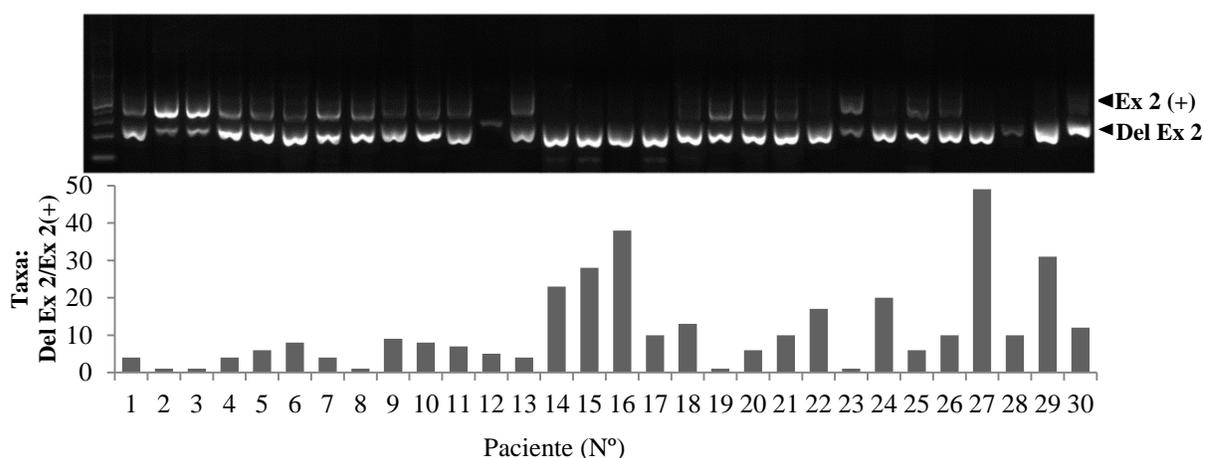


Figura 6.5. Ilustração do RT-PCR de células blásticas de TAM ou LMA com *GATA1* mutado. As amostras testadas obedecem à ordem por tipo de mutação: 1 a 13 mutação tipo PTC 1-5'; 14 a 17 mutação tipo PTC 1-3'; 18 a 26 mutação tipo PTC 2; e 27 a 29 erro de *splicing*; 30, controle (K562).

6.1.5. Tratamento quimioterápico e evolução da doença

Nesta série de casos com LMA ou TAM, 66 (68,0%) pacientes receberam tratamento quimioterápico sistêmico de acordo com protocolos vigentes. Destes, três neonatos com TAM receberam unicamente ARA-C subcutâneo. Os protocolos de terapia “AML-BFM 2004 INTERIM” para o tratamento de Leucemia Mieloide Aguda em crianças e adolescentes e BFM (1983, 1986, 1987, 1995, 1998 e 2002) foram os mais utilizados (53,0%), seguidos do “POG Study 9421” (27,3%), protocolo especial para pacientes com LMA e SD. Foram observadas remissão clínica inicial em 78,3% dos casos, resposta completa em 67,3% e recorrência de leucemia em 11,1%. Todos os pacientes com TAM apresentaram remissão clínica espontânea e quatro evoluíram para óbito em decorrência de infecção ou de complicações pós-cirurgia cardíaca. Morte ocorreu em 53,6%, com morte precoce (≤ 6 meses do diagnóstico) em 29,9% dos casos, principalmente na fase de indução de remissão (39,0%) devido à aplasia grave com consequente septicemia em 73,2% dos casos (Tabela 6.3). Uma das crianças com LMA-M7 foi tratada como LLA, evoluindo a óbito após 13 dias de início da indução por aplasia severa e consequente septicemia. O TMO foi realizado somente em um de 71 casos com LMA. Esta criança apresentava *GATA1* mutado ao diagnóstico. Ao seguimento, se encontrava viva, porém ainda mantém doença residual mínima (0,3% de blastos em fevereiro/2014).

Tabela 6.3. Características relacionadas ao tratamento quimioterápico e evolução da doença de 97 crianças diagnosticadas com TAM ou LMA, Brasil 2000-2014

Características	No. de pacientes (%)
Tratamento quimioterápico	
Sim	66 (68,0)
Não	26 (26,8)
Sem informação	5 (5,2)
Protocolo de tratamento	
BFM	35 (53,0)
POG	18 (27,3)
Outros	12 (18,2)
Sem informação	1 (1,5)
Remissão clínica inicial	
Sim	47 (78,3)
Não	5 (8,3)
Sem informação	8 (13,3)
Resposta ao tratamento	
Completa	37 (67,3)
Parcial	5 (9,1)
Falha	5 (9,1)
Sem informação	8 (14,5)
Recaída	
Sim	5 (11,1)
Não	32 (71,1)
Sem informação	8 (17,8)
Status	
Vivo	52 (53,6)
Morto	41 (42,3)
Sem informação	4 (4,1)
Morte Precoce	
Sim	29 (29,9)
Não	64 (66,0)
Sem informação	4 (4,1)
Momento do óbito	
Pré-terapia	8 (19,5)
Indução	16 (39,0)
Intensificação	7 (17,1)
Pós-terapia	7 (17,1)
Sem informação	3 (7,3)
Causa do óbito	
Toxicidade	30 (73,2)
Progressão de doença	7 (17,1)
Outros*	4 (9,8)

n, número total de pacientes.* Um caso evoluiu a óbito por broncoaspiração e três por complicações pós-cirurgia cardíaca.

Em relação às doses de ARA-C e dos Antracíclicos (doxorrubicina, adriamicina ou idarrubicina), principais drogas utilizadas no tratamento da leucemia mieloide em pacientes com e sem SD, os médicos relataram redução de dose em somente 32,0% dos casos para ARA-C e 42,3% para os antracíclicos, sendo que em 1,0% dos casos não foram obtidas estas informações. A dose de Ara-C variou de 40 a 46.500 mg/m² (ou quilograma de peso) com mediana de 3.740 e a dose dos Antracíclicos variou de 6 a 390 mg/m² (ou quilograma de peso) com mediana de 57. As ilustrações dos esquemas terapêuticos de pacientes tratados com os protocolos mais utilizados estão representados no APÊNDICE F. Os relatos de toxicidade relacionadas ao regime terapêutico durante a fase de indução e intensificação/consolidação dos casos analisados estão representados na Tabela 6.4.

Tabela 6.4. Toxicidade durante a fase de indução e intensificação de 66 crianças diagnosticadas com LMA e submetidas ao tratamento quimioterápico sistêmico, Brasil, 2000-2014

Sítio de toxicidade	Indução, n (%)	Intensificação, n (%)
Cardíaca		
Sim	1 (1,5)	4 (8,0)
Não/ignorado†	62 (93,9)	43 (86,0)
Sem informação	3 (4,5)	3 (6,0)
Gastrointestinal		
Sim	20 (30,3)	22 (44,0)
Não/ignorado†	43 (65,2)	25 (50,0)
Sem informação	3 (4,5)	3 (6,0)
Hematológica		
Sim	54 (81,8)	36 (72,0)
Não/ignorado†	9 (13,6)	11 (22,0)
Sem informação	3 (4,5)	3 (6,0)
Outros		
Sim*	0 (0,0)	2 (4,0)
Não/ignorado†	0 (0,0)	45 (90,0)
Sem informação	0 (0,0)	3 (6,0)

n, número total de pacientes. †Não encontrado relato nos prontuários hospitalares. *Um com toxicidade dermatológica (*rash* cutâneo) e um com toxicidade neurológica.

6.2. ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO

6.2.1 Comparação entre as duas categorias diagnósticas

Foram comparadas as crianças diagnosticadas com TAM e LMA, conforme representado na Tabela 6.5. Para as características demográficas e clínicas obteve-se uma distribuição similar e sem diferenças estatisticamente significantes entre os dois tipos de diagnósticos, exceto para a idade ($p < 0,001$). O sexo masculino representando 58,8% de TAM e 55,6% dos casos de LMA, e o sexo feminino 41,2% e 44,8%, respectivamente. Em relação à cor da pele, houve predominância da cor branca para ambos os diagnósticos, com discreto aumento para LMA (74,6%) comparado com TAM (64,7%). Em aproximadamente metade das crianças houve relato de cardiopatia congênita ao diagnóstico. Na apresentação clínica inicial, foi observado também discreto aumento na frequência nos pacientes com LMA com hepatomegalia (76,2%), esplenomegalia (68,3%) e linfonodomegalia (14,3%) comparado com 58,8%, 55,9% e 5,9% nos casos com TAM, respectivamente. Leucemia “cutis”/cloroma foi observada somente em 4,8% dos casos de LMA, não sendo encontrado relato em TAM. Mutações no *GATA1* foi mais frequente em TAM ($p=0,019$). A abordagem terapêutica adequada foi mais observada nos pacientes com TAM (90,3%) que nos pacientes com LMA (44,1%) de sendo essas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,001$).

Ao seguimento, foi identificado que 74,2% dos casos de TAM estavam vivos, enquanto 46,8% dos casos de LMA evoluíram a óbito ($p = 0,012$). Apenas cinco crianças foram seguidas por menos de 15 dias, e destas uma recebeu quimioterapia. E em relação ao tempo para o óbito, 22,6% as crianças com TAM morreram em até 6 meses após o diagnóstico, enquanto 35,5% de LMA. Além disso, 75% das crianças com TAM morreram antes do início da terapia, enquanto a maioria das crianças (93,3%) com LMA morreram durante ou pós-terapia, ($p = 0,001$).

Em relação às características laboratoriais, foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos casos TAM e LMA para leucometria que variou de 4,6 a $95 \times 10^9/l$ (mediana= 281) e 2,3 a $217 \times 10^9/l$ (mediana= 105) ($p=0,004$); níveis de hematócrito de 4 a 58% (mediana=

38) e 11 a 51% (mediana= 26) ($p=0,002$); níveis de hemoglobina de 5,4g/dL a 19 (mediana= 12) e 3,8 a 57g/dL (mediana 8) ($p=0,001$); e plaquetas de 16 a 490 $\times 10^9/l$ (mediana= 79) e 7 a 255 $\times 10^9/l$ (mediana= 35) ($p=0,005$), respectivamente. Para a contagem absoluta de blastos não houve diferenças estatisticamente significantes ($p= 0,872$).

Tabela 6.5. Fatores associados ao diagnóstico de 34 neonatos com TAM *versus* 63 crianças com LMA, Brasil 2000- 2014

Características	TAM, N (%)	LMA, N (%)	RR (IC 95%)	<i>p</i> -Valor
Idade (meses)				
≤3	34 (100,0)	0 (0,0)	ND	<0,001
>3	0 (0,0)	63 (100,0)		
Gênero				
Masculino	20 (58,8)	35 (55,6)	0,9 (0,7-1,2)	0,757
Feminino	14 (41,2)	28 (44,4)		
Cor da pele				
Branca	22 (64,7)	47 (74,6)	1,1 (0,8-1,7)	0,305
Não branca	12 (35,3)	16 (25,4)		
Cardiopatía congênita				
Sim	15 (44,1)	34 (54,0)	1,1 (0,8-1,5)	0,355
Não	19 (55,9)	29 (46,0)		
Hepatomegalia				
Sim	20 (58,8)	48 (76,2)	1,3 (0,9-2,0)	0,075
Não	14 (41,2)	15 (23,8)		
Esplenomegalia				
Sim	19 (55,9)	43 (68,3)	1,2 (0,9-1,7)	0,226
Não	15 (44,1)	20 (31,7)		
Linfonodomegalia				
Sim	2 (5,9)	9 (14,3)	1,3 (0,9-1,7)	0,319
Não	32 (94,1)	54 (85,7)		
Leucemia“cutis”/cloroma				
Sim	0 (0,0)	3 (4,8)	1,3 (1,2-1,5)	0,562
Não	34 (100,0)	60 (95,2)		
Mutação <i>GATA1</i>				
Mutado	25 (89,3)	27 (64,3)	0,6 (0,4-0,8)	0,019
Selvagem	3 (10,7)	15 (35,7)		
PTC 1-5'				
Sim	9 (40,9)	14 (60,9)	1,4 (0,8-2,7)	0,181
Não	13 (59,1)	9 (39,1)		
PTC 1-3'				
Sim	3 (13,6)	2 (8,7)	0,7 (0,2-2,3)	0,665
Não	19 (86,4)	21 (91,3)		
PTC 2				
Sim	8 (36,4)	5 (21,7)	0,6 (0,3-1,4)	0,279

Não	14 (63,6)	18 (78,3)		
Erro de <i>splicing</i>				
Sim	2 (9,1)	1 (4,3)	0,6 (0,1-3,2)	0,608
Não	20 (90,9)	22 (95,7)		
Tratamento quimioterápico				
Sim	7 (22,6)	59 (96,7)	11,6 (3,0-44,1)	<0,001
Não	24 (77,4)	2 (3,3)		
Tratamento Adequado	28 (90,3)	26 (44,1)	0,5 (0,4-0,7)	<0,001
Inadequado	3 (9,7)	33 (55,9)		
Recaída				
Sim	0 (0,0)	5 (15,2)	ND	1,000
Não	4 (100,0)	28 (84,8)		
Status				
Vivo	23 (74,2)	29 (46,8)	0,7 (0,5-0,9)	0,012
Morto	8 (25,8)	33 (53,2)		
Morte precoce				
Sim	7 (22,6)	22 (35,5)	1,2 (0,9-1,6)	0,205
Não	24 (77,4)	40 (64,5)		
Momento do óbito				
Pré-terapia	6 (75,0)	2 (6,7)	0,3 (0,1-0,8)	<0,001
Durante ou Pós-terapia	2 (25,0)	28 (93,3)		

n, número total de pacientes; ND, não disponível. LMA, leucemia mieloide aguda; TAM, mielopose anormal transitória. Em negrito valores estatisticamente significantes.

6.2.2 Análises dos casos de acordo com a evolução da LM-SD

Foram comparadas as crianças que evoluíram para LM-SD *versus* as que não evoluíram, conforme representado na Tabela 6.6. As características clínicas e demográficas não demonstraram diferenças estatisticamente significantes entre ambos. No entanto, em relação às características moleculares, foi observado risco 2,7 vezes maior nos casos com mutação no *GATA1* ($p=0,030$) naqueles que evoluíram para LM-SD. Além disso, ao analisar a associação do tipo de mutação, foi observado que de 21 pacientes, 15 (75,0%) com mutação tipo PTC 1-5' desenvolveram leucemia. Esta diferença foi estatisticamente significativa com $RR=3,0$. Além disso, foi observado que de 13 pacientes com mutação tipo PTC 2 apenas três (13,6%) desenvolveram LM-SD. Esta diferença foi estatisticamente significativa como fator provável de proteção [$RR=0,4$; $IC95\%$: 0,1-1,1; $p=0,033$]. Não foi observada diferença estatisticamente significativa para mutação tipo PTC 1-3' e erro de *splicing*.

Tabela 6.6. Fatores associados à evolução para LM-SD em crianças com imunofenótipo M7, Brasil 2000-2014

Características	Com evolução para LM-SD, N (%)	Sem evolução para LM-SD, N (%)	RR (IC 95%)	<i>p</i> -Valor
Gênero				
Masculino	16 (53,3)	31 (59,6)	0,8 (0,5-1,5)	0,580
Feminino	14 (46,7)	21 (40,4)		
Cor da pele				
Branca	20 (66,7)	40 (76,9)	0,7 (0,4-1,3)	0,438
Não branca	10 (33,3)	12 (23,1)		
Leucometria				
<100	27 (90,0)	48 (94,1)	0,7 (0,3-1,6)	0,665
≥100	3 (10,0)	3 (5,9)		
Plaquetas				
<100	21 (80,8)	42 (85,7)	0,8 (0,4-1,7)	0,742
≥100	5 (19,2)	7 (14,3)		
Hepatomegalia				
Sim	22 (73,3)	38 (73,1)	1,0 (0,5-1,9)	0,980
Não	8 (26,7)	14 (26,9)		
Esplenomegalia				
Sim	21 (70,0)	33 (63,5)	1,2 (0,6-2,2)	0,548
Não	9 (30,0)	19 (36,5)		
Mutação <i>GATA1</i>				
Mutado	22 (88,0)	26 (63,4)	2,7 (1,0-8,0)	0,030
Selvagem	3 (12,0)	15 (36,6)		
Mutação PTC 1-5'				
Sim	15 (75,0)	6 (27,3)	3,0 (1,3-6,7)	0,002
Não	5 (25,0)	16 (72,7)		
Mutação PTC 1-3'				
Sim	1 (5,0)	3 (13,6)	0,5 (0,1-2,8)	0,608
Não	19 (95,0)	19 (86,4)		
Mutação PTC 2				
Sim	3 (15,0)	10 (45,5)	0,4 (0,1-1,1)	0,033
Não	17 (85,0)	12 (54,5)		
Mutação Erro de <i>splicing</i>				
Sim	1 (5,0)	2 (9,1)	0,7 (0,1-3,5)	1,000
Não	19 (95,0)	20 (90,9)		

n, número total de pacientes. LMA, leucemia mieloide aguda; PTC 1, antes da metionina 84 (PTC 1-3' e PTC 1-5'); PTC 2, após a metionina 84. Em negrito valores estatisticamente significantes.

6.2.3 Análise dos casos de acordo com os tipos de mutação

Conforme observado no item 6.1.4 na Figura 6.4, o tipo de mutação afeta a quantidade de expressão dos transcritos. Os tipos de mutação erro de *splicing* e PTC1-3' apresentam maiores níveis de expressão, enquanto PTC 1-5' e PTC 2 apresentam menores níveis de expressão. Foram analisados os fatores associados com os tipos de mutação com menores (PTC 1-5' e PTC 2) *versus* maiores níveis de expressão (erro de *splicing* e PTC1-3') das crianças diagnosticadas com TAM e LMA. Nenhum fator clínico, demográfico ou biológico se mostrou estatisticamente significativo (APÊNDICE G). Entretanto, ao realizar o teste não paramétrico “Mann-Whitney U” para as variáveis numéricas como características laboratoriais, idade (expressa em mês), tempo até a remissão e doses cumulativas das drogas utilizadas no tratamento quimioterápico, foi encontrada diferença estatisticamente significativa somente para o tempo até remitir para tipos de mutação com menores (PTC 1-5' e PTC 2) *versus* maiores níveis de expressão (erro de *splicing* e PTC1-3') ($p=0,047$). Os tipos de mutação com maiores níveis de expressão apresentam menor tempo de remissão com mediana de 9 dias ($p=0,047$) enquanto que os tipos de mutação com menores níveis de expressão apresentam mediana de 31,5 dias ($p=0,075$) (Tabela 6.7)

Tabela 6.7. Fatores associados ao tipo de mutação e níveis de expressão dos transcritos gênicos do *GATA1* de 45 crianças com TAM ou LMA, Brasil 2000-2014

Características	PTC 1-5' e PTC 2	Erro de splicing e PTC 1-3'	<i>p</i> -Valor
	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	
Idade (mês)	18,4 (0,1-32)	12,0 (0,4-33,5)	0,867
Leucometria ($10 \times 10^9/l$)	14,3 (3,3-150)	29,0 (3-90,7)	0,338
Hemoglobina (g/dL)	6,7 (5,7-9,2)	6,0 (5-17)	1,000
Blastos (%)	68,0 (0-99)	86,0 (48-90)	0,089
Hematócrito (%)	19,6 (17-28)	19,0 (15-48)	0,712
Plaqueta ($10 \times 10^9/l$)	21,2 (10-45)	30,0 (10-188)	0,278
Tempo até remitir (dia)	31,5 (11-169)	9,0 (8-21)	0,047
Dose de ARA-C (mg/kg)	7,6 (1,4-45)	16,0 (900-46,5)	0,424
Dose de Antracíclicos (mg/kg)	36,0 (20-210)	39,0 (24-50)	0,344

PTC 1, antes da metionina 84 (PTC 1-3' e PTC 1-5'); PTC 2, após a metionina 84. Em negrito valores estatisticamente significantes.

6.2.4 Análises dos casos de acordo com a letalidade

Foram analisados os fatores associados ao óbito das crianças diagnosticadas com TAM e LMA, conforme representado nas Tabelas 6.8 e 6.9. Foi observada diferença estatisticamente significativa nos pacientes diagnosticados com TAM para a variável cardiopatia congênita ($p=0,043$). Para LMA, nenhum fator clínico, demográfico ou biológico se mostrou estatisticamente significativo.

