



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

FRANCIANNE GOMES ANDRADE

**Biomarcadores somáticos nas leucemias mielóides agudas
pediátricas**

Orientadora: Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Coorientadora: Dra. Ilana Zalcberg Renault

Rio de janeiro

2014



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

Francianne Gomes Andrade

Biomarcadores somáticos nas leucemias mielóides agudas pediátricas

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientadora: Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Coorientadora: Dra. Ilana Zalberg Renault

Rio de Janeiro

2014

ii

A553b Andrade, Francianne Gomes.

Biomarcadores somáticos nas leucemias mielóides agudas pediátricas. / Francianne Gomes Andrade. – Rio de Janeiro, 2014.

xvi, 145 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) - Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2014.

Orientadores: Maria do Socorro Pombo de Oliveira e Ilana Zalberg Renault.

1. Leucemia Mielóide Aguda - genética. 2. Mutação.
3. Marcadores biológicos de tumor - genética. 4. Criança.
5. Adolescente. I. Oliveira, Maria do Socorro Pombo de. (orient.).
II. Renault, Ilana Zalberg. (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*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

FRANCIANNE GOMES ANDRADE

Biomarcadores somáticos nas leucemias mielóides agudas pediátricas

Orientadora: Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Coorientadora: Dra. Ilana Zalcborg Renault

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Raquel Maia (INCA) – Presidente

Prof. Dr. Luciana Pizzatti Barboza (INCA)

Prof. Dr. Carlos Chiattone (Santa Casa de Misericórdia de São Paulo)

Prof. Dr. Sheila Coelho (INCA) – Suplente I

Prof. Dr. Terezinha Salles (Universidade de Pernambuco) – Suplente II

Rio de Janeiro

2014

iv

Aos meus pais, Rozely e Wilson.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva, pela estrutura e oportunidade;

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 orientação e confiança;

À Dra. Ilana Zalcborg Renault, pela dedicação e pelos ensinamentos que contribuíram para minha formação;

A todos do Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricas, pela atenção e sugestões sempre presentes;

À Camilla Andrade, que contribuiu com os dados de biologia molecular;

Ao Dr. Tárzis Antonio Paiva Vieira, que contribuiu com os ensinamentos sobre a técnica de FISH;

Ao Diego Coutinho, que contribuiu com as discussões metodológicas;

À minha família, em especial minha mãe, Rozely Gomes, pelo grande esforço que fez para que minha formação fosse possível e por ser minha maior inspiração.

| | |
|--|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | ix |
| RESUMO | xiv |
| ABSTRACT | xvi |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. HEMATOPOESE..... | 2 |
| 1.2. LEUCEMIAS AGUDAS PEDIÁTRICAS..... | 3 |
| 1.2.1. ORIGEM DAS TRANSLOCAÇÕES CROMOSSÔMICAS NAS LEUCEMIAS AGUDAS PEDIÁTRICAS | 4 |
| 1.2.2. LEUCEMIAS MIELÓIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS: ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL..... | 9 |
| 1.2.3. IDADE COMO DETERMINANTE DAS VARIAÇÕES ETIOPATOLÓGICAS..... | 16 |
| 1.2.4. LMA DA SÍNDROME DE DOWN..... | 17 |
| 1.3.0. ALTERAÇÕES GENÉTICAS NAS LMAs PEDIÁTRICAS | 18 |
| 1.3.1. ALTERAÇÕES NO FATOR DE LIGAÇÃO AO NÚCLEO (CBF)..... | 20 |
| 1.3.2. ALTERAÇÕES ENVOLVENDO O RECEPTOR DE ÁCIDO RETINÓIDO α (RAR α)..... | 24 |
| 1.3.3. ALTERAÇÕES ENVOLVENDO O GENE <i>MLL</i> | 25 |
| 1.3.4. ALTERAÇÕES TIPO I..... | 27 |
| 1.3.4.1. <i>FLT3</i> | 28 |
| 1.3.4.2. <i>RAS</i> | 30 |
| 1.3.4.3. <i>c-KIT</i> | 31 |
| 1.4.0. ALTERAÇÕES RARAS NA LMA PEDIÁTRICA: FUSÃO GÊNICA <i>MYST3-CREBBP</i> | 33 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 36 |
| 3. OBJETIVOS | 38 |
| 3.1. Objetivos Principais..... | 39 |
| 3.2. Objetivos Secundários | 39 |
| 4. METODOLOGIA..... | 40 |
| 4.1. Casuística..... | 41 |
| 4.2. Purificação do RNA e síntese do DNA complementar | 43 |
| 4.3. Purificação de DNA..... | 45 |
| 4.4. Preparo das amostras para hibridização in situ por fluorescência (FISH)..... | 45 |
| 4.5. Alterações moleculares tipo II..... | 46 |
| 4.6. Análise mutacional do gene <i>KRAS</i> | 49 |
| 4.7. Análise mutacional do gene <i>c-KIT</i> | 52 |
| 4.8. Análise mutacional do gene <i>FLT3</i> | 54 |
| 4.9. Análise estatística | 57 |
| 5. RESULTADOS | 58 |
| 5.0. Análise descritiva dos casos | 59 |
| 5.1. Características genéticas dos casos..... | 63 |
| 5.2. Características dos casos de acordo com a idade | 64 |
| 5.3. Alterações tipo I e tipo II nas LMAs pediátricas..... | 66 |
| 5.4. Fusão gênica <i>MYST3-CREBBP</i> | 71 |
| 6. DISCUSSÃO | 80 |
| 7. CONCLUSÕES | 93 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 95 |
| 10. ANEXOS..... | 116 |

| | |
|--|-----|
| 10.1. ANEXO A. Instituições participantes do projeto com o envio de amostras dos casos de LMA pediátrica..... | 117 |
| 10.2. ANEXO B. Ficha de encaminhamento dos pacientes preenchida através do sistema online do PHOP-INCA (www.imunomolecular.redecancer.org.br). | 118 |
| 10.3. ANEXO C. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INCA, número de protocolo #186.688..... | 119 |
| 10.4. ANEXO D. Modelo do laudo liberado com os resultados gerados pelo laboratório do Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricos, Centro de Pesquisa, INCA..... | 121 |
| 10.5. ANEXO E. Publicação | 122 |

LISTA DE ABREVIATURAS

a – Anti

ABL1 - *C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase*

AFF1 - *AF4/FMR2 family, member 1*

AF1q - *Mixed-lineage leukemia translocated to 11*

APL – Leucemia promielocítica

Asp (D) – Ácido aspártico

ATP – Trifosfato de adenosina

ATRA – Ácido trans-retinóico

BAC – *Bacterial artificial chromosome*

BCR - *Breakpoint cluster region*

BFM – Berlim-Frankfurt-Munique

c – Citoplasmático

CBF - *Core-binding factor*

CBFβ - *Core-binding factor, beta subunit*

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CD - *Cluster* de diferenciação

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

CO₂ – Dióxido de carbono

CPq – Centro de Pesquisa

CREBBP (CBP) - *CREB binding protein*

dATP - *Deoxyadenosine triphosphate*

dCTP - *Deoxycytidine triphosphate*

DEK - *DEK oncogene*

dGTP - *Deoxyguanosine triphosphate*

DIT- Duplicações *in tandem*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNA topo II – DNA topoisomerase II

DRM – Doença residual mínima

DTK – Domínio tirosina quinase

dTTP - *Thymidine triphosphate*
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
EGIL – Grupo europeu para a caracterização imunológica das leucemias
ELL (MLLT11) - Elongation factor RNA polymerase II
ENL (MLLT1) - Mixed-lineage leukemia translocated to 1
ETV6 - Ets variant 6
EVII - Ecotropic virus integration site 1 protein homolog
FAB – Franco-américo-britânico
FISH – Hibridização por fluorescência *in situ*
FLT3 - Fms-like tyrosine kinase
FLT3L – Ligante do receptor *Fms-like tyrosine kinase*
GAP – Proteína ativadora de GTPase
GAPDH - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GATA-1 - GATA-binding factor 1
GDP – Guanosina difosfato
GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*
GTP – Guanosina trifosfato
HCl – Ácido clorídrico
HLA – Antígeno leucocitário humano
HLXB9 - Homeobox HB9
HOX – Homeobox
HOXA9 – Homeobox A9
HOXD13 - Homeobox D13
HRAS - v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HSCT – Transplante de células-tronco hematopoéticas
H3K4 – Histona 3 lisina 4
i - Intracelular
IL-3 – Interleucina 3
Ile (I) – Isoleucina
JAK - *Janus kinase*
KCl – Cloreto de potássio
c-KIT - V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog

KRAS - V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LA – Leucemia aguda

LDI-PCR - Reação em cadeia da polimerase invertida de longa distância

LLA – Leucemia linfoblástica aguda

LLAcpB – Leucemia linfoblástica aguda de célula precursora B

LMA – Leucemia mielóide aguda

LMA-CBF - Leucemia mielóide aguda com alteração em *core-binding factor*

LM-SD - Leucemia mielóide aguda da Síndrome de Down com características megacarioblásticas

MAPK - *Mitogen-activated protein kinase*

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

MKL1 (MAL) - Megakaryoblastic leukemia (translocation)1

MLL - Mixed-lineage leukemia

MLL-r – MLL rearranjado

MLLT3 (AF9) - Mixed-lineage leukemia translocated to 3

MLLT4 (AF6) - Mixed-lineage leukemia translocated to 4

MLLT10 (AF10) - Mixed-lineage leukemia translocated to 3

MO – Medula óssea

c-MPL - Myeloproliferative leukemia virus oncogene

MPO - Mieloperoxidase

MYH11 - Myosin heavy chain 11, smooth muscle

MYST3 (MOZ)- MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3

NEBL - Nebulette

NPM - Nucleophosmin

NRAS - Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog

NSD1 - Nuclear receptor binding SET domain protein 1

NUP98 - Nucleoporin 98 kilo dalton

NUP214 - Nucleoporin 214 kilo Dalton

Oligo dT – Oligonucleotídeo randomizado rico em timina

OMS - Organização Mundial da Saúde

OR – *Odds ratio*

OS – Sobrevida global

PCR – Reação em cadeia da polimerase
pH – Potencial hidrogeniônico
PHOP – Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricos
PI3K - *Phosphoinositide-3-kinase*
PLZF - Promyelocytic leukemia zinc finger protein
PM – Peso molecular
PML - Promyelocytic leukemia
PTPN11 - Protein tyrosine standard phosphatase nonreceptor 11
PU.1 - *Hematopoietic transcription factor PU.1*
RAR α - Retinoic acid receptor, alpha
RBM15 (OTT) - RNA binding motif protein 15
RFLP - Restriction fragment length polymorphism
RNA – Ácido ribonucléico
RPMI – Roswell Park Memorial Institute
RPNI - Ribophorin I
RQ-PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RTK - Receptor tirosina-quinase
RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase a partir da transcriptase reversa
RUNX1 (AML1) - Runt-related transcription factor 1
RUNXIT1 (ETO) - Runt-related transcription factor 1; translocated to
SCF – Fator de células-tronco
SD – Síndrome de Down
SEPT6 - septin 6
SFB – Soro fetal bovino
SKF – Quinases da família Src
SLE – Sobrevida livre de eventos
SNC – Sistema nervoso central
SP – Sangue periférico
STAT - Signal transducer and activator of transcription
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR – Receptor de célula T
TdT – Desoxiribonucleotidil transferase

t-LMA – Leucemia mielóide aguda secundária a tratamento quimioterápico



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

**BIOMARCADORES SOMÁTICOS NAS LEUCEMIAS MIELÓIDES AGUDAS
PEDIÁTRICAS**

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Francianne Gomes Andrade

Introdução. A leucemia mielóide aguda (LMA) pediátrica apresenta uma heterogeneidade reflexo da diversidade de alterações genético-moleculares observadas nos seus diferentes subtipos. Estas anormalidades são importantes para estratificação de risco. Alguns estudos em LMA de adultos relatam que a alteração t(8;16)(p11;p13)/*MYST3-CREBBP* ocorre em <2% dos casos, com aspectos biológicos e clinicamente distintos, com sobrevida média em torno de 5 meses. LMA pediátrica com esta translocação está associada à eritrogocitose e alta mortalidade precoce. O foco principal deste projeto foi investigar as alterações genéticas tipo I e tipo II nas LMAs e explorar associações entre si e subtipos morfológicos. **Metodologia.** Foram analisados 282 casos de LMA *de novo* (≤ 18 anos), encaminhados para o laboratório no período de 2008-2013, para o rastreamento das fusões *RUNX1-RUNX1T1*, *CBF β -MYH11*, *PML-RAR α* , dos rearranjos do gene *MLL* (*MLL-r*) e de mutações em *KRAS*, *FLT3* e *c-KIT*. Dentre as crianças ≤ 24 meses, foram selecionados 15 casos com a presença da eritrofagocitose para pesquisa da fusão *MYST3-CREBBP*. A pesquisa das translocações cromossômicas foi realizada através de RT-PCR e/ou FISH. Mutações nos genes *KRAS*, *FLT3* e *c-KIT* foram rastreadas através das técnicas de RFLP e/ou sequenciamento direto. A distribuição entre as diferentes alterações de acordo com a idade, leucometria e subtipos foi avaliada através de métodos estatísticos. **Resultados.** LMAs com maturação mielomonocítica foram os subtipos mais frequentes observados em crianças com idade ≤ 5 anos e o subtipo promielocítico entre crianças e adolescentes entre 5-18 anos-idade. Dezesesseis de 56 casos (19%) foram reclassificados de acordo com as anormalidades cromossômicas. Os transcritos de fusão foram encontrados em 40,2% dos casos e mutações em *KRAS*, *FLT3* ou *c-KIT* em 26,2%. As alterações genéticas foram diferentemente distribuídas entre crianças com idade ≤ 5 anos e entre 5-18 anos. O *MLL-r* e as mutações em *KRAS* foram predominantes em crianças da primeira infância (≤ 5 anos); as fusões *RUNX1-RUNX1T1* e *PML-RAR α* foram predominantes nos casos com idade entre 5-18 anos. As mutações do *FLT3* foram predominantes entre os casos apresentando as fusões *RUNX1-RUNX1T1* e *PML-RAR α* . Mutações no gene *c-KIT* foram observadas em apenas 2% dos casos. Dos 15 casos com eritrofagocitose, 3 casos apresentaram valores de FISH acima dos valores de *cut off* estabelecidos para a fusão *MYST3-CREBBP*. **Conclusões.** Conforme as recomendações da OMS, as análises das fusões gênicas e das mutações em genes envolvidos em vias de

proliferação são importantes para o diagnóstico da LMA pediátrica e contribuem para o conhecimento das diferentes frequências destas alterações nas LMAs no Brasil. A identificação desses novos subgrupos genéticos pode auxiliar estudos epidemiológico-moleculares, a estratificação de risco e o conhecimento sobre a etiopatogênese da LMA.

Palavras-chave: LMA pediátrica, marcadores moleculares, mutações tipo I, mutações tipo II, *MYST3-CREBBP*.



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

SOMATIC BIOMARKERS IN PEDIATRIC ACUTE MYELOID LEUKEMIA

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Francianne Gomes Andrade

Background. Pediatric acute myeloid leukemia (AML) has long been recognized for its biological heterogeneity. The broad range of abnormalities across different subtypes is important to stratify AML cases to different prognostic groups and choosing of an appropriate therapy of the disease. Studies involving adult AML have shown that the balanced chromosomal rearrangement $t(8;16)(p11;p13)/MYST3-CREBBP$ is found in <2% of cases, with distinct clinical biological and median overall survival of 5 months. This pediatric AML subgroup is associated with erythrophagocytosis and early death. Our aim was to evaluate type I and II genetic alterations in pediatric AML and explore associations with morphological subtypes. **Methods.** A series of 282 samples was ascertained from 2008-2013 prior to any treatment and from different Brazilian centers. We have evaluated the prevalence of the genetic alterations *RUNX1-RUNX1T1*, *CBF β -MYH11*, *PML-RAR α* and *MLL* rearrangements (*MLL-r*), and mutations in *KRAS*, *c-KIT* and *FLT3* in Brazilian childhood AML cases. Among infant AML (aged ≤ 24 months), 15 cases with erythrophagocytosis were selected to test the presence of *MYST3-CREBBP*. Mutations were detected by direct sequencing; the fusion were analyzed by FISH and/or RT-PCR. **Results.** AML with myeloid-monocytic maturations were the most frequent subtypes observed among children aged ≤ 5 years-old and acute promyelocytic leukemia among children and adolescents (5-18 years-old). Sixteen out of 56 cases (19%) were re-classified according to chromosomal abnormalities found according to WHO classification. Fusion transcripts were found in 40.2% of AML patients whereas *KRAS*, *c-KIT* or *FLT3* mutations in 26.2% of children. The investigated genetic alterations were differently distributed among children ≤ 5 years-old and 5-18 years-old. *MLL-r* and *KRAS* mutations were predominant among younger children (≤ 5 years-old); *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RAR α* and *FLT3* mutations were more frequent in aged 5-18 years-old. *FLT3* mutations were more frequent in *RUNX1-RUNX1T1* and *PML-RAR α* subtypes. *c-KIT* mutation was found to be a rare abnormality among children aged ≤ 5 years-old (2.0%). Among the 15 cases with erythrophagocytosis, 3 of them presented FISH counts above cut off values established for *MYST3-CREBBP*. **Conclusion.** As the recommendations from WHO experts, the molecular-cytogenetics screening are important for childhood AML and contribute to growing knowledge on different frequencies of the mutations in Brazilian AMLs. The identification of these genetic subgroups may assist to improve the molecular-epidemiology, risk stratification and etiopathology of AML worldwide.

Key words: pediatric AML, molecular markers, type I mutations, type II mutations, *MYST3-CREBBP*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. HEMATOPOESE

Os processos envolvidos na geração dos diversos tipos de células do sangue a partir de células-tronco são chamados de hematopoese e envolvem mecanismos de autorrenovação das células-tronco, comprometimento das células precursoras a uma única linhagem celular e proliferação e diferenciação destas células precursoras em células maduras e funcionais. Para que a hematopoese seja possível é necessária a existência de um microambiente adequado, capaz de sintetizar fatores de crescimento necessários à sobrevivência das células progenitoras, de acomodar as células em desenvolvimento e de favorecer as interações entre células de diferentes tipos (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

As células-tronco são caracterizadas por sua divisão celular assimétrica, ou seja, ao se dividirem originam uma nova célula-tronco semelhante a ela e uma célula precursora comprometida com uma linhagem específica. A maior parte das células progenitoras encontra-se quiescente (na fase G_0 do ciclo celular) e essa população de células permanece relativamente constante ao longo de toda a vida. A Fig.1.1 mostra um esquema simplificado da diferenciação normal das células hematopoéticas e suas principais alterações moleculares que levam ao desenvolvimento de neoplasias (modificado de ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004). As células-tronco hematopoéticas originam a progênie que progressivamente perde sua capacidade de autorrenovação e se restringem a uma linhagem. O comprometimento do progenitor mielóide com as linhagens de megacariócitos, eritrócitos, granulócitos ou monócitos são eventos mutualmente exclusivos (AKASHI et al., 2000).

As leucemias agudas (LA) são neoplasias do sistema hematopoético que comprometem as linhagens celulares, uma vez que a partir de uma alteração genética em uma célula progenitora, ocorrerá uma supressão da hematopoese normal pelo comprometimento da multiplicação e diferenciação das linhagens normais. As células malignas substituem progressivamente a população de células sanguíneas saudáveis, resultando clinicamente em anemia, neutropenia e plaquetopenia (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

O desenvolvimento de uma neoplasia envolve um processo multifatorial que reflete alterações genéticas que resultam na transformação de uma célula normal em derivados malignos. Essas variações genéticas contribuem para a transformação leucêmica das células-tronco hematopoéticas ou de células precursoras linfóides ou mielóides, alterando suas funções celulares e processos regulatórios essenciais, mantendo ou intensificando sua capacidade de autorrenovação ilimitada, subvertendo os controles de proliferação normal,

bloqueando a diferenciação e promovendo resistência a apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

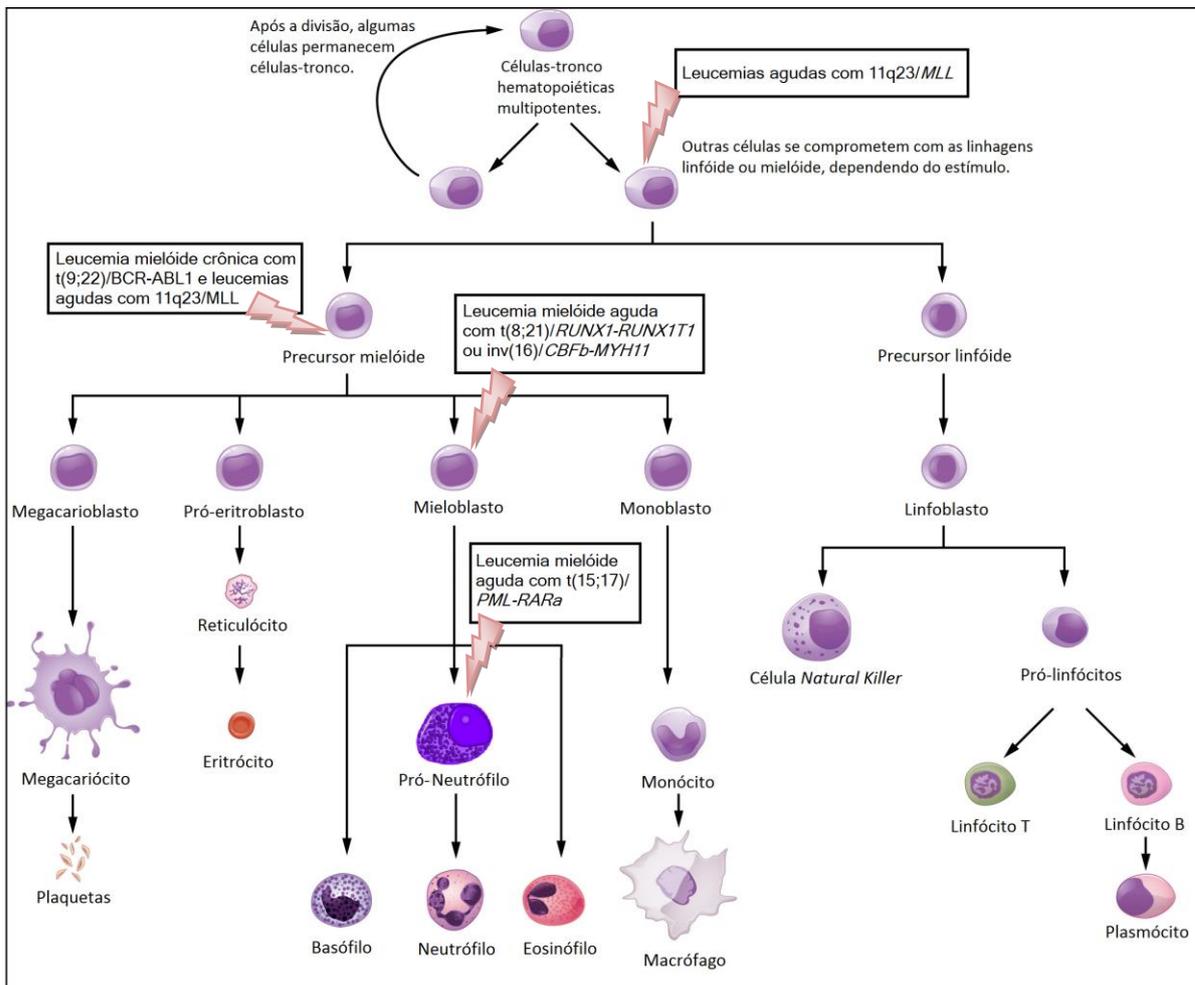


Figura 1.1. Esquema simplificado da diferenciação das células hematopoéticas e suas principais alterações moleculares (Modificado de ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

1.2. LEUCEMIAS AGUDAS PEDIÁTRICAS

A LA é o câncer mais comum em crianças e adolescentes, correspondendo a cerca de 30% dos casos diagnosticados até 19 anos de idade (LINABERY; ROSS, 2008; KAATSCH, 2010). No Brasil, é a neoplasia mais comum da infância, representando 18-45% dos casos diagnosticados nesta mesma faixa etária (CAMARGO et al., 2010).

Existem dois tipos principais de LA: leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mieloide aguda (LMA), que se desenvolvem a partir de uma célula-tronco ou precursor comprometido com as linhagens linfóide e mielóide, respectivamente. A LMA é menos

comum e representa 18% dos casos de LA pediátrica diagnosticados no mundo, em especial nos países desenvolvidos (DOWNING; SHANNON, 2002; LINABERY; ROSS, 2008). No Brasil, as LMAs são responsáveis por 18-24% de todos os novos diagnósticos de câncer em indivíduos ≤ 19 anos de idade e, ao contrário das LLAs, não apresentam um pico de incidência evidente em crianças (REIS et al., 2011). Estudos observacionais, estudos epidemiológicos de incidência e experimentos *in vitro* sugerem que os fatores envolvidos na etiopatogênese das LLAs e LMAs são, provavelmente, diferentes. Poucos fatores de risco foram conclusivamente determinados para a LMA pediátrica, mas sabe-se atualmente que seu desenvolvimento está associado a fatores como radiação ionizante e síndromes genéticas congênitas (síndrome de Down, neurofibromatose, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, entre outras), que juntos explicam a ocorrência de menos de 10% dos casos (revisado em WIEMELS, 2012).

A caracterização das LLAs e LMAs é embasada na identificação de uma série de fatores como o aspecto morfológico e celular, expressão de antígenos na membrana celular associados ao tipo celular e o grau de diferenciação, anormalidades cromossômicas e moleculares e a expressão gênica. Provavelmente, o efeito fundador da leucemogênese é decorrente de translocações cromossômicas somáticas. Nas vias de patogênese, as translocações cromossômicas geralmente originam fusões gênicas nas quais parte dos cromossomos se ligam produzindo estruturas funcionalmente anômalas (LEWIN, 2004); alterações no número de cromossomos, deleções gênicas ou troca de um único nucleotídeo do gene também ocorrem neste processo (GREAVES, 2002).

1.2.1. ORIGEM DAS TRANSLOCAÇÕES CROMOSSÔMICAS NAS LEUCEMIAS AGUDAS PEDIÁTRICAS

No processo da leucemogênese bem como na patogênese de outros tipos de câncer, é necessário que pelo menos duas alterações genético-moleculares importantes ocorram nas células-tronco hematopoiéticas ou nas células precursoras que resultam em uma habilidade desta célula de se dividir e de manter seu estado imaturo. Pesquisas em carcinogênese desenvolvidas ao longo de três décadas já demonstraram que o desenvolvimento de uma célula maligna requer o acúmulo de lesões múltiplas, independentes e complementares (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Células sanguíneas precursoras apresentam a capacidade de crescimento “*blasto-like*”, ou seja, crescem com as mesmas características de uma célula imatura, atributo que pode ser a razão pela qual as leucemias parecem necessitar menos

alterações genéticas para se desenvolverem que os tumores sólidos (HANAHAN; WEINBERG, 2011; VOGELSTEIN et al., 2013).

Esta “simplicidade” genética das LAs combinada com a pouca idade dos casos possibilitou o delineamento do período da formação das aberrações genéticas durante o desenvolvimento da criança com o auxílio de recursos biológicos adquiridos.