Tabela 6.8. Fatores associados ao óbito de 31 crianças diagnosticadas com TAM, Brasil 2000-2014

Características	Vivo, N (%)	Morto, N (%)	RR (IC 95%)	p-Valor
Gênero				
Masculino	14 (60,9)	5 (62,5)	0,9 (0,6-1,5)	1,000
Feminino	9 (39,1)	3 (37,5)		
Cor da pele				
Branca	16 (69,6)	5 (62,5)	1,0 (0,7-1,7)	1,000
Não branca	7 (30,4)	3 (37,5)		
Cardiopatía congênita				
Sim	7 (30,4)	6 (75,0)	0,6 (0,4-1,0)	0,043
Não	16 (69,6)	2 (25,0)		
Leucometria				
<50	14 (60,9)	4 (50,0)	1,1 (0,7-1,7)	0,689
≥50	9 (39,1)	4 (50,0)		
Hepatomegalia				
Sim	15 (65,2)	4 (50,0)	1,1 (0,7-1,8)	0,676
Não	8 (34,8)	4 (50,0)		
Esplenomegalia				
Sim	14 (60,9)	4 (50,0)	1,2 (0,7-1,7)	0,689
Não	9 (39,1)	4 (50,0)		
Linfonodomegalia				
Sim	0 (0,0)	1 (12,5)	ND	0,258
Não	23 (100,0)	7 (87,5)		
Mutação somática (<i>GATA1</i>)				
Mutado	16 (88,9)	6 (85,7)	1,0 (0,5-2,5)	1,000
Selvagem	2 (11,1)	1 (14,3)		
Mutação PTC 1-5'				
Sim	4 (26,7)	4 (80,0)	0,5 (0,3-1,1)	0,109
Não	11 (73,3)	1 (20,0)		
Mutação PTC 1-3'				
Sim	2 (13,3)	0 (0,0)	ND	1,000
Não	13 (86,7)	5 (100,0)		
Mutação PTC 2				
Sim	7 (46,7)	1 (20,0)	1,3 (0,8-2,1)	0,603
Não	8 (53,3)	4 (80,0)		
Mutação Erro de <i>splicing</i>				
Sim	2 (13,3)	0 (0,0)	ND	1,000
Não	13 (86,7)	5 (100,0)		
Tratamento quimioterápico				
Adequado	21 (91,3)	7 (87,5)	1,1 (0,5-2,5)	1,000
Inadequado	2 (8,7)	4 (12,5)		

n, número total de pacientes; ND, não disponível. PTC 1, antes da metionina 84 (PTC 1-3' e PTC 1-5'); PTC 2, após a metionina 84. TAM, mielopose anormal transitória.

Tabela 6.9. Fatores associados ao óbito de 62 crianças diagnosticadas com LMA, Brasil 2000-2014

Características	Vivo, N (%)	Morto, N (%)	RR (IC 95%)	<i>p</i> -Valor
Idade (meses)				
<24	21 (72,4)	24 (72,7)	0,9 (0,5-1,8)	0,978
≥ 24	8 (27,6)	9 (27,3)		
Gênero				
Masculino	14 (48,3)	21 (63,6)	0,7 (0,4-1,2)	0,224
Feminino	15 (51,7)	12 (36,4)		
Cor da pele				
Branca	23 (79,3)	23 (69,7)	1,3 (0,6-2,6)	0,388
Não branca	6 (20,7)	10 (30,3)		
Cardiopatía congênita				
Sim	15 (51,7)	18 (54,5)	0,9 (0,5-1,6)	0,824
Não	14 (48,3)	15 (45,5)		
Leucometria				
<50	26 (89,7)	31 (93,9)	0,7 (0,4-1,6)	0,658
≥50	3 (10,3)	2 (6,1)		
Subtipo imunofenotípico (FAB)				
M7	26 (89,7)	29 (87,9)	1,1 (0,5-2,7)	1,000
Outros	3 (10,3)	4 (12,1)		
Hepatomegalia				
Sim	22 (75,9)	25 (75,8)	1,0 (0,5-1,8)	0,992
Não	7 (24,1)	8 (24,2)		
Esplenomegalia				
Sim	21 (72,4)	21 (63,6)	1,2 (0,7-2,3)	0,461
Não	8 (27,6)	12 (36,4)		
Linfonodomegalia				
Sim	4 (13,8)	5 (15,2)	0,9 (0,4-2,0)	1,000
Não	25 (86,2)	28 (84,8)		
Leucemia“cutis”/cloroma				
Sim	3 (10,3)	0 (0,0)	ND	0,097
Não	26 (89,7)	33 (100,0)		
Evolução para LM-SD*				
Sim	11 (45,8)	12 (46,2)	1,0 (0,6-1,8)	0,982
Não	13 (54,2)	14 (53,8)		
Mutação somática (<i>GATA1</i>)				
Mutado	13 (59,1)	13 (68,4)	0,8 (0,5-1,5)	0,536
Selvagem	9 (40,9)	6 (31,6)		
Mutação PTC 1-5'				
Sim	7 (63,6)	6 (54,5)	1,2 (0,5-2,9)	1,000
Não	4 (36,4)	5 (45,5)		
Mutação PTC 1-3'				
Sim	1 (9,1)	1 (9,1)	1,0 (0,2-4,2)	1,000

Não	10 (90,9)	10 (90,9)		
Mutação PTC 2				
Sim	3 (27,3)	2 (18,2)	1,2 (0,5-3,0)	1,000
Não	8 (72,7)	9 (81,0)		
Mutação Erro de <i>splicing</i>				
Sim	0 (0,0)	1 (9,1)	ND	1,000
Não	11 (100,0)	10 (90,9)		
Tratamento quimioterápico				
Adequado	14 (50,0)	12 (38,7)	1,3 (0,7-2,1)	0,438
Inadequado	14 (50,0)	19 (61,3)		

n, número total de pacientes; ND, não disponível. LMA, leucemia mieloide aguda. PTC 1, antes da metionina 84 (PTC 1-3' e PTC 1-5'); PTC 2, após a metionina 84.*TAM com evolução para leucemia mieloide da síndrome de Down.

6.2.5 Análises dos casos de acordo com a sobrevivência

O tempo de seguimento variou de 01 dia a 13,3 anos, com mediana de 11,2 meses. A SG em 60 meses, foi calculada para todos os casos (Figura 6.6). A mediana não foi atingida, visto que mais de 50% das crianças estavam vivas depois dos 5 anos. Foi observado SG de 52,9% em 60 meses.

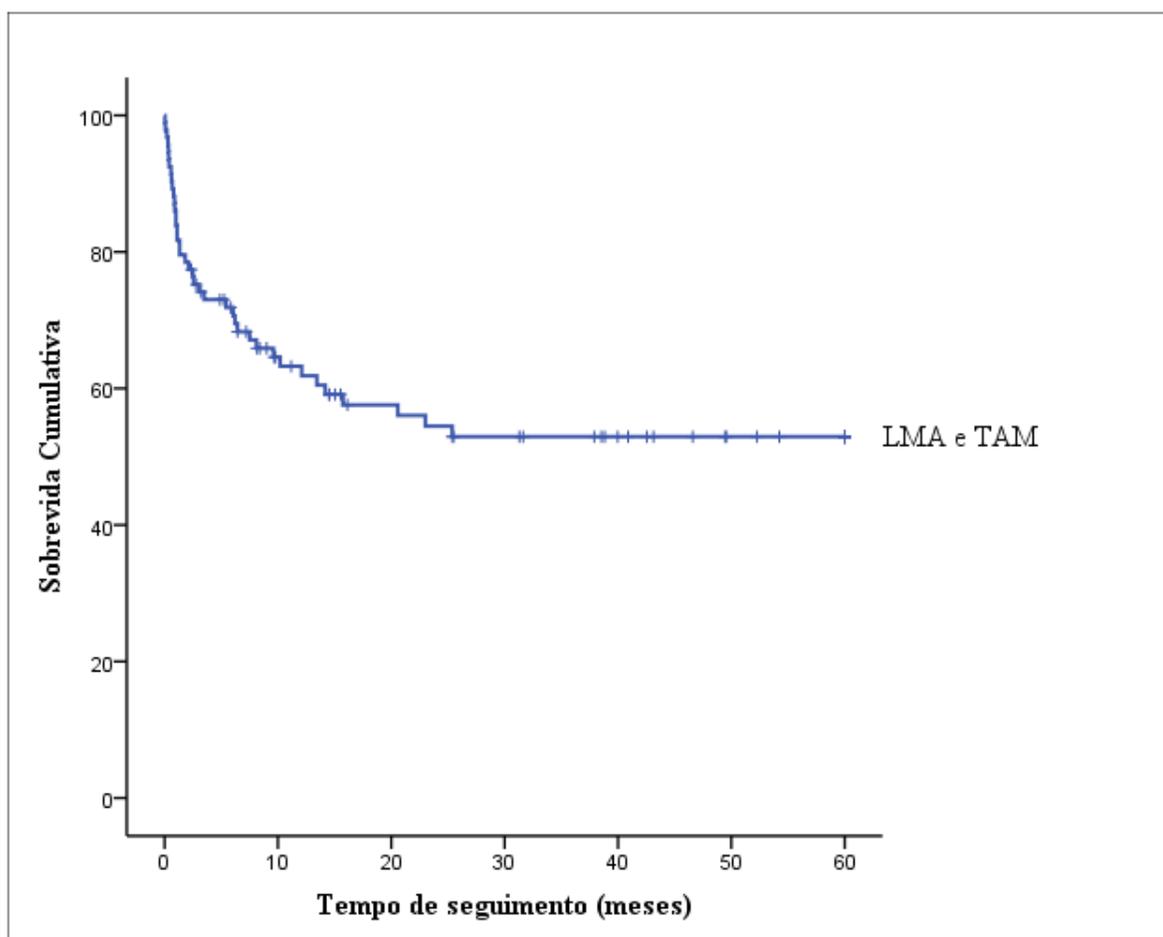


Figura 6.6. Análise de sobrevivência em 5 anos entre as duas categorias diagnósticas, Brasil 2000-2014.

Quanto ao diagnóstico, observou-se que crianças diagnosticadas com TAM apresentaram melhor curva de sobrevida do que as diagnosticadas com LMA, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,057$) (Figura 6.7). Foi observada mediana de 20,6 (IC 95%: 6,2-34,8) para LMA. A mediana para TAM não foi atingida.

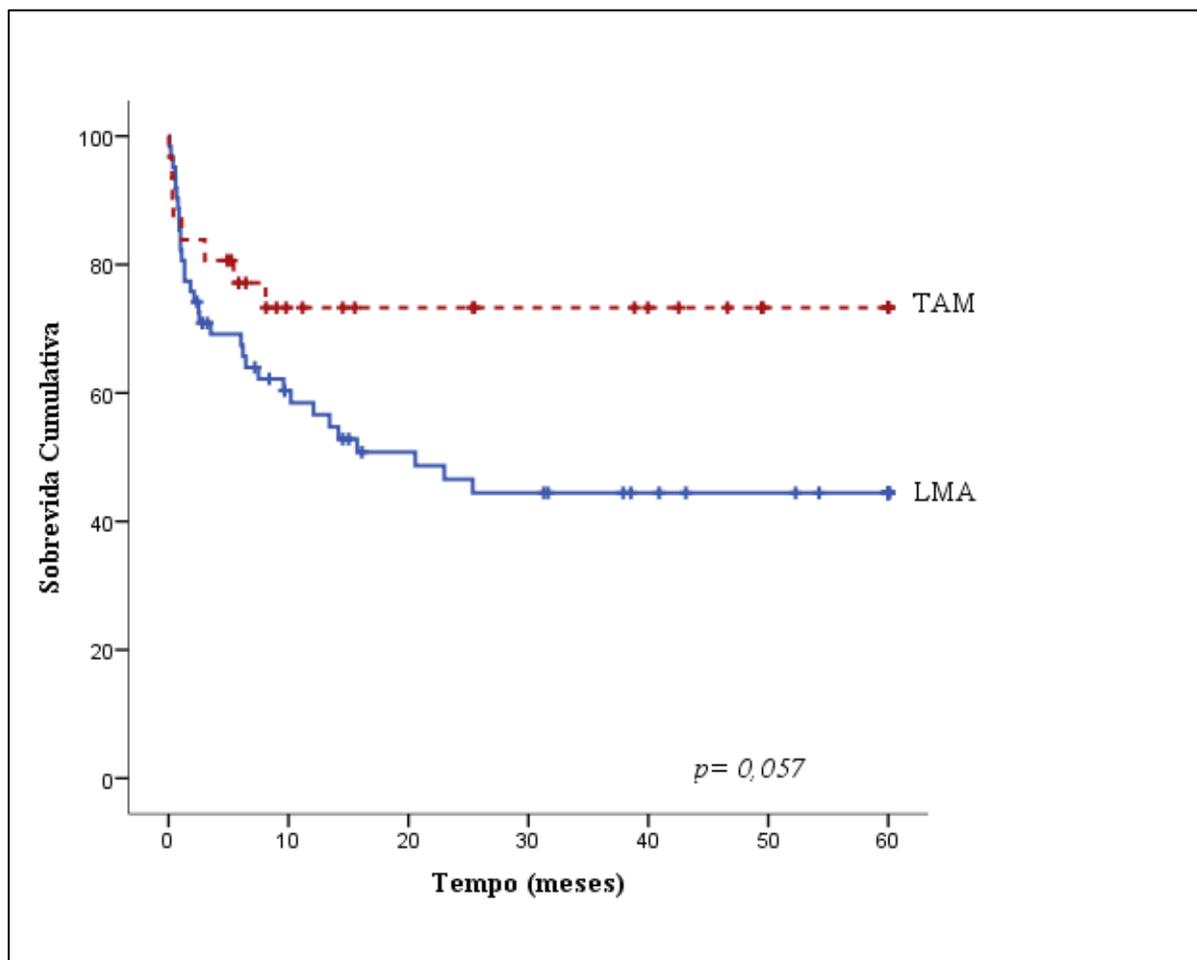


Figura 6.7. Análise de sobrevivência em 5 anos de casos de TAM ou LMA, Brasil 2000-2014.

Os percentuais de pacientes vivos em 60 meses foram estimados, conforme as variáveis demográficas, biológicas e clínicas dos casos com LMA. Foram observadas diferenças clinicamente importantes, mas não estatisticamente significantes para: idade ao diagnóstico, cor da pele, leucometria, hepatomegalia, TAM com evolução para LM-SD e tratamento adequado (Tabela 6.11). A ausência de significância estatística se deve provavelmente, à pequena quantidade de pacientes estudada.

Os valores de sobrevida em 2 e 5 anos são praticamente idênticos, já que houve apenas um óbito após 24 meses (Apêndice H).

Tabela 6.10. Análise de sobrevida em 5 anos de 69 crianças diagnosticadas com LMA, Brasil 2000-2014

Características	Total, N/ Eventos, N	Sobrevida em 5 anos, Mediana (IC 95%)	p-Valor
Idade (meses)			
<24	45/23	20,6 (7,8-33,3)	0,705
≥24	17/9	6,0 (ND)	
Gênero			
Masculino	35/21	12,1 (6,2-18,0)	0,227
Feminino	27/11	ND	
Cor da pele			
Branca	46/22	20,5 (ND)	0,491
Não branca	16/10	13,4 (0,0-34,3)	
Cardiopatía congênita			
Sim	33/17	20,5 (0,0-47,7)	0,779
Não	29/15	15,7 (0,0-32,0)	
Leucometria			
<50	57/30	15,7 (2,0-29,4)	0,773
≥50	5/2	ND	
Hepatomegalia			
Sim	47/25	15,7 (0,6-30,9)	0,533
Não	15/7	ND	
Esplenomegalia			
Sim	42/21	15,7 (ND)	0,753
Não	20/11	20,6 (0,5-40,6)	
Linfonodomegalia			
Sim	9/5	23,0 (0,0-63,4)	0,759
Não	53/27	20,5 (ND)	
Leucemia “cutis”/cloroma*			
Sim	3/0	ND	0,121
Não	59/32	ND	
Mutação somática (<i>GATA1</i>)			
Mutado	26/13	15,7 (ND)	0,567
Selvagem	15/6	ND	
Mutação PTC 1-5'			
Sim	13/6	ND	0,988
Não	9/5	15,7 (0,0-39,4)	
Mutação PTC 1-3'			
Sim	2/1	6,0 (ND)	0,772
Não	20/10	15,7 (ND)	
Mutação PTC 2			
Sim	5/2	ND	0,587
Não	17/9	6,0 (ND)	
Mutação Erro de <i>splicing</i>			
Sim	1/1	1,8 (ND)	0,291
Não	21/10	15,7 (ND)	
Evolução para LM-SD*			
Sim	23/12	25,3 (ND)	0,632
Não	27/14	14,1 (0,0-35,5)	

Tratamento			
Adequado	26/12	25,3 (8,3-42,4)	0,715
Inadequado	33/18	13,4 (ND)	

n, número total de pacientes; ND, não disponível; IC, intervalo de confiança; PTC 1, antes da metionina 84 (PTC 1-3' e PTC 1-5'); PTC 2, após a metionina 84.*Todos os casos foram censurados. *TAM com evolução para leucemia mieloide da síndrome de Down.

7. DISCUSSÃO

No Brasil, o percentual de tumores pediátricos observado nos Registros de câncer de base populacional (RCBP) encontra-se próximo a 3%, sendo estimado cerca de 11.840 casos novos de câncer em crianças e adolescentes com idade ≤ 19 anos para o ano de 2014. Os registros estimam que as regiões que apresentarão os maiores números de casos novos serão Sudeste (5.600 casos novos) e Nordeste (2.790 casos novos), seguidos pelas regiões Sul (1.350 casos novos), Centro-Oeste (1.280 casos novos) e Norte (820 casos novos). Além disso, as neoplasias ocuparam a segunda causa de morte em crianças e adolescentes com 2.812 (7%) de óbitos em 2011, perdendo somente por morte devida causas externas, configurando-se como a doença que mais mata (COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA, INCA, 2014).

As neoplasias pediátricas na SD não têm sido exploradas pelos RCBP neste país, e este é o primeiro estudo na população brasileira com SD e TAM ou LMA. Esta coorte trouxe informações relevantes no cenário epidemiológico-molecular brasileiro, visto que neste estudo foram acrescentados novos casos de TAM e LMA com e sem mutação no gene *GATA1*, análises sobrevida, letalidade, bem como as características de tratamento não abordadas nos estudos (MAGALHAES *et al.*, 2006; AMORIM *et al.*, 2009).

As proliferações mieloides clonais associadas à SD, como TAM e LMA-M7, têm características clínicas, morfológicas e imunofenotípicas distintas das LMAs em crianças sem SD que justifica sua separação de outras neoplasias e condutas terapêuticas (MASSEY *et al.*, 2006; VARDIMAN *et al.*, 2009). Devido à semelhança no fenótipo clínico dessas proliferações mieloides na SD, e por sua vez diferentes das doenças mieloproliferativas de crianças sem SD, Hasle *et al.* (2003) propôs que uma categoria adicional denominada leucemia mieloide da SD (LM-SD) fosse incluída na classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS). O argumento é que crianças com doenças mieloproliferativas na SD são boas respondedoras aos tratamentos quimioterápicos e apresentam maior sensibilidade e melhor prognóstico (GE *et al.*, 2005).

Características diagnósticas bem definidas para crianças com TAM e LMA-M7 evitam erros como sub ou super-diagnóstico da doença, sendo de extrema importância para a conduta terapêutica, sobrevida e letalidade. A TAM é uma doença exclusiva da SD embora casos esporádicos em não-Down tenha sido descritos (MAGALHAES *et al.*, 2005), tem seu início intra-útero, e frequentemente são diagnosticadas em neonatos em até 3 meses após o nascimento (WEBB; ROBERTS; VYAS, 2007; MALINGE; IZRAELI; CRISPINO, 2009). A TAM apresenta-se com característica hepática devido à hematopoese e, usualmente, é diagnosticada nos exames de rotina, principalmente pelas frequentes alterações cardíacas ou distúrbios importantes que necessitam de monitoramento constante (ROIZEN; PATTERSON, 2003; WEBB; ROBERTS; VYAS, 2007). O quadro clínico-laboratorial-molecular frequentemente se apresenta com alterações cardiopulmonares (derrame pericárdico, ascite e edema pulmonar), alterações hepáticas (hepatomegalia, esplenomegalia, fibrose hepática, insuficiência hepática ou icterícia obstrutiva), alterações hematológicas (leucocitose, persistência de blastos circulantes em SP e plaquetopenia) e alterações cutâneas (*rash* cutâneo vesicopapular) (WEBB; ROBERTS; VYAS, 2007). Os marcadores megacariocíticos (CD41, CD42, CD61) são importantes na caracterização da origem megacariocítica dos blastos (MASSEY *et al.*, 2006) e mutações no *GATA1* são os marcadores moleculares (ROBERTS *et al.*, 2013). Em contrapartida, a LMA-M7 ocorre após o período neonatal, usualmente entre 1 e 4 anos de idade (CREUTIZIG *et al.*, 2005). É doença medular que não remite sem quimioterapia (AHMED *et al.*, 2004). Pode ser precedida de TAM (AHMED *et al.*, 2004) nos casos em que haja permanência de clone leucêmico latente após a remissão espontânea e aquisição de mutações genômicas adicionais já pré-existentes no *GATA1* (YOSHIDA *et al.*, 2013). A morfologia e imunofenotipagem de células blásticas são similares a TAM, porém nos casos analisados por biópsia medular foi demonstrado a presença de mielofibrose. O quadro clínico-laboratorial é precedido por fase mielodisplásica, com progressiva anemia e plaquetopenia (WEBB; ROBERTS; VYAS, 2007).

No estudo presente, 34 neonatos com TAM e 63 crianças com LMA embora numericamente inferior se comparada aos estudos anteriores que apresentaram uma casuística para TAM que variou de 48 a 146 casos (MASSEY *et al.*, 2006; KLUSMANN *et al.*, 2008; MURAMATSU *et al.*, 2008; KANEZAKI *et al.*, 2010; ALFORD *et al.*, 2011; GAMIS *et al.*, 2011), e LMA de 103 a 293 casos (GAMIS *et al.*, 2003; CREUTIZIG *et al.*, 2005; ALFORD *et al.*, 2011; SORREL *et al.*, 2012) são bastantes representativos quantos as características

clínicas e laboratoriais corroborando com as discussões internacionais. Essa diferença é compatível com a variação na coorte de idade ≤ 20 anos nesses estudos, enquanto neste a coorte foi ≤ 4 anos por ser indicador de melhor prognóstico (SORREL *et al.*, 2012). É possível que crianças com SD tenham sido sub-diagnosticadas, provavelmente devido ao óbito precoce associado às formas mais agressivas da TAM ou sua evolução para LM-SD, ou até mesmo havendo a remissão espontânea passando despercebidos, nos casos da forma indolente, pelos profissionais de saúde. Sendo assim, apenas os pacientes que apresentaram sintomas clínicos no período neonatal foram acompanhados pelos profissionais de saúde e consequentemente incluídos nesta análise. Outro fato que corrobora esta suposição foram os nossos achados nesse estudo. Ao realizar a revisão dos casos com SD enviados ao laboratório, e informações relativas ao desfecho clínico foi observado, que algumas crianças foram erroneamente classificadas pelas instituições de referência oncológica como TAM. Entre os 20 casos excluídos nesta análise 12 foram matriculados e acompanhados (com mediana de 28 meses) por estas instituições, porém estas crianças não apresentavam nenhuma das características clínicas e biológicas já abordadas nesta análise, mutação no *GATA1*, e obviamente não evoluíram para LMA. Além disso, 8 de 34 (23,5%) crianças incluídas no estudo como TAM foram classificadas pelos médicos como LMA, porém apresentavam idade ≤ 3 meses ao diagnóstico. Este estudo respeitou os critérios para classificação diagnóstica de TAM e LMA já descritos, e, portanto analisou estes pacientes com idade ≤ 3 meses ao diagnóstico como TAM.

Em relação às características demográficas, observou-se que idade nos casos de TAM variou de 1 dia a 3 meses (mediana= 4 dias) e LMA de 3,4 a 56,9 meses (mediana= 20,3 meses) ($p < 0,001$), o que não diferiu dos estudos prévios (KLUSMANN *et al.* 2008; ALFORD *et al.*, 2011; GAMIS *et al.* 2011). Em relação ao sexo, a discreta predominância observada nos casos do sexo masculino também foi compatível com outros estudos (CREUTIZIG *et al.*, 2005; KANEZAKI *et al.*, 2010). A cor da pele no Brasil ou raça para os estudos internacionais de maior frequência foi branca (PINE *et al.*, 2007; SORRELL *et al.*, 2012). Os relatos de cardiopatia congênita homogêneos neste estudo foram diferentes do relatado por Klusmann *et al.* (2008), com 50,5% versus 68,0%, respectivamente. Isto provavelmente é explicado pelo fato deste país não ter um programa efetivo para triagem neonatal cardíaca na SD em todas localidades de onde foram extraídos os casos.

Em relação às características clínicas e biológicas, a maioria das crianças com TAM ou LMA apresentaram hepatomegalia e esplenomegalia ao diagnóstico, sendo rara a presença de comprometimento linfonodal, bem como leucemia “cútis”/cloroma, e estão em concordância com outras frequências reportadas, como também o percentual de blastos (KLUSMANN *et al.*, 2008; ALFORD *et al.*, 2011; ROBERTS *et al.*, 2013). Porém, as contagens de células brancas e plaquetas apresentaram mediana relativamente inferior (~50%) aos achados de Massey *et al.* (2006), Klusmann *et al.* (2008) e Roberts *et al.* (2013). O predomínio do imunofenótipo M7 na SD já está bem estabelecido na literatura sendo reconhecida como entidade biológica distinta com características próprias (VARDIMAN *et al.*, 2009). As informações de idade gestacional, tipo de parto, peso ao nascimento, apgar no 1º e 5º minuto, idade materna analisadas por Massey *et al.* (2006) e Klusmann *et al.* (2008) fizeram parte das variáveis incluídas no questionário, porém não foi possível realizar a análise estatística devido ausência de relato dessas informações nos prontuários das instituições de referência.

Análises para identificação de mutação no *GATA1* em neonatos com SD sem manifestações clínicas de hemopatias tem encontrado uma frequência de mutação de aproximadamente 5 a 10% (ZIPURSKY *et al.*, 2003; ROBERTS *et al.* 2013). Nesta coorte, a identificação das mutações no *GATA1* foi realizada somente em crianças com evidências clínicas e hematológicas de TAM ou LMA-M7. Foram estudadas 70 amostras, por meio da amplificação do éxon 2 do *GATA1* seguida de sequenciamento direto, encontrando frequência de mutação no *GATA1* em 74,3% ainda é inferior aos estudos realizados com técnicas mais sensíveis. Os pacientes com TAM apresentaram maior frequência de mutação do que os pacientes com LMA-M7 ($p=0,019$). Estudos atuais têm demonstrado similar frequência de mutação no *GATA1* em ambos os diagnósticos (ALFORD *et al.*, 2011; YOSHIDA *et al.*, 2013). Esta diferença possivelmente está relacionada às questões técnicas, que incluem limitações aos métodos escolhidos associados as características das amostras com baixa proporção de células de blásticas presentes nas amostras analisadas. Ahmed *et al.* (2004) afirma que a baixa contagem de blastos resulta em uma baixa sensibilidade de detecção por meio do sequenciamento direto.

Alford *et al.* (2011) também relataram limitação no método de detecção no *GATA1* em 16 (12%) pacientes com TAM devido à baixa contagem de blastos. Além disso, estes autores

analisaram a mutação no *GATA1* em todas as crianças com LMA-M7 com idade ≤ 60 meses (média 20,2 meses), enquanto nesta análise a mediana de idade para os casos mutados foi de 18,2 meses variando de 0,1 a 34,1 meses. Em relação à proporção de células blásticas para identificação do *GATA1*, estes autores relataram o menor limite de blastos de 0,5% para sucesso na detecção de mutações. No entanto, um dos pacientes com falha na detecção apresentou 42% de blastos (ALFORD *et al.*, 2011). Posterior a este estudo, Roberts *et al.* (2013) observaram que as mutações em *GATA1* detectadas por dHPLC/sequenciamento direto nos 17 de 200 neonatos identificados apresentavam blastos $>10\%$, o que os fez sugerir para uma definição prática e sensível de TAM a presença de 10% de blastos nos esfregaços sanguíneos e mutação no *GATA1*.

Nesta coorte, as mutações do *GATA1* foram encontradas exclusivamente no éxon 2, corroborando com os achados que descrevem raros registros de mutações no íntron 1 ou 2 e no éxon 3 do *GATA1* (RAINIS *et al.*, 2003; PINE *et al.*, 2007; ALFORD *et al.*, 2011). As posições relativas mostradas na Figura 6.2 revelam que as mutações por deleção nos casos de TAM ou LMA-M7 são encontradas na porção inicial e mediana do éxon 2, que as mutações que por duplicação, inserção e substituição na porção mediana e final do éxon 2. Alford *et al.* (2011) encontraram mutação por deleção em todo o éxon 2 com maior frequência na porção final, bem como as mutações por inserção e duplicação.

Mutações por inserções, deleções e duplicações no éxon 2 são as mais frequentes reportadas na literatura em ambas TAM e LMA-M7, com frequência de 100% (WECHSLER *et al.*, 2002), 74% (CABELOF *et al.*, 2009) e 78% (ALFORD *et al.*, 2011). Nesta análise, as mutações no *GATA1* encontradas nos pacientes com LMA-M7 mais frequentes foram por inserção (36,4%), deleção (27,3%), substituição (21,2%) e duplicação (12,1%), tendo como consequência o códon de parada prematura favorecendo a expansão do clone celular. Nos casos de TAM foi compatível a frequência de mutação por duplicação, inserção e substituição com 26,3% cada, seguido de deleção (10,5%). Observada diferença entre os diagnósticos, sendo menos frequente a deleção nos casos de TAM e duplicação em LMA-M7, ambos com frequência aproximada de 12% cada. Segundo Alford *et al.* (2011), mutações por substituição são raras (1%) e exclusivamente encontradas em TAM. Nesta análise, mutações por substituição não foram raras e exclusivas de TAM, com frequência de 26% em TAM e 21% em LMA-M7.

Recentemente, Yoshida *et al* (2013) analisaram o perfil genômico de amostras de TAM e LMA-M7 com e sem SD, incluindo o sequenciamento completo do genoma ou do exoma, relatando que a TAM parece ser causada por uma única mutação no *GATA1* e constitutiva trissomia 21, enquanto a subsequente LMA-M7 evolui a partir de um clone pré-existente de TAM por meio da aquisição de mutações adicionais ausentes na população original de TAM, indicando um processo *multistep* da leucemogênese. A investigação de mutações não silenciadas por análise do exoma nas amostras de TAM e LMA-M7 em SD mostrou que a média de mutações não silenciadas em LMA-M7 foi significativamente maior que TAM, tendo como a alteração mais frequente a substituição simples de nucleotídeo. Entre as mutações adicionais encontradas incluem-se vários componentes coesina (53%) como *RAD21* e *STAG2*, *CTCF* (20%), e *EZH2* (33%), *KANSL1* (em 3 amostras de LMA-M7) e outros reguladores epigenéticos (45%), bem como as vias de sinalização comuns, tais como família JAK quinases (*JAK1*, *JAK2* e *JAK3*) *MPL* e *SH2B3* (LNK) em 35% das amostras e múltiplos genes da via RAS (47%), como *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *NF1* e *CBL*.

Nesta coorte, foi observado que 33,3% dos casos com LMA-M7 apresentaram TAM no período neonatal. A frequência na evolução para LM-SD nos primeiros 4 anos de vida tem variado nos estudos entre 13% e 33% (HOMANS, VERISSIMO e VLACHA, 1993; HASLE, 2001; KANEZAKI *et al.*, 2010), com redução no risco de leucemia subsequente após 3 anos de idade (MASSEY *et al.*, 2006). A mediana de idade para os pacientes que subsequentemente evoluíram para LM-SD não foi diferente dos pacientes sem histórico de evolução ($p=0,120$), bem como a contagem de leucócitos ($p=0,621$), o que foi compatível com os achados de Klusmann *et al.* (2008). Porém, a contagem de plaquetas ($>100 \times 10^9/L$) associada ao alto risco de evolução observada por estes autores, não foi observada nesta coorte ($p=0,742$). Somente a mutação do *GATA1* foi crucial para esta progressão ($p=0,030$). Mutações no éxon 2 do *GATA1* impede a formação da proteína GATA-1, produzindo apenas a proteína GATA-1s, caracterizada pela ausência do éxon 2 e do domínio de ativação AD. Em adição a esta característica da GATA-1s, Kanezaki *et al.* (2010) mostraram que as mutações afetam o nível de expressão da proteína truncada nos pacientes com TAM, e as dividiu em 2 grupos conforme o nível de expressão estimado de GATA-1s: maior expressão de GATA-1s (que incluem perda da primeira metionina, erro de splicing e PTC 1-3') e menor expressão de GATA-1s (que incluem PTC 1-5' e PTC 2). Eles compararam esses resultados com as características clínicas dos pacientes e mostram que as diferenças quantitativas estão

significativamente associadas com o prognóstico do paciente e o risco de desenvolver LMA-M7. Os pacientes com mutações pertencentes ao grupo de menor nível de expressão apresentaram associação significativa com o risco desenvolver leucemia. Posterior a este estudo, Alford *et al.* (2011) reproduziu esta análise baseando-se nos resultados do nível de expressão, mas não encontrou associação para progressão ou prognóstico.

A partir destes achados relevantes na biologia de células leucêmicas na SD, porém contraditórios, nos propomos testar esta análise na tentativa de confirmar ou não com os achados de Kanezaki *et al.* (2010), e desta forma contribuir com informações adicionais aos estudos sobre *GATA1*. Diante disso, o perfil de expressão dos transcritos gênicos do GATA-1s foi analisado em 32 pacientes, e observado que o erro de *splicing* e PTC1-3' apresentaram maiores níveis de expressão do GATA-1s, enquanto que PTC 1-5' e PTC 2 apresentaram menores níveis de expressão do GATA-1s corroborando com os resultados de Kanezaki *et al.* (2010). No entanto, não foram confirmadas as diferenças por tipo de mutação e expressão (menor expressão, mutação PTC 1-5' e PTC 2; e maior expressão, mutação tipo erro de *splicing* e PTC1-3') com a resposta terapêutica. Diferentemente do estudo de Kanezaki *et al.* (2010), que encontrou correlação com o risco de desenvolvimento da LM-SD em pacientes com PTC 2 e PTC 1-5', este estudo encontrou associação com risco de desenvolver LM-SD somente nos pacientes com mutação PTC 1-5' ($p=0,002$), enquanto os pacientes com PTC 2 ($p=0,033$) apresentaram associação provável de proteção para desenvolver a doença (apenas 3 de 13 pacientes evoluíram de TAM para LM-SD). Em pacientes com erro de *splicing* e PTC 1-3' o período de tempo entre o início do tratamento e a remissão foi menor ($p=0,047$). Fator este que não foi analisado nos estudos anteriores.

Em uma análise comparativa na série de 457 lactentes com leucemias, incluindo 77 neonatos (diagnóstico com idade ≤ 31 dias) com e sem SD observamos que a taxa de letalidade em neonatos sem SD é superior aos neonatos com SD (65,7% *versus* 35,9%, respectivamente), com risco relativo de 0,39 (IC 95% 0,2-0,7), que confere um efeito de proteção para morte em neonatos com SD. Além disso, a SG em 5 anos foi superior nos neonatos com SD ($p=0,002$) (MOURA *et al.*, 2014, Publicação em anexo C).

Na década de 80, devido ao prognóstico mais reservado da LMA em SD (ROBSON *et al.*, 1984; RAVINDRANATH, 1992; ZIPURSKY, 1997), as crianças eram tratadas com altas

doses de quimioterapia, com consequentes efeitos mórbidos devido a alta toxicidade quimioterápica e aumento da letalidade (LANGE, 2000). Há aproximadamente 10 anos, estudos tem demonstrado que crianças com SD e LMA-M7 com idade inferior a 4 anos são ótimos respondedores a citarabina (GAMIS *et al.*, 2003; SORREL *et al.*, 2012;), e devido a alta sensibilidade são mais propensos a toxicidade terapêutica (GE *et al.*, 2005; TAUB *et al.*, 2000). A redução da morbimortalidade relacionada ao tratamento e aumento na SLE foi observada nas crianças que receberam protocolos tratamento com redução de ARA-C e antracíclicos (CREUTZIG *et al.*, 2005; SORRELL *et al.*, 2012). Para os pacientes com TAM a indicação de quimioterapia é restrita aos neonatos com problemas hepáticos e complicações severas. As crianças se beneficiam com baixas doses de ARA-C (AL-KASIM *et al.*, 2002; DORMANN *et al.*, 2004). Klusmann *et al.*, 2008 recomendaram as doses de 0,5 a 1,5mg/kg de ARA-C por 3 a 12 dias para os pacientes com leucometria $>50.000/\mu\text{l}$, contagem de plaquetas $<100 \times 10^9/\text{L}$, ou sinais de coletase (bilirrubina conjugada 15mg/mL) e disfunção hepática. Importante ressaltar que esta terapêutica não previne a progressão para LMA-M7, tendo seu objetivo principal a redução de complicações metabólicas decorrentes da disfunção hepática.

Neste estudo, foi observada maior frequência de tratamento quimioterápico nos casos de LMA ($p < 0,001$), 59 casos foram tratados de forma sistêmica, enquanto que os demais não foram tratados devido às complicações clínicas da doença e óbito precoce. Foi observado que as instituições optaram por fazer o protocolo para a LMA padrão em aproximadamente 60% dos casos, ou seja, sem redução quimioterápica. Para os casos de TAM, apenas 3 pacientes receberam 5mg de ARA-C subcutâneo por 8 dias, devido ao comprometimento hepático importante no diagnóstico. O seguimento mostrou que essas crianças até o momento estão estavam livres de doença. Importante também ressaltar que três crianças analisadas neste estudo como TAM receberam tratamento inadequado com altas doses de quimioterapia e evoluíram a óbito. Possivelmente estas crianças se beneficiariam de baixas doses de ARA-C.

A remissão espontânea sem tratamento ocorreu em quase todos os casos de TAM. Os mecanismos descritos para a remissão da TAM ainda são obscuros, e entre as explicações plausíveis tem-se: 1) a redução da atividade da telomerase observada no início do desenvolvimento TAM, contribuindo como um fator crítico para a conversão do clone da TAM em LM-SD (HOLT *et al.*, 2002); 2) transição do sítio de hematopoese fetal para

medular o que impediria o desenvolvimento de blastos leucêmicos causando a regressão da TAM (MIYAUCHI *et al.*, 1992; GAMIS; HILDEN, 2002; AHMED *et al.*, 2004).

Em relação aos protocolos adotados pelas instituições, foi observado que não há padronização de protocolo único por instituição, o que impediu à análise do padrão de resposta ao tratamento específico por protocolo e instituição. No Brasil, há uma iniciativa do Grupo Cooperativo Brasileiro de Síndrome Mielodisplásica em Pediatria juntamente com o Grupo Brasileiro de Leucemia Mieloide Aguda para implementação de protocolo diferenciado nos pacientes com LMA em SD (MAGALHAES *et al.*, 2006). A estratégia terapêutica nesta proposta brasileira é uma adaptação do POG 9421 em relação à redução de dose de ARA-C. Está em andamento desde 2010 com previsão de término em 2015. Acreditamos que estas análises de casos retrospectivos contribuirão para a adesão aos protocolos diferenciados.

Em relação à resposta terapêutica, a remissão clínica inicial foi observada em 90,4% dos casos, com falha na indução de 9,6%. A resposta completa ao final da quimioterapia foi observada em 78,7% e resposta parcial em 10,6%. A recorrência de leucemia foi observada em 6 (13,5%) casos, com mediana de 2 recaídas por paciente, tendo como sítio principal a MO, e com mediana de 8 meses do início do tratamento até a primeira recaída. Tais achados são compatíveis com Sorrel *et al.* (2012). Um paciente foi submetido ao TMO, com evidência de doença até o presente, com doença residual mínima positiva por citometria de fluxo. É reconhecido que a alta mortalidade relacionada ao TMO em crianças com SD é maior (RUBIN; MICK; JOHNSON, 1996), no entanto Taga *et al.* (2012) relataram que 2 de 8 pacientes sobreviveram após submetidos ao TMO. No entanto, a principal causa de falha do TMO é a progressão da doença (MEISSNER *et al.*, 2007).