A maioria das alterações genéticas observadas nos primeiros anos de vida dos casos de LA parece ter se iniciado durante a vida intrauterina (GALE et al., 1997; HUNGER et al., 1998; GREAVES et al., 2003; FORD et al., 1993). Essas evidências se tornaram possíveis através da análise do material genético de crianças com LA, disponível nos cartões de filtro com sangue do teste do pezinho realizado em recém-nascidos para detecção de doenças genéticas (WIEMELS et al., 2002; MCHALE et al., 2003). Determinadas alterações genéticas identificadas revelaram-se insuficientes para levar o desenvolvimento da leucemia quando avaliadas isoladamente. Além disso, estudos utilizando sangue de cordão umbilical coletados para transplantes indicaram que estas alterações podem ocorrer em uma taxa de pelo menos 1% na população em geral (MORI et al., 2002). Estes resultados sugerem que uma significativa proporção da população transporta clones pré-leucêmicos e a grande maioria destes clones apresentam proliferação limitada, são deletados e não são necessariamente sinônimos do desenvolvimento da doença.

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

Uma característica marcante das translocações cromossômicas na LA é que estas alterações são seletivamente associadas a subtipos biologicamente distintos e são, em geral, translocações recíprocas (Fig. 1.2) e estáveis (revisado em GREAVES; WIEMELS, 2003). Apesar de alguns tumores pediátricos compartilharem estas características, outros tumores em

geral, apresentam cariótipos diversificados entre os clones, com deleções e translocações cromossômicas não balanceadas, indicativas da instabilidade cromossômica (LENGAUER, 2001). Esta distinção é importante uma vez que indica que as alterações cromossômicas na LA usualmente refletem um único evento, que ocorre precocemente e é estável, e não como sendo subjacente a um defeito na manutenção da estabilidade genômica.

Em LMA, dois mecanismos principais estão envolvidos na geração das translocações cromossômicas: o processamento do ácido desoxirribonucleico (DNA) pela enzima topoisomerase II (topo-II) e a ação de endonucleases apoptóticas (GREAVES; WIEMELS, 2003). A topo-II atua durante o processo de replicação do DNA e alivia a tensão de enovelamento helicoidal gerado pelo próprio mecanismo de replicação, através da clivagem reversível de uma dupla hélice e re-ligamento de ambas as fitas (ALBERTS et al., 2006). A enzima cria, temporariamente, uma quebra na dupla fita do DNA e realiza, em seguida, a religação das regiões terminais quebradas pelo reparo do DNA (revisado em RAFFINI et al., 2002; GILLILAND; JORDAN; FELIX, 2004). Alguns agentes podem aumentar a proporção das quebras na dupla fita, o que determina a variação da cinética de clivagem, uma vez que alteram a atividade da topo-II.

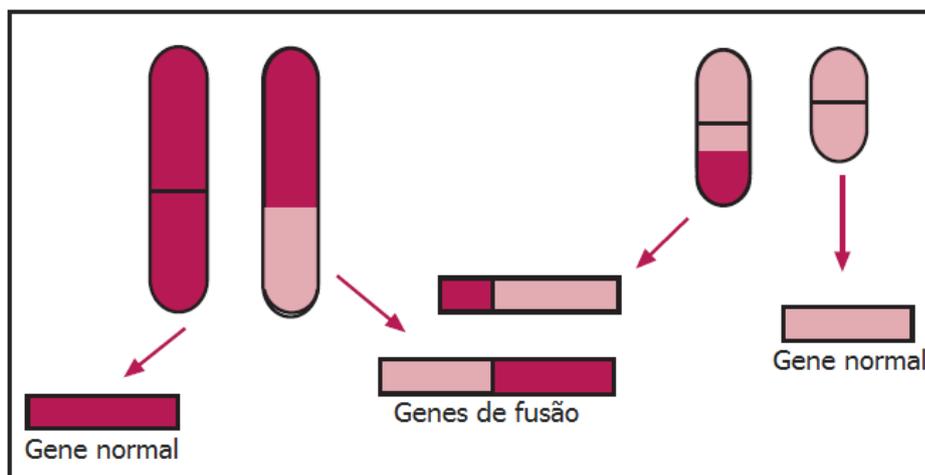


Figura 1.2. Translocação recíproca balanceada em LA. A translocação pode originar transcritos de fusão “para frente” e seu recíproco, com a possibilidade de os dois alelos serem expressos (DASH; GILLILAND, 2001).

Assim, estes agentes estabilizam o complexo da topo-II com as extremidades da fita de DNA clivado, reduzindo a religação das fitas e deixando suas terminações livres e vulneráveis à formação de translocações intercromossômicas favorecidas pela proximidade do

enovelamento das fitas cromossômicas (RICHARDSON; JASIN, 2000; GREAVES, 2002; GILLILAND; JORDAN; FELIX, 2004; SPECTOR et al., 2005; POMBO-DE-OLIVEIRA; KOIFMAN, 2006). Estudos demonstraram que a exposição a drogas que atuam sobre a enzima DNA topo-II estão associados aos rearranjos do gene *MLL* (*MLL-r*), uma vez que o sítio de clivagem no gene *MLL* está localizado próximo a um sítio específico de reconhecimento da enzima e a clivagem desta região foi induzida nas células expostas aos inibidores de DNA topo-II (APLAN et al., 1996).

Nas LAs infantis, a análise dos pontos de quebra e os ensaios de clivagem *in vitro* sugerem um mecanismo no qual o dano ao DNA ocorre quando um componente com propriedades de alterar a atividade da DNA topo-II induz uma quebra mediada pela própria enzima, tanto no gene *MLL* quanto em outro gene, interrompendo o equilíbrio clivagem-religação. Isso criaria regiões que serviriam como modelo para polimerização, resultando em duplicação da sequência, uma vez que o *MLL* e seu parceiro apresentariam algumas bases de homologia nos pontos de fusão, permitindo o reparo do DNA com uma região não homóloga (revisado em RAFFINI et al., 2002; GILLILAND; JORDAN; FELIX., 2004). Apesar dos mecanismos de apoptose serem capazes de prevenir uma célula com uma alteração oncogênica de se tornar um clone leucêmico, estudos indicam que os componentes seletivos do processo apoptótico podem ser ativados e podem recuperar o fenótipo celular normal na ausência da morfologia característica da apoptose (revisado em GREAVES; WIEMELS, 2003). Sítios de clivagem similares àqueles observados nos rearranjos do *MLL* foram identificados para outros genes envolvidos nas translocações cromossômicas, como por exemplo aquelas envolvendo o gene *AML1* (*RUNX1*) (STANULLA et al., 1997; STRISSEL et al., 2000; ZHANG et al., 2002).

A origem precisa das translocações na hierarquia das células-tronco hematopoiéticas é difícil de determinar, uma vez que o impacto funcional destas alterações na expansão clonal pode ocorrer após seu momento de origem. Os produtos envolvidos na transformação leucêmica são dependentes do contexto celular e apresentam impacto variado na proliferação e diferenciação das células originadas a partir daquela que inicialmente apresentou a alteração (BARR, 1998). Esta célula alterada deve ser permissiva à expansão do produto da translocação, possibilitando o estabelecimento de uma via de sinalização intracelular capaz de manter a vantagem clonal e não a sua eliminação. A associação marcada entre uma determinada translocação cromossômica particular com determinados subtipos leucêmicos parece refletir a especificidade da alteração na seleção clonal (GREAVES; WIEMELS, 2003) e, conseqüentemente, nos subtipos de LA e no impacto na resposta ao tratamento, como

marcadores prognósticos independentes com influência na escolha da terapia (RUBNITZ, 2012).

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

1.2.2. LEUCEMIAS MIELÓIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS: ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Os sinais e sintomas clínicos observados na LMA devem-se à infiltração da medula óssea (MO) e, eventualmente, outros órgãos pelo clone leucêmico com a subsequente inibição da hematopoese normal (TENEN, 2003). Células de natureza mielóide são derivadas de precursores críticos na imunidade inata do indivíduo. Estas células, particularmente precursores neutrofílicos, produzem grandes quantidades de enzimas que podem produzir mediadores citotóxicos como parte de sua função normal [como a enzima mieloperoxidase (MPO)], mas também ativar mediadores químicos que alcançam a MO e levam à produção de intermediários genotóxicos (LONKAR; DEDON, 2011). Os pacientes apresentam sintomas de anemia, sangramento devido à plaquetopenia e febre às vezes sem foco infeccioso devido à neutropenia. Em geral, a presença de células imaturas no sangue periférico (SP) é o primeiro passo importante para caracterização clínica da leucemia, na grande maioria das vezes com leucocitose. A infiltração leucêmica de tecidos extramedulares pode resultar em hepatomegalia, esplenomegalia, hipertrofia das gengivas e cloromas. A infiltração de pele por células blásticas e o comprometimento do sistema nervoso central (SNC) também podem ser observados em LMA. A leucocitose, quando excede $100 \times 10^9/l$, pode levar a sintomas respiratórios, oculares e sintomas resultantes da infiltração e comprometimento do SNC (ZAGO et al., 2004).

O diagnóstico da LMA é realizado a partir do quadro clínico agudo dos sinais e sintomas descritos acima, bem como pela caracterização morfológica, imunofenotípica e molecular dos blastos (células imaturas) leucêmicos. É necessário demonstrar a diferenciação mielóide dos blastos e, a classificação morfológica é baseada no fenótipo associado à linhagem (indiferenciado, mielóide, monoblástico, eritroblástico ou megacariobástico). Morfológicamente, pode ser definido de acordo com a classificação do grupo Franco-Américo-Britânico (FAB), que estratifica a LMA em oito subtipos distintos (M0 a M7; Fig. 1.3) (BENNETT et al., 1991). A análise morfológica revela a porcentagem de blastos indiferenciados, granulados ou atípicos e a presença de estruturas intracelulares, como bastonetes de Auer. As reações citoquímicas podem confirmar o comprometimento com a linhagem mielóide [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). É importante observar que algumas neoplasias eritróides raras

necessitam diagnóstico diferencial por apresentarem características morfológicas semelhantes aos blastos nas LMAs, por exemplo, casos raros de eritremia aguda que representam 0,5% de todos os diagnósticos hematológicos (Figura 1.3J). Este tipo de desordem mieloproliferativa deve ser distinguido das eritroleucemias mielóides e de neoplasias eritróides secundárias (GRIESSER; HORNY, 1987).

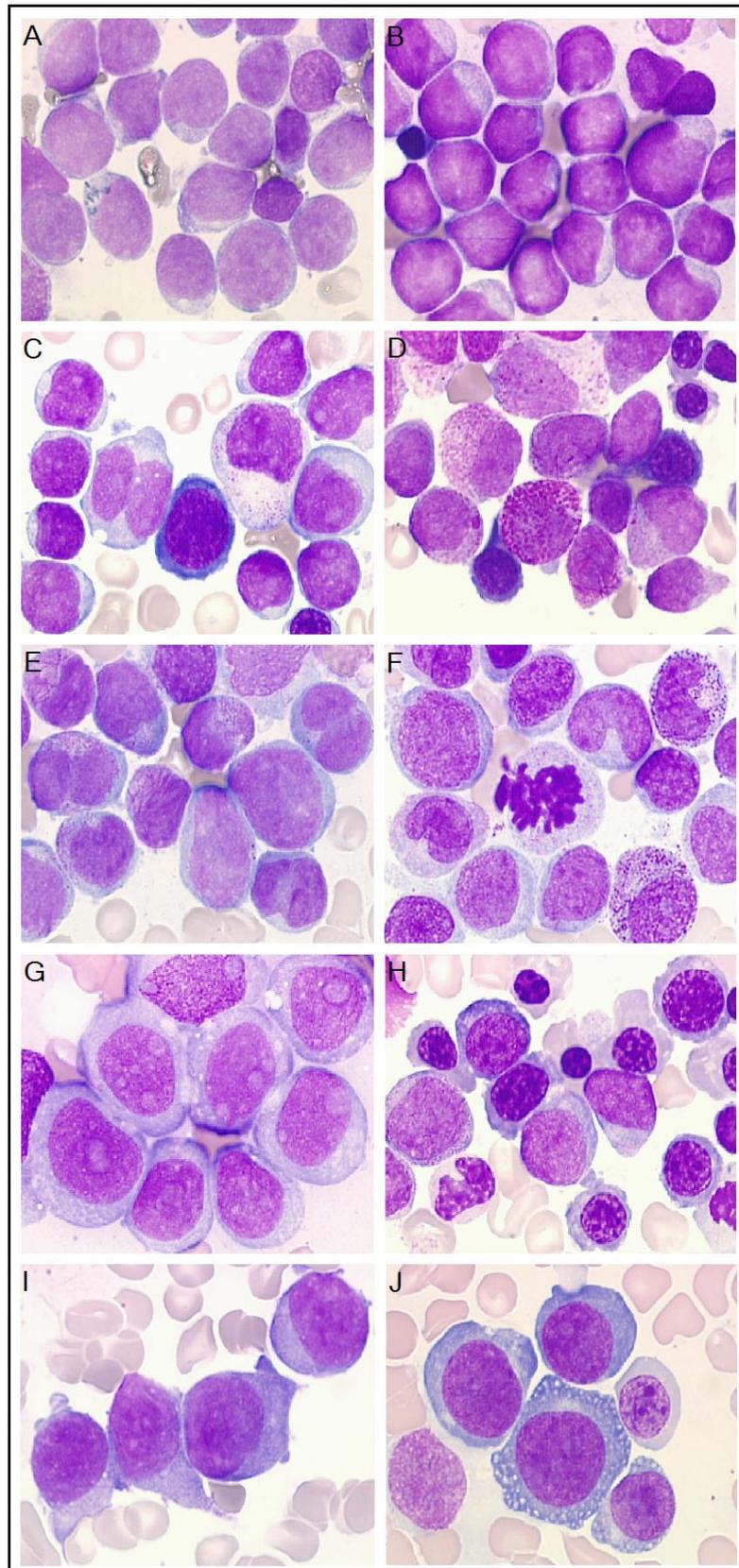


Figura 1.3. Classificação morfológica das LMAs de acordo com os critérios FAB. A, LMA minimamente diferenciada ou LMA-M0; B, LMA sem maturação ou LMA-M1; C, LMA com maturação granulocítica ou LMA-M2; D, LMA promielocítica ou LMA-M3; E, LMA

promielocítica variante agranular ou LMA-M3v; F, LMA mielomonocítica ou LMA-M4; G, LMA monocítica/monoblástica ou LMA-M5; H, Eritroleucemia ou LMA-M6; I, LMA megacarioblástica ou LMA-M7; J, Eritremia aguda. LMA, leucemia mielóide aguda; FAB, Grupo Franco-Américo-Britânico. (Imagens gentilmente cedidas pela professora Marie Thérèse Daniel do Hospital Saint-Louis, Paris, França)

A imunofenotipagem é uma abordagem metodológica rápida e através da citometria de fluxo é capaz de determinar as linhagens para a distinção entre LMA e LLA. Esta ferramenta é fundamental para classificação da LMA imatura (M0) e com diferenciação megacarioblástica (M7). De acordo com a classificação recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para neoplasias mielóides (VARDIMAN, 2010), os marcadores a(anti)MPO, CD (*cluster* de diferenciação) 11b, CD14, CD64, i(intracelular)CD3, CD19, iCD22, iCD79a e CD10 são essenciais para especificação de linhagens e definições de LAs de fenótipo misto não especificadas (CREUTIZIG et al., 2012).

BÉNÉ et al. (2011) revisaram o painel de marcadores imunofenotípicos propostos pelo Grupo Europeu para Caracterização Imunológica das Leucemias (*European Group for the Immunological Characterization of Leukemias*, EGIL) com o objetivo de facilitar a interpretação dos dados. A imunofenotipagem se tornou uma ferramenta de diagnóstico adicional à morfologia, devido à sua precisão e velocidade. Biomarcadores celulares detectados através da imunofenotipagem permitem a definição do grau de diferenciação e da linhagem comprometida nas malignidades hematológicas, enquanto que alterações genético-moleculares caracterizam subgrupos destas doenças na maioria das vezes pertencentes a um determinado subtipo imunofenotípico (VARDIMAN et al., 2009).

A escolha do painel de anticorpos apropriado é necessário para direcionar posteriores estudos moleculares e, conseqüentemente, as estratégias terapêuticas. Os marcadores imunofenotípicos que merecem destaque no painel mielóide são: CD13, CD33, CD117, CD14, CD15, CD65, HLA-DR. Os dois marcadores associados à linhagem mielóide, CD33 e CD13, usualmente combinados ao aMPO, permitem a identificação da LMA na ausência de marcadores associados à linhagem linfóide (iCD3, CD19, iCD22, iCD79a e CD10). O marcador CD34 está associado à linhagem imatura, presente nas células-tronco e pode ser expresso pelos blastos leucêmicos. Nestes casos raros de LA indiferenciada, sua presença como único antígeno de diferenciação, associada à fraca expressão do marcador CD45, confirma a origem hematopoiética das células tumorais (revisado em BÉNÉ et al., 2011). A

expressão do antígeno leucocitário humano (HLA, *human leukocyte antigen*) DR de classe II, também é um marcador de células progenitoras e pode ser útil na identificação das LAs indiferenciadas, mas, na maioria das vezes, está presente nas LLAs de célula precursora B (LLA-cpB) e nas LMAs, exceto no subtipo M3 (PAIETTA, 2003; VARDIMAN et al., 2009). O marcador mielóide imaturo CD117 é encontrado em 75% das LMAs com parada maturativa nos primeiros estágios de diferenciação (BÉNÉ et al., 1998). CD14 é raramente observado nos blastos mielóides, mas pode estar presente em alguns casos raros de LMA com diferenciação mielomonocítica. Apesar disto, CD14 é útil na distinção entre blastos e monócitos remanescentes, uma vez que estes monócitos co-expressam CD13/CD33 fisiologicamente, característica também observada nos blastos mielóides. O marcador CD65 está associado aos blastos comprometidos com a diferenciação granulocítica e, ao contrário de CD15, não apresenta promiscuidade de linhagem. O marcador CD15 também é um antígeno de diferenciação granulocítica, mas, pode ser observado em alguns casos de LLA-cpB, bem como durante a diferenciação mielóide, associado ao CD65 (revisado em BÉNÉ et al., 2011).

A identificação de alterações genéticas nas LMAs associadas com a patogênese da doença permitiu a distinção de grupos de risco, estratificação terapêutica e monitoramento da resposta do paciente ao tratamento (RUBNITZ, 2012). Considerando a relevância destas alterações no curso clínico do paciente e as diferenças na resposta ao tratamento entre os subtipos, a OMS propôs uma classificação para as LMAs que incluísse as características genéticas como principal critério para a categorização da doença, inter-relacionando as informações morfológicas e citoquímicas (estabelecidas pelo grupo FAB), às imunofenóticas e às citogenético-moleculares como melhor estratégia para estratificação de risco (HARRIS et al., 1999; VARDIMAN et al., 2010).

A técnica de citogenética convencional (bandeamento G) pode detectar anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais em 70-80% dos casos, auxilia na caracterização da LMA e vem sendo indispensável na estratificação de risco: favorável, intermediário ou adverso. Em geral, pacientes com alterações genéticas recorrentes favoráveis devem ser tratados com terapia convencional, enquanto que os pacientes de alto risco devem ser direcionados para tratamentos mais intensivos com indução de transplante de células-tronco hematopoiéticas (HSCT). A decisão de tratamento para pacientes pertencentes ao grupo de risco intermediário, representados principalmente pelos casos apresentando análise citogenética normal, é difícil de ser determinada devido à heterogeneidade molecular e clínica deste grupo (MARTELLI et al., 2013). Entretanto, análises moleculares demonstram translocações crípticas no grupo de pacientes sem alterações citogenéticas, elevando para 90%

o percentual de casos com aberrações cromossômicas (BALGOBIND et al., 2011). A técnica de citogenética convencional seria insuficiente para determinar as alterações cromossômicas chamadas crípticas, nas quais a translocação se dá entre partes aparentemente similares, resultando em cromossomos derivados citogeneticamente semelhantes aos seus homólogos normais. Portanto, apesar do cariótipo normal na análise inicial do paciente, alterações detectadas por técnicas moleculares [como hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR)] são importantes para a caracterização da doença, com impacto na decisão terapêutica (CREUTZIG et al., 2012).

As anormalidades cromossômicas mais frequentes em crianças com LMA incluem a translocação entre os cromossomos 8 e 21, nas regiões 22 do braço longo de ambos os cromossomos [representada como t(8;21)(q22;q22)], a inversão do cromossomo 16, nas regiões 13.1 do braço longo e 22 do braço curto [inv(16)(p13.1q22)], a translocação entre a região 22 do braço longo do cromossomo 15 e a região 21 do braço longo do cromossomo 17 [t(15;17)(q22;q21)], além dos rearranjos envolvendo o gene *MLL* (*MLL-r*) na região 23 do braço longo do cromossomo 11 (11q23). Juntas, estas anormalidades correspondem a 50% dos casos de LMA pediátrica, uma frequência muito maior que a observada em adultos (GRIMWADE, 2001; BETTS et al., 2007; HARRISON et al., 2010; VON NEUHOFF et al., 2010).

A OMS categoriza ainda, como entidades distintas, as anormalidades adicionais t(1;22)(p13;q13), envolvendo os genes *RBM15(OTT)-MKL1(MAL)* e predominante em LMA de lactente com diferenciação megacarioblástica (Torres *et al.*, 2011), a inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2)/*RPNI-EVII*, a t(6;9)(p23;q34)/*DEK-NUP214* e as alterações t(9;11)(p22;q23), envolvendo os genes *MLL* e *MLLT3(AF9)*, seu parceiro mais frequente em LMA e a t(10;11)(p12;q23)/*MLL-MLLT10(AF10)* (VARDIMAN, 2010).

A LMA pediátrica representa um grupo de LA relativamente heterogêneo apesar da sua origem mielóide comum. A grande variedade de alterações moleculares observadas na LMA reflete esta heterogeneidade, tanto do ponto de vista fenotípico quanto genético. Estas características genéticas e a resposta à terapia são importantes determinantes do prognóstico e são usados para a estratificação de risco na maioria dos estudos clínicos atuais (ABRAHAMSSON et al., 2011). A Tabela 1.1 resume as principais anormalidades genéticas com implicações clínicas consolidadas, aquelas com potencial relevância clínica e aquelas com relevância clínica ainda desconhecida (revisado em RUBNITZ; INABA, 2012).

Tabela 1.1. Alterações genéticas nas LMAs pediátricas

| Cariótipo | Genes comprometidos | Frequência nas LMAs pediátricas (%) | Significado clínico |
|---|-------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| t(8;21)(q22;q22) | <i>RUNX1-RUNX1T1</i> | 15 | Prognóstico favorável |
| inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) | <i>CBFB-MYH11</i> | 10 | Prognóstico favorável |
| t(15;17)(q22;q12) 11q23 | <i>PML-RARA</i> <i>MLL</i> | Exclusiva de LMA promielocítica 20 | Prognóstico favorável Variável |
| t(9;11)(p12;q23) | <i>MLL-MLLT3</i> | 8 | Prognóstico intermediário |
| t(10;11)(p12;q23) | <i>MLL-MLLT10</i> | 1 | Prognóstico adverso |
| t(1;22)(p13;q13) | <i>RBM15-MKLI</i> | 1 | Desconhecido |
| t(6;9)(p23;q34) | <i>DEK-NUP214</i> | 1 | Prognóstico adverso* |
| inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) | <i>RPNI- EVII</i> | <1% | Prognóstico adverso |

LMA, leucemia mielóide aguda. * O prognóstico adverso desta alteração rara foi estabelecido apenas na LMA do adulto.

A alta especificidade e sensibilidade (até 10^{-5}) da PCR quantitativa em tempo real (RQ-PCR) representa, dentro das abordagens fundamentais para o tratamento e prognóstico de LMA, a detecção das fusões gênicas úteis no monitoramento da doença residual mínima (DRM). Entretanto, esta metodologia é aplicável a apenas 35% dos pacientes pediátricos, uma vez que os níveis de DRM podem variar amplamente em um curto período de tempo durante o tratamento (VIEHMANN et al., 2003). A cinética da recaída difere entre os subtipos genéticos, com uma média de tempo de recaída molecular para clínica entre 2 e 8 meses (OMMEN et al., 2010). Se confirmado como sendo de significância prognóstica, os níveis aumentados de DRM medidos pela presença das fusões gênicas podem indicar a necessidade de HSCT ou reinício da quimioterapia (CREUTZIG et al., 2012).

1.2.3. IDADE COMO DETERMINANTE DAS VARIAÇÕES ETIOPATOLÓGICAS

A LMA pediátrica é uma entidade distinta da LMA do adulto (CREUTZIG et al., 2008; RADTKE et al., 2009; CREUTZIG et al., 2012) e este conceito é substanciado por evidências que demonstram frequências variadas de alterações citogenéticas e mutações em genes de vias de sinalização na LMA entre crianças, adultos jovens e idosos, sendo que, algumas alterações são exclusivas das crianças, refletindo, portanto, uma história natural diferente (MRÓZEK; HEEREMA; BLOOMFIELD, 2004; LORIAUX et al., 2008; RADTKE et al., 2009; BALGOBIND et al., 2011). Com o delineamento dos fatores de risco independentes, novas estratégias vêm sendo consideradas para estratificar modalidades terapêuticas baseadas nestes fatores, evitando exposição desnecessária a pacientes de baixo risco e incluindo terapia intensiva quando necessária naqueles de risco adverso (RADHI; MESHINCHI; GAMIS, 2010; CREUTZIG et al., 2012).

Um pico de incidência discreto para a LMA é observado no primeiro ano de vida e diminui progressivamente até os quatro anos de idade, permanecendo relativamente constante durante os outros anos da infância, na adolescência e na fase adulta. A LMA é uma doença que afeta, principalmente, os idosos (≥ 60 anos de idade), com uma taxa de incidência de 208,9 por 1.000.000 nas pessoas com idade ≥ 75 anos (DORES et al., 2012).

Embora não apresente um pico de incidência característico, diferentemente da LLA (REIS et al., 2011), é importante considerar que a LMA pediátrica deve ser estratificada em relação às faixas etárias. As LMAs da primeira infância, que acometem crianças até 5 anos de idade, destacam-se pelo curto período de latência, características imuno-citogenéticas distintas das demais e na maioria dos casos, estão associadas a um prognóstico desfavorável (PUI et al., 2000; ROSS, 2008; CREUTZIG et al., 2012a; CREUTZIG et al., 2012b). As crianças entre 2 e 5 anos de idade apresentam manifestação da doença que se assemelha mais às LMAs que ocorrem em crianças até 2 anos de idade do que a crianças maiores que 5 anos, adolescentes e adultos jovens. As crianças com LMA e idade ≤ 2 anos, em geral, apresentam características de LMA de risco intermediário e de alto risco (PUI et al., 2000; CREUTZIG et al., 2012b). Nesta faixa etária, as crianças com LMA apresentam características de hepatoesplenomegalia e envolvimento de órgãos extra medulares, além de uma alta incidência dos subtipos FAB M4/M5 e M7, fatos que estão correlacionados à alta frequência do *MLL-r*, consistente com a origem pré-natal destas leucemias (GREAVES; WIEMELS, 2003).