Nesta análise, foram encontradas altas frequências de toxicidades quimioterápicas durante a fase de indução e intensificação/consolidação, principalmente a toxicidade hematológica nas fases de indução (81,8%) e intensificação (72,0%). Esta toxicidade está relacionado às altas doses de ARA-C e evidenciadas por aplasia severa progressiva, neutropenia febril e infecções recorrentes resultando em prolongamento do período de internação e necessidade de transfusões sanguíneas frequentes. A toxicidade gastrointestinal (média de 37,15%) evidenciada pela presença de náuseas e vômitos intensos com risco de comprometimento do equilíbrio hidroeletrólítico e mucosite grau III e IV foi avaliada

conforme a classificação da OMS. A toxicidade cardíaca foi maior na intensificação comparada com a indução (8,0% *versus* 1,5%). Outras toxicidades não foram relatadas no período de indução, mas na intensificação/consolidação um paciente apresentou alteração dermatológica (*rash* cutâneo) e para outro, houve relato de toxicidade neurológica por lesão cerebral extensa após seis ciclos de quimioterapia. Observou-se que estes pacientes apresentaram maiores toxicidades no período de intensificação que os analisados por Sorrel *et al.* (2012), além disso a toxicidades gastrointestinal foi mais frequente em ambas as fases. Estas complicações adversas devem ser avaliadas para indicação de protocolos de tratamento para LMA com adaptação de dose para os pacientes com SD.

A alta letalidade nos casos de LMA não nos permitiu avaliar diferenças entre a morte precoce e morte. Porém, ao analisar o momento do óbito, 93,3% das crianças com LMA morreram durante a terapia, o que pode ser explicado pela frequência de toxicidade. A letalidade não foi associada às características clínicas e biológicas, exceto para as crianças com cardiopatia congênita ($p=0,020$) nos pacientes com TAM.

Em relação à sobrevida em 60 meses, foi observado melhor curva de sobrevida para TAM (73,3%) do que LMA-M7 (44,4%) $p=0,057$. Estes resultados diferem dos estudos atuais que revelam que o prognóstico é excelente, com taxa de cura de aproximadamente 80% (GAMIS *et al.*, 2003; CREUTZIG *et al.*, 2005). Gamis *et al.* (2003) ao comparar a SG e SLE em crianças com e sem SD e LMA-M7 observou melhores resultados nas crianças com SD para SG (81% *versus* 31%; $p<0,001$) e SLE (78% *versus* 28%; $p<0,001$). Além disso, eles não observaram diferença nas crianças com SD e subtipo M7 *versus* outros subtipos. Esta alta taxa de cura tem sido explicada pela sensibilidade incomum dos blastos leucêmicos de pacientes com LMA-M7 para múltiplas drogas quimioterápicas, principalmente a ARA-C. Acredita-se que essa sensibilidade seja efeito das mutações *GATA1* e Trissomia 21 sobre os níveis da enzima na metabolização desta droga (ZWAAN *et al.*, 2002; GE *et al.*, 2005). Devido ao pequeno número de pacientes com TAM tratados com baixas doses de ARA-C, não foi possível comparar se houve diferenças entre SLE e SG com os pacientes que não receberam tratamentos e consequentemente confirmar os achados por Klusmann *et al.* (2008).

Esta coorte de crianças com SD e hemopatias clonais representa a totalidade de casos elegíveis para análises de mutações no gene *GATA1* (período 2000-2014) registrados no

PHOP. Os casos foram enviados por médicos de 39 centros brasileiros de tratamento oncológico pediátrico. A maioria é apresentada por crianças da região Sudeste (40%), seguida das regiões Centro Oeste (24%), Nordeste (22%) e Sul (11%). Estes índices não refletem a ocorrência de casos nas diferentes regiões brasileiras como um todo, pois só correspondem ao maior número de centros cooperativos da Rede de Apoio de Atenção ao Câncer Infanto-Juvenil. Porém, pela representatividade em termos numéricos, os resultados obtidos por meio das análises moleculares devem ser considerados como pontos positivos deste trabalho. A associação de determinados padrões de mutação com o poder preditivo de evolução clonal corroborou com estudo anterior em população americana. Além disso, a avaliação dos efeitos adversos da quimioterapia precoce certamente será um documento importante para estimular futuras indicações terapêuticas com mais parcimônia. E finalmente, a inclusão dos testes moleculares no algoritmo diagnóstico, se tornando mais acessível e indispensável na prática destes pacientes com SD.

8. CONCLUSÕES

- Ao analisar diferenças no perfil clínico-epidemiológico das proliferações mieloides em SD, foi observada frequência de casos com TAM de 35,1% e LMA de 64,9%. Ambas as proliferações não apresentaram diferenças importantes, exceto para a idade mediana dos pacientes com TAM que foi menor a mediana dos pacientes com LMA, e contagens hematológicas com menor mediana para os pacientes com LMA do que os pacientes com TAM;
- Foi observado que 33,3% dos casos com LMA-M7 houve histórico de TAM prévia;
- Mutações no éxon 2 do gene *GATA1* foram identificadas em 90,5% nos casos de TAM e 67,3% nos casos de LMA-M7;
- As mutações no *GATA1* encontradas nos pacientes com LMA-M7 mais frequentes foram por inserção (36,4%), deleção (27,3%), substituição (21,2%) e duplicação (12,1%); e em TAM foi por duplicação, inserção e substituição com 26,3% cada, seguido de deleção (10,5%). As mutações por substituição não foram raras e exclusivas de TAM;
- Os tipos de mutação erro de *splicing* e PTC1-3' apresentaram maiores níveis de expressão, enquanto que PTC 1-5' e PTC 2 apresentam menores níveis de expressão;
- Remissão clínica inicial foi observada em 78,3% dos casos, resposta completa em 67,3% e recorrência de leucemia em 11,1%;
- A letalidade foi maior em LMA (53,2%) do que TAM (25,8%);
- A sobrevida em 60 meses foi maior em TAM (73,3%) do que LMA-M7 (44,4%);
- Crianças com mutação do tipo PTC 1-3' e erro de *splicing* apresentam menor tempo para remissão após o início da terapia;
- Crianças com TAM e mutação tipo PTC 1-5' apresentam pior prognóstico, com aumento no risco de progressão para LM-SD, bem como maior risco de morrer;

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AHMED, M. *et al.* **Natural history of GATA1 mutations in Down syndrome.** Blood, New York, v.103, p.2480-2489, 2004.

ALFORD, KA. *et al.* **Analysis of GATA1 mutations in Down syndrome transient myeloproliferative disorder and myeloid leukemia.** Blood. 118:2222-2238. 2011

AL-KASIM, F.; *et al.* **Incidence and treatment of potentially lethal diseases in transient leukemia of Down syndrome: Pediatric Oncology Group Study.** J Pediatr Hematol Oncol, Vol.24, No.1, pp.9-13, 2002.

AMORIM, M.R. *et al.* **Detection of mutations in GATA1 gene using automated denaturing high-performance liquid chromatography and direct sequencing in children with Down syndrome.** Leukemia and Lymphoma, Chur, v.50, n.5, p.834-840, 2009.

BARTLEY, T. D.. *et al.* **Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl.** Cell 77, 1117–1124, 1994

BENNETT, J.M. *et al.* **Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes.** Br J Haematol., Oxford, v.51, p.189-199, 1982.

BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, *et al.* **Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0).** Br J Haematol.;78:325-329, 1991.

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

BREWSTER, H.; CANNON, H. **Acute lymphatic leukemia: report of a case in an eleventh month mongolian idiot.** New Orleans Med. Surg. J., New Orleans, v.82, p.872–873, 1930.

BOROWITZ, M.; CHAN, J.T. **Lymphoblastic leukemia/lymphoma.** In: SWERDLOW, S. *et al.* WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: International Agency for Resarchon Cancer, p. 176–178, 2008.

CABELOF, DC. *et al.* **Mutational spectrum at GATA1 provides insights into mutagenesis and leukemogenesis in Down syndrome.** Blood 114:2753-2763, 2009.

CALLIGARIS, R.; *et al.* **Alternative translation Initiation site usage results in two functionally distinct forms of the gata-1 Transcription factor.** Proc natl acad sci u s a, vol.92, no.25, pp.11598- 11602, , 1995.

CHOI, K. *et al.* **A common precursor for hematopoietic and endothelial cells.** Development. 125(4):725-32, 1998.

COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA ESTIMATIVA 2014: **Incidência de Câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

CRAZE, J.L. *et al.* **Improved outcome of acute myeloid leukaemia in Down's syndrome.** Arch. Dis. Child., London, v.81, p.32–37, 1999.

CREUTZIG, U. *et al.* **Transient myeloproliferative disorders and acute leukaemias in infants with Down's syndrome.** Contrib Oncol, v.41, p.75-84, 1990.

CREUTZING, U. *et al.* **AML patients with Down syndrome have a high cure rate with AML-BFM therapy with reduce dose intensity.** Leukemia, New Jersey, v.19, p.1355-1360, 2005.

CREUTZIG, U *et al.*. **Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel.** *Blood*, 120(16):3187-205, 2012

CRISPINO, JD: **GATA1 in normal and malignant hematopoiesis.** *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16:137, 2005

DICKINSON, R. *et al.* **The evolution of cellular deficiency in GATA2 mutation.** *Blood*. 6;123(6):863-74, 2014.

DORMANN, S.; *et al.* **Life threatening complications of transient abnormal myelopoiesis in neonates with Down syndrome.** *Eur J Pediatr*, Vol.163, No.7, pp.374-377, 2004.

DUNCAN, S. **Generation of embryos directly from embryonic stem cells by tetraploid embryo complementation reveals a role for GATA factors in organogenesis.** *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1534–1536, 2005.

ELAGIB, K.E. *et al.*. **RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation.** *Blood*, New York, v.101, p.4333-4341, 2003.

GAMIS, A.S. *et al.*. **Increased age at diagnosis has a significantly negative effect on outcome in children with Down syndrome and acute myeloid leukemia: a report from the Children's Cancer Group Study 2891.** *Journal of Clinical Oncology*, New York, v.21, n.18, p.3415-3422, 2003.

GAMIS, A.S. *et al.*. **Natural history of transient myeloproliferative disorder clinically diagnosed in Down syndrome neonates: a report from the Children's Oncology Group Study A2971,** *Blood*, New York, v.118, p.6752-6759, 2011.

GAMIS, A. S.; and HILDEN, J. M. **Transient myeloproliferative disorder, a disorder with too few data and many unanswered questions: does it contain an important piece of the puzzle to understanding hematopoiesis and acute myelogenous leukemia?** *J Pediatr Hematol Oncol*, Vol.24, No.1, pp.2-5, ISSN 1077-4114, 2002.

GE, Y. *et al.* **GATA1, cytidine deaminase, and the high cure rate of Down syndrome children with acute megakaryocytic leukemia.** Journal of the National Cancer Institute, Cary, v.97, n.3, p.226-231, 2005.

GREENBERG, PL. **Clinical and prognostic characterization of myelodysplastic syndromes.** In Myelodysplastic syndromes clinical and biological advances, 1st ed, ed P. Greenberg. Cambridge, p. 1-24, 2006.

GROSSMANN, A. *et al.* **Synergistic effects of thrombopoietin and granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil recovery in myelosuppressed mice.** Blood 88, 3363–3370, 1996.

GURBUXANI, S.; VYAS, P.; CRISPINO, J.D. **Recent insights into mechanisms of myeloid leukemogenesis in Down Syndrome.** Blood, New York, v.103, p399-406, 2004

HASLE, H.; KERNDROP, G.; JACOBSEN, BB. **Childhood myelodysplastic syndrome in Denmark: incidence and predisposing conditions.** Leukemia, New Jersey, v.9, p.1569-1572, 1995.

HASLE, H.; CLEMMENSEN, I.H.; MIKKELSEN, M. **Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome.** Lancet, London, v.355, n.9199, p.165–169, 2000. [PubMed: 10675114].

HASLE, H. **Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome.** Lancet Oncol. London, v2, p.429-436, 2001.

HAYASHI, Y. **Cytogenetic findings and clinical features in acute leukemia and transient myeloproliferative disorder in Down's syndrome.** Blood, New York, v.72, p.15-23, 1988.

HATTORI M. *et al.* **High expression of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 in blast cells from patients with Down Syndrome suffering from transient myeloproliferative disorder and organ fibrosis.** British Journal of Haematology, 115: 472-475, 2001

HITZLER, J. K. & ZIPURSKY, A. **Origins of leukaemia in children with Down syndrome.** *Nat Rev Cancer*, Vol.5, No.1, .11-20, ISSN 1474-175X, 2005.

HITZLER, JK. *et al.* **GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome.** *Blood* 101:4301-4304. 2003.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em hematologia.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HOLT, S. E.; BROWN, E. J.; and ZIPURSKY, A. **Telomerase and the benign and malignant megakaryoblastic leukemias of Down syndrome.** *J Pediatr Hematol Oncol*, Vol.24, No.1, pp.14-17, ISSN 1077-4114, 2002.

HOMANS, AC.; VERISSIMO, AM.; and VLACHA, V. **Transient abnormal myelopoiesis of infancy associated with trisomy 21.** *American journal of pediatric hematology oncology*, New York, v. 15, p.392-399, 1993.

IZRAELI, S. *et al.* **Trisomy of chromosome 21 in leukemogenesis.** *Blood Cells Mol Dis.* 39(2):156-9, 2007.

KANEZAKI, R. *et al.*. **Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia.** *Blood*, Vol.116, No.22, pp.4631-4638, ISSN 0006-4971, 2010.

KEARNEY, L. *et al.*. **Specific JAK2 mutation (JAK2R683) and multiple gene deletions in Down syndrome acute lymphoblastic leukemia.** *Blood*, New York, v.113, n.3, p.646-648, 2009.

KIRITO, K.; and KAUSHANSKY, K. **Transcriptional regulation of megakaryopoiesis: thrombopoietin signaling and nuclear factors.** *Curr. Opin. Hematol.* 13, 151–156, 2006

KLUSMANN, JH. *et al.*. **Treatment and prognostic impact of transient leukemia in neonates with Down syndrome.** *Blood*, New York, v.111, n.6, p.2991-2998, 2008.

KOJIMA, S. *et al.*. **Favorable treatment outcome in children with acute myeloid leukemia and Down syndrome.** *Blood*, New York, v.81, p.3164, 1993.

KRIVIT, W.; GOOD, R.A. **Simultaneous occurrence of mongolism and leukemia; report of a nationwide survey.** *AMA American Journal of Diseases of Children*, Chicago, v.94, p.289-293, 1957.

KHAN, I., MALINGE, S. & CRISPINO, J. **Myeloid leukemia in Down syndrome.** *Crit. Rev. Oncog.* 16, 25–36 (2011).

KAUSHANSKY, K. **The molecular mechanisms that control thrombopoiesis.** *Journal of Clinical Investigation*, 115: 3339–3347, 2005

KAUSHANSKY, K. *et al.* **Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin.** *Nature* 369, 568–571, 1994.

KAZAURA; LIE; SKJAERVEN. **Grandparents' age and the risk of Down's syndrome in Norway.** *Acta Obstet Gynecol Scand.* ;85(2):236-40, 2006.

KURAHASHI, H.; HARA, J. **Transient abnormal myelopoiesis in Down's syndrome.** *Leukemia and lymphoma*, Chur, v.8, p. 465-475, 1992.

LANGE, B.J. *et al.*. **Distinctive demography, biology, and outcome of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children with Down syndrome: Children's cancer group studies 2861 and 2891.** *Blood*, New York, v.91, p.608-615, 1998.

LANGE, B. **The management of neoplastic disorders of haematopoiesis in children with Down's syndrome.** *British Journal of Haematology*, Oxford, v.110, p.512–524, 2000.

LANGEBRAKE, C.; CREUTZIG, U.; REINHARDT, D. **Immunophenotype of Down syndrome acute myeloid leukemia and transient myeloproliferative disease differ**

significantly from other diseases with morphologically identical or similar blasts. *Klin Padiatr*, 217:126-134, 2005.

LÉCUYER, E; EHOANG, T. **SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia.** *Exp Hematol*. 32(1):11-24, 2004.

LEJEUNE, J.; GAUTIER, M.; TURPIN, R. **Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens.** *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, v.248,p.1721-2, 1959.

LOPES, L.F. **Leucemia na infância.** *Rev Paul Pediatr*, São Paulo, v.8, p.79-81, 1990.

LOWRY, J. A.; and ATCHLEY, W. R. **Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain.** *J. Mol. Evol.* 50, 103–115 (2000).

MAGALHAES, I.Q. *et al.*. **GATA1 mutations in acute leukemia children with Down syndrome.** *Cancer Genetics and Cytogenetics*. New York, v.166, p.112-116, 2006.

MAGALHÃES, I.Q. *et al.* **Transient neonatal myeloproliferative disorder without Down syndrome and detection of GATA1 mutation.** *J Pediatr Hematol Oncol*, 27: 50-52, 2005.

MALINGE, S.; IZRAELI, S.; CRISPINO, J.D. **Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome.** *Blood*, New York, v.113, p.2619-2628, 2009.

MARTIN, D.I.; ORKIN, S.H. **Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1.** *Genes Dev*, 4(11): 1886-1898, 1990.

MASSEY, G.V. *et al.*. **A prospective study of the natural history of transient leukemia (TL) in neonates with Down syndrome (DS): Children's Oncology Group (COG) study POG-9481.** *Blood*, New York, v.107, p.4606-4613, 2006.

MEISSNER B, BORKHARDT A, DILLOO D, *et al.* **Relapse, not regimen-related toxicity, was the major cause of treatment failure in 11 children with Down syndrome undergoing haematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia.** *Bone Marrow Transplant*, 40(10):945-949, 2007.

MERRICK J. **Incidence and mortality of Down syndrome.** *Israel Med Assoc J*; **2**: 25–26, 2000.

MIYAUCHI, J. *et al.* **Unusual diffuse liver fibrosis accompanying transient myeloproliferative disorder in Down's syndrome: a report of four autopsy cases and proposal of a hypothesis.** *Blood*, Vol.80, No.6, (Sep 1992), pp.1521-1527, ISSN 0006-4971, 1992.

MOURA, SV. *et al.* **Clinical and molecular epidemiology of neonatal leukemia in brazil.** *Leuk Lymphoma*, 3:1-19, 2014.

MULLER, AM. *et al.* **Development of Hematopoietic Stem Cell Activity in the Mouse Embryo.** *Immunity*. 1(4):291-301, 1994.

MUNDSCHAU, G; CRISPINO, J. **GATA1s goes germline.** *Nat Genet*, 38(7):741-2, 2006.

MURAMATSU, H. *et al.* **Risk factors for early death in neonates with Down syndrome and transient leukaemia.** *Br. J. Haematol.* 142, 610–615, 2008.

NUTT, S.L., *et al.* **Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors.** *Journal of Experimental Medicine*, 201: 221–231, 2005.

O'BRIEN, *et al.* **Cardiomyopathy in children with Down syndrome treated for acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group Study POG 9421.** *J Clin Oncol*, 20;26(3):414-20, 2008.

OGAWA, M. **Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells.** *Blood* 81, 2844–2853, 1993.

ORKIN SH, ZON LI. **Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity.** *Nat Immunol*;3:323-328, 2002.

PATTERSON, D. **Genetic mechanisms involved in the phenotype of Down syndrome.** *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 13:199, 2007.

PENROSE LS. **The relative effects of paternal and maternal age in mongolism.** *J Genet*, 27: 219, 1933.

PINE, SR. **Incidence and clinical implications of GATA1 mutations in newborns with Down syndrome.** *Blood*, New York, v.110, p.2128-2131, 2007.

RAINIS, L.; BERCOVICH, D.; STREHL, S.; TEIGLER-SCHLEGEL, A., *et al.* **Mutations in exon 2 of GATA1 are early events in megakaryocytic malignancies associated with trisomy 21.** *Blood*, 102: 981-986, 2003.

RAVINDRANATH, Y. *et al.* **Acute myeloid leukemia (AML) in Down's syndrome is highly responsive to chemotherapy: experience on Pediatric Oncology Group AML Study 8498.** *Blood*, New York, v.80, p.2210–2214, 1992.

ROBERTS I, *et al.* **GATA1-mutant clones are frequent and often unsuspected in babies with Down syndrome: identification of a population at risk of leukemia.** *Blood*, 5;122(24):3908-17, 2013.

ROBINSON, B. E., MCGRATH, H. E. and QUESENBERRY, P. J. **Recombinant murine granulocyte macrophage colony-stimulating factor has megakaryocyte colony-stimulating activity and augments megakaryocyte colony stimulation by interleukin 3.** *J. Clin. Invest.* 79, 1648–1652, 1987.

ROBISON, L.L. *et al.* **Down syndrome and acute leukemia in children: a 10-year retrospective survey from Children's Cancer Study Group.** *Journal of Pediatrics*, St. Louis v.105, p.235–242, 1984.

- ROBISON, L.L. **Down syndrome and leukemia**. Leukemia, New Jersey, v.6, p.5–7, 1992.
- ROIZEN, N.J.; PATTERSON, D. **Down's syndrome**. Lancet, London, v.361, n.9365, p.1281–1289, 2003. [PubMed: 12699967]
- ROWLEY, J.D. **Down Syndrome and acute leukaemia: increased risk may be due to trisomy 21**. Lancet, London, v.2, p.1020–1022. 1981. [PubMed: 6118480]
- RUBIN CM, MICK R, JOHNSON FL. **Bone marrow transplantation for the treatment of haematological disorders in Down's syndrome: toxicity and outcome**. *Bone Marrow Transplantation*. 18(3):533-540, 1996.
- SANKARAN, V.G. *et al.* **Exome sequencing identifies gata1 mutations resulting in diamond-blackfan anemia**. *J clin invest.*, 2;122(7):2439-43, 2012.
- SILVA-JÚNIOR, L.S.; RIBEIRO, R.C. **Leucemia megacarioblástica da criança: apresentação de um caso e revisão da literatura**. *Bol Soc Bras Hematol Hemoter*, Rio de Janeiro, v.15, p.105-14, 1993.
- SITNICKA, E., LIN, N., PRIESTLEY, G. V., FOX, N., BROUDY, V. C., WOLF, N. S. and KAUSHANSKY, K. **The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells**. *Blood* 87, 4998–5005, 1996.
- SHIMIZU, R.; and YAMAMOTO, M. **Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors**. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 129–136, 2005.
- SHIMIZU, R; ENGEL; JD; YAMAMOTO, M. **GATA1-related leukaemias**. *Nat Rev Cancer*, 8(4):279-87, 2008.
- SORRELL, A.D. *et al.*. **Favorable Survival Maintained in Children Who Have Myeloid Leukemia Associated With Down Syndrome Using Reduced-Dose Chemotherapy on**

Children's Oncology Group Trial A2971: A Report From the Children's Oncology Group. Cancer, Philadelphia, v.118, p.4806-4814, 2012.

TAGA, T. *et al.* **Clinical characteristics and outcome of refractory/relapsed myeloid leukemia in children with Down syndrome.** Blood, 120: 1810-1815, 2012.

TANAKA, S. *et al.* **The enhancer HS2 critically regulates GATA-3-mediated Ii4 transcription in T(H)2 cells.** Nat Immunol, 12(1):77-85, 2011.

TSAI, S. *et al.* **Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of erythroid lineage through expression in mammalian cells.** Nature, 339; 446-451, 1989.

TAUB JW, HUANG X, GE Y, *et al.* **Cystathionebeta- synthase cDNA transfection alters the sensitivity of metabolism of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in CCRF-CEM leukemia cells in vitro and in vivo: a model of leukemia in Down syndrome.** Cancer Res.;60:6421- 6426, 2000.

TSANG, A. P. *et al.* **FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation.** Cell, Vol.90, No.1.109- 119, 1997.

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

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

VIANA, M.B. *et al.* **Acute myeloid leukemia in childhood: fifteen-year experience in a single institution.** Jornal de Pediatria, Rio de Janeiro, v.79, n.6, p.489-96, 2003.

VYAS, P.; ROBERTS, I. **Down myeloid disorders: A paradigm for childhood preleukaemia and leukaemia and insights into normal megakaryopoiesis.** *Early Human Development*, Amsterdam, v.82, p.767-773, 2006.

WEBB, D.; ROBERTS, I.; VYAS, P. **Haematology of Down syndrome.** *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, London, v.92, p.503-507, 2007.

WECHSLER, J. *et al.* **Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome.** *Nature Genetics*, Vol.32, No.1, pp.148–152, ISSN 1061-4036, 2002.

XU, G. *et al.* **Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome.** *Blood*, Vol;102, No.8, pp.2960-2968, ISSN 0006-4971, 2003.

YAMAMOTO, M. *et al.* **Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family.** *Genes Dev.* 4, 1650–1662, 1990.

YOSHIDA, K. *et al.* **The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders.** *Nat Genet*, 45(11):1293-9, 2013.

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

ZHENG, W. and FLAVELL, RA. **The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells.** *Cell*, 16;89(4):587-96, 1997.

ZIPURSKY, A. *et al.* **Myelodysplasia and acute megakaryoblastic leukemia in Down's syndrome.** *Leuk. Res.*, Oxford, v.18, p.163–171, 1994.

ZIPURSKY, A. **Transient leukaemia--a benign form of leukaemia in newborn infants with trisomy 21.** *Br J Haematol*, Vol.120, No.6, pp.930-938, 2003.

ZWAAN, C.M. *et al.*. **Different drug sensitivity profiles of acute myeloid and lymphoblastic leukemia and normal peripheral blood mononuclear cells in children with and without Down syndrome.** *Blood*, New York, n.99, p. 245-251, 2002.

ANEXOS

ANEXO A – FICHA DE ENCAMINHAMENTO DOS PACIENTES

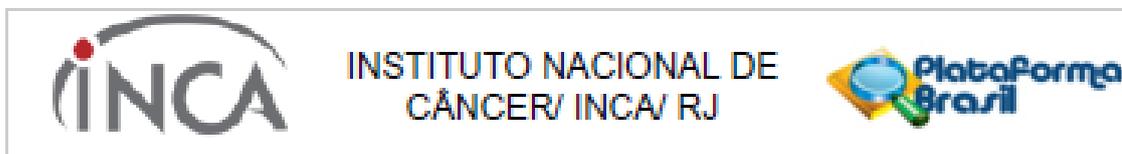
(sistema online do PHOP-INCA: www.imunomolecular.redecancer.org.br).

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

ANEXO B – LISTA DE INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

	N	%
AGAPE INSTITUTO MÉDICO CUIABÁ	2	1,8
CENTRO INFANTIL - DR. DOMINGOS A. BOLDRINI - SP	8	7,1
CLINICA CEBROM	1	,9
HEMOCENTRO DALTON BARBOSA CUNHA	1	,9
HEMORIO - RJ	2	1,8
HOSPITAL A.C.CAMARGO	3	2,7
HOSPITAL ALBERT SABIN	1	,9
HOSPITAL AMARAL CARVALHO	1	,9
HOSPITAL ARAUJO JORGE	2	1,8
HOSPITAL ARISTIDES MALTES	3	2,7
HOSPITAL BOM JESUS-ISPON	1	,9
HOSPITAL DA CRIANÇA DE BRASÍLIA JOSÉ ALENCAR	15	13,3
HOSPITAL DE CÂNCER DE CASCAVEL - UOPECAN	1	,9
HOSPITAL DO AÇUCAR E ALCOOL, MACEIO - AL	1	,9
HOSPITAL DOS SERVIDORES DO ESTADO (HSE)	4	3,5
HOSPITAL FATIMA - CAXIAS DO SUL	1	,9
HOSPITAL INFANTIL DARCY VARGAS - SP	10	8,8
HOSPITAL INFANTIL JOANA DE GUSMAO	7	6,2
HOSPITAL MARTAGAO GESTEIRA IPPMG/UFRJ - RJ	5	4,4
HOSPITAL MARTAGAO GESTEIRA, SALVADOR - BA	2	1,8
HOSPITAL NAPOLEAO LAUREANO - PB	4	3,5
HOSPITAL NOSSA SENHORA LORETO	1	,9
HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE	2	1,8
HOSPITAL REGIONAL DE MATO GROSSO DO SUL ROSA PEDROSSIAN - CETOHI-HRMS	3	2,7
HOSPITAL SANTA IZABEL - SCM - BA	4	3,5
HOSPITAL SANTA MARCELINA	2	1,8
HOSPITAL SARINA ROLIN	1	,9
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ALCIDES CARNEIRO	2	1,8
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA	1	,9
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JULIO MULLER DE CUIABA	1	,9
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO OSWALDO CRUZ - CEON	2	1,8
INSTITUTO DE ONCO-HEMATOLOGIA DE NATAL	1	,9
INSTITUTO DE ONCOLOGIA PEDIÁTRICA - GRAAC - SP	3	2,7
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA	2	1,8
PRONTO BABY	1	,9
SANTA CASA DE SAO PAULO	2	1,8
SERV. BABY	1	,9
SOCIEDADE DE ONCOLOGIA DA BAHIA	8	7,1
UFR CURITIBA	1	,9
Total	113	100,0

ANEXO C – APROVAÇÃO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FATORES PROGNÓSTICOS RELACIONADOS À SOBREVIVÊNCIA EM CRIANÇAS COM SÍNDROME DE DOWN E SÍNDROME MIELOPROLIFERATIVA.

Pesquisador: Marta do Socorro Pombo de Oliveira

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 2

CAAE: 05882712.0.0000.5274

Instituição Proponente: Coordenação de Pesquisa

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 181.947

Data da Relatoria: 21/01/2013

Apresentação do Projeto:

O presente Projeto de Pesquisa já recebeu Parecer Consubstanciado número 145.295, em 12/11/2012.

Objetivo da Pesquisa:

O presente Projeto de Pesquisa já recebeu Parecer Consubstanciado número 145.295, em 12/11/2012.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O presente Projeto de Pesquisa já recebeu Parecer Consubstanciado número 145.295, em 12/11/2012.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente Projeto de Pesquisa já recebeu Parecer Consubstanciado número 145.295, em 12/11/2012.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O presente Projeto de Pesquisa já recebeu Parecer Consubstanciado número 145.295, em 12/11/2012.

Recomendações:

Não se aplica.

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-002
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



Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A Pesquisadora Principal respondeu às pendências apresentadas no Parecer Consubstanciado número 145.295, em 12/11/2012 adequadamente.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

RIO DE JANEIRO, 28 de Dezembro de 2012

Assinador por:

**Carlos Henrique Debenedito Silva
(Coordenador)**

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203

Bairro: CENTRO

CEP: 20.231-002

UF: RJ

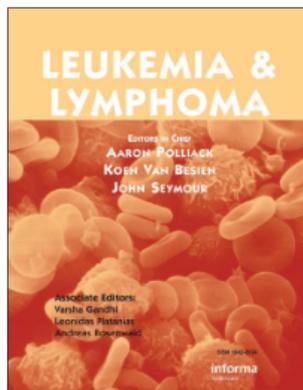
Município: RIO DE JANEIRO

Telefons: (21)3207-4550

Fax: (21)3207-4558

E-mail: cep@inca.gov.br

PUBLICAÇÃO



Clinical and molecular epidemiology of neonatal leukemia in Brazil

Suellen Valadares Moura, Francianne Andrade, Isis Q. Magalhães, Imaruí Costa, Denise Bousfield Silva, Maria Lydia D' Andrea, Vitória P. Pinheiro, Maria Lucia M. Lee, Fernando Werneck, Mariana Emerenciano, Maria S. Pombo-de-Oliveira

doi: 10.3109/10428194.2014.938327

ABSTRACT

The clinical and molecular findings of 77 neonates (NL) and 380 infant leukemia cases (IL) were selected to distinguish features between NL and IL; somatic gene mutations associated with acute leukemia including *FLT3*, *RAS* and *PTPN11* were revisited. There were 42 cases of congenital leukemia associated with Down syndrome (DS) and 39 of these cases presented features of acute myeloid leukemia (AML)-M7. Twenty-seven of the DS cases underwent spontaneous remission and were re-classified as a transient myeloproliferative disorder. *GATA1* mutations were found in 70% of these cases. In non-DS, frequent abnormalities were *MLL* rearrangements, mainly *MLL-AFF1* in acute lymphoblastic leukemia and *MLL-MLL3* in AML; the *FLT3* mutation was not found, while *RAS* (n=4) and *PTPN11* (n=2) mutations were identified and reported for the first time in NL. There was substantial evidence to support that somatic abnormalities occur in utero; thus, congenital leukemia is a good model for understanding leukemogenesis.

Clinical and molecular epidemiology of neonatal leukemia in Brazil

Suellen Valadares Moura¹, Francianne Andrade¹, Isis Q. Magalhães², Imaruí Costa³, Denise Bousfield Silva³, Maria Lydia D' Andrea⁴, Vitória P. Pinheiro⁵, Maria Lucia M. Lee⁶, Fernando Werneck⁷, Mariana Emerenciano¹, Maria S. Pombo-de-Oliveira¹

¹Pediatric Hematology-Oncology Program, Research Center, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil; ²Hospital da Criança de Brasília Jose Alencar, Distrito Federal, Brazil; ³Hospital Infantil Joana Gusmão, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil; ⁴Hospital Infantil Darcy Vargas, São Paulo, Brazil; ⁵Centro Infantil Dr. Domingos A Boldrini, Campinas, São Paulo, Brazil; ⁶Instituto de Oncologia Pediátrica – IOP/GRAAC, São Paulo, Brazil; ⁷Hospital Federal dos Servidores do Estado - HSE, Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondence: Maria S. Pombo-de-Oliveira, MD, PhD, Pediatric Hematology-Oncology Program, Research Center, Instituto Nacional de Câncer-Inca, Rio de Janeiro, Brazil; Rua André Cavalcanti 37, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, Zip Code: 20231050, E-mail: mpombo@inca.gov.br

Short title: Neonatal leukemia in Brazil.

ABSTRACT

The clinical and molecular findings of 77 neonates (NL) and 380 infant leukemia cases (IL) were selected to distinguish features between NL and IL; somatic gene mutations associated with acute leukemia including *FLT3*, *RAS* and *PTPN11* were revisited. There were 42 cases of congenital leukemia associated with Down syndrome (DS) and 39 of these cases presented features of acute myeloid leukemia (AML)-M7. Twenty-seven of the DS cases underwent spontaneous remission and were re-classified as a transient myeloproliferative disorder. *GATA1* mutations were found in 70% of these cases. In non-DS, frequent abnormalities were *MLL* rearrangements, mainly *MLL-AFF1* in acute lymphoblastic leukemia and *MLL-MLL3* in AML; the *FLT3* mutation was not found, while *RAS* (n=4) and *PTPN11* (n=2) mutations were identified and reported for the first time in NL. There was substantial evidence to support that somatic abnormalities occur in utero; thus, congenital leukemia is a good model for understanding leukemogenesis.

Keywords: congenital acute lymphoblastic leukemia; acute myeloid leukemia, *FLT3*; *KNRAS*; *PTPN11*; *MLL*; *GATA1*

INTRODUCTION

Congenital or neonatal leukemia (NL) is diagnosed up to 31 days after birth and is a very rare malignancy that occurs at a rate of 1 per 5 million live births in developed countries. It represents less than 1% of all childhood leukemia [1]. Acute myeloid leukemia (AML) is more common than acute lymphoblastic leukemia (ALL) in NL [2,3]. Complete characterization of the worldwide NL cohort is lacking, likely because many patient descriptions were published as isolated case-reports. In low and middle-income countries, there is not a clear picture of the NL occurrence due to unstable case documentation or a lack of proper investigations for leukemia. Nevertheless, since 1999 in Brazil, three basic treatment tenets were established for pediatric oncology improvements: (i) the recognition of neoplasia at an early age with immunomolecular diagnostic procedures; (ii) public access to treatment protocols and health care to assist children with long-term treatments; and, (iii) extensive pediatric oncology training [4]. As a result, the recognition of NL has improved overtime.

In neonates, ALL is characterized by a trend toward a higher incidence of *MLL* gene rearrangements (*MLL-r*); whereas, in AML, the subtypes are diverse and more studies are needed to determine consistent and specific associations in neonates with and without Down syndrome (DS) [5]. The etiology of congenital leukemia is still unknown. However, some factors may be associated with the development of a leukemia clone during the fetal period and chromosomal instability. The remarkably brief preclinical features associated with the somatic mutation profile of hematopoietic cells may be a unique *in vivo* model for correlating cooperative molecular events in the malignant pathways. This study aimed to add to the clinical and molecular findings in NL, which may lead to a better understanding of the diverse pathogenesis mechanisms started during fetal life.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The Brazilian Collaborative Study Group of Infant Leukemia (BCSGIAL) included patients from a network of hospitals located in different Brazilian states. Its purpose was to confirm the

immunophenotypic and molecular findings in children younger than 24 months-old diagnosed with acute leukemia [4,6]. Thirty onco-centers from different Brazilian cities enrolled patients in the BCSGIAL. Of the 457 cases enrolled, 77 (17%) neonates (younger than 1 month of life) and 380 (83%) infants (age \geq 32 days up to 12 months after birth) were selected for the present study (shown in Table I). Myeloid leukemias (AML) with DS were also included. Data collection and laboratory procedures at the diagnosis were evaluated and approved by the Ethics Committee of all participating institutions. Data analysis was approved by the Research Ethics Committee, Instituto Nacional de Câncer (CEP #024/10; CONEP # 707/2010).

Leukemia diagnosis

The ALL and AML diagnoses were first established through morphological examinations according to standard criteria, followed by immunophenotyping and molecular tests. ALL was categorized as B-cell precursor ALL (Bcp-ALL) based on the immunophenotyping profile, and the CD10 status was determined. AML was defined by WHO classification [7]. The immunophenotype was assessed by flow cytometry with a panel of monoclonal antibodies, using a FACS Calibur or Canto (Becton, Dickinson and Company, CA, USA) as described previously [8].

Banding cytogenetics and FISH

The karyotypes of leukemic cells were obtained at the time of diagnosis prior to any treatment using a standard G-band cytogenetic technique. Chromosomes were identified and analyzed in accordance with the International System of Human Cytogenetic Nomenclature 2005 [9]. To detect possible cryptic and/or fusion gene translocations, fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed to complement conventional cytogenetic analysis [10].

Molecular tests

Genomic DNA and total RNA were isolated from mononuclear cells isolated from bone marrow samples with the QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) or the TRIzol reagent kit (Invitrogen, Carlsbad, USA), respectively.

Detection of recurrent fusion genes

Detection of somatic fusion genes commonly associated with the major childhood ALL subtypes (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1*, *MLL-t*) and with AML (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-*

MYH11, *MLL-r*) were systematically performed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) according to standard techniques. Detection of the *MLL-r* was performed by conventional cytogenetics, RT-PCR (*MLL-AFF1*, *MLL-MLL3*-, *MLL-MLL1ENL*-), and/or by FISH as previously described [6,11].

Detection of *GATA1* mutations

In samples from neonates with DS, *GATA1* mutations were analyzed by direct sequencing in diagnostic samples prior to any treatment and when there were more than 10% blast cells. Genomic DNA was extracted from bone marrow (BM) aspirate or peripheral blood (PB) cells following standard protocols. Exons 2 of *GATA1* were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers 2F = GTCCTCGCAGGTTAATCCCC, 2R = GCCAAGGATCTCCATGGCAACCC [12]. PCR products were purified with the GFX PCR DNA and gel Band Purification kit (GE Healthcare, New England, UK) and sequenced in both directions with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) using a 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequence analysis was performed with BioEdit 7.0.9 software, comparing the obtained electropherograms with the reference sequence for *GATA1* (GenBank NM_002049). [12].

Detection of *FLT3* mutations

The presence of *FLT3* mutations were screened according to methods previously described [13]. Briefly, *FLT3*-D835 mutations were detected by restriction fragment polymorphism-mediated polymerase chain reaction assay and the *FLT3*-ITD was examined by the amplification of the JM domain in exons 11 and 12. Samples with altered pattern were sequenced. PCR products were purified with the GFX PCR DNA and gel Band Purification kit (GE Healthcare, New England, UK) and sequenced in both directions with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) using a 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequence analysis was performed with BioEdit 7.0.9 software, comparing the electropherograms with the reference sequence for *FLT3* was accessed from the National Center for Biotechnology Information (NG_007066.1; NM_004119.2; NP_004110.2).

Detection of *KRAS* and *NRAS* mutations

Genomic DNA was screened for mutations in exon 1 (codons 12 and 13) of the *KRAS* and *NRAS* genes (denoted *K/NRAS*) with PCR amplification followed by direct sequencing [14,15], comparing the electropherograms with the reference sequence of *KRAS* (NG_007524.1; NM_004985.3; NP_004976.2) and *NRAS* (NG_007572.1; NM_002524.4; NP_002515.1).