1.2.4. LMA DA SÍNDROME DE DOWN

Crianças com síndromes congênitas específicas apresentam risco aumentado para o desenvolvimento da LMA, sendo a síndrome de Down (SD) a desordem genética mais frequentemente associada à probabilidade aumentada de desenvolverem LMA (revisado em CREUTZIG et al., 2012). As crianças com SD ou mosaicismo da SD apresentam risco de 14-20 vezes maior que as crianças sem SD de desenvolverem LA. Aproximadamente 5% dos neonatos com SD apresentam leucemia transitória, também chamada de mielopoese anormal transitória ou desordem mieloproliferativa transitória, que usualmente regridem espontaneamente. Nos quatro primeiros anos de vida, 10-20% das crianças desenvolvem LMA com características megacarioblásticas (LM-SD) (GAMIS et al., 2011). As proliferações mielóides relacionadas à SD apresentam características morfológicas, imunofenótípicas, clínicas e moleculares únicas, o que justifica sua separação das demais neoplasias mielóides (revisado em VARDIMAN et al., 2009).

A leucemia transitória e a LM-SD são caracterizadas por mutações no éxon 2 do fator de transcrição *GATA-1*, que resultam na perda do domínio de ativação do gene e levam a formação de uma proteína truncada (HITZLER et al., 2003). Os blastos leucêmicos se originam durante a hematopoese fetal que ocorre no fígado (LI et al., 2005). Apesar de a maioria dos neonatos com LMA e SD apresentarem remissão espontânea em 4-10 semanas, alguns deles desenvolvem sintomas clínicos graves associados à pancitopenia ou infiltração extramedular (KLUSMANN et al., 2008).

A LM-SD pode ser tratada com sucesso se administrada a quimioterapia com intensidade reduzida e sem HSCT, resultando em taxas de sobrevida global (OS) e sobrevida livre de eventos (SLE) atingindo 85% (CREUTZIG et al., 2005; KUDO et al., 2007; KUDO et al., 2010). Como as crianças com SD são mais suscetíveis a quimioterapia e apresentam sistema imune comprometido, efeitos colaterais e infecções são resultados frequentes do tratamento e óbitos relacionados à terapia e recaídas são características comuns observadas nestes casos (ZWAAN et al., 2002; CREUTZIG et al., 2005; TAUB; GE, 2005).

1.3.0. ALTERAÇÕES GENÉTICAS NAS LMAs PEDIÁTRICAS

As translocações cromossômicas geram a recombinação ilegítima ou justaposição de genes normalmente separados e, em geral, envolvem dois fatores de transcrição. Como resultado destas fusões gênicas, pode ocorrer a formação de uma proteína híbrida com propriedades oncogênicas (ROWLEY, 1998). Estes fatores transcricionais são conservados evolutivamente e são importantes para a embriogênese e para a hematopoese normal, como por exemplo, o fator de ligação ao núcleo (*core binding factor*, CBF), o receptor alfa de ácido retinóico (*retinoic acid receptor alpha*, RAR α), e os membros da família homeobox (HOX) (DASH; GILLILAND, 2001). Apesar de associações específicas destas fusões gênicas com as LMAs, estudos *in vitro* envolvendo as fusões gênicas mais frequentes em leucemias demonstraram que as proteínas de fusão são insuficientes *per si* para induzir um fenótipo leucêmico completo (CASTILLA et al., 1996; CORRAL et al., 1996; CASTILLA et al., 1999; HE et al., 1997; DOBSON et al., 1999; YUAN et al., 2001; HIGUCHI et al., 2002). A expressão destas proteínas de fusão parece alterar o crescimento e a diferenciação das células-tronco hematopoiéticas gerando uma população de células pré-leucêmicas suscetível à aquisição de mutações cooperativas para induzir o desenvolvimento da LMA. A expressão inicial dos produtos da fusão gênica possivelmente fornece uma vantagem de crescimento mínima que não seria detectada clinicamente (DOWNING; SHANNON, 2002). O número e o tipo de mutações cooperativas variam significativamente entre os diferentes subtipos (BALGOBIND et al., 2011).

A partir de evidências experimentais e epidemiológicas, DASH; GILLILAND (2001) sugeriram um modelo de cooperação entre pelo menos duas classes de mutações nas LMAs. No modelo da leucemogênese chamado de “2 eventos” (Fig. 1.4), uma classe de mutações (classe I) confere vantagem proliferativa e de sobrevivência às células com esta alteração e, uma segunda classe de mutações (classe II) serviria primariamente para interferir na diferenciação hematopoiética e na subsequente apoptose celular. Entre as mutações de classe I, estão mutações de ativação em *RAS*, *FLT3* ou *c-KIT* e, na classe II, estão as fusões gênicas *RUNX1-RUNX1T1*, *MLL-r*, *CBFb-MYH11* e *PML-RAR α* . As LMAs, que são caracterizadas pela proliferação e sobrevivência celular aumentadas e parada na diferenciação hematopoiética, seriam, portanto, consequência da expressão de ambas as classes de mutações (DASH; GILLILAND, 2001).

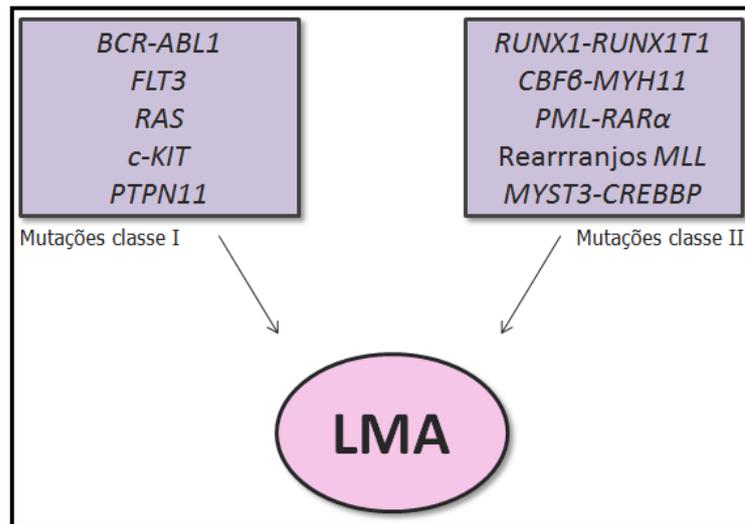


Figura 1.4. Modelo dos “2 eventos” proposto para a leucemogênese das leucemias mielóides. Duas classes principais de anormalidades genéticas são necessárias para o desenvolvimento da LMA: alterações cromossômicas recorrentes (por ex., as fusões gênicas *CBFb-MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*, *MLL-r*, *PML-RARα*, *MYST3-CREBBP*) que bloqueiam a diferenciação mantendo a auto-renovação do clone leucêmico; e alterações em genes que conferem vantagem proliferativa ou de sobrevivência celular ao progenitor hematopoiético (por ex., nos genes *c-KIT*, *FLT3*, *PTPN11*, *RAS*, *BCR-ABL1*) (modificado de GILLILAND; GRIFFIN, 2002).

Corroborando com esta hipótese, estudos demonstram que alterações em *FLT3* e em *NRAS*, ambas que transmitem sinais de proliferação e sobrevivência, não coexistem no mesmo paciente. Em alguns raros exemplos, quando mutações em *FLT3* e *NRAS* são encontradas em um mesmo paciente, sugere-se que existe uma vantagem seletiva adicional nas células que apresentam ambas as alterações ou que existem dois clones leucêmicos distintos (STIREWALT et al., 2001). De maneira similar, *CBFb-MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*, *MLL-r*, *PML-RARα* e as mutações classe II são mutualmente excludentes entre si. Apesar disto, alterações em *FLT3* ocorrem em 30-40% dos casos apresentando a fusão gênica *PML-RARα* (BALGOBIND et al., 2011). Estes dados não impedem a possibilidade de que alterações adicionais sejam necessárias para a leucemogênese, como vem sendo proposto atualmente (LEY et al., 2010; PASCHKA et al., 2010; SHIH et al., 2010; PATEL et al., 2012; NAOE; KIYOI, 2013), mas sugerem fortemente que, no mínimo, estas duas classes de mutações sejam necessárias.

Desde sua terceira edição, a classificação da OMS para as neoplasias mielóides vem ressaltando a importância de lesões genéticas múltiplas que cooperam para o estabelecimento da leucemogênese e influenciam as características clínicas e morfológicas da doença (VARDIMAN; HARRIS; BRUNNING, 2002), incluindo não apenas os rearranjos cromossômicos detectados microscopicamente, mas também as mutações genéticas submicroscópicas (KELLY; GILLILAND, 2002). Estas anormalidades genéticas estão associadas a características clínicas, morfológicas e fenotípicas que distinguem uma entidade leucêmica específica. Apesar da relevância das alterações genéticas para a classificação das LMAs e estratificação de risco, a designação FAB pode ser concluída rapidamente após análise morfológica e avaliação da marcação citoquímica. Entre alterações cromossômicas mais frequentes em crianças, a alteração *RUNX1-RUN1T1* está associada aos subtipos morfológicos M1/M2 e a fusão gênica *CBF β -MYH11* é descrita como associada ao subtipo M4 (VON NEUHOFF et al., 2010); a fusão *PML-RAR α* é exclusiva do subtipo M3 (revisado em CREUTZIG et al., 2012); e o *MLL-r* está associado, principalmente, aos subtipos mielomonocíticos (BIONDI et al., 2000). Sendo assim, a classificação FAB ainda é importante para direcionar as análises moleculares para o fornecimento de um diagnóstico mais rápido.

1.3.1. ALTERAÇÕES NO FATOR DE LIGAÇÃO AO NÚCLEO (CBF)

O fator de transcrição heterodimérico CBF é formado pelas subunidades CBF α (composta pelas proteínas RUNX1 ou AML1, RUNX2 e RUNX3) e CBF β . A afinidade de ligação da subunidade RUNX1 por regiões promotoras no DNA é aumentada por sua associação com CBF β , o qual não interage diretamente com o DNA mas protege o complexo da proteólise (PASCHKA, 2008). O complexo CBF recruta diversas proteínas que atuam na ligação de regiões promotoras regulando a expressão de genes importantes para a diferenciação hematopoiética normal. Entre eles, incluem-se a interleucina 3 (IL-3), o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), receptores de citocinas, como o receptor do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), e genes importantes para a maturação de células T e B (DASH; GILLILAND, 2001). Além disto, CBF recruta cofatores com atividade de histona deacetilases, relaxando a dupla fita de DNA e permitindo o acesso da maquinaria de transcrição (KITABAYASHI et al., 1998).

Uma vez que CBF é crítico para a hematopoese normal, é plausível que o comprometimento da função de CBF através de translocações cromossômicas prejudique a diferenciação celular (DASH; GILLILAND, 2001). Estudos de depleção gênica em camundongos para o gene *RUNX1* demonstraram fenótipo de morte embrionária precoce com característica de hemorragia no SNC. Apesar de estes animais apresentarem hematopoese normal no saco vitelínico, eles não desenvolvem a hematopoese definitiva (WANG et al., 1996).

As duas translocações mais frequentes em LMA envolvendo o complexo CBF são a fusão da subunidade *CBF α* com o gene *ETO*, também conhecido como *RUNX1T1* [t(8;21)(q22;q22)], e a fusão de *CBF β* com o gene *MYH11* [inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)] (CREUTZIG et al., 2012). Os transcritos de fusão (Fig. 1.5A e 1.5B) codificam uma proteína quimérica que é um inibidor dominante negativo da proteína selvagem. Por exemplo, a fusão *RUNX1-RUNX1T1* é um inibidor do produto do gene *RUNX1* no alelo selvagem, uma vez que sua expressão no contexto da fusão *RUNX1-RUNX1T1* origina o mesmo fenótipo de embriões que não expressam o gene *RUNX1* (MEYERS; LENNY; HIEBERT, 1995; DOWNING, 2003). As Figs. 1.5C e 1.5D ilustram a morfologia característica de casos de LMA com alteração em CBF (LMA-CBF).

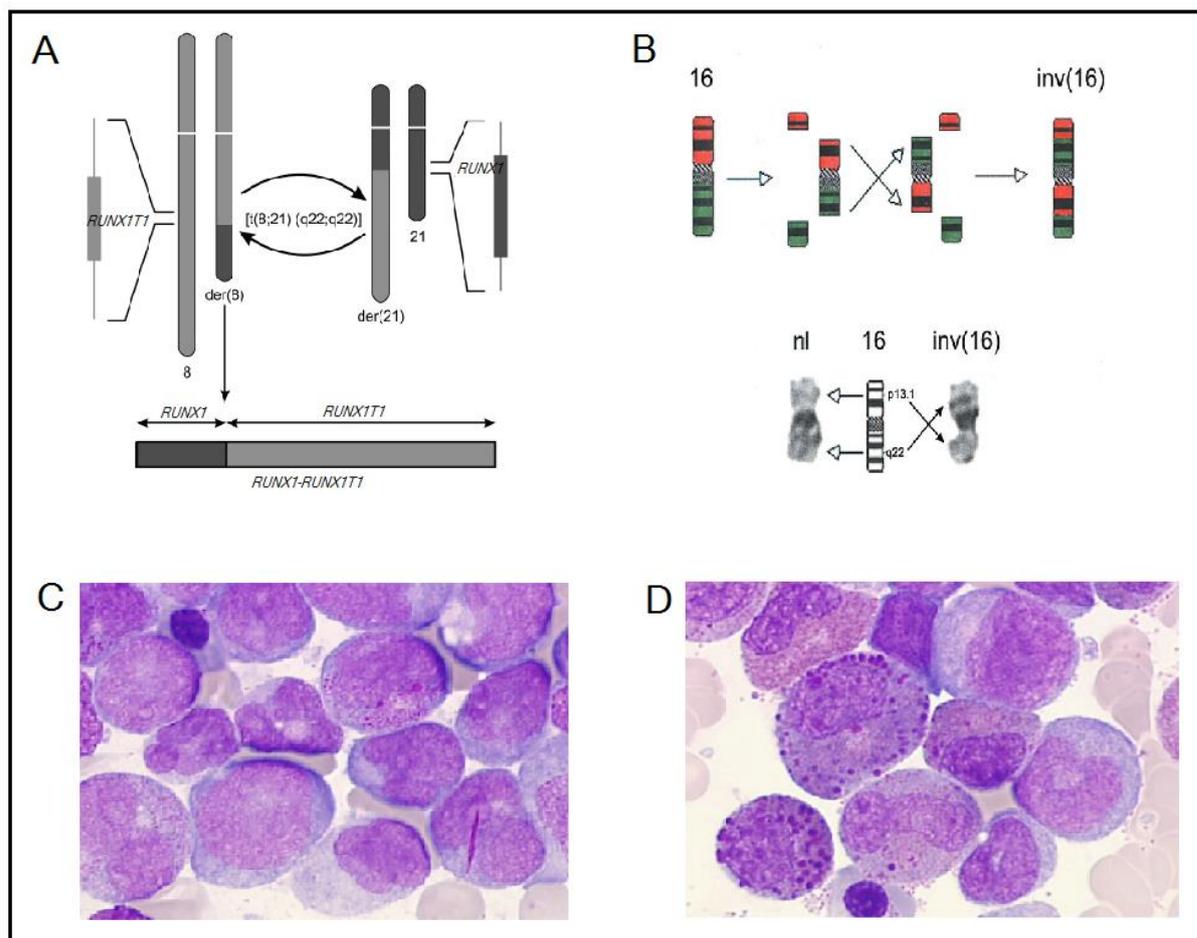


Figura 1.5. LAMs com alteração em CBF. A, Representação esquemática da translocação $t(8;21)(q22;q22)$ resultando na formação do transcrito de fusão *RUNX1-RUNX1T1*, sendo que uma cópia do alelo não é afetado (reproduzido de RULINA; SPIRIN; PRASSOLOV, 2010). B, A $inv(16)(p13.1;q22)$ é resultado da quebra e religação das bandas 16p13.1 e 16q22. O cromossomo 16 normal (nl) e o cromossomo 16 alterado [$inv(16)$] estão representados na figura de acordo com a coloração obtida no bandeamento G. C, LMA com a alteração *RUNX1-RUNX1T1*; D, LMA com a alteração *CBFβ-MYH11*. LMA, leucemia mielóide aguda. (Imagens gentilmente cedidas pela professora Marie Thérèse Daniel do Hospital Saint-Louis, Paris, França)

MARCUCCI (2006) propôs que a proteína de fusão *RUNX1-RUNX1T1* recruta histonas deacetilases e DNA metiltransferases para alvos de CBF, o que leva a uma deacetilação aumentada da cromatina e hipermetilação de regiões promotoras, resultando em repressão da transcrição e desregulação das vias de sinalização para a hematopoese normal

(MARCUCCI, 2006). A proteína de fusão CBF β - MYH11 é um inibidor do complexo CBF, pois apresenta afinidade aumentada pela proteína RUNX1 e inibe a atividade normal do complexo CBF α /CBF β , interferindo no controle normal da transcrição e diferenciação hematopoéticas, progressão do ciclo celular e resposta a apoptose (KUNDU; LIU, 2001). Animais que expressam esta proteína apresentam o mesmo fenótipo de animais que expressam a proteína RUNX1-RUNX1T1, sendo que ambos são idênticos ao fenótipo de animais que não expressam as proteínas *RUNX1* ou *CBF β* (CASTILLA et al., 1996).

A proteína RUNX1-RUNX1T1 atua como repressor transcricional interferindo em diferentes vias de transdução de sinais, bloqueando a ativação de fatores que promovem a diferenciação hematopoiética e que atuam como supressores de tumor em várias etapas deste processo (ELAGIB; GOLDFARB, 2007). Estudos funcionais das proteínas de fusão contendo as subunidades *RUNX1* ou *CBF β* mostraram o envolvimento destas proteínas na formação de população de células pré-leucêmicas, que se manifestaram pelo acúmulo de precursores imaturos com diminuição da capacidade de diferenciação, mas sem uma leucemia evidente. Estudos *in vivo* confirmaram que mutações em *RUNX1* são eventos iniciadores das LAs, mas para o estabelecimento do fenótipo leucêmico mutações secundárias são necessárias (NIEBUHR et al., 2008).

1.3.2. ALTERAÇÕES ENVOLVENDO O RECEPTOR DE ÁCIDO RETINÓIDO α ($RAR\alpha$)

As translocações envolvendo o gene $RAR\alpha$ são invariavelmente associadas à leucemia promielocítica (APL) ou LMA-M3 de acordo com a classificação FAB (Fig. 1.6A); seu principal parceiro de fusão é o gene PML (nomeado pelo seu envolvimento na APL) na $t(15;17)(q22;q11)$, que origina dois transcritos de fusão (CREUTZIG et al., 2012; Fig. 1.6B). Um deles é regulado pelo promotor de PML e codifica uma proteína contendo a maioria dos domínios funcionais de $RAR\alpha$, incluindo o domínio de ligação ao DNA. A maior parte do gene PML é incorporada na fusão. O transcrito recíproco menor $RAR\alpha$ - PML também é expresso em pacientes com APL. A relação causal entre a fusão PML - $RAR\alpha$ e a origem da APL é baseada não só em observações epidemiológicas de que o rearranjo está sempre associado à APL, mas também ao fato de que esta fusão causa uma síndrome com fenótipo semelhante à APL em modelos murinos transgênicos (HE et al., 1997; BROWN et al., 1997).

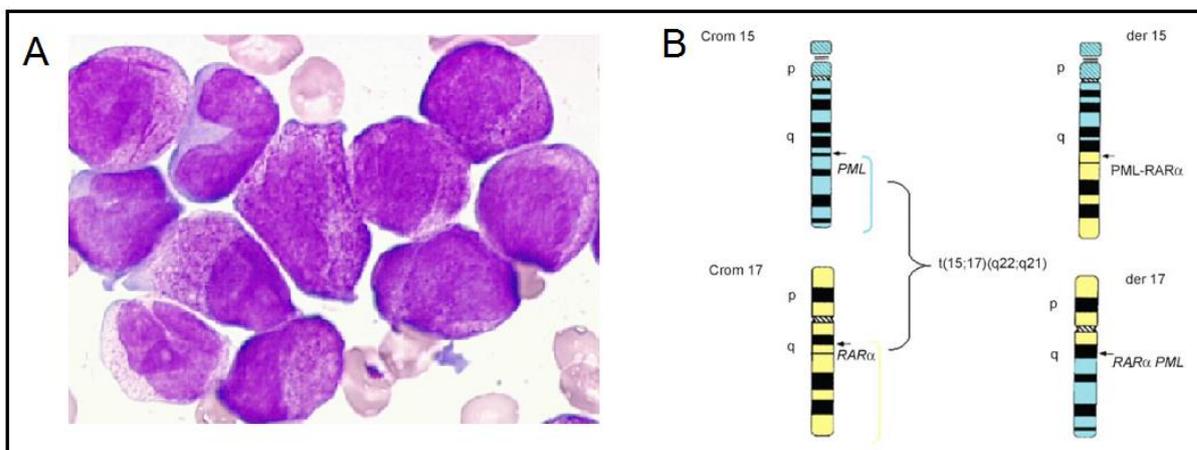


Figura 1.6. Características da LMA promielocítica. A, Leucemia promielocítica ou LMA-M3 com a alteração PML - $RAR\alpha$ (Imagem gentilmente cedida pela professora Marie Thérèse Daniel do Hospital Saint-Louis, Paris, França); B, Representação esquemática da $t(15;17)(q22;q11)$ gerando as fusões gênicas PML - $RAR\alpha$ e $RAR\alpha$ - PML .

O gene $RAR\alpha$ codifica uma proteína que atua como repressor da transcrição de genes importantes para a mielopoese (ALCALAY et al., 1998). Em concentrações fisiológicas do ligante de $RAR\alpha$, o ácido trans-retinóico (ATRA), ocorre liberação do complexo repressor e

ativação da transcrição (GERMAIN et al., 2006). Em APL, existe uma parada na maturação de progenitores hematopoiéticos no estágio promielocítico. A proteína *PML-RAR α* não permite a ligação ao ATRA (RUTHARDT et al., 1997) e recruta corepressores nucleares que inibem a transativação de genes-alvo de *RAR α* via deacetilação de histonas, impedindo o acesso e a ligação da maquinaria de transcrição, conseqüentemente, impedindo a expressão de genes necessários para a diferenciação hematopoiética (GRIGNANI et al., 1998). A reversão deste efeito se dá com a adição de ATRA em concentrações supra fisiológicas, que induz um programa de diferenciação de promielócitos em neutrófilos diferenciados terminais, seguido por apoptose. A nível molecular, ATRA sobrepõe a atividade inibitória dominante de *PML-RAR α* , se ligando ao domínio RARa da proteína de fusão e liberando o complexo corepressor nuclear, permitindo a expressão de genes necessários para a diferenciação de promielócitos em neutrófilos maduros. Existem outras translocações variantes envolvendo *RAR α* e associadas ao fenótipo de APL. O ponto de quebra em *RAR α* é preservado, mas outros genes estão envolvidos na translocação, como o gene da nucleofosmina (*NPM*) e o gene dedo de zinco em APL (*PLZF*), nas alterações t(5;17)(q32;q12) e t(11;17)(q23;q21), respectivamente. Entretanto, pacientes apresentando t(11;17) não respondem ao tratamento com ATRA, apesar das similaridades com o fenótipo clínico de APL. Esta observação pode ser explicada, em parte, pelo fato de que *PLZF* é capaz de recrutar o complexo nuclear corepressor e a proteína *PLZF/RAR α* não é afetada pelo ATRA, levando a um bloqueio persistente na expressão gênica e na diferenciação hematopoiética (MUINDI et al., 1992; GRIGNANI et al., 1998).

1.3.3. ALTERAÇÕES ENVOLVENDO O GENE *MLL*

O gene *MLL* codifica uma proteína com atividade de histona metiltransferase e funciona como ativador transcricional, regulando a expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário e a hematopoese. A proteína *MLL* atua como um complexo proteico que modula a modificação da cromatina via metilação, acetilação e remodelamento dos nucleosomas (TAKEDA et al., 2006). Fatores de transcrição, como *RUNX1* (KOH et al., 2013), *p53* e β -catenina, são capazes de recrutar o complexo *MLL* para iniciar a transcrição e (SIERRA et al., 2006), genes específicos, como aqueles da família *HOX*, são dependentes da modificação da cromatina pelo complexo *MLL* durante a transcrição (YOKOYAMA et al., 2004).

A desregulação do *MLL* por translocações cromossômicas é frequentemente observada em LLA e LMA. Mais de 70 parceiros de fusão já foram identificados nestas alterações (ZHANG et al., 2012) sendo que, em LMA, os principais genes envolvidos são *AF9 (MLLT3)*, *AF10 (MLLT10)*, *ELL* e *AF6 (MLLT4)* (MEYER et al., 2013). Experimentos *in vivo* indicam que o potencial leucemogênico da translocação cromossômica envolvendo o *MLL* depende do parceiro a ser considerado (BARABÉ et al., 2007), fato que pode auxiliar no entendimento das diferenças observadas na OS e na SLE dos pacientes com determinadas alterações (BALGOBIND et al., 2009; CREUTZIG et al., 2012). Por exemplo, o prognóstico favorável independente da fusão *MLL-AF1q* (BALGOBIND et al., 2009) pode ser explicado por estudos de CO et al. (2008), que permitiram concluir que a superexpressão de *AF1q* resulta em apoptose induzida por doxorubicina aumentada, mediada via proteínas BAD. Portanto, sugere-se que pacientes com a fusão *MLL-AF1q* devem ser alocados no grupo de baixo risco em determinados protocolos de tratamento (BALGOBIND et al., 2009). Já o significado prognóstico da fusão *MLL-MLLT3* permanece controverso. BALGOBIND et al. (2009) não confirmaram o prognóstico favorável em pacientes com a *t(9;11)(p22;q23)*, como descrito anteriormente em uma corte pediátrica e em adultos (MROZEK et al., 1997; RUBNITZ et al., 2002; LIE et al., 2003). Estas variações podem ser explicadas pelas diferenças nas dosagens de citarabina aplicadas ou pela homogeneidade étnica da coorte avaliada (BALGOBIND et al., 2009).

Apesar disto, as proteínas de fusão envolvendo *MLL* apresentam algumas características em comum, ou seja, a maioria delas mantem o domínio N-terminal do *MLL* e perde o domínio C-terminal, que contém o motivo responsável pela metilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4) nas regiões promotoras dos genes *HOX* (MILNE et al., 2002). Os genes *HOX* apresentam papel importante na regulação do hematopoese e sua expressão aberrante está associada à leucemogênese (MAGLI; LARGMAN; LAWRENCE, 1997; DRABKIN et al., 2002).

ZUNA et al. (2009) defendem a hipótese de que o *MLL-r* permitiria a auto renovação do clone maligno não-diferenciado, o qual ficaria vulnerável a posteriores alterações genéticas e, sofreria então, mutações subsequentes que acarretariam uma proliferação descontrolada e o desenvolvimento do fenótipo leucêmico, particularmente devido a exposição crônica ou intermitente a agentes químicos mutagênicos (EGUCHI; EGUCHI-ISHIMAE; GREAVES, 2005; ZUNA et al., 2009). A mesma distribuição dos pontos de quebra do *MLL* nas leucemias dos lactentes foi observada em leucemias secundárias a tratamento quimioterápico (t-LMA) (CIMINO et al., 1997; SPECTOR et al., 2005). Os sítios de ligação da DNA topo-II parecem

estar envolvidos em rearranjos do *MLL* relacionados a tratamentos com drogas que atuam sobre esta enzima (SUPER et al., 1993). Esta observação indicou que os mecanismos de quebra do *MLL* nas leucemias dos lactentes podem ser similares aos das t-LMAs (BROEKER et al., 1996), sugerindo que a exposição fetal a alguns agentes com atividade inibidora da DNA topo-II poderia ser o evento inicial para o desenvolvimento das LAs que afetam crianças com idade inferior a 12 meses. O evento leucemogênico inicial envolveria a exposição pré-natal a inibidores da DNA topo-II de maneira similar àquela observada em t-LMAs contendo o *MLL-r* (revisado em EMERENCIANO; KOIFMAN; POMBO-DE-OLIVEIRA, 2007).