Detection of *PTPN11* mutations

Exon 3 of *PTPN11* was screened for mutations by PCR amplification [16], followed by direct sequencing, comparing the electropherograms with the reference sequence of *PTPN11* was accessed from the NCBI (NG_007459.1; NM_002834.3; NP_002825.3).

Treatments

The children recruited in the study received different chemotherapy treatments in accordance with the Brazilian AML and ALL Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) treatment protocol group (GBTLI-ALL93, GBTLI-ALL99) or the INTERFANT-based protocols [17-19].

Statistical Analysis

The χ^2 -test (two-sided) was used (or Fisher's Exact Test when expected values were less than five) to compare the frequency of neonates and infants (children less than 12 months of age), as well as distinct variables in the neonate group (gender, ALL versus AML patients, clinical findings). *P*-values <0.05 were considered statistically significant. For a subset of patients (*n* = 318) with a minimum of 2 years follow up, the Kaplan-Meier method was used to estimate survival rates [20], and differences were compared with the 2-sided log-rank test [21]. All statistical analyses were performed using the Statistical Product and Services Solutions statistical package, version 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

RESULTS

Differences and similarities in the demographics and clinic features of 77 neonates and 380 infant leukemia (IL) cohorts, from 1990 to 2013, are provided in Table I. There was a similar distribution regarding gender (ratio males: females, 0.93) in both the NL and IL groups. Differences were observed in the leukemia subtypes as AML was more frequent than ALL in neonates, and ALL was more frequent than AML in infants (*p*<0.001). Forty-two (55%) of the

neonates had DS ($p < 0.001$). There were statistically significant differences in clinical signs, such as hepatosplenomegaly, enlarged nodes, and leukemia cutis/chloroma ($p = 0.014, 0.002, 0.030$, respectively). Thirty-five children were not treated with conventional chemotherapy, the majority from the NL groups ($p < 0.001$). For all NL and IL the white blood cell counts (WBCs) ranged from 1 to $913 \times 10^9/l$ (median = 53), hemoglobin levels from 2 to 50/dL (median = 07), and platelets counts from 5 to $568 \times 10^9/l$ (median = 54). Absolute blast counts varied with a median value of 63. Differences were observed in hemoglobin levels between those two groups ($p < 0.001$).

Because clonal transient myeloproliferative disorder (TMD) in newborn with DS is separate entity, the clinical characteristics and biological findings of 77 NL patients with or without DS are shown in Supplemental Table I. There was a predominance of NL with DS and AML characteristics ($p < 0.001$). Newborns with DS and non-DS showed the same frequencies of leukemia cutis and/or chloroma. Statistically significant differences were observed for hepatomegaly, splenomegaly, enlarged nodes and central nervous system involvement ($p = 0.021, < 0.001, < 0.001, 0.001$, respectively). The white blood cell counts (WBCs) and hemoglobin levels were statistically differences in DS and non-DS. The WBCs ranged from 3 to $270 \times 10^9/l$ (median = 30) and 7 to $730 \times 10^9/l$ (median = 120), and hemoglobin levels from 8 to 24/dL (median = 13) and 4 to 14/dL (median = 10) ($p < 0.001$), respectively.

The most frequent ALL subtype was CD10⁺ pro-B ALL. Amongst the AML characteristics, the megakaryoblastic (AML-M7) subtype was the most frequent (52%), followed by AML-M4 and M5 (12%). Myelomonocytic leukemia was positive for CD13/CD33, CD14, and CD117 and AML-M7 was positive for CD41/61/42. Other than constitutive trisomy 21, the most common chromosomal somatic aberrations were *MLL-r* in 71% of ALL and 57% of AML (excluding neonates with DS) patients and *MLL-AFF1* in ALL. The most frequent abnormal fusion gene in AML was *MLL-MLL3*. Less frequent chromosomal alterations were hyperdiploidy and t(2;19)(q31;q13.2) and t(8;21)(q22;q22), which generate the *NUP98-BCL3* and *RUNX1-RUNX1T1* fusion genes, respectively. Additionally, sub-microscopic mutations such as *PTPN11* (n=1; 8%) and *RAS* (n=4; 21%) were found. All of these mutations were found in *MLL-r* cases. No mutation was found in the *FLT3* gene.

As DS was associated with TMDs, the clinical and laboratory findings were analyzed separately. The time of the diagnosis ranged from 3 to 31 days, with a mean age of 8 days and median age of 14 days. Males, white children, and the AML-M7 blast cell morphology and immunophenotype (n=39) predominated. *GATA1* mutations were found in 20 of the 29 (70%) cases tested. All mutations in exon 2 were recurrent, inserted as a frame shift that results in a stop codon. The spontaneous remission observed in more than 50% of the NL cases was documented as a TMD. The initial diagnosis of AML remained in 5 cases because the NL was treated due to persistence of blast cells and hepatic failure. The death rates were calculated separately in congenital leukemia with and without DS. The frequency of mortality in acute leukemia in neonates without DS was 65.7%; whereas, it was 35.9% in DS neonates ($p=0.001$). The relative risk of 0.39, 95% CI (0.20-0.75), confers a protection factor on death risk in DS neonates.

The 5-year overall survival (OS) after diagnosis according to neonate leukemia subtypes in DS and non-DS is shown in Figure 1. The results were significantly better for DS than non-DS patients. The median OS for non-DS patients with ALL and AML were 6.2 months (95% CI, 3.3-9.2) and 0.3 months (95% CI, 0-1.0), whereas the median in DS patients with TMD or ML-DS (myeloid leukemia) was not reached. Log-rank test showed differences ($p<0.001$).

DISCUSSION

Both medicine-based evidence and a descriptive analysis of rare diseases are important for understanding malignancies. Ten years ago, Hart Isaacs published a very extensive literature review (dating back to the 1970s), which included clinical and laboratory (cytology, molecular, and cytogenetic) findings of congenital leukemia. Almost at the same time, Bresters et al reported on the Dutch experience along with a review of literature [2,3]. These descriptive analyses included a huge number of NL cases and had enough data to determine the differences in these subsets. Neonatal CD10^{pos} Bcp-ALL is the most common subtype (in non-DS) and AML is more frequent in DS newborns; whereas, T-cell ALL is rare. Furthermore, the *MLL-AFF1* fusion gene is the most frequent genetic abnormality found in non-DS NL cases.

In both Bresters 2002 and Isaacs H 2003 reviews, spontaneous remission of TMDs was observed for DS patients [2,3]. Since then, new congenital leukemia cases have been reported,

revisited, and updated with new insights (as shown in Table II [2,3,22-34]). Cases of TMD have been better characterized and are positively associated with trisomy 21 (DS) and somatic *GATA1* mutations [35]. Nowadays, it is known that *GATA1* mutations are required for development of TMD. Recently, van der Linden et al recommended that the diagnosis and management of NL should be distinguished from TMD-DS and other clinical conditions that mimic leukemoid reactions [5]. The NL cases in our series were divided in two subgroups: 1) neonates without DS or any other genetic syndrome (n=35) and 2) neonates with DS (n=42). In this study, we included both groups, which comprised an unselected series of congenital leukemia with Bcp-ALL, AML without DS, and TMD, which were analyzed separately. The groups are representative of a heterogeneous population. Our analyses took into account the clinical and demographic characteristics of the patients, which showed similar distributions to those commonly observed in previous reported series [2,3,5,31]. One of the major concerns with the recognition of NL is the differential diagnosis to exclude congenital infections, vaccine reaction, hemolysis, and primary immune deficiency. For example, the immunization schedule recommended by the Brazilian Ministry of Healthy includes vaccination of the newborns with Bacillus Calmette–Guérin (BCG, single dose) and first dose of hepatitis B still in the maternity ward and occasionally the child would present adverse reactions [36]. All of these conditions present similar clinical signs, including leukocytosis and circulating immature cells, and involve the natural immunity system; thus, there are overlapping clinical signs with NL. It is recommended that immunophenotyping, cytogenetics, and molecular analyses should always be performed in neonates with leukemoid reactions to distinguish these entities from other serious diseases that affect this population [37]. *MLL* gene rearrangements, most commonly with *AFF1* and *MLL3*, were observed in ALL (71%) and AML (57%) without DS. One of the 21 ALL cases presented with hyperdiploidy. This numerical chromosomal abnormality has not been described in other NL studies; although, hyperdiploidy has been identified in neonatal blood spots, providing definitive evidence that this chromosomal event occurred before birth [38]. One AML case presented with the novel cytogenetic abnormality t(12;19)(q31;q13.2), which has not been reported in NL. The fusion transcript *RUNX1-RUNX1T1* was identified in another AML case. Despite the rarity of these findings, it is likely they arose *in utero*.

The *MLL*-fusion gene is sufficient in itself to cause leukemia, which may explain the difference between the frequencies of *MLL*-r and other abnormalities; in addition, essential secondary mutations may be rapidly acquired, which is especially important if the protein product has an effect on chromatin structure or the stability of gene expression [39]. The disruptive effect of *MLL*-gene fusion on DNA repair or cell-cycle regulation could facilitate the rapid acquisition of additional, genetic changes, particularly when continuously exposed to genotoxic substances during fetal hematopoiesis [40]. Gilliland suggested that additional genetic changes in cell signaling pathway of clone with abnormal fusion genes is required mainly throughout kinase activation to provide proliferative advantage to abnormal cells [41]. Since then, candidate genes in the Ras/MAPkinase signaling pathway have been constantly examined. In the present study, the *KRAS* mutations (n=4) were found in NL, as well as *PTPN11* mutations (8%), suggesting that such mutations act as cooperative leukemogenic events along with recurrent fusion genes. *KRAS* mutations have been previously found in NL, especially in those cases with *MLL*-r [33,34]. Although somatic mutations in *FLT3* were recently identified using whole exome sequencing of samples from patients with congenital ALL, we failed to demonstrate *FLT3* mutations in our NL series [24].

Neonates with DS frequently have a TMD, with clonal proliferation of immature myeloid-megakaryocytic cells due to *GATA1* mutations (reviewed in Yoshida et al, 2013 [42]). However, TMD is self-limiting and proliferation decreases spontaneously without leukemia specific treatment. *GATA1* encodes a transcription factor essential for erythroid and megakaryocyte differentiation. The majority of *GATA1* mutations prevent synthesis of full-length GATA1, leading to a truncated protein GATA1s [43]. A total of 20 (70%) mutations in the *GATA1* gene were identified in this cohort of DS neonates. This lower frequency compared to previous studies [44] may be explained by technical issues, which include limitations of screening method and blast cell proportion in the beginning of the analyzed samples, discussed in detail previously [12]. *GATA1* mutations were exclusively found in TMD and/or AML-M7. The pathogenesis of TMD-DS and development to true AML-M7 are still unclear and the estimation of the *GATA1* expression level at diagnosis in the neonate period may be a predictive factor.

As in all retrospective analyses, there are some negative and positive points that should be discussed. The weakness of this study is that we might have missed important variables in the broad spectrum of some NL subtypes at the time of the diagnosis, or missed the unrecognized cases during the period of study. However, the strong point of the study is the increased recognition of NL over time and, the clear, defined diagnosis and treatment of TMD-DS. In addition, molecular abnormalities other than *MLL-r* and *GATA1* mutations, such as *RAS* and *PTPN11* mutations, were identified and reported.

In conclusion, molecular aberrations are highly frequent among NL cases. These critical somatic abnormalities that occur in early hematopoietic precursors *in utero* are good models to demonstrate the distinct set of gene mutations that explain leukemogenesis.

ACKNOWLEDGEMENTS AND DECLARATION OF INTERESTS

This work was made possible due to the collaboration of physicians from different regions of Brazil who provided samples and clinical data. The authors are currently supported by grants from the Brazilian National Research Council (CNPq) and FAPERJ. The funding bodies had no influence on the study design; the collection, analysis, or interpretation of data; the writing of the manuscript; or the decision to submit the manuscript for publication.

There is no conflict of interest. The San Francisco edit personal polish the English language (<http://www.sfedit.net>).

Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at www.informahealthcare.com/la.

REFERENCES

1. Bader JL, Miller RW. US cancer incidence and mortality in the first year of life. *Am J Dis Child* 1979;133:157-159.
2. Bresters D, Reus AC, Veerman AJ, van Wering ER, van der Does-van den Berg A, Kaspers GJ. Congenital leukaemia: the Dutch experience and review of the literature. *Br J Haematol* 2002;117:513-524.
3. Isaacs H, Jr. Fetal and neonatal leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003;25:348-361.
4. Pombo de Oliveira MS, Koifman S, Vasconcelos GM, Emerenciano M, de Oliveira Novaes C, Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute L. Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 2009;42:121-125.
5. van der Linden MH, Creemers S, Pieters R. Diagnosis and management of neonatal leukaemia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2012;17:192-195.
6. Emerenciano M, Agudelo Arias DP, Coser VM, et al. Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47:549-554.
7. 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.
8. van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, et al. . EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012;26:1908-1975.
9. Shaffer LG, Tommerup N. ISCN 2005: an international system for human cytogenetic nomenclature (2005): recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Karger Publishers; 2005.
10. Kohn ZJ, Wright SL, Barber KE, Harrison CJ. Fluorescence In situ hybridization (FISH) as a tool for the detection of significant chromosomal abnormalities in childhood leukaemia. *Methods Mol Biol* 2009;538:29-55.
11. Emerenciano M, Meyer C, Mansur MB, Marschalek R, Pombo-de-Oliveira MS, Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute L. The distribution of MLL breakpoints correlates with outcome in infant acute leukaemia. *Br J Haematol* 2013;161:224-236.
12. Magalhaes IQ, Splendore A, Emerenciano M, Figueiredo A, Ferrari I, Pombo-de-Oliveira MS. GATA1 mutations in acute leukemia in children with Down syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;166:112-116.
13. Emerenciano M, Menezes J, Vasquez ML, et al. . Clinical relevance of FLT3 gene abnormalities in Brazilian patients with infant leukemia. *Leuk Lymphoma* 2008;49:2291-2297.
14. Liang DC, Shih LY, Fu JF, et al. . K-Ras mutations and N-Ras mutations in childhood acute leukemias with or without mixed-lineage leukemia gene rearrangements. *Cancer* 2006;106:950-956.
15. Bornholdt J, Hansen J, Steiniche T, et al. . K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure. *BMC Cancer* 2008;8:53.
16. Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, et al. . PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 2002;70:1555-1563.
17. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, et al. . Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 2000;95:3310-3322.
18. Pieters R, Schrappe M, De Lorenzo P, et al. . A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet* 2007;370:240-250.
19. Brandalise SR, Pinheiro VR, Aguiar SS, et al. . Benefits of the intermittent use of 6-mercaptopurine and methotrexate in maintenance treatment for low-risk acute

- lymphoblastic leukemia in children: randomized trial from the Brazilian Childhood Cooperative Group--protocol ALL-99. *J Clin Oncol* 2010;28:1911-1918.
20. Kaplan EL, Meir P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;53:457-481.
 21. Mantel N. Evaluation of survival data and two rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep.* 1966;50:163-170
 22. Borkhardt A, Wilda M, Fuchs U, Gortner L, Reiss I. Congenital leukaemia after heavy abuse of permethrin during pregnancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:F436-437.
 23. Carroll A, Civin C, Schneider N, et al. . The t(1;22) (p13;q13) is nonrandom and restricted to infants with acute megakaryoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 1991;78:748-752.
 24. Chang VY, Basso G, Sakamoto KM, Nelson SF. Identification of somatic and germline mutations using whole exome sequencing of congenital acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer* 2013;13:55.
 25. Chantrain CF, Sauvage D, Brichard B, et al. . Neonatal acute myeloid leukemia in an infant whose mother was exposed to diethylstilboestrol in utero. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:220-222.
 26. Ergin H, Ozdemir OM, Karaca A, et al. A Newborn with Congenital Mixed Phenotype Acute Leukemia After In Vitro Fertilization. *Pediatr Neonatol* 2013.
 27. Ferguson EC, Talley P, Vora A. Translocation (6;17)(q23;q11.2): a novel cytogenetic abnormality in congenital acute myeloid leukemia? *Cancer Genet Cytogenet* 2005;163:71-73.
 28. Frontanes A, Montalvo F, Valcarcel M. Congenital leukemia with leukemia cutis: a case report. *Bol Asoc Med P R* 2012;104:52-54.
 29. Prigogina EL, Fleischman EW, Puchkova GP, et al. . Chromosomes in acute leukemia. *Hum Genet* 1979;53:5-16.
 30. Van den Berghe H, David G, Broeckert-Van Orshoven A, et al. . A new chromosome anomaly in acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Hum Genet* 1979;46:173-180.
 31. van der Linden MH, Valsecchi MG, De Lorenzo P, et al. . Outcome of congenital acute lymphoblastic leukemia treated on the Interfant-99 protocol. *Blood* 2009;114:3764-3768.
 32. Wong KF, Yuen HL, Siu LL, Pang A, Kwong YL. t(8;16)(p11;p13) predisposes to a transient but potentially recurring neonatal leukemia. *Hum Pathol* 2008;39:1702-1707.
 33. Liang DC, Shih LY, Fu JF, et al. . K-Ras mutations and N-Ras mutations in childhood acute leukemias with or without mixed-lineage leukemia gene rearrangements. *Cancer* 2006;106:950-956.
 34. Driessen EM, van Roon EH, Spijkers-Hagelstein JA, et al. . Frequencies and prognostic impact of RAS mutations in MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants. *Haematologica* 2013;98:937-944.
 35. Carpenter E, Valverde-Garduno V, Sternberg A, et al. . GATA1 mutation and trisomy 21 are required only in haematopoietic cells for development of transient myeloproliferative disorder. *Br J Haematol* 2005;128:548-551.
 36. Manual de normas de vacinação [Internet]. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde; 2001 June - [cited 2014 April 12]; Available from: http://www.fasa.edu.br/images/pdf/manual_de_normas_de_vacinacao.pdf
 37. 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.
 38. Maia AT, Tussiwand R, Cazzaniga G, et al. . Identification of preleukemic precursors of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in cord blood. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40:38-43.
 39. Ayton PM, Cleary ML. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene* 2001;20:5695-5707.
 40. Ishii E, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, et al. . In vitro cleavage of the MLL gene by topoisomerase II inhibitor (etoposide) in normal cord and peripheral blood mononuclear cells. *Int J Hematol* 2002;76:74-79.

41. Gilliland DG. Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Semin Hematol* 2002;39:6-11.
42. Yoshida K, Toki T, Okuno Y, et al. . The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet* 2013;45:1293-1299.
43. Vyas P, Crispino JD. Molecular insights into Down syndrome-associated leukemia. *Curr Opin Pediatr* 2007;19:9-14.
44. Alford KA, Reinhard K, Garnett C, et al. Analysis of GATA1 mutations in Down syndrome transient myeloproliferative disorder and myeloid leukemia. *Blood* 2011; 118 (8): 2222-2238.

JUST ACCEPTED

Table Legends

Table I. Demography and clinic features of neonatal compared with infant leukemia, Brazil 1990-2013.

Age at diagnosis, mo	All leukemias Total (n=457)	Neonatal leukemias		Infant leukemias	p-Value [†]
		Total (n=77)	Total (n=380)		
Gender					
Female	219 (48)	38 (49)	181 (48)		0.783
Male	238 (52)	39 (51)	199 (52)		
Type of leukemias					
ALL	270 (59)	26 (34)	244 (64)		<0.001
AML	187 (41)	51 (66)	136 (36)		
Down Syndrome					
Yes	53 (12)	42 (55)	11 (03)		<0.001
No	404 (88)	35 (45)	369 (97)		
Initial findings					
Hepatomegaly	315 (69)	44 (57)	271 (71)		0.014
Splenomegaly	331 (72)	47 (61)	284 (75)		0.014
Enlarged nodes	126 (28)	10 (13)	116 (31)		0.002
CNS involvement	85 (19)	11 (14)	74 (20)		0.286
Leukemia cutis/chloroma	27 (06)	09 (12)	18 (05)		0.030
Therapy [‡]					
No	35 (12)	28 (49)	07 (03)		<0.001
Yes	247 (88)	29 (51)	218 (97)		
Status [‡]					
Alive	188 (48)	33 (47)	155 (48)		0.933
Dead	207 (52)	37 (53)	170 (52)		
		Median (Min-Max)	Median (Min-Max)		p-Value [†]
WBC count (x10 ⁹ /L)	53 (1-913)	63 (2-730)	56 (1-913)		0.601
Hemoglobin (xg/dL)	07 (2-50)	12 (4-24)	07 (2-50)		<0.001
Platelets (x10 ⁹ /L)	54 (5-568)	57 (159-490)	49 (5-568)		0.437
Blast (%)	63 (0-100)	60 (0-100)	80 (0-100)		0.374

n, total number of patients; ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; CNS, central nervous system; WBC, white blood cell; [†]p-Value correspond to neonatal leukemia *versus* infant leukemia; [‡] differences are due to missing values.