As t-LMAs podem ser induzidas pelo tratamento de um tumor sólido ou leucemia anteriores e estão associadas a agentes quimioterápicos específicos e prognóstico adverso, provavelmente devido à maior probabilidade de apresentarem características citogenéticas de alto risco. As t-LMAs que resultam do tratamento com agentes alquilantes apresentam um período de latência de 4-6 anos após a terapia primária, podem se desenvolver a partir de mielodisplasia e estão associadas a aberrações nos cromossomos 5 ou 7 (revisado em MANOLA, 2009). As t-LMAs que ocorrem após o tratamento com inibidores de topo-II se desenvolvem após o período de latência de 1-3 anos e estão associadas aos *MLL-r* (TABORI et al., 2008).

1.3.4. ALTERAÇÕES TIPO I

Em LMA pediátrica, alterações tipo I e tipo II e sua relação com a sobrevida dos pacientes já foi descrita em diversos estudos (VON NEUHOFF et al., 2010; GOEMAN et al., 2005; MESHINCHI et al., 2001; ZWAAN et al., 2003). Aberrações leucemogênicas específicas podem guiar o desenvolvimento de alvos terapêuticos para grupos específicos de pacientes. Alterações somáticas categorizadas como tipo I, como *FLT3*, *RAS* e *c-KIT*, vêm sendo identificadas em LMA pediátrica como possíveis biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, especialmente no grupo citogeneticamente normal (BALGOBING et al., 2011). A frequência e as associações não randômicas entre as alterações tipo I e tipo II diferem dos adultos, evidenciando as diferenças na biologia da doença entre estes grupos etários (BALGOBIND et al., 2011).

1.3.4.1. *FLT3*

O gene *FLT3* está localizado na região 13q12 e codifica um receptor tirosina-quinase (RTK) classe III. Esta família inclui receptores de membrana que contêm domínios extracelulares tipo imunoglobulina, um domínio transmembrana, um domínio justamembrana e dois domínios tirosina-quinase (DTK) intracelulares (Fig. 1.7). Os membros desta família desempenham papéis importantes na proliferação, diferenciação e sobrevivência das células-tronco hematopoéticas normais. O *FLT3* é expresso em células hematopoéticas imaturas e, junto com o seu ligante, é importante para o desenvolvimento normal das células-tronco e o sistema imune (revisado em GILLILAND; GRIFFIN, 2002). Alterações de perda de função do receptor resultam no desenvolvimento de animais adultos com população normal de células hematopoiéticas maduras. Entretanto, em experimentos de HSCT, as células precursoras com alteração no gene apresentam capacidade reduzida de reconstituir a população de células mielóides e T (MACKAREHTSCHIAN et al., 1995).

A maioria dos receptores *FLT3* inativos é encontrada na forma de monômeros na membrana plasmática. Na presença de um ligante (*FLT3L*) há a indução de sua dimerização que estabiliza uma mudança conformacional reforçando a ativação do receptor. O *FLT3* promove a auto-fosforilação dos DTKs, ativando o receptor e gerando transmissão do sinal extracelular. O complexo *FLT3L-FLT3*-fosfato é rapidamente internalizado e seus subprodutos são degradados (STIREWALT; RADICH, 2003).

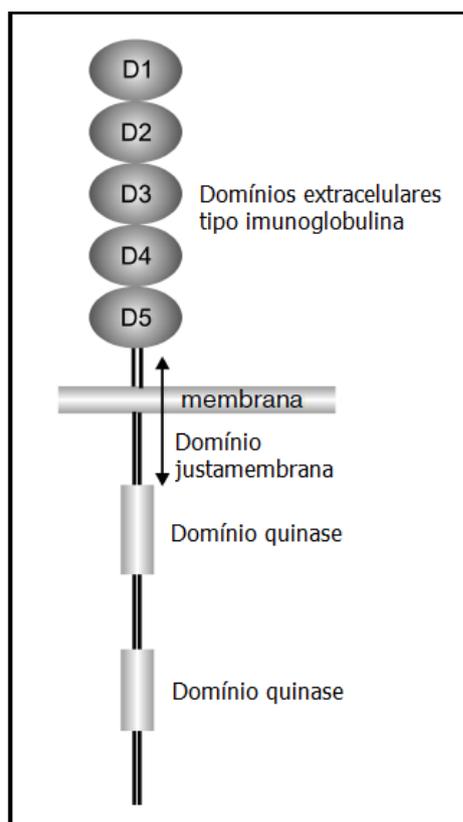


Figura 1.7. Receptor tirosina quinase classe III. O receptor de membrana apresenta cinco domínios extracelulares tipo imunoglobulina (D1-D5) responsáveis pela interação com o ligante, um domínio transmembrana, um domínio justamembrana e dois domínios tirosina-quinase intracelulares (RULINA; SPIRIN; PRASSOLOV, 2010).

As principais alterações em *FLT3* são do tipo as duplicações *in tandem* (DITs) no domínio justamembrana e mutações pontuais ou pequenas deleções/inserções afetando os códons 835 no resíduo de ácido aspártico (Asp835 ou D835) ou 836 no resíduo de isoleucina (Ile836 ou I836) no DTK (NAKAO et al., 1996; YAMAMOTO et al., 2001). As DITs resultam na ativação constitutiva do receptor e foram primariamente identificadas em pacientes com LMA. As mutações pontuais no domínio de ativação D835/I836 do *FLT3* também induzem uma fosforilação anormal, levando a uma maior atividade proliferativa em células hematopoiéticas, principalmente na linhagem linfóide (GILLIAND; GRIFFIN, 2002).

As DITs são encontradas em 15-35% das LMAs (MESHINCHI et al., 2001; STIREWALT et al., 2001; SCHNITTGER et al., 2002; THIEDE et al., 2002) e são formadas quando um fragmento da seqüência codificante do domínio justamembrana é duplicado e inserido numa orientação direta. O comprimento da DIT varia de 3 a ≥ 400 pb, e o ordem de

leitura do transcrito em geral é preservada (SCHNITTGER et al., 2002). As mutações pontuais ocorrem com menor frequência em LMA (5-10%), sendo encontradas também em casos de LLA (1-3%) (STIREWALT; RADICH, 2003). Na série casos brasileiros de lactentes com LA, a frequência de casos com alterações no *FLT3* foi de 7% do total de casos e de cerca de 5% nos casos com *MLL-r* (EMERENCIANO et al., 2008).

1.3.4.2. RAS

O gene *KRAS* está localizado na região 12p12.1, o *NRAS* na região 1p13.2 e o gene *HRAS* na região 11p15.5. Estes genes codificam proteínas que apresentam alta afinidade por nucleotídeos contendo guanina, em geral são representados pela guanosina di- ou tri-fosfato (GDP ou GTP, respectivamente), e que estão associadas à camada interna da membrana plasmática. Este grupo de proteínas apresenta capacidade intrínseca de hidrólise destes nucleotídeos e esta capacidade encontra-se extremamente reduzida quando ocorre uma mutação em determinadas regiões de, pelo menos, um dos alelos (revisado em MALUMBRES; BARBACID, 2003).

As proteínas RAS se ligam ao nucleotídeo guanosina e podem ciclar entre um estado ativo GTP-ligado e um estado inativo GDP-ligado. Elas podem ser ativadas quando um fator de crescimento se liga ao receptor tirosina quinase, resultando em ativação do receptor pela sua dimerização e autofosforilação, o qual recruta proteínas adaptadoras para a membrana plasmática. Estas proteínas desempenham papel importante na ativação da proteína RAS, catalisando a troca do GDP pelo GTP. O resultado desta sinalização é uma alteração no padrão de expressão gênica pelo estímulo da proliferação celular, sobrevivência ou controle da diferenciação. A sinalização termina quando o GTP é hidrolisado a GDP pela atividade GTPásica intrínseca da RAS (lenta), ou através de proteínas ativadoras de GTPases (GAPs, rápida) (DONOVAN; SHANNON; BOLLAG, 2002).

Mutações pontuais nos oncogenes *RAS* nos códons 12, 13 ou 61, fazem com que a proteína RAS permaneça no seu estado ativo (RAS-GTP), uma vez que ela perde sua atividade GTPásica intrínseca e sua afinidade por GAPs e, portanto, a hidrólise do GTP. A transdução do sinal se dá continuamente através da cascata de fosforilação. O sinal chega ao núcleo estimulando o crescimento celular (RENNEVILLE et al., 2008; DENAYER et al., 2008). Os principais pontos de mutação nos genes *RAS* levam a troca dos aminoácidos glicina no códon 12 (G12) e glicina no códon 13 (G13). Mutações nestes resíduos diminuem a atividade GTPásica da proteína RAS e impedem sua interação com GAPs, resultando em

ativação permanente RAS-GTP e consequente ativação constitutiva dos efetores da via RAS-MAPK (ADJEI, 2001; SCHUBBERT; SHANNON; BOLLAG, 2007). Incapazes de reverter para o estado inativo RAS-GDP, a conformação modificada de RAS mutante favorece o estado GTP-ligado, conferindo vantagem proliferativa às células neoplásicas (BEERAM; PATNAIK; ROWINSKY, 2005).

Mutações em diferentes componentes da via RAS-MAPK são encontradas em tumores humanos, sendo a prevalência maior em adenocarcinoma de pâncreas (90%), cólon (50%), tireóide (50%), pulmão (30%) e melanoma (25%) (MALUMBRES; BARBACID, 2003), ocorrendo em cerca de 20% das leucemias agudas (GILLILAND; TALLMAN, 2002). As mutações são encontradas mais frequentemente no gene *KRAS* (85% do total), menos no *NRAS* (15%) e raramente no *HRAS* (1%). Nas malignidades hematopoéticas, estas mutações são observadas em frequência variável (5-20%) (LIANG et al., 2006), sendo aproximadamente 15% dos pacientes com LLA (PERENTESIS et al., 2004) e aproximadamente 30% dos pacientes com LMA (BARLETTA et al., 2004). Diferentemente de outros cânceres humanos, onde as mutações no *KRAS* geralmente são predominantes, as mutações no *NRAS* são mais frequentes nas neoplasias hematológicas (USHER et al., 2009). Mutações em genes da via RAS-MAPK foram correlacionadas a alterações citogenéticas dos subgrupos de LA (BALGOBIND et al., 2011).

1.3.4.3. *c-KIT*

O gene *c-KIT* codifica a proteína KIT (ou CD117 com peso molecular de 145kDa), que é um receptor de citocinas expresso na superfície de células-tronco hematopoéticas e de outras células. KIT é um RTK classe III (Fig. 1.7) e desempenha papel importante na regulação da hematopoese e na embriogênese. A interação do receptor com o ligante (fator de células tronco, SCF) induz sua dimerização e mudanças conformacionais no SCF que estimulam a dimerização dos dímeros já formados, com produção de tetrâmeros complexos (LIU et al., 2007). Esta reação induz a atividade enzimática de autofosforilação que resulta na modificação de resíduos de tirosina fora dos domínios quinase que atuam como sítios de ligação para moléculas transdutoras de sinais (MOL et al., 2004). O término do sinal se dá pela ubiquitinação do receptor com consequente internalização para degradação nos lisossomos (LENNARTSSON et al., 2005). O domínio justamembrana atua como inibidor intracelular, uma vez que apresenta estrutura secundária estável e está fortemente ligado à região de ligação da adenosina trifosfato (ATP) no receptor. Desta forma, KIT está inativo e

não é capaz de fosforilar outras proteínas. Entretanto, a fosforilação do domínio justamembrana altera sua conformação e anula o efeito inibitório (CHAN et al., 2003).

O estímulo de KIT leva à ativação de vias de sinalização associadas à divisão celular, diferenciação, adesão, secreção, sobrevivência e reorganização do citoesqueleto, como a via PI3K e JAK/STAT (WANDZIOCH et al., 2004; LIU et al., 2007). A ativação de KIT dependente de ligante leva a rápida ativação de quinases da família Src (SKF), responsáveis pela sobrevivência, quimiotaxia, adesão, proliferação e migração celular (LENNARTSSON et al., 2005). O estímulo de SCF é capaz de induzir, ainda, a ativação da cascata de sinalização RAS-MAPK que desempenha papel importante na divisão celular, sobrevivência e formação de tumor (MCCUBREY et al., 1998).

A superexpressão ou mutações em *c-KIT* são observadas em pacientes com LMA, síndrome mielodisplásica, tumor do estroma gastrointestinal e em mastocitose (LONGLEY; REGUERA; MA, 2001). As mutações de ativação podem ocorrer no domínio justamembrana, diminuindo o tempo necessário para ativação de KIT, ou nos domínios tirosina quinase, que levam à falha na estabilidade da conformação ativa da região enzimática (Torrent et al., 2004).

Mutações em *c-KIT* são, em geral, pouco frequentes nos casos de LMA pediátrica e de adultos, ocorrendo em 6-9% dos casos (ZAKER; MOHAMMADZADEH; MOHAMMADI, 2010; BALGOBIND et al., 2011) mas, são observadas, nos casos de LMA-CBF, em 28-40% dos casos pediátricos e adultos. As mutações mais frequentes envolvem a substituição do resíduo de ácido aspártico na posição 816, códon 17 (KELLY; GILLILAND, 2002; BALGOBIND et al., 2011) e levam à ativação constitutiva do receptor (TURNER et al., 1995). Mutações de deleções e inserções no éxon 8 também são frequentes e afetam os domínios imunoglobulina, se manifestando como hiperativação do receptor na presença do ligante (KOHL et al., 2005).

1.4.0. ALTERAÇÕES RARAS NA LMA PEDIÁTRICA: FUSÃO GÊNICA *MYST3-CREBBP*

Em LMA pediátrica, a classificação citogenética é importante para estratificação de risco. Entretanto, algumas alterações são muito raras e necessitam ampla investigação para posterior subclassificação biológica da LMA e para o entendimento desta doença heterogênea. Além da anormalidade $t(6;9)(p23;q34)/DEK-NUP214$ contemplada pela classificação da OMS para neoplasias mielóides (SWERDLOW, 2008; VARDIMAN et al., 2009), existem duas anormalidades crípticas que não estão incluídas nesta classificação, mas seu rastreamento é recomendado por grupos especialistas internacionais (CREUTZIG et al., 2012) e merecem especial atenção não só por ajudar na melhor caracterização dos pacientes, mas também por definirem grupos de risco de prognóstico adverso nas LMAs. São elas: a $t(5;11)(q35;p15.5)/NUP98-NSD1$ e a $t(7;12)(q36;p13)/ETV6-HLXB9$. Outra alteração que merece destaque é o rearranjo cromossômico recíproco $t(8;16)(p11;p13)/MYST3-CREBBP$, uma vez que as vias leucemogênicas envolvidas no desenvolvimento da LMA com esta alteração ainda não estão completamente descritas.

A $t(8;16)(p11;p13)$ resulta na fusão dos genes *MYST3* (também conhecido como *MOZ* ou *KAT6A* localizado no cromossomo 8p11) e *CREBBP* (também chamado *CBP* localizado no cromossomo 16p13). Ambas as proteínas apresentam atividade histona acetiltransferase e estão envolvidas na regulação do ciclo celular (CAMÓS et al., 2006; GERVAIS et al., 2008). *MOZ* interage com fatores de transcrição, como *RUNX1*, e estimula a transcrição de seus genes alvo (KITABAYASHI et al., 2001). Animais deficientes na expressão de *MYST3* morrem no décimo quinto dia de gestação apresentando palidez, fígado em tamanho menor que o normal e maturação eritróide defeituosa. *MYST3* é necessário para auto-renovação das células-tronco hematopoéticas através da regulação da expressão de *c-KIT*, *c-MPL* e *HOXA9* (KATSUMOTO et al., 2006). *CREBBP* acetila proteínas histonas e não histonas, incluindo p53 (GU; ROEDER, 1997) e *GATA-1* (BOYES et al., 1998), ativando a transcrição de fatores essenciais para a hematopoese, como *RUNX1*, *RARα* e *PU.1*. A proteína de fusão *MYST3-CREBBP* altera a transcrição dependente de *RUNX1* e inibe a diferenciação de células mielóides murinas, desregulando fatores importantes para a hematopoese e, conseqüentemente, contribuindo para a leucemogênese (KITABAYASHI et al., 2001).

HAFERLACH et al. (2009) caracterizaram a $t(8;16)(p11;p13)$ como um subgrupo distinto raro em pacientes adultos com LMA (13/6124; 0,2% dos casos), com prognóstico desfavorável (OS média de 4,7 meses), além de apresentar eritrofagocitose marcada na

morfologia (Fig. 1.8) e imunofenótipo característico. O grupo descreveu que os pacientes adultos com a $t(8;16)(p11;p13)$ compartilham algumas características clínicas e biológicas com os casos de LMA *MLL-r*, como a alta frequência dos subtipos FAB M4/M5, maior frequência de casos de LMA relacionada à terapia e similaridades nos perfis de expressão gênica, como superexpressão de *HOXA* (HAFERLACH et al., 2009). Por suas características distintas, esta alteração rara merece destaque em pacientes pediátricos, sendo que alguns estudos sugerem a ocorrência de remissão espontânea, ao passo que outros demonstram prognóstico adverso (DINULOS et al., 1997; STARK et al., 2004; CLASSEN et al., 2005; WONG et al., 2008; WU et al., 2011).

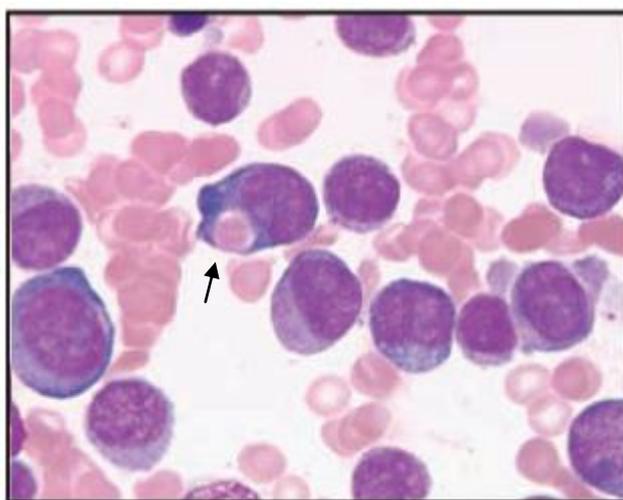


Figura 1.8. Eritrofagocitose característica de casos de LMA com a alteração $t(8;16)(p11;p13)$ (reproduzido de HAFERLACH et al., 2009).

COENEN et al. (2013) realizaram um estudo colaborativo com grupos diferentes de 18 países e reuniram os casos de LMA pediátrica com $t(8;16)(p11;p13)$. Neste estudo, quase metade dos casos apresentou idade ≤ 2 anos ao diagnóstico, sendo que 28% dos casos foram diagnosticados no primeiro mês de vida. Grande parte dos casos apresentava envolvimento cutâneo e eritrofagocitose. Entretanto, a coorte apresentou sobrevida semelhante aos outros pacientes de LMA pediátrica. Os 7 casos com LMA congênita apresentaram remissão espontânea, sendo que 4 deles sofreram com a recorrência da doença. Esta coorte apresentou também superexpressão de *HOXA* (COENEN et al., 2013), o que é suficiente para aumentar o número de células-tronco hematopoéticas (DICKSON et al., 2009).

Considerando a importância das alterações descritas nas LMAs, o efeito da associação entre as mutações de classe I e classe II pode auxiliar na caracterização dos pacientes pediátricos e na maior compreensão dos mecanismos envolvidos na leucemogênese, identificando possíveis biomarcadores ou alvos terapêuticos potenciais. Assim, a identificação dos subgrupos genéticos pode melhorar a descrição epidemiológica-molecular, a estratificação de risco e a etiopatogênese da doença.

2. JUSTIFICATIVA

A leucemia é uma doença clonal e evolui a partir de mutações sucessivas neste clone. Isso resulta em uma diversificação genética progressiva seguida por uma “seleção natural” de subclones dominantes (GREAVES; MALEY, 2012). O prognóstico dependerá da natureza do clone leucêmico e do quanto ele evoluiu a partir do período de aparecimento dos sintomas, diagnóstico correto e início do tratamento. Novas abordagens terapêuticas podem direcionar o tratamento contra alvos específicos e, em contrapartida, requerem um entendimento mais detalhado das lesões genéticas que contribuem para a leucemogênese e levam ao insucesso do tratamento (MULLIGHAN, 2009).

Eventos mutagênicos que possivelmente ocorrem durante a vida intrauterina contribuem para o aparecimento da doença em idade tão precoce (FORD et al., 1993; GALE et al., 1997; HUNGER et al., 1998; GREAVES et al., 2003). Neste sentido, nós já demonstramos associações de risco elevadas entre as leucemias de lactentes e a exposição materna durante a gestação a substâncias com ações inibidoras da DNA topoisomerase II, como estrógenos, quinolonas, pesticidas e dipirona, sendo que o alto peso ao nascer também foi identificado como um fator de risco. Demonstramos ainda que, a exposição materna a metabólitos do cigarro aumenta o risco para desenvolvimento da leucemia em lactentes (OR 6,00; 95% IC=1,62-22,28) quando associada a mutações em *RAS* e ao polimorfismo 609CT da enzima *NQO1* (ANDRADE et al., 2014; Publicação em anexo).

O foco principal deste trabalho foi investigar as alterações de genes crucias para o desenvolvimento e a diferenciação de células progenitoras como recomendações da OMS e de grupos especialistas internacionais. Os dados gerados por este estudo poderão fornecer informações importantes referentes às evidências que demonstram aumento da incidência de LMA no Brasil. A proposta de avaliar a frequência das alterações gênicas de classe I e classe II permitiram a identificação de fatores prognósticos na LMA pediátrica, uma vez que estas alterações estão associadas a fatores determinantes de resposta terapêutica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Principais

- Identificar mutações de classe I e II nas LMAs pediátricas tratadas no Brasil com o protocolo Berlim-Frankfurt-Munique (BFM) -AML2004.

3.2. Objetivos Secundários

- Adaptar, no laboratório do Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricos, Centro de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (PHOP, CPq, INCA), técnicas para realização das investigações moleculares para as alterações recorrentes em LMA pediátrica, conforme recomendado pela OMS.
- Explorar a associação entre as principais alterações genéticas das LMA pediátricas e seus subtipos celulares;
- Rastrear os principais pontos de mutações nos genes *KRAS*, *FLT3* e *c-KIT* nas LMAs pediátricas;
- Identificar as fusões gênicas *CBF β -MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RAR α* e *MLL-r* nas LMAs pediátricas;
- Avaliar o papel das mutações em *c-KIT* no prognóstico dos casos pediátricos;
- Rastrear as fusões gênicas envolvendo *MYST3* e *CREBBP* em LMA de lactentes (≤ 24 meses ao diagnóstico).

4. METODOLOGIA

4.1. Casuística

Estudo retrospectivo de uma série de casos de leucemia enviados para a caracterização diagnóstica, no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2013. Foram analisadas amostras de MO de casos de LMA encaminhadas para laboratório do PHOP, CPq, INCA, de crianças e adolescentes (≤ 18 anos), enviadas para o diagnóstico e/ou encaminhadas diretamente para esta pesquisa.

As amostras foram enviadas de diversos centros de tratamentos oncopediátricos representativos de todas as regiões do Brasil (Anexo A). Informações clínicas e demográficas foram enviadas através de uma ficha de encaminhamento preenchida no sistema online (imunomolecular.redecancer.org.br) sumarizada no Anexo B.

O algoritmo de testes estabelecido para a caracterização das LMAs está representado na Fig. 4.1.

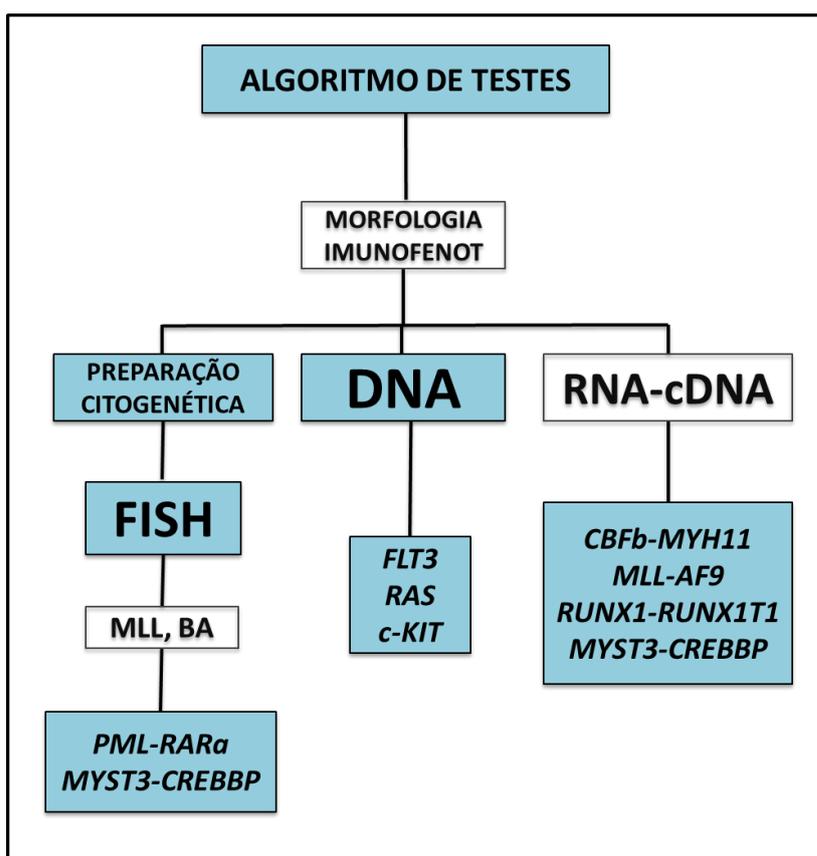


Figura 4.1. Representação esquemática do algoritmo de testes realizado no laboratório do PHOP, CPq, INCA, para caracterização das LMAs pediátricas. Inicialmente, as amostras passaram pelas análises morfológica e imunofenotípica e, foram então direcionadas para os testes moleculares. A identificação do status do gene *MLL* (rearranjado vs. não rearranjado)

foi realizada através da técnica de FISH, que também permitiu a determinação das fusões *PML-RAR α* e *MYST3-CREBBP*. A partir do DNA extraído, foram realizadas as técnicas de sequenciamento direto, para rastreamento de mutações nos genes *KRAS* e *c-KIT*, e RFLP, para identificação de mutações em *FLT3*. A partir do RNA, foi sintetizado o cDNA e realizada a técnica de RT-PCR para identificação das fusões *CBF β -MYH11*, *MLL-AF9(MLL3)*, *RUNX1-RUNX1T1* e confirmação da fusão *MYST3-CREBBP*. FISH, hibridização por fluorescência *in situ*; LMA, leucemia mielóide aguda; RFLP, *restriction fragment length polymorphism*; RT-PCR, reação em cadeia da polimerase a partir da transcriptase reversa.