*results not shown in table: one biphenotypic cases (both lymphoid and myeloid markers) (0-1 age), one biphenotypic cases (both lymphoid and myeloid markers) (1-12 age), two juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) (1-12 age);

Table II. The results of the systematic review of the recent data in the literature, including the Brazilian cases, 1970-2013.

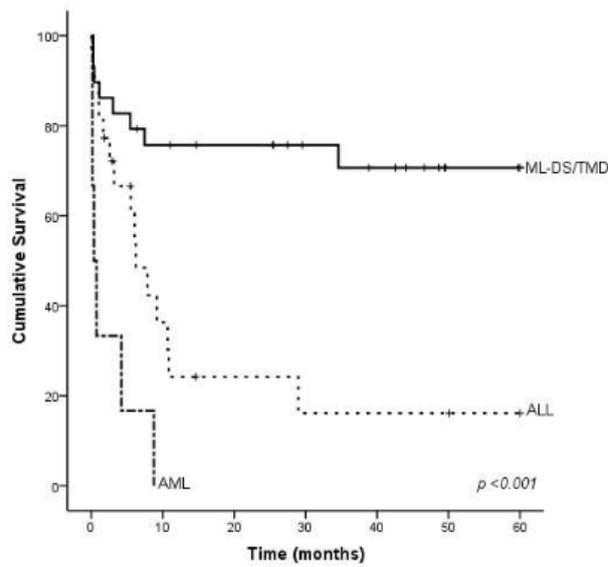
Leukemia subtype	Type of study	Period	Number Cases	Karyotype and/or molecular	(%)	Reference
ALL + AML	Review	1970-2002	55/145	Cytogenetic abnormalities	115 (79)	Issacs, 2003 [3]
			81/145	<i>With MLL-r</i>	42 (37)	
				__t(4;11)(q21;q23)	11 (10)	
				__t(9;11)(p22;q23)	7 (6)	
				__t(11;19)(q23;p13)	17 (15)	
				Other	7 (6)	
			t(11;22)(p13;q13)	8 (7)		
ALL	Single Center Experience		01	t(4;11)(q21;q23)	01	Prigogina et al, 1979 [29]
ALL + AML	Single Center Experience	1975-2000	04/15	<i>MLL-r</i>	14 (20)	Bresters et al, 2002 [2]
			11/15	t(4;11)(q21;q23)	5 (7)	
				__t(9;11)(p22;q23)	2 (3)	
			t(11;19)(q23;p13)	7 (10)		
ALL	Clinical trial	1999-2005	30	<i>MLL</i> germ line	2 (7)	Van der Linden et al, 2009 [31]
				<i>MLL-r</i>	25 (93)	
				__t(4;11)(q21;q23)	12 (48)	
				__t(9;11)(p22;q23)	1 (4)	
				__t(11;19)(q23;p13)	8 (32)	
				Other <i>MLL</i> translocations	2 (8)	
			Undefined <i>MLL</i> translocations	2 (8)		
AML	Clinical trial	1988-1990	02	t(1;22)(p13;q13)	2	Carroll et al, 1991 [23]
ALL	Case Report	Un	2/4	<i>FLT3</i> mutations	2	Chang et al, 2013 [24]
				<i>MLL-r</i>	3	
				__t(4;11)(q21;q23)	2	
			__t(11;19)(q23;p13)	3		
Mixed phenotype	Case Report	Un	01	<i>MLL</i> germ line	0	Ergin et al, 2013 [26]
AML	Case Report	Un	01	t(11;19)(q23;p13)	1	Borkhardt et al, 2003 [22]
ALL	Case Report	Un	01	t(4;11)(q13;q22)	1	Van den Berghe et al, 1979 [30]
ALL	Case Report	Un	01	t(4;11)(q21;q23)	1	Frontanes et al, 2012 [28]
AML	Case Report	Un	01	t(11;19)(q23;p13.1)	1	Chantrain et al, 2009 [25]
AML	Case Report	Un	01	t(3;16)(p11;p13) <i>MYST3-CREBBP</i>	1	Wong et al, 2008 [32]
AML	Case Report	Un	01	46,XY,t(6;17)(q23;q11.2)	1	Ferguson et al, 2005 [27]
ALL + AML	Retrospective study	Un	3/443	<i>ERAS/NRAS</i>	3	Liang et al, 2006 [33]
ALL	Clinical trial	Un	1/109	<i>ERAS/NRAS</i>	1	E.M.C. Driessen et al, 2013 [34]
AML+ ALL	Retrospective study	1990-2013	77/457	<i>MLL-r</i>	29 (68)	The presente report
				<i>RUNX1/RUNX1T1</i>	2 (7)	
				<i>ERAS/NRAS</i>	4 (21)	
				<i>GATA1</i>	20 (70)	

16

n, total number of cases; ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; *MLL-r*, *MLL* gene rearrangements; Un, unknown.

Figure Legend

Figure 1. Overall survival of neonatal (age ≤ 31 days) leukemia subtypes, Brazil 1990-2011. The median OS for non-DS patients with ALL and AML was worse than the OS for DS patients. Log-rank test showed differences ($p < 0.001$). Abbreviations. ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia (in patient without Down syndrome); TMD, transient myeloproliferative disorders and ML-DS, myeloid leukemia in patients with Down syndrome.



APÊNDICES

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO

INFORMAÇÕES DA PROCEDÊNCIA DA AMOSTRA		
1. Instituição:		
2. Médico responsável pelo envio/atendimento:		
3. Ano de envio da amostra:		
INFORMAÇÕES SÓCIO-DEMOGRÁFICAS		
4. Nome do paciente:		
5. Data de Nascimento:		6. Peso ao nascimento:
/ / (Dia/Mês/Ano)		Kg
7. Sexo:	8. Raça/Cor:	
<input type="checkbox"/> Feminino	<input type="checkbox"/> Branca	<input type="checkbox"/> Parda
<input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Negra	<input type="checkbox"/> Indígena
9. Local de moradia:		
9.1 Cidade:	9.2 UF:	
10. Local de nascimento:		
10.1 Cidade:	10.2 UF:	
11. Nome da mãe:		12. Idade da mãe:
		() Anos
STATUS NA ÚLTIMA AVALIAÇÃO		
13. Data da última consulta/avaliação:		
/ / (Dia/Mês/Ano)		
14. Vivo:	15. Data do óbito:	
<input type="checkbox"/> Sim (passe para 18)	/ / (Dia/Mês/Ano)	
<input type="checkbox"/> Não		
16. Causa do óbito:		17. Quais complicações:
<input type="checkbox"/> Progressão da doença		

<input type="checkbox"/> Toxicidade medicamentosa			
<input type="checkbox"/> Outras complicações			
INFORMAÇÕES CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS INICIAIS			
18. Data do diagnóstico:			
/ /		(Dia/Mês/Ano)	
19. Diagnóstico:			
LMA com subtipo:		Mielodisplasia (SMD): <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
20. Contagem total de leucócitos:		21. Contagem de plaquetas:	
() ml.		() mm ³ .	
22. Hemoglobina:		23. Percentual de hematócrito:	
() g/dL.		() %.	
24. Percentual de blastos:		25. Fonte dos blastos:	
() %.		<input type="checkbox"/> Medula óssea <input type="checkbox"/> Sangue periférico	
INFORMAÇÕES RELATIVAS AO TRATAMENTO			
26. Fez tratamento quimioterápico?		27. Data de início do tratamento:	
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não (passe para 42)		/ / (Dia/Mês/Ano)	
28. Qual a superfície corporal?		29. Protocolo terapêutico:	
() m ² .			
30. Descrição sumária e dosagens com as etapas mais importantes do tratamento:			
31. Dose utilizada de Ara-C:		32. A dose de ARA-C foi reduzida comparada com o protocolo LMA sem SD?	
() m ² .		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
33. Dose utilizada de Doxorrubicina:		34. A dose de Doxorrubicina foi reduzida comparada com o protocolo LMA sem SD?	
() m ² .		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
35. Dose cumulativa de Ara-C e Doxorrubicina ao final do tratamento:			
Ara-C () m ²		Doxorrubicina () m ² .	
36. Fez redução de dose de outro quimioterápico?		40. Remissão clínica:	

<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
37. Nome do quimioterápico e a dose utilizada:		41. Data da remissão:	
		/ / (Dia/Mês/Ano)	
38. Duração da aplasia		40. Morbidades adicionais ao tratamento:	
() dias.			
39. Qual a resposta ao tratamento inicial?			
<input type="checkbox"/> Resposta completa <input type="checkbox"/> Resposta parcial <input type="checkbox"/> Falha ou não-resposta			
42. Transplante de Medula Óssea:			
<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não		
43. Toxicidade na Indução		44. Toxicidade na Intensificação	
<input type="checkbox"/> Cardíaca <input type="checkbox"/> Hepática <input type="checkbox"/> Renal <input type="checkbox"/> Gastrointestinal <input type="checkbox"/> Pulmonar <input type="checkbox"/> Sistema Nervoso Central <input type="checkbox"/> Cutânea		<input type="checkbox"/> Cardíaca <input type="checkbox"/> Hepática <input type="checkbox"/> Renal <input type="checkbox"/> Gastrointestinal <input type="checkbox"/> Pulmonar <input type="checkbox"/> Sistema Nervoso Central <input type="checkbox"/> Cutânea	
45. Observações adicionais:			

APÊNDICE B – CARTA CONVITE

MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA - CPq
PROGRAMA DE HEMATOLOGIA-ONCOLOGIA PEDIÁTRICA

Ref.: Pesquisa de mutações no *GATA1* em crianças com síndrome de Down e desordens hematopoiéticas clonais.

Carta convite para participação em projeto de pesquisa.

Projeto: Fatores prognósticos relacionados à sobrevida em crianças com síndrome de Down e leucemia mieloide aguda e síndrome mielodisplásica.

Caro colega,

A vossa colaboração nos estudos epidemiológicos moleculares de nossas pesquisas sobre mutações no *GATA1* em leucemias gerou novos conhecimentos na prática clínica. Nesta oportunidade convido-o para colaborar com o Projeto de Pesquisa de Mestrado da aluna SUELLEN VALADARES MOURA, intitulada “Fatores prognósticos relacionados à sobrevida em crianças com síndrome de Down e leucemia mieloide aguda e síndrome mielodisplásica”. A Suellen é enfermeira com Residência Multiprofissional em Oncologia pelo INCA e está sob minha orientação desde 2011.

Esta pesquisa objetiva analisar a sobrevida global de crianças com SD, diagnosticadas com LMA e/ou SMD entre o período de janeiro de 2000 e dezembro de 2011, e avaliar os fatores prognósticos identificados. Os sujeitos desta análise serão crianças portadoras da SD, com idade entre 0 a 5 anos, de ambos os sexos, cujas amostras foram recebidas no período citado acima em nosso laboratório.

Utilizaremos como instrumento para coleta de informações um **formulário eletrônico**, já constando as informações disponibilizadas no momento do recebimento da amostra com os

detalhes clínicos anteriores ao tratamento. Portanto, as informações que já constam em nosso banco não precisam ser re-enviadas.

Gostaríamos de vossa atenção ao convite para participar de nova etapa do estudo referente às análises de prognóstico. Colocamo-nos à disposição para qualquer esclarecimento que se faça necessário. Contamos, com a sua participação que, além de qualificar nossa pesquisa, viabilizará uma oportunidade efetiva para partilharmos experiências, estreitarmos relações e refletirmos sobre a nossa prática laboratorial/assistencial.

Atenciosamente,

(Assinatura eletrônica)

APÊNDICE C - DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS CATEGÓRICAS

1. Características demográficas e clínicas ao diagnóstico:

Nome	Descrição (label)	Categorias
SEX	Sexo	Masculino = 1; Feminino = 2
IDADE	Idade ao diagnóstico (mês)	
PESO	Peso ao nascimento (medido em gramas)	
ALTURA	Altura ao nascimento (medido em cm)	
PARTO	Tipo de parto	Normal = 1; Cesário = 2
APGAR	Apgar no 1º e 5º minuto	
COR	Cor da pele	Branca = 1; Não branca = 2
CARDIOREC	Cardiopatia congênita	Sim = 1; Não = 2
GEMELARREC	Irmão gemelar	Sim = 1; Não = 2
HEPATOREC	Hepatomegalia	Sim = 1; Não = 2
ESPLENREC	Esplenomegalia	Sim = 1; Não = 2
LINFREC	Linfonodomegalia	Sim = 1; Não = 2
SNCREC	Comprometimento de Sistema Nervoso Central	Sim = 1; Não = 2
TUMOREC	Apresentação tumoral (leucemia “cutis”/cloroma)	Sim = 1; Não = 2

2. Características biológicas, imunofenotípica e molecular ao diagnóstico:

Nome	Descrição (label)	Categorias
DIAG	Diagnóstico	1 = LM-DS; 2 = TAM
FAB	Subtipo imunofenotípico	M0 a M7
FABREC	Subtipo imunofenotípico recodificado	M7 = 1; Outros = 2
TAMPREVIA	TAM prévia a LM-SD (somente M7)	Sim = 1; Não = 2

LEUCO	Leucometria: número total de leucócitos por milímetro cúbico de sangue	Expresso em mm ³
HG	Hemoglobina, contagem de glóbulos vermelhos	Expresso em g/dl
HT	Hematócrito: percentual de glóbulos vermelhos em relação ao sangue da amostra;	Expresso em %
BLAST	Blastos: percentual de leucócitos imaturos na amostra de sangue	Expresso em %
PLAQ	Plaquetas: número total de plaquetas por milímetro cúbico de sangue	Expresso em mm ³
GATAREC	Mutação no gene <i>GATA1</i>	Sim = 1; Não = 2
TIPOMUTREC	Classificação da mutação conforme perfil de expressão dos transcritos gênicos do <i>GATA1</i>	PTC1-3' = 1; PTC1-5' = 2; PTC2 = 3; Splicing error = 4; Perda da 1º metionina = 5; Desconhecido = 6

3. Características relacionadas ao tratamento e evolução da doença:

Nome	Descrição (label)	Categorias
TTO	Tratamento quimioterápico	Sim = 1; Não = 2
TTO adequado versus inadequado: TAM	Tratamento adequado: baseado em Klusmann <i>et al.</i> , 2008 foi considerado tratamento adequado quando utilizado baixas doses de ARA-C subcutânea ou observação clínica sem uso de quimioterapia (apenas medicações de suporte); Tratamento inadequado: altas doses de quimioterapia.	Tratamento adequado = 1 Tratamento inadequado = 2
TTO adequado versus inadequado: LMA	Tratamento adequado: baseado em GAMIS <i>et al.</i> , 2003; CREUTZIG <i>et al.</i> , 2005; SORREL <i>et al.</i> , 2012 que indicam crianças que receberam protocolos tratamento com redução de ARA-C e antracíclicos. Tratamento inadequado: altas doses	Tratamento adequado = 1 Tratamento inadequado = 2

	de quimioterapia (ARA-C e antracíclicos).	
PROTREC	Protocolo terapêutico utilizado	1= BFM; 2= POG; 3= Outros; 4= sem informação
SC	Superfície corporal expressa em m ²	
ARACFINAL	Dose cumulativa de ARA-C até o óbito ou “cura”	Expressa em mg
DAUNO/DOXO/I DAFINAL	Dose cumulativa de doxorubicina, daunorrubicina ou idarrubicina até o óbito ou “cura”	Expressa em mg
V16FINAL	Dose cumulativa de Vepeside 16 até o óbito ou “cura”	Expressa em mg
DOSEARAREDU ZIDA	Dose de ARA-C reduzida (protocolo Down)	Sim = 1; Não = 2
DOSEDOXREDU ZIDA	Dose de doxorubicina, daunorrubicina ou idarrubicina reduzida (protocolo Down)	Sim = 1; Não = 2
REMISSÃO REC	A remissão de doença observada através da análise morfológica: após terapia de indução para os pacientes com LMA que receberam quimioterapia; e para os pacientes com TAM que remitem espontaneamente. Excluído pacientes que evoluíram a óbito antes da avaliação e aqueles cuja informação não foi encontrada.	Sim = 1; Não = 2
TEMPO ATÉ REMITIR	Tempo em dias entre o início do tratamento até a remissão. Excluído pacientes que evoluíram a óbito antes da avaliação.	
RESPOSTA REC	Resposta ao tratamento ao final da indução para os pacientes com LMA. Completa: quando a avaliação morfológica da MO ou SP demonstrou contagem de células blásticas <5%; Parcial: quando as contagens de blastos variaram entre 5-29%; Falha: >5% de blastos na MO ou SP no final da terapia de indução (SORREL et al, 2012).	Completa = 1; Parcial = 2; Falha ou não resposta = 3

RECAIDAREC	Recaída da doença após tratamento quimioterápico. Excluído pacientes que evoluíram a óbito antes ou durante o tratamento e aqueles cuja informação não foi encontrada.	Sim = 1; Não = 2
TOTALRECA	Total de recaída	Nº de eventos = x; Sem evento = 0
TMOREC	Transplante de medula óssea	Sim = 1; Não = 2
TOXREC	Toxicidade na indução e/ou intensificação	Cardíaca = 1; Hepática = 2; Renal = 3; Gastrointestinal = 4; Pulmonar = 5; Neurológica = 6; Cutânea = 7; Hematológica = 8; Sem toxicidade = 9
ÓBITO		Sim = 1; Não = 0
EARLY DEATH	Até 6 meses após diagnóstico. Excluído pacientes que não evoluíram a óbito	Sim = 1; Não = 2
MOMENTO DO ÓBITO	Em que fase do diagnóstico/tratamento o paciente evoluiu a óbito	Pré-terapia = 1; Indução = 2; Intensificação = 3; Pós-terapia = 4
COBITO	Causa do óbito	Toxicidade medicamentosa = 1; Progressão da doença = 2; Outras complicações = 3

APÊNDICE D – TABELA DE MUTAÇÕES *GATA1*

Tabela 6.3. Características clínicas e moleculares de 52 crianças com mutação no éxon 2 do *GATA1*, Brasil 2000-2014

Nº	Sexo	Idade	Leuco	Diag	Mutação	Consequência da mutação	Tipo de mutação
1	M	0	38,0	TAM	c.182_192dupCCTACTACAGG	Mudança no quadro de leitura no códon65, códon de parada 137	PTC 2
2	M	0	162,5	LMA	c.138_139insC	Mudança no quadro de leitura no códon47, códon de parada 67	PTC 1-5'
3	F	27	7,1	LMA	c.164_178delinsTGCTCCGTTGCACATGCGGCAA	Mudança no quadro de leitura no códon55, códon de parada 69	PTC 1-5'
4	F	0	219,0	TAM	c.21dupG	Mudança no quadro de leitura no códon8, códon de parada 38	PTC 1-5'
5	F	31	12,8	LMA	c.114_115insT (p.E39fs*1)	Mudança no quadro de leitura no códon39, códon de parada 40	PTC 1-5'
6	M	7	24,9	LMA	c.90_91delAG	Mudança no quadro de leitura no códon30, códon de parada 38	PTC 1-5'
7	M	12	8,2	LMA	c.42_43delCC	Mudança no quadro de leitura no códon14, códon de parada 38	PTC 1-5'
8	F	34	41,8	LMA	c.90_91delAG	Mudança no quadro de leitura no códon30, códon de parada 38	PTC 1-5'
9	M	13	36,7	LMA	c.201G>A (p.E67E)	Substituição - mutação silenciosa	Desconhecido
10	M	1	53,5	TAM	c.154-173dup20pb	Mudança no quadro de leitura no códon58, códon de parada 143	PTC 2
11	M	0	150,0	LMA	c.151A>T (c.153-162 delCACAGCCACC)	Mudança no quadro de leitura no códon51, códon de parada 133	PTC 2
12	M	19	6,4	LMA	c.3G>A	Não tradução da met1	Perda 1ª Met.
13	M	1	20,7	TAM	c.29_30delGG	Mudança no quadro de leitura no códon10, códon de parada 38	PTC 1-5'
16	M	1	35,0	LMA	ND	ND	Desconhecido
14	F	20	4,0	LMA	c.182C>A (p.A61D)	Substituição - Missense	Desconhecido
15	F	25	18,0	LMA	c.90_91delAG	Mudança no quadro de leitura no códon30, códon de parada 38	PTC 1-5'