Os diagnósticos de LMA foram estabelecidos antes de qualquer procedimento terapêutico específico e foi realizada a caracterização morfológica e imunofenotípica destas amostras, utilizando o painel de anticorpos monoclonais (BD Bioscience, NJ, USA) representados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Principais marcadores imunofenotípicos no diagnóstico de leucemias de células precursoras B, de células T e mielóides

| Marcadores de células B | Marcadores de células T | Marcadores de células mielóides |
|--------------------------------|--------------------------------|--|
| CD10 | CD1a | aMPO |
| CD19 | CD2 | CD13 |
| CD22 | CD3 | CD33 |
| CD79a | CD4 | CD11b |
| cIgM | CD5 | CD14 |
| TdT | CD7 | CD15 |
| | CD8 | CD41 |
| | TdT | CD42b |
| | TCR $\alpha\beta/\gamma\delta$ | CD117 |

Relação de anticorpos monoclonais utilizados para identificação dos diferentes subtipos celulares das leucemias agudas de acordo com os critérios propostos pelo grupo EGIL (*European Group for the Immunological Characterization of Leukemias*) (BÉNÉ et al., 1995); CD, *cluster* de diferenciação; c, citoplasmático; TdT, desoxiribonucleotidil transferase; TCR, receptor de célula T; aMPO, anti-mieloperoxidase.

Critérios de Inclusão: i) amostras de crianças e adolescentes (<19 anos de idade) com diagnóstico de LMA *de novo*, caracterizadas por morfologia, imunofenotipagem e citogenética-molecular; ii) amostras com pelo menos 20% de blastos na MO; iii) informação do médico de que o paciente seria tratado de acordo com o protocolo BFM-AML2004.

Critérios de Exclusão: i) pacientes com SD ou outras síndromes genéticas; ii) material biológico insuficiente para as análises propostas neste estudo; iii) pacientes submetidos a tratamento prévio; iv) crianças cujas mães ou responsáveis discordaram em assinar o termo em consentimento livre e esclarecido (TCLE).

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

À medida que as análises moleculares eram realizadas, os resultados obtidos eram disponibilizados na forma de laudo (Anexo D) via online, em caráter de pesquisa, à equipe médica envolvida no diagnóstico e tratamento dos pacientes.

4.2. Purificação do RNA e síntese do DNA complementar

O material coletado em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foi processado e 1×10^6 células foram armazenadas em Trizol (Invitrogen, CA, USA) a -20°C ou armazenadas em dimetilsulfóxido (DMSO) a -80°C para posterior extração do material genético e pesquisa das alterações cromossômicas recorrentes. Na maioria das alterações tipo II, os pontos de quebra estão espalhados por regiões de pelo menos 10kb no DNA, o que dificulta a sua amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) básica. Para que a reação fosse feita a partir do DNA, seria necessário que os pontos de quebra específicos de cada paciente fossem determinados. Em geral, a fusão gênica origina um transcrito de fusão (ácido ribonucleico mensageiro, RNA), que pode ser alvo das reações de PCR após sua transcrição reversa para a síntese de DNA complementar (cDNA) (VAN DONGEN et al., 1999).

Portanto, a purificação do RNA foi realizada através do ensaio comercial Trizol (Invitrogen, CA, USA), conforme protocolo padrão estabelecido pelo fabricante. Após a extração, o RNA foi quantificado em um espectrofotômetro (*NanoDrop1000*, Wilmington,

DE, USA), avaliando-se a absorbância a 260nm, e foram geradas as quantificações dos ácidos nucleicos através do programa ND-1000 que acompanha o aparelho. Para cada 3µg de RNA, foram usados 0,8µl da enzima DNase (1U/µl; Promega, Madison, WI, USA). Após incubação à temperatura ambiente por 15 min, foi adicionado 1µL de EDTA (25mM) e a solução foi incubada a 65°C por 15 min. Após esse período, as amostras foram resfriadas a -20°C por 1 min. Foi adicionado 1µl de oligonucleotídeos ricos em timina (Oligo dT) 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 de cDNA foi realizada utilizando-se 1µL da enzima transcriptase reversa (5U/ml, Invitrogen, CA, USA), tampão 2x (50mM KCl, 20nM Tris-HCl pH 8,4) (Invitrogen, CA, USA), cloreto de magnésio (MgCl₂) a 2,4mM (Invitrogen, CA, USA) e oligonucleotídeos 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 através da amplificação do gene constitutivo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*). Para esta reação, 3,5 µl 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 Fig. 4.2.

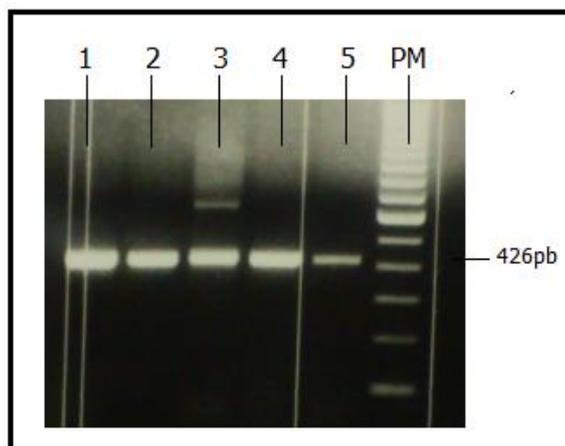


Figura 4.2. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para visualização da região amplificada do *GAPDH*. (1-5) Amostras de casos com banda amplificada; (PM) Padrão de peso molecular de 100pb. Pb, pares de bases.

4.3. Purificação de DNA

O DNA foi obtido a partir de células mononucleares através do kit DNA Blood Mini (Qiagen, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante e/ou após obtenção do RNA, utilizando-se o reagente comercial Trizol (Invitrogen, CA, USA) conforme o protocolo padrão estabelecido pelo fabricante. Posteriormente, o DNA foi quantificado através do espectrofotômetro (*NanoDrop 1000*, Wilmington, DE, USA), com a absorvância a 260nm, e foram geradas as quantificações pelo programa ND-1000 que acompanha o aparelho. O material foi utilizado para rastreamento das alterações tipo I.

4.4. Preparo das amostras para hibridização *in situ* por fluorescência (FISH).

Após separação e direcionamento das amostras para diagnóstico inicial morfológico e imunofenotípico, 5×10^6 células do aspirado de MO em heparina foram incubadas por 24 horas (37°C, 5% de CO₂) com 4 ml de meio de cultura (desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial, RPMI, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 1 ml de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen, CA, USA). O tratamento do material para obtenção de núcleos metafásicos e interfásicos foi modificado de acordo com o descrito por KONN et al. (2009) com o objetivo de preparação das lâminas para a FISH. Ao término do período de incubação, 100 µl de colchicina (Cytogen, Cambridge, UK) foram adicionados à solução e as amostras foram incubadas por mais 1 h (37°C, 5% de CO₂). Após esse período, as amostras foram

centrifugadas por 5 min a 1500 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 5 ml da solução de cloreto de potássio a 0,075 M (KCl, Merck KGaA, Darmstadt, DE). Os tubos foram, posteriormente, incubados a 37°C por 17 min e, novamente centrifugados por 5 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e foram gotejados, aos poucos, 5 ml da solução de fixador (3metanol:1ácido acético, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). As amostras descansaram por 20 min a 4°C e seguiram-se pelo menos três etapas de lavagem da amostra com a solução de fixador, que consistiram em centrifugação por 5 min a 1500 rpm, retirada do sobrenadante e adição de 5 ml de fixador. As lâminas foram preparadas gotejando-se cerca de 100 µl da amostra lavada e fixada e, posteriormente, direcionadas para a técnica de FISH, com sondas específicas, conforme protocolo padrão recomendado pelo fabricante.

4.5. Alterações moleculares tipo II

MLL-r. Para a definição inicial do *status* do *MLL*, foi realizada a FISH utilizando-se a sonda LSI MLL Dual Color, Break ApartRearrangement Probe, (Cytogen, Cambridge, UK) seguindo os protocolos do fabricante. Para a detecção dos parceiros mais frequentes *AFF1/AF4*, *MLLT3/AF9*, *MLLT1/ENL*, *MLLT10/AF10*, *ELL*, foi utilizada a técnica de RT-PCR (EMERENCIANO et al., 2006). Nos casos em que não foi possível a identificação do parceiro de fusão do *MLL*, foi realizada a técnica de PCR invertido de longa distância (LDI-PCR), na qual 1µg do DNA genômico foi digerido com a enzima de restrição *BamHI* e religado a 16°C overnight na presença de 5 unidades da enzima DNA ligase T4 para a formação de DNA circular antes da análise da LDI-PCR. As reações de ligação foram realizadas a 65°C por 10 min. Foram usados 100ng do DNA genômico religado para as análises de LDI-PCR. As sequências obtidas foram amplificadas com combinações diferentes de cinco oligonucleotídeos iniciadores e visualizadas através de gel de agarose 0,8% e, posteriormente, isoladas e sequenciadas para a distinção das sequências de fusão específicas (MEYER et al., 2005).

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

RUNX1-RUNX1T1 e *CBF β -MYH11*. A técnica de RT-PCR para identificação das fusões gênicas *RUNX1-RUNX1T1* e *CBF β -MYH11* foi realizada de acordo com o descrito por van DONGEN et al. (1999).

MYST3-CREBBP. A revisão da descrição morfológica dos casos de LMA pediátrica e a identificação eritrofagocitose sugeriram que a alteração genética t(8;16)(p11;p13)/*MYST3-CREBBP*, até então não rastreada na população brasileira pelas técnicas de RT-PCR e/ou FISH, poderia ser encontrada nos nossos casos seguindo os critérios propostos por HAFERLACH et al. (2009). As sondas para realização da FISH foram desenhadas a partir de clones de cromossomos bacterianos artificiais (*bacterial artificial chromosome*, BAC) já descritos (www.ensembl.org). Estes clones foram marcados com as moléculas fluorescentes *SpectrumOrange* (laranja) ou *SpectrumGreen* (verde) pela empresa BlueGnome (Cambridge, UK). Os BACs RP11-231D20 e RP11-108L9 foram selecionados por serem complementares ao *MYST3* e foram marcados com a cor laranja. Os BACs RP11- 387O21 e RP11- 461A8 foram selecionados por serem complementares ao *CREBBP* e foram marcados com a cor verde. Ambos as localizações estão indicadas pelas setas na Fig. 4.3.

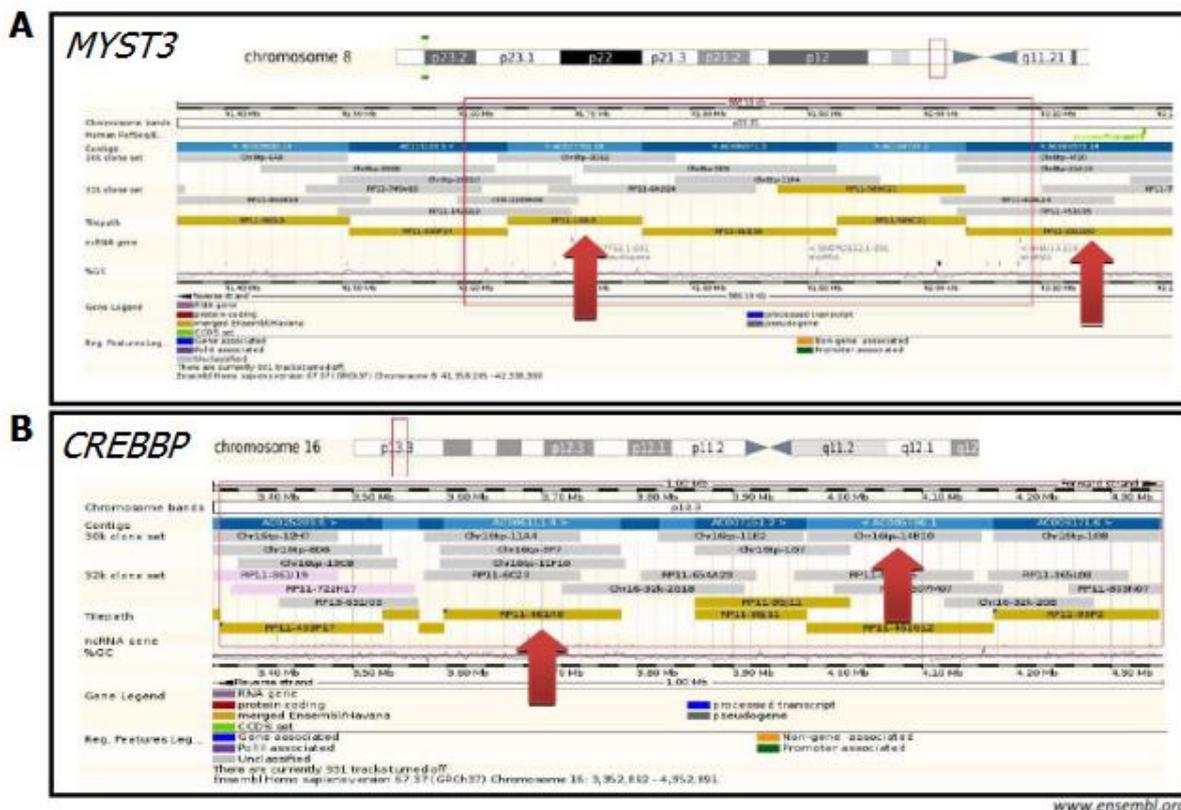


Figura 4.3. Representação dos cromossomos bacterianos artificiais (BACs) selecionados de acordo com sua posição nos genes de interesse. A, BACs RP11-231D20 e RP11-108L9

complementares ao *MYST3*. B, BACs RP11- 387O21 e RP11- 461A8 complementares ao *CREBBP* (www.ensembl.org).

Inicialmente, foram estabelecidos os valores do ponto corte para a definição da positividade da fusão *MYST3-CREBBP*. Para isso, a FISH foi realizada em leucócitos normais de doadores saudáveis, a partir de amostras gentilmente cedidas pelo Banco de Sangue do INCA. A preparação das amostras de SP em EDTA (0,5ml) foi realizada a partir da incubação por 72 horas (37°C, 5% de CO₂) com 4 ml de meio de cultura RPMI (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1 ml de SFB (Invitrogen, CA, USA) e 0,2ml de fitohemaglutinina (Invitrogen, CA, USA). Ao término do período de incubação, 100 µl de colchicina (Cytogen, Cambridge, UK) foram adicionados à solução e as amostras foram incubadas por mais 2 h (37°C, 5% de CO₂). A partir desta etapa, seguiu-se o tratamento do material para obtenção de núcleos metafásicos e interfásicos de acordo com o descrito no item 4.4 (KONN et al., 2009). Para a identificação da presença da fusão *MYST3-CREBBP* e para o estabelecimento dos valores de ponto de corte, foi realizada a FISH com os BACs mencionados anteriormente, seguindo os protocolos do fabricante (BlueGnome, Cambridge, UK).

O ponto de corte calculado foi de 6%. A Fig. 4.4 representa núcleos metafásicos com os BACs hibridizados nos respectivos genes.

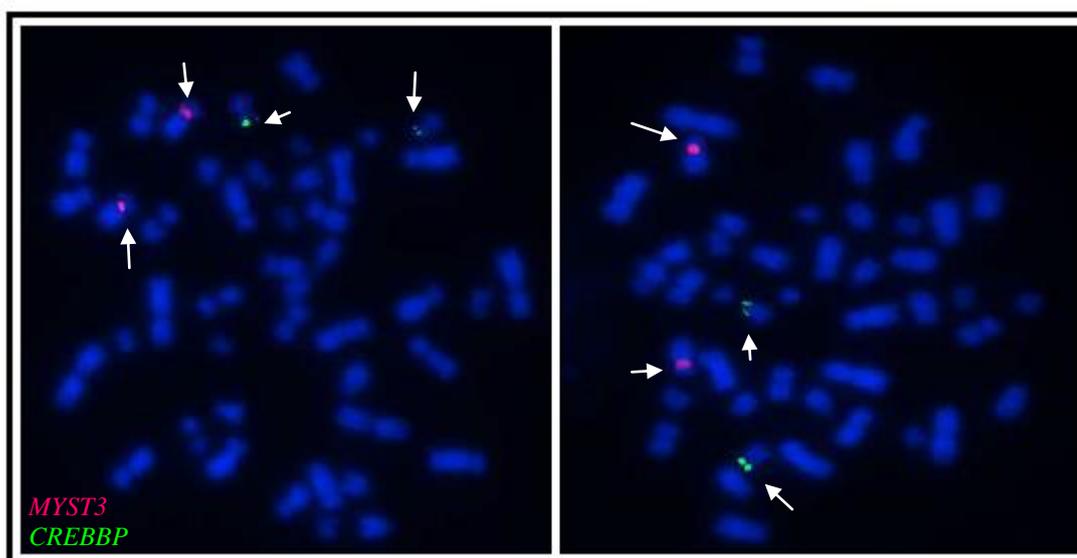


Figura 4.4. Núcleos metafásicos com os BACs hibridizados nos genes *MYST3* (laranja) e *CREBBP* (verde).

As fusões gênicas identificadas foram confirmadas pela RT-PCR para a identificação dos transcritos de fusão tipo I e II (*MYST3-CREBBP*), bem como *CREBBP-MYST3* (BORROW et al., 1996; SCHMIDT et al., 2004). Para detecção da fusão mais frequente *MYST3-CREBBP* tipo I (*MYST3* quebra no éxon 16 e *CREBBP* quebra no éxon 5), de ~1100 pb, foi realizada apenas uma reação utilizando um controle positivo gentilmente cedido pelo Dr. Oskar Haas, do St. Anna Kinderspital, Medical University Vienna, Vienna, Áustria. Para detecção do transcrito *CREBBP-MYST3* tipo II (*CREBBP* quebra no éxon 2 e *MYST3* quebra no éxon 17), de ~ 410 pb, foi realizada uma reação RT-PCR *nested*. Uma terceira reação foi realizada, com primers desenhados para aumentar a sensibilidade da amplificação do transcrito *MYST3-CREBBP* tipo I, gerando um amplicon de 353 pb, conforme descrito por SCHMIDT et al. (2004). A confirmação dos transcritos amplificados foi realizada através da técnica de sequenciamento direto, conforme descrito posteriormente, no item 4.6.

Amostras de 15 casos (≤ 24 meses) foram, inicialmente, selecionadas para a avaliação da presença da fusão *MYST3-CREBBP*. O critério para seleção foram casos de LMA com eritrofagocitose (Figura 1.6) ao diagnóstico morfológico, incluindo todos os subtipos FAB. O diagnóstico de LMA-M7 foi baseado no imunofenótipo com os marcadores CD41, CD61 e CD42. Todos os casos foram rastreados para a presença das alterações tipo II mais frequentes em LMA (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBF β -MYH11* e *MLL-r*), conforme descrito anteriormente.

De acordo com o material biológico disponível, a técnica de FISH foi realizada em 5 casos, a técnica de RT-PCR exclusiva em apenas 1 caso e ambas as técnicas em 9 casos.

4.6. Análise mutacional do gene *KRAS*

As mutações dos códons 12 e 13 do *KRAS* foram detectadas por PCR, utilizando iniciadores previamente descritos (Tabela 4.2), seguida da reação de sequenciamento direto (BORNHOLDT et al., 2008).

Para a reação de PCR foram utilizados 100-150ng de DNA. A solução adicionada ao DNA foi preparada para um volume final de 50 μ l com as seguintes quantidades: iniciadores a 0,5 μ M; 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).

Tabela 4.2. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação gênica *KRAS* (BORNHOLDT et al., 2008)

| Iniciador | Sequência |
|-----------------|--|
| SEQ1213F | Senso- 5' – AAC CTT ATG TGT GAC ATG TTC - 3' |
| SEQ1213R | Anti-senso- 5'- ATG GTC CTG CAC CAG TAA T - 3' |

As reações de PCR foram realizadas no termociclador Veriti® Thermal Cycler (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. 4.5) e, posteriormente, direcionados para o sequenciamento direto.

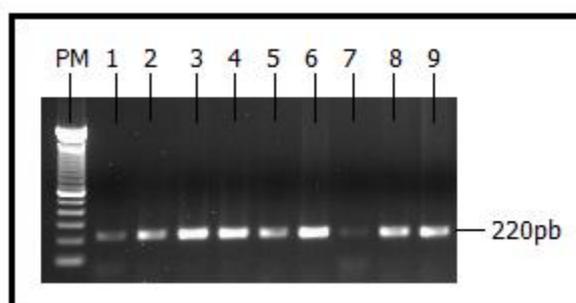


Figura 4.5. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para visualização da região amplificada do *KRAS*. (PM) Padrão de peso molecular de 100pb; (1-9) amostras de casos com região esperada amplificada. Pb, pares de bases.

A preparação das amostras para o sequenciamento se deu através da purificação dos produtos amplificados pela reação de PCR com o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, NE, UK), de acordo com o recomendado. 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 µL de isopropanol 75% (Merck KGaA, Darmstadt, DE) e as amostras foram ressuspensas, com a pipeta, de 3 a 4 vezes, para homogeneizá-las. As placas foram incubadas, por 15 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e, posteriormente, centrifugadas a 4°C e 4.000 rpm, por 45 min. O sobrenadante foi descartado vertendo-se as placas sobre papel-toalha, através de movimentos circulares. Foram adicionados 50 µL de Etanol 75% (Merck KGaA, Darmstadt, DE) e seguiu-se uma nova centrifugação a 4°C/4.000 rpm, por 15 min. O sobrenadante foi, novamente, descartado e as placas aquecidas a 60°C, por 10 min, ao abrigo da luz. Foram adicionados 10 µL de Formamida Hi-Di™ (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA) em cada poço da placa, que foi submetida a aquecimento a 95°C durante 5 min no termociclador. Após estas etapas, as amostras estavam adequadas para o processamento no sequenciador automático ABI3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). A análise das sequências geradas pelo aparelho foi realizada nos programas Chromas versão 2.32 (Technelysium, South Brisbane, AUS) e Mutation Surveyer® (Softgenetics, PA, USA). A Fig. 4.6 representa um eletroferograma gerado para o gene *KRAS* com a região mutada indicada.

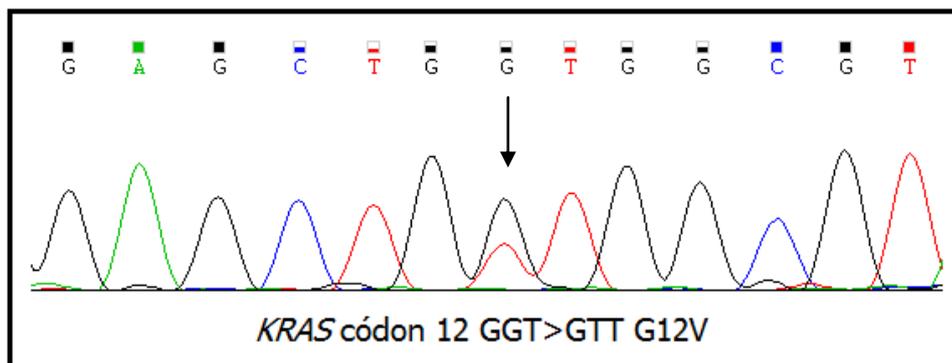


Figura 4.6. Eletroferograma de uma amostra mutada no códon 12, com a troca do nucleotídeo guanina (G) por timina (T), levando à substituição do aminoácido glicina por valina (representada como G12V).

4.7. Análise mutacional do gene *c-KIT*

As regiões mais frequentes de mutação no gene *c-KIT* (éxon 8 e éxon 17) foram rastreadas através da técnica de sequenciamento direto. Previamente, as regiões de interesse foram amplificadas a partir do DNA em uma reação de PCR, utilizando-se os iniciadores descritos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Sequência de oligonucleotídeos para a amplificação gênica de *c-KIT*

| Iniciador | Sequência |
|------------------|--|
| KIT8F | Senso- 5'- GAC ATA TGG CCA TTT CTG TT - 3' |
| KIT8R | Anti-senso- 5'- CCA AAA ATA ATC ATC TCA CC - 3' |
| KIT17F | Senso- 5'- TGT ATT CAC AGA GAC TTG GC - 3' |
| KIT17R | Anti-senso- 5'- GAA ACT AAA AAT CCT TTG CAG GAC - 3' |

Para a reação de PCR, foram utilizados 200-500ng de DNA. A solução adicionada ao DNA foi preparada para um volume final de 50µl com as seguintes quantidades: iniciadores a 0,2µM; dATP, dTTP, dCTP e dGTP a 0,2mM finais; solução tampão HiFi PCR Buffer 1x (50mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8,4) (Invitrogen, CA, USA), sulfato de magnésio (MgSO₄) a 1,5mM, (Invitrogen, CA, USA), DMSO a 10%, 1U de Taq-polimerase HiFi (Taq DNA Polymerase HiFi; Invitrogen, CA, USA).

As reações de PCR foram realizadas no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA), onde os perfis térmicos da reação seguiram as seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 1 min, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, temperatura e tempo de anelamento de 50°C por 30 seg, e extensão a 68°C por 1 min; ciclo final de extensão a 68°C por 3 min. Depois de amplificados, os produtos da PCR foram visualizados através de gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (Fig. 4.7) e, posteriormente, direcionados para o sequenciamento direto.

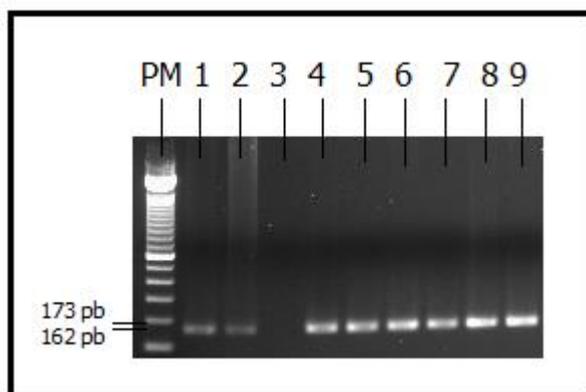


Figura 4.7. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para visualização das regiões amplificadas do *c-KIT*. (PM) Padrão de peso molecular de 100pb; (1-2) Amostras de casos com região esperada do éxon 8 amplificada; (3) Controle negativo da reação; (4-9) Amostras de casos com região esperada do éxon 17 amplificada. Pb, pares de bases.

A purificação das amostras com o kit GFX® PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, NE, UK) e sequenciamento com os reagentes BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA), no sequenciador ABI3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA), foram realizadas conforme descrito anteriormente, no item 4.5. A Fig. 4.8 representa eletroferogramas das regiões de interesse referentes aos éxons 8 (Fig. 4.8A) e 17 (Fig. 4.8B).

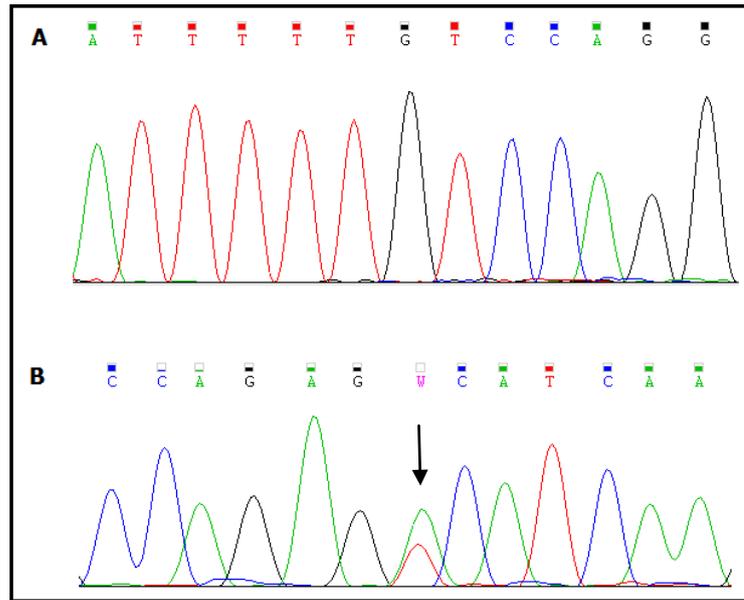


Figura 4.8. Eletroferograma de uma região do gene *c-KIT*. A, Eletroferograma de parte do éxon 8. B, Eletroferograma de parte do éxon 17, indicando a região mutada no códon 816, com a troca do nucleotídeo adenina (A) por timina (T), levando à substituição do aminoácido ácido aspártico por valina (representada como D816V).

4.8. Análise mutacional do gene *FLT3*

As mutações em *FLT3*-D835 foram detectadas por ensaio de PCR para a amplificação do éxon 17, utilizando iniciadores previamente descritos por NAKAO et al. (1996) (Tabela 4.4), seguida da digestão dos produtos com a enzima *EcoRV*. Para a reação de PCR, foram utilizados 250ng de DNA. A solução adicionada ao DNA foi preparada contendo uma solução final de 50µl com iniciadores a 0,15µM, dNTPs a 0,2mM, solução tampão 1x (Invitrogen, CA, USA), MgCl₂ a 2,5mM (Invitrogen, CA, USA), DMSO a 5% e 1U de Taq-polimerase (Taq DNA Polymerase; Invitrogen, CA, USA).

Tabela 4.4. Sequência de oligonucleotídeos para a amplificação gênica *FLT3*

| Iniciador | Sequência |
|----------------------------|---|
| <i>FLT3</i> éxon 17 | Senso- 5' -CCGCCAGGAACGTGCTTG- 3' Anti-senso- 5'-CAGCCTCACATTGCCCC- 3' |
| <i>FLT3</i> éxon 11 | Senso- 5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC- 3' |
| <i>FLT3</i> éxon 12 | Anti-senso- 5'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC- 3' |

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Veriti® Thermal Cycler (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA), seguindo o ciclo: 94°C por 7 min para a desnaturação inicial, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 61°C por 30 seg e 72°C por 45 seg, e uma extensão final de 72°C por 10 min. Depois de amplificados, os produtos de PCR foram visualizados através de gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (Fig. 4.9A) e, posteriormente, digeridos através de enzimas de restrição.

A digestão ocorreu no período *overnight* a 37°C, usando a enzima de restrição *EcoRV* (Biolabs, New England, UK). Os produtos digeridos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo (Fig. 4.9B). Para fins de validação da metodologia, as primeiras amostras que apresentaram alterações foram cortadas do gel, purificadas (GFX® PCR DNA and Gel Band Purification kit, GE Healthcare, NE, UK) e sequenciadas utilizando kit de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA), no sequenciador ABI3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA), conforme descrito anteriormente.

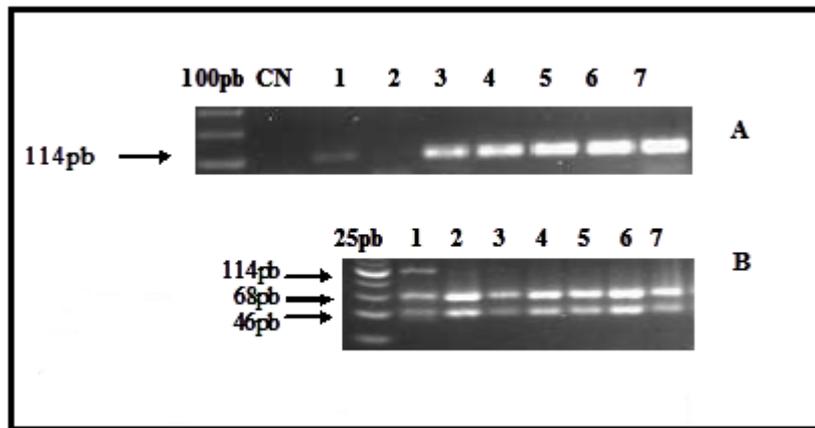


Figura 4.9. Detecção das mutações pontuais no domínio tirosina quinase do gene *FLT3*. A, Corrida em gel de agarose do produto da PCR após amplificação do éxon 17. B, Corrida em gel de agarose após digestão com a enzima *EcoRV*. Nos casos selvagens a enzima encontra seu sítio de restrição e gera dois fragmentos, de 68pb e de 46pb. Nos casos mutados, a enzima não atua em um dos alelos, permanecendo visível a banda de 114pb. (1) Caso apresentando mutação no gene *FLT3*; (2-7) Casos selvagens na região analisada.

O *FLT3*-DIT foi avaliado pela amplificação dos éxons 11 e 12, onde se localiza o domínio justamembrana, usando iniciadores previamente descritos e representados na Tabela 4.3 (NAKAO et al., 1996). Para a reação de PCR, foram utilizados 100ng de DNA. A solução adicionada ao DNA foi preparada contendo uma solução final de 50µl com os iniciadores a 50 pmol, dNTPs a 0,2mM, solução tampão 1x (Invitrogen, CA, USA), MgCl₂ a 2,5mM (Invitrogen, CA, USA), 1U de Taq-polimerase (Taq DNA Polymerase; Invitrogen, CA, USA). As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Veriti® Thermal Cycler (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA), de acordo com as seguintes condições de ciclagem: 94°C por 3 min para a desnaturação inicial, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 56°C por 1 min e 72°C por 2 min, e uma extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo, conforme ilustrado na Fig. 4.10.

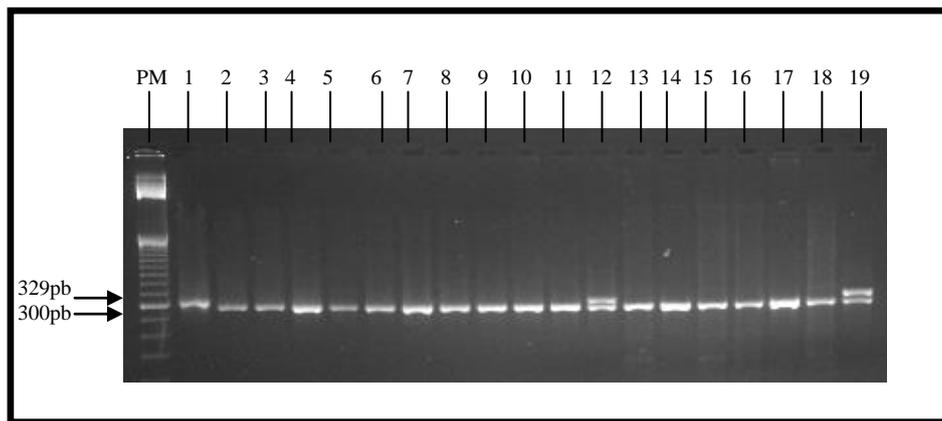


Figura 4.10. Detecção das duplicações *in tandem* no domínio justamembrana do gene *FLT3*. (PM) padrão de peso molecular de 50pb; (1, 12, 19) Amostras que apresentam *FLT3*-DIT; (2-11, 13-18) Amostras selvagens.

4.9. Análise estatística

Por se tratar de um estudo descritivo, as distribuições das variáveis foram categorizadas inicialmente em variáveis contínuas (frequência de casos por ano, idade) e categóricas (faixa etária, leucometria, presença de mutações, subtipo da LMA). Foram realizados testes de frequência, buscando a significância estatística entre os diferentes grupos estudados e correlacionando os achados moleculares com os dados clínico-epidemiológicos dos pacientes, através do teste de qui-quadrado (*student*) e do teste exato de Fisher. A associação entre as alterações rastreadas e as variáveis selecionadas foi considerada significativa quando $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada através do programa SPSS 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA, 2004).

5. RESULTADOS

5.0. Análise descritiva dos casos

Foram incluídos neste estudo 282 casos de LMA no período 2008-2013, sendo que 73 (25,8%) casos com diagnóstico confirmado não foram submetidos às análises moleculares em virtude da quantidade de material biológico limitada para todas as análises, conforme ilustrado na Fig.5.1.

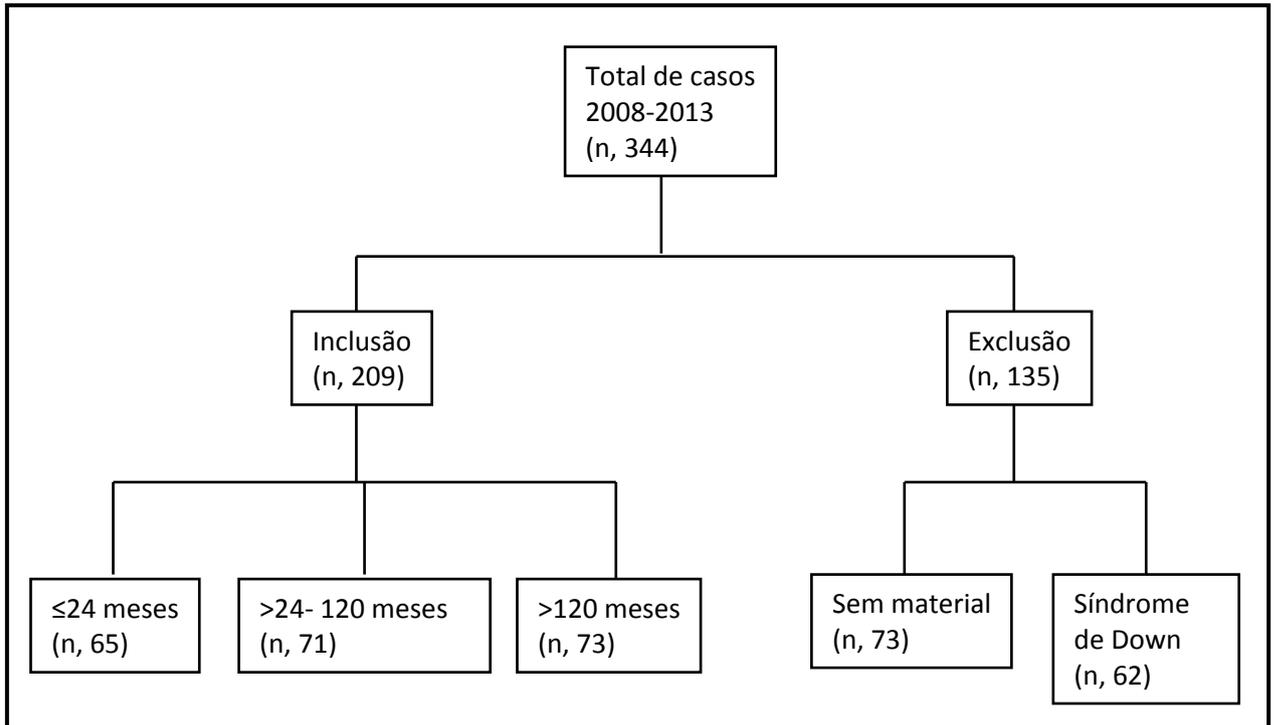


Figura 5.1. Total de casos de LMA que foram encaminhados para o laboratório do Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricos, INCA, no período de 2008-2013. Foram excluídos os casos de LMA com Síndrome de Down e aqueles sem material biológico suficiente para todas as análises moleculares. LMA, leucemia mielóide aguda.

No ano de 2008, 53 pacientes foram diagnosticados como LMA e incluídos no estudo, 48 casos em 2009, 50 casos em 2010, 43 casos em 2011, 42 casos em 2012 e, por fim, 46 casos em 2013, conforme ilustrado na Fig. 5.2. A média foi de 47,1 casos por ano (desvio padrão 4,2) e a mediana de 47,5 casos por ano.

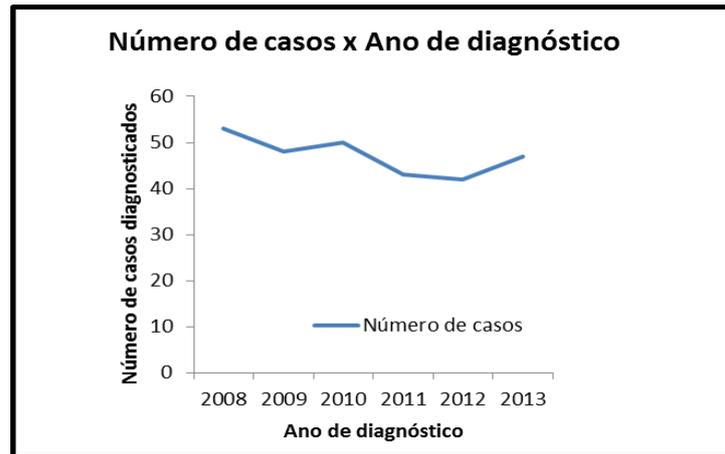


Figura 5.2. Número de casos de LMA encaminhados para o laboratório do Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricos no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2013.

As características demográficas, imunofenotípicas e laboratoriais dos casos de analisados estão representadas na Tabela 5.1. A idade dos casos incluídos foi separada em faixas, uma vez que as características das LMAs variam de acordo com a faixa etária, sendo que 81 (28,7%) casos apresentavam idade menor ou igual a 24 meses (2 anos) ao diagnóstico, 106 (37,6%) casos apresentavam idade entre 24 e 120 meses (2 e 10 anos, respectivamente) e 95 (33,7%) casos pediátricos foram diagnosticados com idade maior que 120 meses (10 anos). As idades variaram de 29 dias a 18,6 anos, com mediana de 73 meses (6 anos), não apresentando distribuição normal, conforme representado na Fig. 5.3. Apenas 2 casos (0,7%) foram diagnosticados com a idade de 180 meses (15 anos). Houve uma discreta predominância de casos do sexo masculino (51,4%) e de casos em crianças com cor da pele considerada não branca (60,5%), que incluíam crianças cujos responsáveis declararam a cor da pele como sendo negra, parda ou de etnia indígena (26, 140 e 1 caso, respectivamente). Em 1 caso (0,4%) a cor da pele não foi especificada.

Tabela 5.1. Características demográficas, imunofenotípicas e laboratoriais dos casos de LMAs analisados

| Características das LMAs | n/n total(%) |
|--------------------------------|----------------|
| Idade (anos) | |
| ≤24 | 81/282 (28,7) |
| >24-120 | 106/282 (37,6) |
| >120 | 95/282 (33,7) |
| Gênero | |
| Masculino | 145/282 (51,4) |
| Feminino | 137/282 (48,6) |
| Cor da pele | |
| Branca | 114/281 (40,6) |
| Não Branca | 167/281 (59,4) |
| Região | |
| Norte | 0/282 (0,0) |
| Nordeste | 133/282 (47,2) |
| Centro Oeste | 71/282 (25,2) |
| Sudeste | 68/282 (24,1) |
| Sul | 10 (3,5) |
| Leucometria($\times 10^9/l$) | |
| ≤50 | 180/279 (64,5) |
| >50 | 99/279 (35,5) |
| Subtipo imunofenotípico * | |
| LMA M0 | 11/282 (3,9) |
| LMA M1 | 8/282 (2,8) |
| LMA M2 | 19/282 (6,7) |
| LMA M3 | 47/282 (16,7) |
| LMA M4 | 66/282 (23,4) |
| LMA M5 | 24/282 (8,5) |
| LMA M6 | 2/282 (0,7) |
| LMA M7 | 21/282 (7,4) |
| LMA sem especificação | 84/282 (29,8) |
| Alterações tipo II | |
| Presente | 84/209 (40,2) |
| Ausente | 125/209 (44,3) |
| Alterações tipo I | |
| Presente | 34/130 (26,2) |
| Ausente | 96/130 (73,8) |

*De acordo com a classificação do grupo FAB (Franco-américo-britânico). LMA, leucemia mielóide aguda.

O PHOP fornece uma cobertura diagnóstica a crianças com câncer em âmbito nacional, através da Rede de Apoio de Atenção ao Câncer Infante-Juvenil. Tem um recorte cooperativo para prover a caracterização da LMA antes do tratamento, contando, por isso,

com amostras provenientes de centros das diferentes regiões do Brasil. A maioria dos casos foi da região Nordeste (47,2%), seguida das regiões Centro Oeste (25,2%), Sudeste (24,1%) e Sul (3,5%) do Brasil.

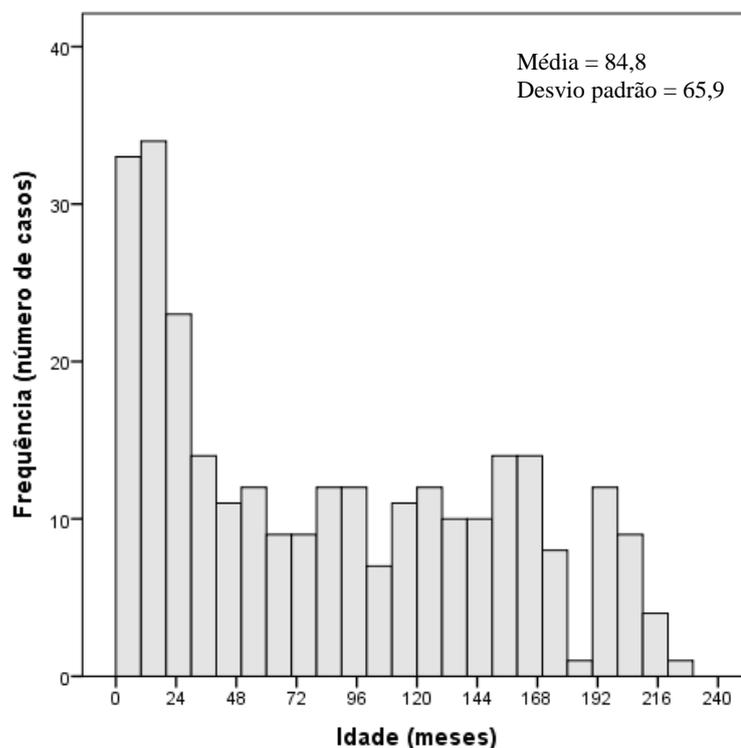


Figura 5.3. Histograma de distribuição dos casos de LMA incluídos no estudo de acordo com a idade.

A maioria dos casos apresentou contagem leucocitária $\leq 50 \times 10^9/L$ (64,5%), variando de $1,0$ a $540 \times 10^9/L$; a contagem absoluta de blastos variou de acordo com a mediana de 68, média 63 e desvio padrão 24,6. A análise morfológica e imunofenotípica, por citometria de fluxo, foram realizadas em todos os casos e permitiram a classificação de acordo com os critérios FAB e EGIL. O subtipo de linhagem mielomonocítica (M4) foi o mais frequente (23,4%), seguido de APL (16,7%). Em 29,8% dos casos não foi possível definir o subtipo de acordo com a análise morfológica e com os marcadores imunofenotípicos, conforme representado na Tabela 5.1.

5.1. Características genéticas dos casos

As alterações genéticas tipo II mais frequentes em LMA rastreadas pelas técnicas de RT-PCR e FISH foram encontradas em 40,2% dos casos e, mutações tipo I em 26,2% dos casos (Tabela 5.2). A Tabela 5.2 demonstra a frequência das alterações genéticas nos casos analisados. As alterações que caracterizam a LMA-CBF corresponderam a 16,6% dos casos e, o *MLL-r* a 16,9% dos casos. Os parceiros de fusão mais frequentes do *MLL* foram *MLLT3* (25,0%), *AFF1* (15,0%) e *MLLT10* (10,0%), respectivamente. Outros parceiros identificados foram os genes *NEBL*, *ELL*, *SEPT6*, *ABL1*, *ENL* e *ELL*. A fusão *PML-RAR α* foi observada em 10,5% do total de casos, correspondendo a 44,4% dos casos analisados para esta alteração, rastreados segundo as características morfológicas de APL ou nos casos cujo estágio de diferenciação mielóide não pôde ser estabelecido. A fusão gênica *NUP98-HOXD13* foi encontrada em 2 casos com diferenciação mielomonocítica. As mutações no gene *FLT3* foram encontradas em 15,1% dos casos, predominando a DIT (87,0%).

Tabela 5.2. Rearranjos gênicos e mutações detectados nos casos de LMA pediátrica analisados

| Alterações genético-moleculares | n/n total(%) |
|---|----------------|
| Mutações tipo II | |
| <i>RUNX1-RUNX1T1</i> | 28/228 (12,3) |
| <i>CBFβ-MYH11</i> | 8/217 (3,7) |
| <i>MLL-r</i> | 20/118 (16,9) |
| <i>MLL-MLLT3 (AF9)</i> | 5/20 (25,0) |
| <i>MLL-MLLT10 (AF10)</i> | 2/20 (10,0) |
| <i>MLL-AFF1 (AF4)</i> | 3/20 (15,0) |
| <i>PML-RARα</i> | 24/54 (44,4) |
| Outras [†] /Desconhecidas [¥] | 202/282 (71,6) |
| Mutações tipo I | |
| <i>FLT3</i> | 23/152 (15,1) |
| <i>FLT3-DIT</i> | 20/23 (87,0) |
| <i>FLT3-DTK</i> | 3/23 (13,0) |
| <i>cKIT</i> | 2/98 (2,0) |
| <i>KRAS</i> | 8/119 (6,7) |
| Outras ^δ /Desconhecidas [¥] | 251/282 (89,0) |

[†] Inclui a fusão gênica menos frequentes em LMA pediátrica *NUP98-HOXD13*. [¥] Incluem possíveis alterações não rastreadas neste estudo. ^δ Inclui uma mutação no gene *PTPN11*.

Alterações no gene *c-KIT* foram observadas em 2,0% dos casos analisados, ambas no éxon 17, aminoácido 816, correspondendo à troca do nucleotídeo adenina por timina, e levando à substituição do aminoácido ácido aspártico por valina (D816V). Foram encontradas ainda duas mutações silenciosas em *c-KIT*, no éxon 17, aminoácido 798, com a troca de uma citosina por uma timina (ATC>ATT), não levando à substituição do aminoácido isoleucina codificado. Mutações no *KRAS* foram identificadas em 6,7% dos casos. Do total, 17 casos foram analisados para o éxon 3 do gene *PTPN11*, que participa da via de sinalização de RAS, e um caso encontrou-se mutado no códon 182, com a troca de uma adenina por uma citosina, levando à substituição do aminoácido ácido aspártico por alanina na posição 61 (D61A).

5.2. Características dos casos de acordo com a idade

Foram comparadas as crianças diagnosticadas com idade menor ou igual a 24 meses, entre 24 e 120 meses e maior que 120 meses, conforme representado na Tabela 5.3. Nas crianças com idade menor ou igual a 24 meses e entre 24 e 120 meses, o sexo masculino mostrou discretamente predominante (51,9% e 59,4%, respectivamente) e, nas crianças com idade maior que 120 meses, o sexo feminino foi mais acometido pela doença (57,9%). Em todas as faixas etárias estabelecidas predominaram casos com leucometria $\leq 50 \times 10^9/L$, sem diferenças estatisticamente significantes ($p=0,15$). Entretanto, observou-se diferença nos subtipos FAB entre os casos, sendo que nas crianças com idade ≤ 24 meses, predominaram os subtipos mielomonocíticos (M4=42,0% e M5= 17,3%) e megacarioblástico (M7=16,0%). Em 9,9% destes casos não foi possível estabelecer o subtipo morfológico. Para as crianças com idade >24-120 meses, predominaram os subtipos promielocítico (M3=18,9%) e mielomonocítico (M4=14,2%), sendo que em 38,7% dos casos não foi possível estabelecer o subtipo morfológico ($p<0,0001$, Tabela 5.3). Da mesma maneira, para as crianças com idade >120 meses, predominaram os subtipos promielocítico (M3=26,3%) e mielomonocítico (M4=17,9%); em 36,8% dos casos não foi possível estabelecer o subtipo morfológico ($p<0,0001$, Tabela 5.4). Entre os casos ≤ 24 meses-idade, a alteração genética mais frequente foi o *MLL-r* (29,2%) e nos casos >24-120 meses-idade, predominaram as fusões *RUNX1-RUNXIT1* (18,3%) e *PML-RAR α* (15,5%, $p<0,0001$). Novamente, entre os casos >120 meses-idade, predominaram as fusões *PML-RAR α* (16,4%) e *RUNX1-RUNXIT1* (15,1%, $p<0,0001$).

Tabela 5.3. Características biológicas e demográficas dos casos de LMA de acordo com a faixa etária (meses)

| | | Idade (meses) | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------|---------------|------------|----------|
| | | ≤24, n(%) | >24-120, n(%) | >120, n(%) | <i>p</i> |
| Gênero | | | | | |
| | Masculino | 42 (51,9) | 63 (59,4) | 40 (42,1) | 0,05 |
| | Feminino | 39 (48,1) | 43 (40,6) | 55 (57,9) | |
| Leucometria (x10 ⁹ /L) | | | | | |
| | ≤50 | 51 (63,7) | 74 (71,2) | 55 (57,9) | 0,15 |
| | >50 | 29 (36,2) | 30 (28,8) | 40 (42,1) | |
| Subtipo imunofenotípico* | | | | | |
| | LMA M0 | 3 (3,7) | 5 (4,7) | 3 (3,2) | <0,0001 |
| | LMA M1 | 3 (3,7) | 3 (2,8) | 2 (2,1) | |
| | LMA M2 | 3 (3,7) | 8 (7,5) | 8 (8,4) | |
| | LMA M3 | 2 (2,5) | 20 (18,9) | 25 (26,3) | |
| | LMA M4 | 34 (42,0) | 15 (14,2) | 17 (17,9) | |
| | LMA M5 | 14 (17,3) | 7 (6,6) | 3 (3,2) | |
| | LMA M6 | 1 (1,2) | 1 (0,9) | 0 (0,0) | |
| | LMA M7 | 13 (16,0) | 6 (5,7) | 2 (2,1) | |
| | LMA sem especificação | 8 (9,9) | 41 (38,7) | 35 (36,8) | |
| Mutações tipo II | | | | | |
| | <i>RUNX1-RUNX1T1</i> | 4 (6,2) | 13 (18,3) | 11 (15,1) | <0,0001 |
| | <i>CBFβ-MYH11</i> | 0 (0,0) | 2 (2,8) | 6 (8,2) | |
| | <i>MLL-r</i> | 19 (29,2) | 1 (1,4) | 0 (0,0) | |
| | <i>PML-RARα</i> | 1 (1,5) | 11 (15,5) | 12 (16,4) | |
| | Outras/Desconhecidas [‡] | 41 (63,1) | 44 (62,0) | 44 (60,3) | |
| Mutações tipo I | | | | | |
| | <i>FLT3</i> | 1 (1,8) | 13 (26,0) | 9 (39,1) | <0,0001 |
| | <i>cKIT</i> | 0 (0,0) | 2 (4,0) | 0 (0,0) | |
| | <i>KRAS</i> | 2 (3,5) | 4 (8,0) | 0 (0,0) | |
| | Outras/Desconhecidas [‡] | 54 (94,7) | 31 (62,0) | 14 (60,9) | |

*De acordo com a classificação do grupo FAB (Franco-américo-britânico). LMA, leucemia mielóide aguda. [‡] Incluem possíveis alterações genético-moleculares não rastreadas neste estudo.