17	F	0	22,0	TAM	c.183insTACGGGCACTGGCATAAC	Mudança no quadro de leitura no códon59, códon de parada 143	PTC 2
18	F	0	22,2	TAM	c.199G>T	Glu67parada	PTC 1-3'
19	M	1	45,4	TAM	c.49C>T	Glu17parada	PTC 1-5'
20	F	24	34,9	LMA	c.99_101dupCTT	Mudança no quadro de leitura no códon35, códon de parada 69	PTC 1-5'
21	F	0	136,6	LMA	c.168insTGCAGCTG	Mudança no quadro de leitura no códon56, códon de parada 139	PTC 2
22	M	23	11,0	LMA	c.161_162insC	Mudança no quadro de leitura no códon54, códon de parada 67	PTC 1-5'
23	M	1	12,7	TAM	ND	ND	Desconhecido
24	F	0	53,9	TAM	c.113_117delCTGAG	Mudança no quadro de leitura no códon39, códon de parada 66	PTC 1-5'
25	F	29	59,0	LMA	c.42_51delCCTCCCCCAG	Mudança no quadro de leitura no códon14, códon de parada 133	PTC 2
26	M	0	81,0	TAM	c.155_168dupCAGCCACCGCTGCA	Mudança no quadro de leitura no códon57, códon de parada 141	PTC 2
27	M	32	15,2	LMA	c.158insACACACC	Mudança no quadro de leitura no códon53, códon de parada 69	PTC 1-5'
28	F	1	20,6	TAM	ND	ND	Desconhecido
29	M	21	2,5	LMA	c.163_184dupGCTGCAGCTGCGGCACTGGCCT	Mudança no quadro de leitura no códon61, códon de parada 142	PTC 2
30	M	19	3,3	LMA	c.31_32insA	Mudança no quadro de leitura no códon11, códon de parada 39	PTC 1-5'
31	F	12	29,0	LMA	c.185insCCTCCCACGTGACTCCATTGAA	Mudança no quadro de leitura no códon62, códon de parada 74	PTC 1-3'
32	F	21	14,5	LMA	c.115G>T	Glu40stop	PTC 1-5'
33	M	18	10,8	LMA	c.78delG	Mudança no quadro de leitura no códon20, códon de parada 136	PTC 2
34	M	33	47,0	LMA	c.195insCAGTGCCAGCT	Mudança no quadro de leitura no códon65, códon de parada 77	PTC 1-3'
35	M	20	6,9	LMA	c.201G>A (p.E67E)	Substituição - mutação silenciosa	Desconhecido

36	F	24	63,3	LMA	c.149_169dupCCTCCACTGCCCC	Mudança no quadro de leitura no códon50, códon de parada 71	PTC 1-5'
37	F	18	13,3	LMA	c.159_165_dupCACCGCT	Mudança no quadro de leitura no códon55, códon de parada 69	PTC 1-5'
38	M	1	95,6	TAM	c.187_188insT	Mudança no quadro de leitura no códon63, códon de parada 67	PTC 1-3'
39	M	18	15,3	LMA	c.138_139insTCCTC	Mudança no quadro de leitura no códon48, códon de parada 138	PTC 2
40	F	0	90,7	LMA	c.221T>C	Erro de splicing	Erro de <i>splicing</i>
41	F	7	4,4	LMA	c.156_157insCA	Mudança no quadro de leitura no códon53, códon de parada 137	PTC 2
42	M	2	8,1	TAM	c.85G>T (p.E29*)	Glu29stop	PTC 1-5'
43	M	0	66,9	TAM	c.151ins8	Mudança no quadro de leitura no códon51, códon de parada 139	PTC 2
44	M	0	18,2	TAM	c.145_146insCT	Mudança no quadro de leitura no códon49, códon de parada 137	PTC 2
45	M	0	7,6	LMA	c.12_13insC (p.P4fs*35)	Mudança no quadro de leitura no códon5, códon de parada 39	PTC 1-5'
46	M	0	22,0	TAM	c.187_188insTACT	Mudança no quadro de leitura no códon63, códon de parada 68	PTC 1-3'
47	M	15	6,0	LMA	c.90_91delAG	Mudança no quadro de leitura no códon30, códon de parada 38	PTC 1-5'
48	M	4	13,1	LMA	c.84_86del AGA	Mudança no quadro de leitura no códon28, códon de parada 66	PTC 1-5'
49	F	2	4,6	TAM	c.108dupT	Mudança no quadro de leitura no códon38, códon de parada 40	PTC 1-5'
50	F	5	24,0	LMA	c.193ins17	ND	Desconhecido
51	F	1	23,7	TAM	c.219A>C (p.V74_C199del)	<i>Erro de splicing</i>	Erro de <i>splicing</i>
52	F	34	3,0	LMA	c.220G>A (p.V74I)	<i>Erro de splicing</i>	Erro de <i>splicing</i>

Nº, número de identificação dos pacientes; Leuco, leucometria ($\times 10^9/l$); Diag, diagnóstico; LMA, leucemia mieloide aguda; TAM, mielopose anormal transitória. Em negrito valores estatisticamente significantes.

APÊNDICE E – RESULTADO DAS ANÁLISES DENSITOMÉTRICAS

Paciente (N. Lab)	Paciente No.	Tipo de mutação	Banda superior	Banda inferior	Relação inferior/superior
490/2004	1	PTC 1-5'	125,46	462,05	4
204/2006	2	PTC 1-5'	518,85	126,71	1
061/2007	3	PTC 1-5'	477,31	212,80	1
455/2008	4	PTC 1-5'	153,36	650,02	4
754/2008	5	PTC 1-5'	111,02	674,74	6
444/09	6	PTC 1-5'	87,37	700,04	8
688/09	7	PTC 1-5'	163,47	615,21	4
0083/2010	8	PTC 1-5'	17,95	25,73	1
351/2010	9	PTC 1-5'	65,77	564,32	9
158/11	10	PTC 1-5'	70,71	569,97	8
182/11	11	PTC 1-5'	72,94	483,35	7
0388/12	12	PTC 1-5'	7,22	35,00	5
0234/13	13	PTC 1-5'	102,36	429,48	4
345/2008	14	PTC 1-3'	29,41	688,19	23
343/2010	15	PTC 1-3'	27,14	748,14	28
527/2010	16	PTC 1-3'	16,35	621,23	38
282/11	17	PTC 1-3'	72,80	707,25	10
306/2008	18	PTC 2	55,94	737,37	13
602/2008	19	PTC 2	112,65	97,11	1
447/09	20	PTC 2	98,34	629,92	6
452/2010	21	PTC 2	72,85	707,19	10
307/11	22	PTC 2	38,60	640,94	17
276/12	23	PTC 2	112,59	97,71	1
0029/13	24	PTC 2	29,89	595,67	20
592/09 ou 602/09	25	PTC2	78,12	494,47	6
0467/12	26	PTC2	61,47	634,63	10
483/11	27	Splicing error	12,65	620,02	49
0412/13	28	Splicing error	6,77	70,62	10
0030/14	29	Splicing error	30,33	944,18	31
K562	30	K562	60,31	716,20	12

APÊNDICE F – ESQUEMA TERAPÊUTICO

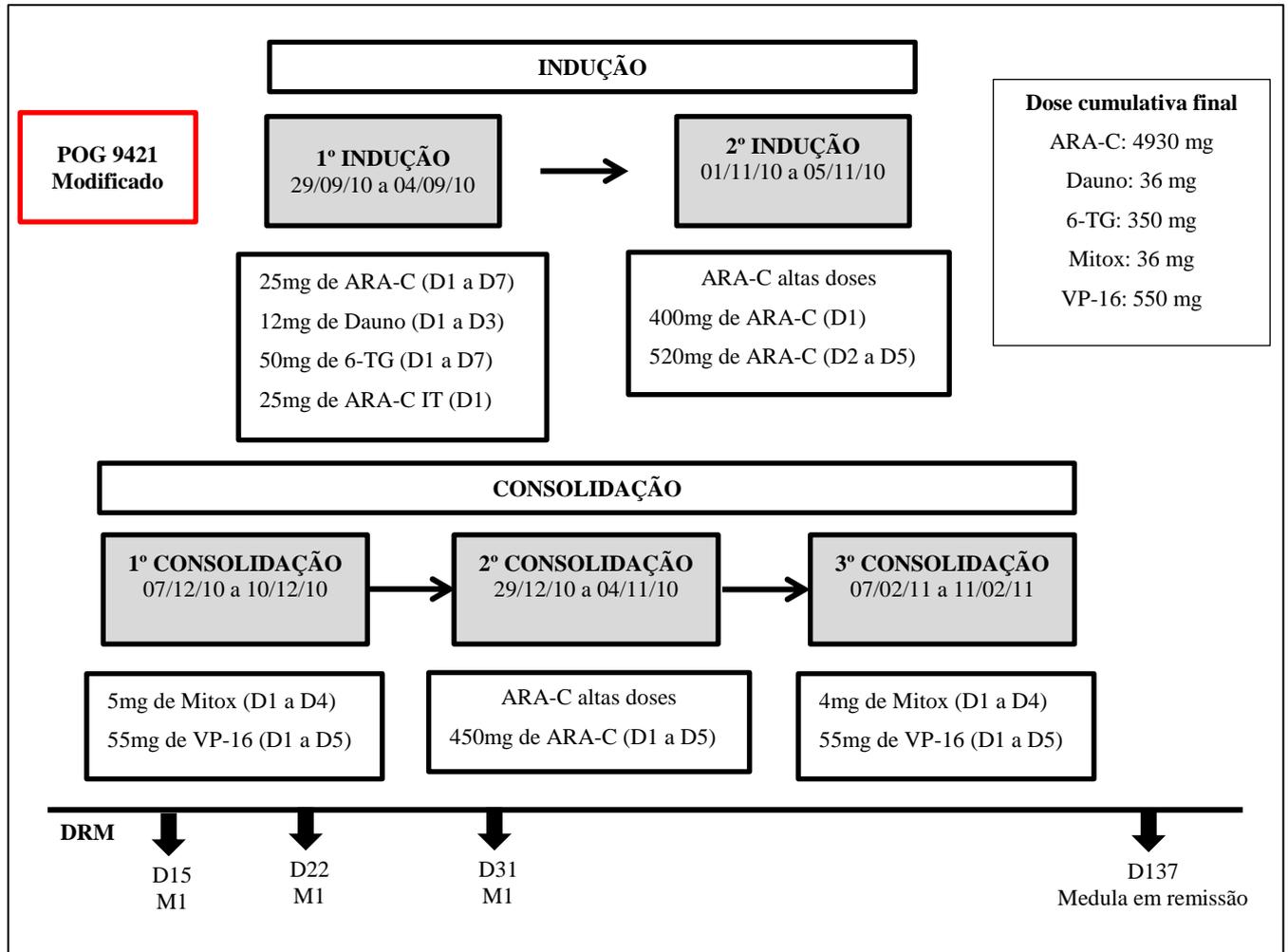


Figura 6.5. Ilustração do esquema terapêutico baseado no protocolo “POG Study 9421” de um caso com LMA e mutação no *GATA1*. ARA-C, citarabina; Dauno, daunorribicina; 6-TG, tioguanina; Mitox, mitoxantrone; VP-16, vepeside; DRM, doença residual mínima

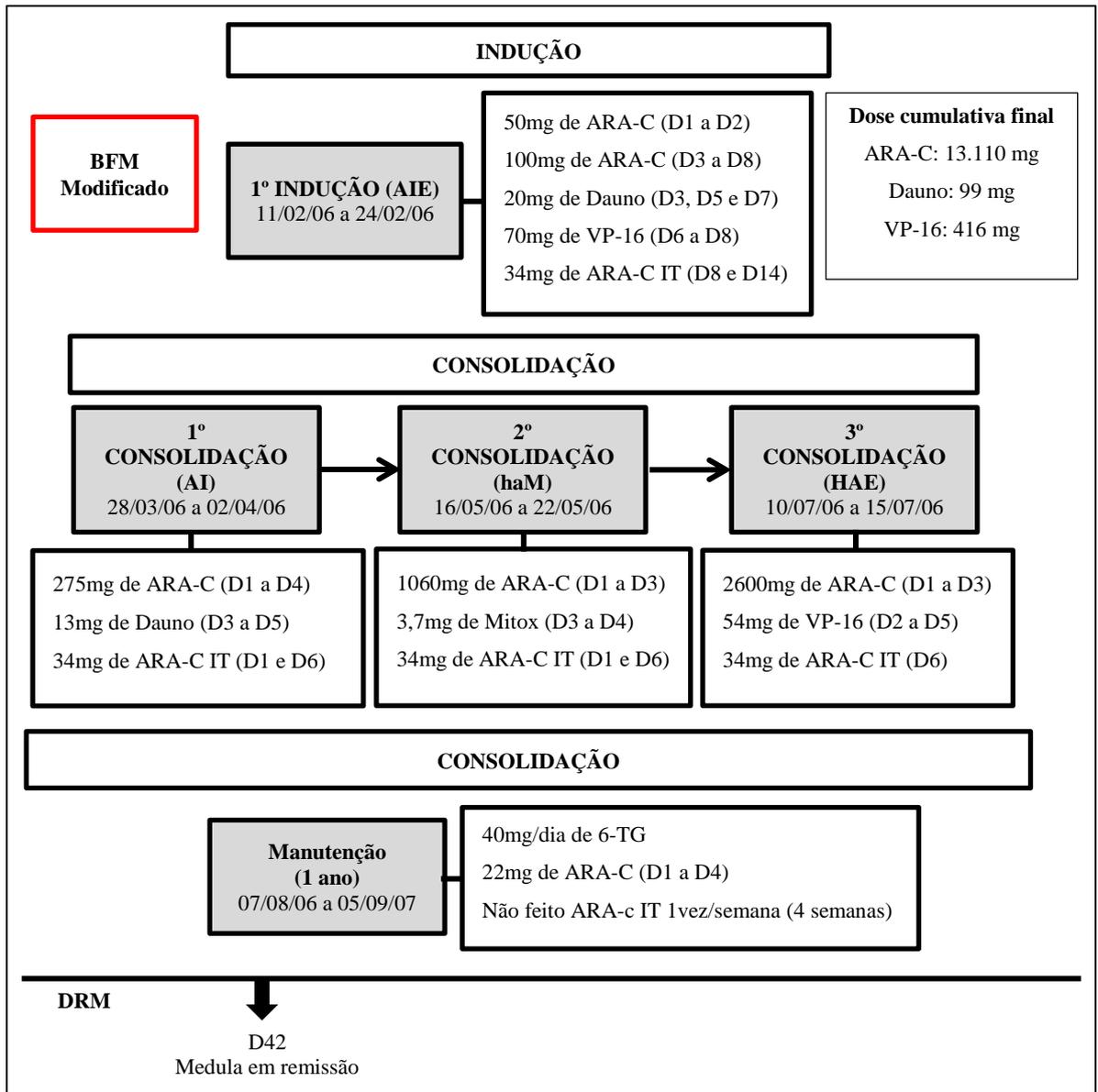


Figura 6.6. Ilustração do esquema terapêutico baseado no protocolo “AML-BFM 2004 INTERIM” de um caso com LMA e mutação no *GATA1*. ARA-C, citarabina; Dauno, daunorribicina; 6-TG, tioguanina; Mitox, mitoxantrone; VP-16, vepeside; DRM, doença residual mínima.

APÊNDICE G – TABELA GRUPO TRANSCRITOS

Tabela 6.7. Fatores associados ao tipo de mutação e níveis de expressão dos transcritos gênicos do *GATA1* de 44 crianças com TAM ou LMA, Brasil 2000-2014

Características	PTC 1-5' e PTC2, N (%)	Erro de <i>splicing</i> e PTC1-3', N (%)	RR (IC95%)	<i>p</i> -Valor
Gênero				
Masculino	21 (58,3)	3 (37,5)	1,0 (0,8-1,5)	0,436
Feminino	15 (41,7)	5 (62,5)		
Cor da pele				
Branca	28 (77,8)	4 (50,0)	1,3 (0,8-1,9)	0,185
Não branca	8 (22,2)	5 (50,0)		
Hepatomegalia				
Sim	27 (75,0)	5 (62,5)	1,1 (0,8-1,5)	0,663
Não	9 (25,0)	3 (37,5)		
Esplenomegalia				
Sim	26 (72,2)	4 (50,0)	1,2 (0,8-1,7)	0,242
Não	10 (27,8)	4 (50,0)		
Linfonodomegalia				
Sim	5 (13,9)	1 (12,5)	1,0 (0,7-1,5)	1,000
Não	31 (86,1)	7 (87,5)		
Diagnóstico (WHO)				
LMA	23 (63,9)	4 (50,0)	1,1 (0,8-1,4)	0,690
TAM	13 (36,1)	4 (50,0)		
Evolução para LM-SD*				
Sim	18 (52,9)	2 (28,6)	1,2 (0,9-1,6)	0,410
Não	16 (47,1)	5 (71,4)		
Tratamento quimioterápico				
Sim	21 (63,6)	5 (71,4)	0,9 (0,7-1,2)	1,000
Não	12 (36,4)	2 (28,6)		
Resposta ao tratamento				
Completa	12 (80,0)	3 (75,0)	1,1 (0,6-1,9)	1,000
Parcial ou falha	3 (20,0)	1 (25,0)		
Remissão clínica inicial				
Sim	13 (81,2)	4 (80,0)	1,0 (0,5-1,9)	1,000
Não	3 (18,8)	1 (20,0)		
Status				
Vivo	21 (61,8)	5 (62,5)	0,9 (0,7-1,3)	1,000
Morto	13 (38,2)	3 (37,5)		
Morte Precoce				
Sim	12 (35,3)	2 (28,6)	1,0 (0,7-1,3)	1,000
Não	22 (64,7)	5 (71,4)		

n, número total de pacientes. LMA, leucemia mieloide aguda; TAM, mielopoese anormal transitória; PTC 1, antes da metionina 84 (PTC 1-3' e PTC 1-5'); PTC 2, após a metionina 84.

*TAM com evolução para leucemia mieloide da síndrome de Down.

APÊNDICE H – TABELA SOBREVIDA

Tabela 6.10. Análise de sobrevivência em 2 anos de 69 crianças diagnosticadas com LMA no período de 2000 a 2014

Características demográficas, clínicas e biológicas	Total, N/ Evento, N	Sobrevivência em 2 anos, Mediana (IC 95%)	p-Valor
Idade (meses)			
<24		15,7 (3,0-28,3)	0,709
≥24		6,0 (ND)	
Gênero			
Masculino	35/20	12,1 (6,2-18,0)	0,303
Feminino	27/11	ND	
Cor da Pele			
Branca	46/22	20,5 (ND)	0,688
Não branca	16/9	13,4 (0,0-34,3)	
Cardiopatía congênita			
Sim	33/16	20,5 (ND)	0,904
Não	29/15	15,7 (0,0-32,0)	
Leucometria			
<50	57/29	15,7 (ND)	0,817
≥50	5/2	ND	
Hepatomegalia			
Sim	47/25	15,7 (0,6-31,0)	0,370
Não	15/6	ND	
Esplenomegalia			
Sim	42/21	15,7 (ND)	0,941
Não	20/10	20,6 (ND)	
Linfonodomegalia			
Sim	9/5	23,0 (0,0-63,4)	0,702
Não	53/26	20,5 (ND)	
Leucemia “cutis”/cloroma*			
Sim	3/0	ND	0,129
Não	59/31	ND	
Mutação somática (<i>GATA1</i>)			
Mutado	26/13	15,7 (ND)	0,567
Selvagem	15/6	ND	
TAM prévia			
Sim	23/11	ND	0,519
Não	27/14	14,1 (0,0-35,5)	
Tratamento			
Adequado	26/11	ND	0,542
Inadequado	33/18	13,4 (ND)	
Sobrevivência total		15,7 (ND)	

N, número total de pacientes; ND, não disponível; IC, intervalo de confiança; * todos os casos foram censurados.