Em relação às alterações tipo I, mutações em *FLT3* foram mais frequentes nas crianças >120 meses-idade e as mutações em *KRAS* nas crianças >24-120 meses-idade ($p < 0,0001$). Mutações em *c-KIT* foram identificadas apenas nas crianças >24-120 meses-idade (Tabela 5.3). Mutações em *FLT3* foram mais frequentes nas crianças >120 meses-idade ($p < 0,0001$; Tabela 5.3). A Fig. 5.4 representa a distribuição das alterações tipo I e tipo II observadas de acordo com a idade de cada caso. Cada coluna representa uma amostra de um único paciente e cada linha representa uma alteração genética do tipo I ou tipo II, conforme representado. A

Tabela 5.4. Características demográficas e laboratoriais dos casos de LMA de acordo com a presença das alterações tipo I e tipo II rastreadas

| | Alterações tipo II | | | Alterações tipo I | | |
|--------------------------------------|--------------------|------------------|----------|-------------------|------------------|----------|
| | Presente, n(%) | Ausente, n(%) | <i>p</i> | Presente, n(%) | Ausente, n(%) | <i>p</i> |
| Gênero | | | | | | |
| Masculino | 40 (47,6) | 64 (51,2) | 0,61 | 18 (52,9) | 49 (51,0) | 0,85 |
| Feminino | 44 (52,4) | 61 (48,8) | | 16 (47,1) | 47 (49,0) | |
| Leucometria (x10 ⁹ /L) | | | | | | |
| ≤50 | 64 (65,1) | 76 (61,8) | 0,63 | 17 (50,0) | 61 (64,9) | 0,13 |
| >50 | 29 (34,9) | 47 (38,2) | | 17 (50,0) | 33 (35,1) | |
| Subtipo imunofenotípico* | | | | | | |
| LMA M0 | 0 (0,0) | 8 (6,4) | 0,002 | 0 (0,0) | 6 (6,2) | 0,27 |
| LMA M1 | 0 (0,0) | 3 (2,4) | | 1 (2,9) | 4 (4,2) | |
| LMA M2 | 11 (13,1) | 8 (6,4) | | 4 (11,8) | 6 (6,2) | |
| LMA M3 | 24 (28,6) | 17 (13,6) | | 6 (17,6) | 12 (12,5) | |
| LMA M4 | 25 (29,8) | 28 (22,4) | | 9 (26,5) | 26 (27,1) | |
| LMA M5 | 6 (7,1) | 9 (7,2) | | 3 (8,8) | 15 (15,6) | |
| LMA M6 | 0 (0,0) | 1 (0,8) | | 1 (2,9) | 0 (0,0) | |
| LMA M7 | 2 (2,4) | 11 (8,8) | | 1 (2,9) | 10 (10,4) | |
| LMA sem especificação | 16 (19,0) | 40 (32,0) | | 9 (26,5) | 17 (17,7) | |

*De acordo com a classificação do grupo FAB (Franco-américo-britânico). LMA, leucemia mielóide aguda.

As características demográficas e laboratoriais dos casos de LMA em relação às alterações tipo II e tipo I estão representadas na Tabela 5.5. A maioria dos casos com as fusões gênicas *CBFβ-MYH11* e *PML-RARα* foi do sexo feminino (75,0% e 58,3%, respectivamente) e, para os casos com *MLL-r*, a discreta maioria dos casos foi do sexo masculino (55,0%). A maioria dos casos com a fusão *CBFβ-MYH11* apresentou leucometria >50 x10⁹/L (87,5%), característica contrária ao observado para as demais fusões gênicas, que foram associadas à contagem de leucócitos ≤50 x10⁹/L (p=0,001). A fusão *RUNX1-RUNX1T1* foi observada nos subtipos FAB M2 (39,3%) e M4 (21,4%); a fusão *CBFβ-MYH11* foi exclusiva dos casos FAB M4 (75,0%); os *MLL-r* se distribuíram entre os subtipos FAB M4 (50,0%), M5 (30,0%) e M7 (5,0%); a fusão *PML-RARα* foi exclusiva dos casos FAB M3 cujo rastreamento foi condicionado pelas características morfológicas e para confirmação do diagnóstico de APL. Em 19,0% dos casos sem especificação do subtipo morfológico e imunofenotípico, a classificação genética permitiu a estratificação de risco do paciente de

acordo com os critérios propostos pela OMS em LMA com alterações genéticas recorrentes. A fusão *RUNX1-RUNX1T1* possibilitou a reclassificação de 39,3% dos casos de LMA sem especificação; 25,0% dos casos com a fusão *CBF β -MYH11* foram reclassificados; e 12,2% dos casos com *MLL-r* puderam ser reclassificados. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as alterações tipo I e as variáveis gênero, leucometria e subtipo de LMA. Os subtipos FAB M0 e M6 não apresentaram mutação nos genes *FLT3* ou *KRAS* (Tabela 5.5).

Tabela 5.5. Características biológicas e demográficas dos casos de leucemia mielóide aguda de acordo com as principais alterações tipo I e tipo II rastreadas

| | | Alterações tipo II | | | | Alterações tipo I | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|----------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------|----------|
| | | <i>RUNX1- RUNX1T1</i> , n(%) | <i>CBFβ- MYH11</i> , n(%) | <i>MLL-r</i> , n(%) | <i>PML-RARα</i> , n(%) | <i>p</i> | <i>FLT3- DTK</i> , n(%) | <i>FLT3-DIT</i> , n(%) | <i>KRAS</i> , n(%) | <i>p</i> |
| Gênero | | | | | | | | | | |
| | Masculino | 14 (50,0) | 2 (25,0) | 11 (55,0) | 10 (41,7) | 0,49 | 1 (33,3) | 11 (55,0) | 3 (50,0) | 0,78 |
| | Feminino | 14 (50,0) | 6 (75,0) | 9 (45,0) | 14 (58,3) | | 2 (66,7) | 9 (45,0) | 3 (50,0) | |
| Leucometria (x10 ⁹ /L) | | | | | | | | | | |
| | ≤50 | 22 (78,6) | 1 (12,5) | 10 (52,6) | 19 (79,2) | 0,001 | 3 (100,0) | 10 (50,0) | 3 (50,0) | 0,26 |
| | >50 | 6 (21,4) | 8 (87,5) | 9 (47,4) | 5 (20,8) | | 0 (0,0) | 10 (50,0) | 3 (50,0) | |
| Subtipo imunofenotípico | | | | | | | | | | |
| | LMA M0 | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | |
| | LMA M1 | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 1 (16,7) | |
| | LMA M2 | 11 (39,3) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | | 1 (33,3) | 2 (10,0) | 1 (16,7) | |
| | LMA M3 | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 24 (100,0) | | 0 (0,0) | 6 (30,0) | 0 (0,0) | |
| | LMA M4 | 6 (21,4) | 6 (75,0) | 10 (50,0) | 0 (0,0) | <0,0001 | 0 (0,0) | 5 (25,0) | 2 (33,3) | 0,39 |
| | LMA M5 | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 6 (30,0) | 0 (0,0) | | 1 (33,3) | 1 (5,0) | 0 (0,0) | |
| | LMA M6 | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | |
| | LMA M7 | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 1 (5,0) | 0 (0,0) | | 0 (0,0) | 1 (5,0) | 0 (0,0) | |
| | LMA sem especificação | 11 (39,3) | 2 (25,0) | 3 (15,0) | 0 (0,0) | | 1 (33,3) | 5 (25,0) | 2 (33,3) | |

*De acordo com a classificação do grupo FAB (Franco-américo-britânico). LMA, leucemia mielóide aguda.

Em 28,6% dos casos, as alterações tipo II e tipo I estiveram concomitantemente presentes. Entretanto, as alterações tipo II foram exclusivas de 71,4% e as alterações tipo I exclusivas de 18,4% dos casos (Tabela 5.6).

Tabela 5.6. Associação entre a presença das alterações tipo I e tipo II analisadas

| | | Alterações tipo II | | |
|-------------------|--|--------------------|---------------|----------|
| | | Presente, n(%) | Ausente, n(%) | <i>p</i> |
| Alterações tipo I | | | | |
| Presente | | 12 (28,6) | 10 (18,2) | 0,23 |
| Ausente | | 30 (71,4) | 45 (81,8) | |

De acordo com a Tabela 5.7, os subtipos de LMA com a fusão *RUNX1-RUNX1T1* e com a fusão *PML-RAR α* apresentaram principalmente a alteração em DIT em *FLT3* (22,2% e 37,5%, respectivamente). Casos com o transcrito *CBF β -MYH11* apresentaram apenas mutação em *KRAS* (25,0%) e *FLT3-DIT* (25,0%).

Tabela 5.7. Associação entre as alterações tipo I e tipo II analisadas

| | Alterações tipo II | | | | | <i>p</i> |
|-----------------------------------|-----------------------------|---|---------------------|--|----------------------|----------|
| | <i>RUNX1-RUNX1T1</i> , n(%) | <i>CBFβ-MYH11</i> , n(%) | <i>MLL-r</i> , n(%) | <i>PML-RARα</i> , n(%) | Outras/Desconhecidas | |
| Alterações tipo I | | | | | | |
| <i>FLT3-DTK</i> , n(%) | 1 (11,1) | 0 (0,0) | 1 (5,6) | 0 (0,0) | 1 (1,8) | 0,09 |
| <i>FLT3-DIT</i> , n(%) | 2 (22,2) | 1 (25,0) | 0 (0,0) | 3 (37,5) | 4 (7,1) | |
| <i>KRAS</i> , n(%) | 1 (11,1) | 1 (25,0) | 1 (5,6) | 0 (0,0) | 2 (3,6) | |
| Outras/Desconhecidas [¥] | 5 (55,6) | 2 (50,0) | 16 (88,9) | 5 (62,5) | 49 (87,5) | |

[¥] Incluem possíveis alterações não rastreadas neste estudo.

Casos com *MLL-r* apresentaram mutações em *KRAS* (5,6%) e *FLT3-DTK* (5,6%), sendo que a maioria destes não apresentou mutação nos genes analisados (88,9%), conforme ilustrado na Fig. 5.5. Cada coluna representa uma amostra de um único paciente e cada linha representa uma alteração genética do tipo II, conforme representado. Entre os casos que apresentaram

Tabela 5.8. Características dos casos selecionados para avaliação da presença da fusão envolvendo *MYST3* e *CREBBP*.

| ID | Gênero | Idade (meses) | Leucometria (x10 ⁹ /L) | Diagnóstico (FAB) | FISH (%) | RT-PCR | Citogenética convencional* |
|--------|--------|---------------|-----------------------------------|-------------------|----------|--------|---|
| 663/08 | F | 36 | 180,0 | M5 | 3 | NR | NR |
| 127/12 | F | 15 | 63,5 | NE | 3 | NR | NR |
| 499/10 | F | 20 | 29,4 | M0 | 4 | NR | NR |
| 004/12 | M | 10 | 35,0 | M2 | 6 | NEG | NR |
| 107/06 | M | 22 | 25,9 | M7 | 6 | NR | 46, XY, 16H+ |
| 098/12 | F | 12 | 71,1 | M4 | 6 | NR | NR |
| 236/06 | M | 13 | 61,6 | M5 | 8 | NR | 45, XY, t(8;8)(q21;1p25) |
| 430/10 | M | 11 | 25,4 | M5 | 9 | NR | NR |
| 439/11 | M | 16 | 4,5 | M5 | 9 | NEG | NR |
| 524/10 | M | 12 | 36,8 | M7 | 10 | NR | NR |
| 006/11 | F | 23 | 42,4 | M7 | 15 | NEG | NR |
| 495/10 | F | 1 | 8,6 | M4 | 18 | NEG | NR |
| 579/10 | M | 18 | 5,7 | M7 | 34 | NEG | NR |
| 167/12 | F | 11 | 2,0 | M7 | 9 | INES | NR |
| 243/03 | F | 12 | 111,0 | M4 | 37 | INES | 46, XX, der(16), t(16;?)(p13;?)[35]/46, XX[2] |

*Os resultados de citogenética convencional obtidos foram fornecidos pelo serviço de origem da amostra. ID, identificação; FAB, grupo Franco-Américo-Britânico para diagnóstico morfológico das LMAs; FISH, hibridização *in situ* por fluorescência; RT-PCR, reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa; F, feminino, M, masculino, NR, não realizado; NE, não especificado; NEG, negativo; INES, inespecífico.

A Fig. 5.6 representa uma eritrofagocitose ao diagnóstico. Com o resultado negativo para as alterações tipo II recorrentes, seguiu-se com a análise por FISH para avaliação da presença da translocação envolvendo *MYST3* e *CREBBP*. Seis casos (663/08, 127/12, 186/10, 107/06, 499/10 e 098/12) apresentaram valores de FISH abaixo do ponto de corte pré-estabelecido, sendo, portanto, casos verdadeiramente negativos.

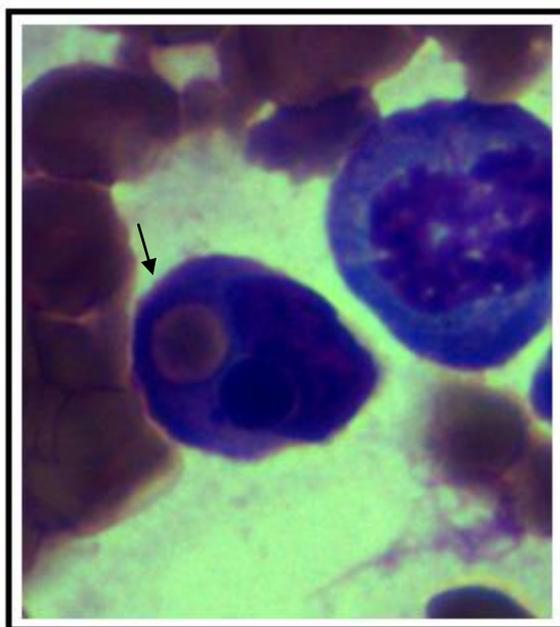


Figura 5.6. Eritrofagocitose (blastos fagocitando eritrócitos) característica. Caso 495/10.

Conforme exemplificado na Fig. 5.7, o padrão de sinais observado para os casos negativos foi de dois sinais vermelhos e dois sinais verdes distintos em núcleos metafásicos (Fig. 5.7A) e interfásicos (Fig. 5.7B). De acordo com a localização das sondas no gene e com os pontos de quebra descritos, o padrão de sinais esperado para a fusão seria de dois sinais colocalizados (um sinal verde ao lado de um sinal vermelho ou um único sinal amarelo, resultado da localização próxima dos sinais de cores distintas), um sinal vermelho intenso e um sinal vermelho fraco, um sinal verde intenso e um sinal verde fraco.

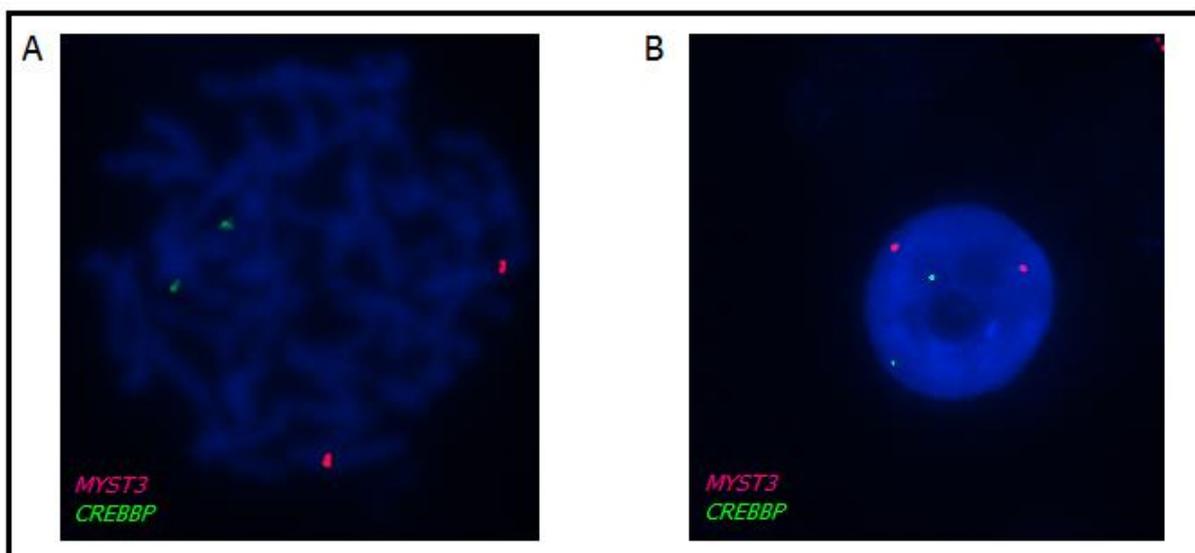


Figura 5.7. Exemplo do padrão de sinais observados na FISH para a fusão *MYST3-CREBBP* em núcleos metafásicos (A), no caso 107/06, e interfásicos (B), no caso 004/12.

Em um caso (127/12), os sinais co-localizados indicativos da fusão *MYST3-CREBBP* foram observados em apenas 3% das células analisadas, sendo, portanto, negativos para a fusão. Apesar disto, o padrão normal de dois sinais verdes e dois vermelhos também foi minoria (20%) entre o total de células avaliadas. A maioria das células (77%) apresentou o padrão de três sinais vermelhos e dois sinais verdes (Fig. 5.8), indicando a presença de 3 genes *MYST3*.

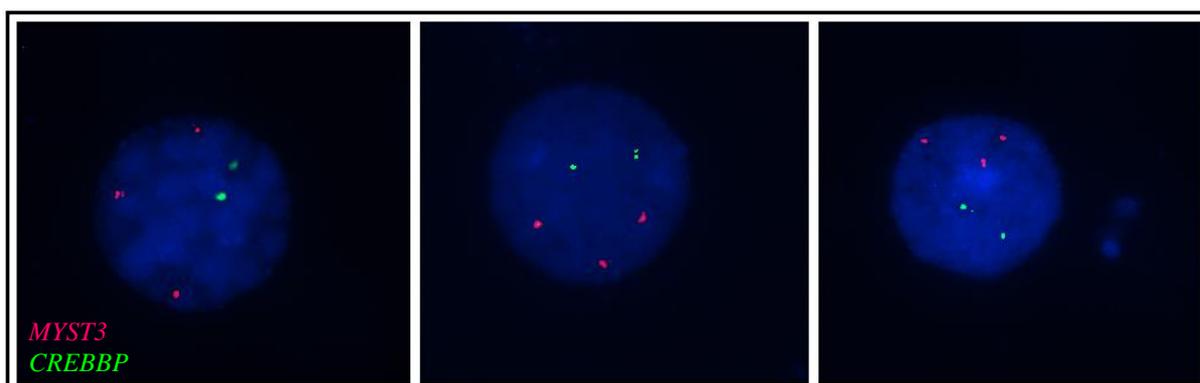


Figura 5.8. Padrão de sinais observado na maioria das células analisadas para o caso 127/12, com três sinais vermelhos e dois sinais verdes distintos.

Seis casos (236/06, 430/10, 439/11, 524/10, 006/11 e 167/12) apresentaram um sinal verde e um vermelho co-localizados, gerando valores de FISH de 8-15%, acima do ponto de corte estabelecido. Entretanto, os outros quatro sinais esperados não foram observados, sendo observados apenas um sinal verde e um sinal vermelho restantes (Fig. 5.9), significando que, provavelmente, estes casos são falso-positivos.

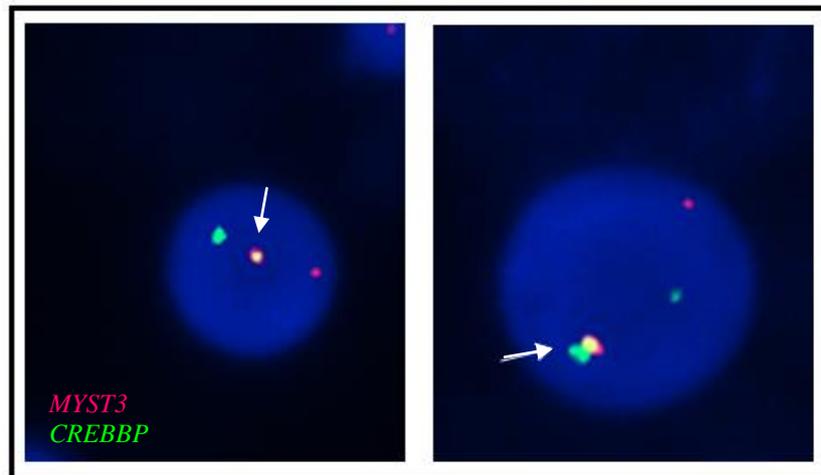


Figura 5.9. Padrão de um sinal verde e um sinal vermelho co-localizados (sinal amarelo), um sinal verde e um sinal vermelho restantes.

Para os casos 006/11, 439/11 e 167/12 foi possível realizar a RT-PCR para confirmação da presença da fusão gênica. Conforme observado na Fig. 5.10, os casos 006/11 e 439/11 foram negativos para o transcrito tipo I da fusão *MYST3-CREBBP*.

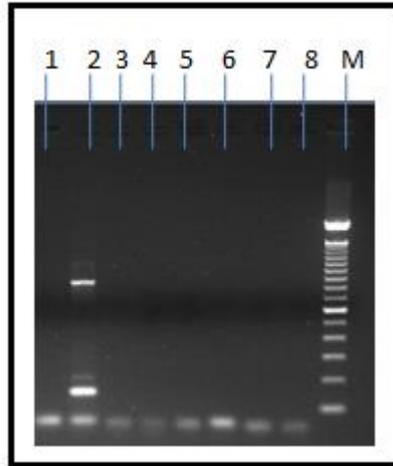


Figura 5.10. Gel de agarose 1,5% para detecção do transcrito tipo I da fusão *MYST3-CREBBP*. (1) Controle negativo da reação; (2) Controle positivo da reação; (3) Caso 006/11; (4) Caso 439/11; (5-8) Casos negativos para a fusão por FISH; (M) Marcador de peso molecular de 100pb.

A técnica de RT-PCR realizada para o caso 167/12 revelou a presença de um amplicon de aproximadamente 900 pb, com tamanho diferente do esperado para o transcrito da fusão *MYST3-CREBBP* tipo I, de aproximadamente 1100 pb, conforme observado para o controle positivo (Fig. 5.11).

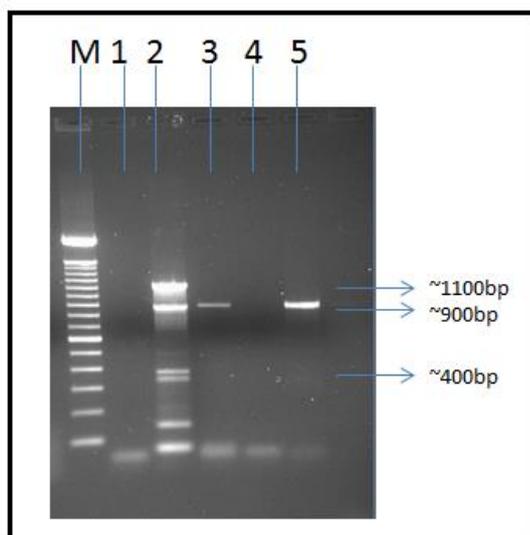


Figura 5.11. Gel de agarose 1,5% para detecção do transcrito tipo I da fusão *MYST3-CREBBP*. (M) Marcador de peso molecular de 100pb; (1) Controle negativo da reação; (2) Controle positivo da reação; (3) Caso 167/12; (4) Casos negativos para a fusão por FISH; (5) Caso 243/03.

A técnica de sequenciamento direto permitiu a identificação da sequência amplificada e revelou que se tratava de uma amplificação inespecífica, envolvendo regiões complementares ao cromossomo 1. Parte da região sequenciada está representada na Fig. 5.12.

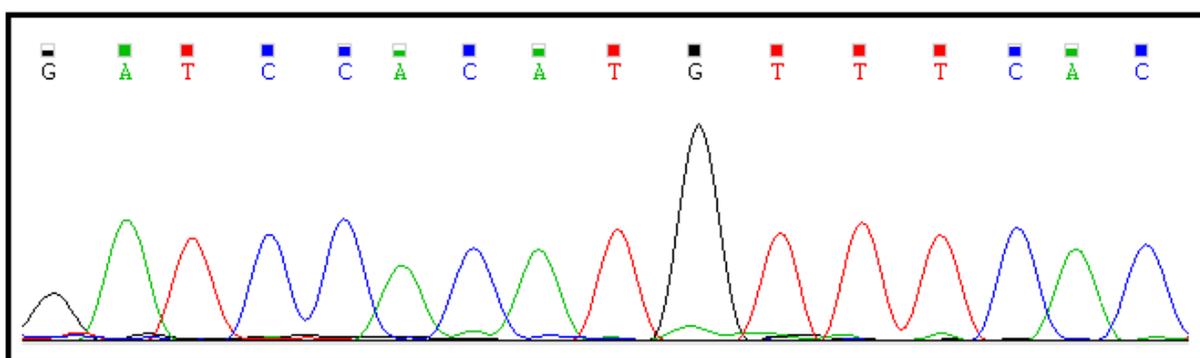


Figura 5.12. Parte da sequência do caso 167/12, referente à região amplificada de aproximadamente 900 pares de bases.

Três casos (495/10, 579/10 e 243/03) se destacaram por apresentarem valores para o padrão de sinais sugestivo da fusão entre 18-37%. Em determinadas células, o padrão de sinais observado era o de quatro sinais co-localizados, ou seja, os dois sinais verdes se encontravam justapostos aos dois sinais vermelhos distintos, conforme representado na Fig. 5.13.

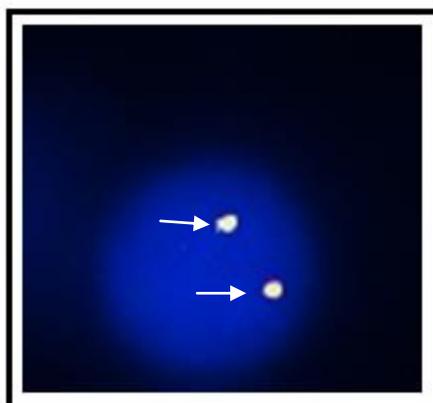


Figura 5.13. Padrão de sinais observado em algumas células nos casos 495/10, 579/10 e 243/03, representando dois sinais verdes distintos co-localizados a dois sinais vermelhos distintos, originando um único sinal amarelo.

O caso 495/10 era do sexo feminino e foi diagnosticado com LMA-M4 ao 1 mês de vida. Ao diagnóstico apresentava tumoração e proptose ocular direita, com infiltração do SNC. Os exames laboratoriais revelaram leucometria de $8,6 \times 10^9$ células/L; hemoglobina 10,7 g/dL; plaquetas $29 \times 10^3/\text{mm}^3$. Os marcadores imunofenotípicos foram CD33+13 (91%), CD14 (38%) e CD15 (60%). A análise de FISH mostrou que 18% das células apresentavam padrão de fusão para o rearranjo *MYST3-CREBBP*, sugerindo a presença da anormalidade. Entretanto, a técnica de RT-PCR não detectou a presença do transcrito tipo I. A paciente foi a óbito durante o primeiro mês de tratamento.

O caso 579/10 era do sexo masculino e apresentou diagnóstico de LMA-M7 aos 11 meses de vida. Clinicamente apresentava hematomas esparsos e palidez. Os exames laboratoriais revelaram leucometria $5,7 \times 10^9$ células/L; hemoglobina 7,0 g/dL; plaquetas $3 \times 10^3/\text{mm}^3$. Os marcadores imunofenotípicos foram CD33+13 (21%), CD61 (21%) e CD42 (48%). A análise de FISH mostrou que 34% das células apresentavam padrão de fusão para o rearranjo *MYST3-CREBBP*, sugerindo a presença da anormalidade. Entretanto, novamente a técnica de RT-PCR não detectou a presença do transcrito tipo I.

O caso 243/03 era do sexo feminino e apresentou diagnóstico de LMA-M4 aos 12 meses de vida. A leucometria ao diagnóstico foi de 111×10^9 células/L e a hemoglobina 5,8 g/dL. Os marcadores imunofenotípicos positivos foram CD33, CD13, CD14 e CD11b. A citogenética convencional (bandeamento G) foi caracterizada por 46, XX, der(16), t(16;?)(p13;?)[35]/46, XX[2]. A paciente foi a óbito 5 meses após iniciar o tratamento. A análise de FISH mostrou que 37% das células apresentavam padrão de fusão para o rearranjo *MYST3-CREBBP*, sugerindo a presença da anormalidade. A técnica de RT-PCR não detectou a presença do transcrito mais frequente. Entretanto, da mesma forma que o observado para o caso 167/12, o caso 243/03 apresentou uma região amplificada na reação de RT-PCR (Figura 5.5). Novamente, o amplicon foi isolado e revelou que se tratava de uma região com amplificação inespecífica, cuja sequência parece ser complementar ao cromossomo 1. Parte da sequência está ilustrada na Fig. 5.14.

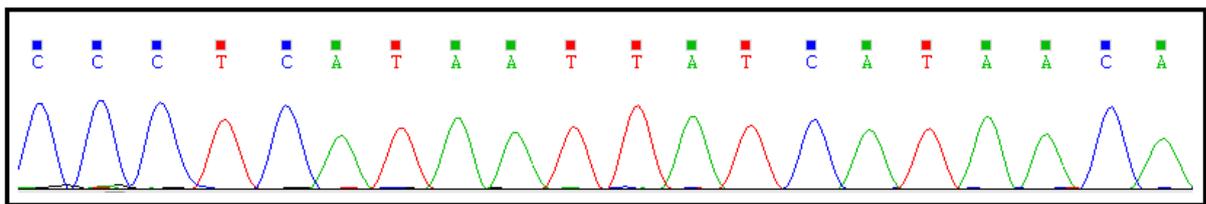


Figura 5.14. Parte da sequência do caso 243/03, referente à região amplificada de aproximadamente 900 pares de bases.

6. DISCUSSÃO

O câncer é a segunda causa de morte mais comum em crianças nos países desenvolvidos (KAATSCH, 2010). No Brasil, registros de base populacional revelam que são estimados mais de 9.000 novos casos de câncer por ano em crianças e adolescentes, correspondendo, de maneira similar aos países desenvolvidos, à segunda causa mais comum de mortalidade nos pacientes pediátricos (COORDENAÇÃO-GERAL DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA, INCA, 2014). A LA é a neoplasia mais comum da infância, representando 18-45% dos casos diagnosticados (LINABERY; ROSS, 2008; CAMARGO et al., 2010; KAATSCH, 2010; HORIBE et al.; 2013) e, entre esses casos, a LMA representa 18-24% dos diagnósticos (DOWNING; SHANNON, 2002; LINABERY; ROSS, 2008; REIS et al., 2011). No laboratório do PHOP, CPq, INCA, nos últimos 6 anos (janeiro de 2008 a dezembro de 2013), foram recebidos 282 casos de LMA pediátrica para diagnóstico e caracterização molecular, correspondendo à frequência de 23,8% do total de amostras recebidas no período.

Diferentes estudos demonstraram que existem diferenças nos padrões de incidência entre as diferentes regiões geográficas em populações europeias e norte americanas (STELIAROVA-FOUCHER et al., 2004; LI et al., 2008). Entretanto, nos países em desenvolvimento, os registros de câncer de base populacional cobrem apenas uma parcela da população, uma vez que são escassos e as análises são afetadas pela checagem inadequada dos dados e variações ao acaso prejudicadas por fatores econômicos. Sendo assim, as taxas reais de incidência de leucemia infantil ainda podem ser desconhecidas, apesar de os dados serem reportados no cenário regional (VALSECCHI; STELIAROVA-FOUCHER, 2008; REIS et al., 2011) e as diferenças entre as taxas de incidência de LMA variam de acordo com os registros (REIS et al., 2011). A maioria dos casos de LMA recebida no PHOP, CPq, INCA foi da região Nordeste (47,2%), seguida das regiões Centro Oeste (25,2%), Sudeste (24,1%) e Sul (3,5%) do Brasil. Estes números não refletem os dados de incidência das regiões brasileiras e correspondem ao maior número de centros cooperativos da Rede de Apoio de Atenção ao Câncer Infanto-Juvenil.

A LMA é uma doença rara e heterogênea em que a classificação atual visa criar subgrupos uniformes definidos por alvos moleculares em comum, possibilitando o direcionamento para tratamentos específicos (CREUTZIG et al., 2012). A análise molecular das LMAs pediátricas está restrita a determinadas instituições, localizadas principalmente nas regiões Sudeste e Sul do país. No Brasil, ocorreram notáveis avanços na identificação e diagnóstico das LAs pediátricas (POMBO-DE-OLIVEIRA et al., 2009). O presente estudo buscou investigar as alterações gênicas recorrentes de acordo com as recomendações da OMS e de grupos especialistas internacionais, com o intuito de incorporar esta caracterização

molecular no diagnóstico das LMAs no Brasil para posterior melhora na estratificação dos grupos de risco. Além disso, a ampla cobertura diagnóstica de crianças com LA em âmbito nacional permitiu ao PHOP a criação de um biorepositório com grande volume de amostras e interesse na investigação de alterações genéticas particulares. A revisão morfológica dos casos de LMA pediátrica e a identificação de achados intrigantes, sugeriram que a alteração genética t(8;16)(p11;p13)/*MYST3-CREBBP*, até então não rastreada na população brasileira pelas técnicas de RT-PCR e/ou FISH, poderia ser encontrada nos nossos casos seguindo os critérios propostos por HAFERLACH et al. (2009). Sendo assim, a identificação desta alteração genética rara também possibilitaria a caracterização de novos subgrupos genéticos em LMA pediátrica para melhor estratificação de risco destes pacientes.

Estudos envolvendo LMA pediátrica, em geral, apresentam diferenças quanto às faixas etárias estabelecidas para as análises. CREUTZIG et al. (2012b) avaliaram a resposta ao tratamento de 615 casos de LMA pediátrica com idade <10 anos e tratados pelos protocolos terapêuticos BFM-AML98, Interim-98 (combinado ao BFM-AML98) e BFM-AML2004. Os casos foram separados em grupos com idade <1 ano, 1-<2 anos e <10 anos. Todos os pacientes <1 ano-idade foram classificados como alto risco, exceto 4% dos casos que apresentavam características de risco padrão (com diagnóstico de LMA com os subtipos FAB M1/M2 e bastonetes de Auer observados morfolologicamente, subtipos FAB M3, M4 com eosinofilia, as alterações moleculares *PML-RAR α* , *RUNX1-RUNX1T1* ou *CBF β -MYH11* considerados bons respondedores). Os grupos de pacientes com idade <1 ano e entre 1-<2 anos apresentaram características similares de hiperleucocitose, subtipos FAB M4/M5 e M7, envolvimento do SNC e órgãos extramedulares, e *MLL-r*, que foram mais frequentes do que na faixa etária ≥ 2 -<10 anos-idade. O grupo relatou que, ao contrário do que acontece em LLA, a idade <6 meses não foi um fator de risco independente ou associado à SLE em LMA. PUI et al. (2000) também descreveram que crianças com LMA e idade ≤ 2 anos, em geral, apresentam características de LMA de risco intermediário e de alto risco e, BALGOBIND et al. (2011) observaram diferenças nas alterações genéticas entre crianças com LMA ≤ 2 anos-idade e >2 anos-idade. Sendo assim, é importante considerar que a LMA pediátrica deva ser estratificada em relação às faixas etárias, que refletem a biologia da doença e a origem pré-natal destas leucemias (GREAVES; WIEMELS, 2003) e, conseqüentemente, refletem a variação na frequência das alterações moleculares observadas. Para avaliar as características das diferentes idades neste estudo, os pacientes foram estratificados em idade ≤ 24 meses (28,7%), >24-120 meses (37,6%) e >120 meses (33,7%). CREUTZIG et al. (2008) demonstraram que adolescentes (13-21 anos-idade) apresentam uma sobrevida discretamente

inferior à de crianças mais novas, entretanto, sem diferenças entre crianças ≤ 2 anos de idade e $>2-\leq 13$ anos-idade. Embora estas características não sejam sugestivas de que diferentes estratégias de tratamento com base na idade possam beneficiar os pacientes, possíveis diferenças biológicas podem levar a diferentes estratégias de tratamento para as categorias de idade.

Diferentes fatores do hospedeiro, como gênero, raça, índice de massa corporal e polimorfismos genéticos já apresentaram risco associado ao desenvolvimento da LMA (revisado em RADHI; MESHINCHI; GAMIS, 2010). Crianças do sexo masculino apresentam maior risco de câncer que crianças do sexo feminino (KAATSCH, 2010) e a incidência de LMA difere de acordo com o gênero (DORES et al., 2012). Houve uma discreta predominância de casos do sexo masculino (51,4%) entre as crianças ≤ 120 meses (10 anos) e o risco para o desenvolvimento da LMA não foi avaliado por se tratar de um estudo incluindo apenas casos (*case-only*). Frequências similares de crianças do sexo masculino acometidas pela doença foram observadas na população germânica (CREUTZIG et al., 2005; CREUTZIG et al., 2012b), norte-americana (PUI et al., 2000) e japonesa (HORIBE et al., 2013). Variações na incidência dos subtipos leucêmicos podem ser observadas também entre os grupos étnicos, sugerindo uma correlação entre as populações geneticamente distintas e a ocorrência da LA (LI et al., 2008; DORES et al.; 2012). Devido à grande heterogeneidade étnica brasileira, os casos foram estratificados como cor da pele branca (39,5%) ou não branca (60,5%), que incluiu crianças cujos responsáveis declararam a cor da pele como sendo negra, parda ou de etnia indígena (26, 140 e 1 caso, respectivamente), na tentativa de criar grupos menos heterogêneos. Diferenças raciais já foram associadas à sobrevida, sendo que pacientes afro-americanos apresentaram sobrevida pior do que os correspondentes de cor da pele branca (APLENC et al., 2008). Países da América do Sul apresentam maior incidência de crianças com neoplasias mielóides (REIS et al., 2011) e, diferenças entre crianças hispânicas e não hispânicas de cor da pele branca já foram descritas nos Estados Unidos (LI et al., 2008). A população brasileira apresenta características especiais devido à sua variabilidade étnica, formada pela miscigenação entre ameríndios, europeus e africanos e é bastante diversificada (PIMENTA et al., 2006; PENA et al., 2011).

Os procedimentos iniciais para diagnóstico da LMA pediátrica envolvem avaliação morfológica, imunofenotípica e genética-molecular das células leucêmicas (CREUTZIG et al., 2012). Historicamente, características que pareciam ser inerentes às leucemias incluíam fatores como contagem leucocitária ao diagnóstico e características morfológicas (subtipos FAB). CREUTZIG et al. (1999) demonstraram que a leucometria foi um fator prognóstico em

LMA, sendo que, casos com leucometria $<20 \times 10^9/L$ foram associadas a um prognóstico melhor e, casos apresentando leucometria $>100 \times 10^9/L$ estavam associados a um prognóstico desfavorável. Portanto, a leucometria ao diagnóstico demonstrou-se como sendo uma variável para a sobrevida; o aumento de leucócitos está associado a uma queda na sobrevida (CREUTZIG et al., 1999). A maioria dos casos deste estudo apresentou contagem leucocitária $\leq 50 \times 10^9/L$ (64,5%), variando de 1,0 a $540 \times 10^9/L$. Análises posteriores nos permitirão avaliar se estes dados estão associados a variações na sobrevida dos pacientes. Sendo uma variável contínua, a leucometria apresenta dificuldades na incorporação a estratégias de estratificação de risco em LMA, uma vez que existem eventos moleculares que medeiam a leucemogênese mielóide levam à leucocitose [como *FLT3-ITD* (KIYOI et al., 1998; HAYAKAWA et al., 2000; MIZUKI et al., 2000; FENSKI et al., 2000) e mutações em *KRAS* (BRAUN et al., 2004; SABNIS et al., 2009)]. A identificação de mecanismos biológicos responsáveis pelas características de proliferação e sobrevivência celular levando à leucocitose proporcionam meios mais efetivos de avaliação do risco de falha no tratamento, tornando-se ferramentas mais relevantes de serem estabelecidas ao diagnóstico.

As análises morfológica e imunofenotípica revelaram que o subtipo de linhagem mielomonocítica (M4) foi o mais frequente (23,4%), seguido de APL (16,7%). HORIBE et al. (2013) reportaram o subtipo M2 como sendo o mais frequente, correspondendo a uma incidência de 24,5% das LMAs pediátricas registradas pela Sociedade Japonesa de Hematologia Pediátrica. Segundo MANOLA (2009), a distribuição dos subtipos FAB varia com a idade, sendo que os subtipos M4, M5 e M7 são mais comuns em crianças mais novas. HALL (2001) afirma que os subtipos FAB em LMA pediátrica apresentam distribuição semelhante àquela observada em adultos, com os subtipos M1/M2 sendo os mais frequentes e representando 35-40% dos casos, M3 em 10% dos casos, M4 em 20-25%, M5 em 20% e M6/M7 em 10% dos casos pediátricos. A frequência de APL observada é discretamente superior à frequência descrita para a população europeia (4-11%; ORTEGA et al., 2005), norte americana (5-10%; revisado em GREGORY; FEUSNER, 2009) e japonesa (8%; HORIBE et al., 2013). Dados institucionais e dados obtidos a partir de estudos de base populacional sugerem que a população latina apresenta maior proporção de APL entre os diagnósticos de LMA, alcançando 37,5% (REGO; JÁCOMO, 2011). REGO; JÁCOMO (2011) relataram que as APLs representam 28,2% dos casos de LMA no Brasil, frequência similar à obtida por MELO et al. (2006), de 28% no Hemocentro de Recife, Pernambuco, e a dados de países latinos como México (20%; RUIZ-ARGÜELLES, 1997), Venezuela (27,8%; DE SALVO et al., 1989) e Peru (22%; OTERO; SANTILLANA; FERREYROS, 1996).

Possivelmente, a alta frequência de APL em pacientes latinos está relacionada às características étnicas e/ou a fatores de exposição ambiental distintos que refletem a frequência de APL mais alta também em crianças (MENDES et al., 2004).

Em 29,8% dos casos não foi possível definir o subtipo de acordo com a análise morfológica e com os marcadores imunofenotípicos, o que ressalta a importância de marcadores moleculares na classificação das LMAs pediátricas. Além disto, devido à natureza subjetiva da classificação FAB e a ausência de correlação com a biologia da doença, a OMS desenvolveu um sistema para classificação das LMAs baseado nos marcadores genéticos (CREUTZIG et al., 2012).

A citogenética convencional (técnica de bandeamento G) contribuiu com os avanços na compreensão da biologia da LMA, revelando marcadores importantes de diagnóstico e prognóstico. Aberrações cromossômicas recorrentes permitiram a distinção de subtipos específicos da doença. A citogenética convencional detecta anormalidades numéricas e estruturais em 70-80% das crianças com LMA (Harrison *et al.*, 2010; Creutzig *et al.*, 2012) uma vez que realiza uma análise global do material genético em núcleos metafásicos. Determinadas fusões gênicas, produto de translocações crípticas, ou perdas cromossômicas específicas só podem ser detectadas pela técnica de FISH, que envolve princípios da citogenética e da biologia molecular. Além disso, a obtenção de índice mitótico adequado para o diagnóstico pelo bandeamento G, a sensibilidade restrita e a interpretação e análise do material preparado requer profissionais especializados nesta caracterização, o que limita a incorporação desta técnica nos diversos centros de onco-hematológicos do país. A análise por RT-PCR é mais sensível e específica que a citogenética, podendo ser utilizada em amostras criopreservadas ou com pouca celularidade e a FISH é útil para avaliação de núcleos interfásicos. Sendo assim, a FISH combinada à RT-PCR/PCR se tornaram ferramentas essenciais no diagnóstico da LMA pediátrica e na identificação de biomarcadores prognósticos.

As alterações cromossômicas mais frequentes em crianças incluem as alterações CBF [t(8;21)(q22;q22)/*RUNX1-RUN1T1* e inv(16)(p13.1q22)/*CBFβ-MYH11*], a alteração t(15;17)(q22;q21)/*PML-RARα* e alterações na região 11q23/*MLL-r* que, juntas, correspondem a cerca de 50% dos casos de LMA pediátrica (BALGOBIND et al., 2011; CREUTZIG et al., 2012). No presente estudo, as alterações genéticas mais frequentes em LMA rastreadas pelas técnicas de RT-PCR e FISH foram encontradas em 40,2% dos casos. A frequência das alterações CBF foi de 16%, sendo 12,3% representados pela fusão *RUNX1-RUN1T1* e 3,7% representados pela fusão *CBFβ-MYH11*. A frequência de *RUNX1-RUN1T1* está de acordo

com a descrita por outros grupos, como BALGOBIND et al. (2011), que realizou estudo envolvendo pacientes pediátricos europeus (12,6%), YATSENKO et al. (2013) que avaliou pacientes da Rússia e por WELLS et al. (2002), que relatou a frequência de 13% em pacientes dos Estados Unidos. Em relação à frequência do transcrito *CBF β -MYH11* encontrada, ela está de acordo com a descrita em uma revisão realizada por MANOLA (2009), cuja variação ocorre entre 3-8%. BALGOBIND et al. (2011) encontraram 9,5%, YATSENKO et al. (2013) 5,7% e WELLS et al. (2002) encontraram anormalidades envolvendo o cromossomo 16 em 6% dos casos. Maiores frequências da alteração *CBF β -MYH11* já foram descritas na população chinesa, de 11,6% (CHAN et al., 2004).

O *MLL-r* foi observado em 16,9% do total de casos. VON NEUHOFF et al. (2010) descrevem esta frequência como sendo de 20% e BANGOBIND et al. (2011) relatam 24,1%. Outros estudos já relataram frequências inferiores, variando de 14-22% (WELLS et al., 2002; RAVINDRANATH et al., 2005; HARRISON et al., 2010). As LAs que apresentam *MLL-r* são de interesse em particular devido às suas características clínicas e biológicas únicas. CREUTZIG et al. (2012) recomendam a avaliação do *MLL-r* por FISH e RT-PCR com iniciadores específicos, uma vez que rearranjos complexos e crípticos são frequentes, como por exemplo a fusão *MLL-MLLT4* que pode ser gerada envolvendo inversões, inserções ou translocações com outros cromossomos. Além disto, o parceiro envolvido no rearranjo com o *MLL* levam à variações na sobrevida neste grupo de pacientes (BALGOBIND et al., 2009). Já foi demonstrado que a fusão *MLL-MLLT4* e *MLL-MLLT10* estão associadas ao prognóstico desfavorável e, a alteração *MLL-MLLT3* está associada a uma taxa de sobrevida significativamente maior (VON NEUHOFF et al., 2010). A avaliação de 42 pacientes com *MLL-r* tratados pelos protocolos do St. Jude Children's Research Hospital (Tennessee, Estados Unidos) mostrou que pacientes com *MLL-MLLT3* apresentaram taxas de OS e SLE maiores que pacientes com cariótipo normal ou outras anormalidades envolvendo *MLL* (RUBNITZ et al., 2002). A frequência do *MLL-r* em casos de LMA pediátrica pode variar de 40-65% (revisado em MANOLA, 2009). Estas variações ocorrem nos estudos devido à sensibilidade dos métodos de detecção utilizados. Os parceiros de fusão mais frequentes do *MLL* foram *MLLT3* (25,0%), *AFF1* (15,0%) e *MLLT10* (10,0%), respectivamente. Outros parceiros identificados foram os genes *NEBL*, *ELL*, *SEPT6*, *ABL1*, *ENL* e *ELL*. Alguns parceiros são exclusivos de determinados pacientes, sendo descritos em apenas 1 caso até o momento, como por exemplo a fusão *MLL-NEBL* descrita por EMERENCIANO et al. (2013). MEYER et al. (2013) estabeleceram uma rede de diagnóstico que permitiu a diferentes centros ao redor do mundo obter os pontos de quebra genômicos do *MLL* e os parceiros

envolvidos nas translocações. O grupo identificou os parceiros *MLLT3* (73,0%), *MLLT10* (40,0%) e *MLLT4* (19,0%) e *ELL* (19,0%) como sendo os mais frequentes em LMA pediátrica.

Devemos considerar que a APL é um tipo distinto de LMA caracterizada por sua invariável associação com translocações cromossômicas envolvendo *RAR α* no cromossomo 17 e é considerada uma emergência médica por levar à hemorragia com risco de vida; o tratamento deve ser imediato. Devido ao fato de que a fusão *PML-RAR α* é detectada em mais de 98% dos pacientes com APL, este subtipo é um paradigma para as LMAs associadas à translocações cromossômicas específicas. Além disto, APL é distinta dos outros subtipos por sua resposta ao ATRA, que induz a diferenciação granulocítica terminal nos blastos (REGO; JÁCOMO, 2011). Consequentemente, o uso combinado de ATRA e antraciclina se tornou o pilar da terapia para APL e os diferentes grupos relatam taxas de cura superiores a 80% (DE LA SERNA et al., 2008; BALLY et al., 2012). Entre o total de casos, a alteração *PML-RAR α* foi observada em 10,5%. Considerando que a frequência de APL neste estudo foi de 16,7%, podemos explicar a diferença na concordância da frequência da fusão *PML-RAR α* e da frequência de APL pela não realização de exames citogenético moleculares em todos os casos. Em determinados casos, especialmente aqueles dos anos iniciais incluídos no estudo, as características clínicas, morfológicas e imunofenotípicas, em conjunto com a boa resposta ao ATRA, permitiram a conclusão diagnóstica. Atualmente, a técnica de FISH é utilizada para a identificação da fusão *PML-RAR α* no PHOP, CPq, INCA, e tem sido satisfatória na obtenção de resultados rápidos e conclusivos. Entre o total de casos avaliados para a presença da fusão *PML-RAR α* , esta anormalidade foi encontrada em 44,0% destes. Conforme mencionado anteriormente, REGO; JÁCOMO (2011) afirmam que a fusão está associada a mais de 98% dos casos de APL. Esta discrepância é aceita no nosso grupo uma vez que a pesquisa da presença da fusão não esteve restrita aos casos de APL, mas sim aos casos que apresentavam características morfológicas sugestivas de APL ou nos casos cujo estágio de diferenciação mielóide não pôde ser estabelecido.

Acredita-se que a LMA seja resultado de pelo menos duas classes de mutações cooperativas, segundo hipotetizado por GILLILAND; JORDAN; FELIX (2004) e suportado por modelos animais. Esta classe de mutações categorizada como mutações tipo I induzem a proliferação, como anormalidades nos RTKs e em seus efetores subsequentes, que vêm recebendo importância por seu envolvimento na patogênese de diferentes tumores (WEINER; ZAGZAG, 2000; MALUMBRES; BARBACID, 2003). A ativação constitutiva do receptor por mutação intrínseca e a ativação dos efetores contribuem para a origem, progressão e

resistência à quimioterapia (TURNER et al., 1996; TOWATARI et al., 1997). Além disto, estas alterações vêm sendo reconhecidas em LMA e contribuem para a heterogeneidade da doença. A frequência e as associações tipo I e tipo II não randômicas em LMA pediátrica diferem da LMA do adulto, enfatizando as diferenças na biologia da doença entre os grupos etários (BALGOBIND et al., 2011). Neste estudo, mutações tipo I foram identificadas em 23,8% dos casos analisados, sendo que estas mesmas alterações aqui rastreadas foram descritas por BALGOBIND et al. (2011) em 32,8% do total de casos. As mutações no gene *FLT3* foram encontradas em 15,1% dos casos, predominando a DIT em 87,0% das alterações em *FLT3*. BALGOBIND et al. (2011) identificaram *FLT3* alterado em 20,7% dos casos de LMA pediátrica. YATSENKO et al. (2013) identificaram estas alterações em 12,1% dos casos. As discrepâncias observadas com o estudo de BALGOBIND et al. (2011) são relativas às frequências de *FLT3*-DIT encontradas, e podem ser explicadas pelas diferenças metodológicas para detecção desta alteração, uma vez que o grupo realizou a detecção através da amplificação do domínio justamembrana, clonagem e seleção de colônias recombinantes para confecção de um DNA plasmidial e sequenciamento de ambas as fitas (KIYOI et al., 1997). A detecção através da amplificação da região seguida pela análise da eletrofose em gel de agarose 3% pode levar a resultados falso-negativos, uma vez que regiões que apresentarem a inserção de um pequeno número de pares de bases podem não ser detectadas.

Foram observadas alterações no gene *c-KIT* em 2,0% dos casos analisados, sendo ambas do tipo D816V. O baixo número de casos positivos impediu o estabelecimento de associações entre esta alteração e as características clínico-laboratoriais. Mutações em *c-KIT*, principalmente nos éxons 8 e 17, são descritas em 2-15% de todas malignidades mielóides (revisado em MESHINCHI; ARCECI, 2007) e em 5-8% das LMAs pediátricas (CREUTZIG et al., 2012). Mutações em *c-KIT* são mais frequentes dentro do subgrupo de LMA-CBF, conforme descrito por GOEMANS et al. (2005), ocorrendo em 37% das LMAs-CBF, por BALGOBIND et al. (2011) em 28-40%, e por PARK et al. (2011) em 34-39% das LMAs-CBF. Apesar disto, as mutações encontradas neste estudo foram em casos que não apresentavam alterações CBF. Em geral, as mutações de ativação no domínio justamembrana, codificado pelo éxon 17, são mais frequentes e apresentam associação com o prognóstico. A baixa incidência de determinadas alterações em LMA pediátrica torna difícil a descrição da relevância destas alterações. Mutações em *c-KIT* já foram descritas como sendo possivelmente associadas a altas taxas de recaída nas LMAs-CBF (BALGOBIND et al., 2011). Entretanto, POLLARD et al. (2010) demonstraram que *c-KIT* alterado não apresenta

significância prognóstica em LMAs-CBF pediátricas, em contraste ao observado por PASCHKA et al. (2006) nas LMAs-CBF do adulto.

Mutações no *KRAS* foram identificadas em 6,7% dos casos. Estas mutações ocorrem em cerca de 5% dos pacientes com LMA (TYNER et al., 2009) e raramente ocorrem em conjunto com outras alterações tipo I. Em LMA pediátrica, LIANG et al. (2006) descreveram alterações em *KRAS* em 6,2% dos casos, BALGOBIND et al. (2011) em 3,7% e GOEMANS et al. (2005) em 3,3%. Mutações em *KRAS*, assim como mutações em *c-KIT*, são descritas como associadas a subtipos genéticos específicos da LMA, como LMA-CBF e *MLL-r*, mas segundo estes estudos, parecem não apresentar impacto significativo na sobrevida das crianças com a doença (BALGOBIND et al., 2011). Na LMA do adulto, NEUBAUER et al. (2008) não observaram diferenças nas taxas de remissão completa, no tempo de seguimento ou na sobrevida de pacientes com ou sem as mutações do *RAS*. Entretanto, sugerem que estas mutações apresentam impacto no risco de recaída dependendo do tipo de quimioterapia pós-remissão, e os pacientes com cariótipo normal que carregam alterações no *RAS* podem se beneficiar de altas doses de citarabina na fase de consolidação.

Conforme descrito anteriormente, a LMA pediátrica é caracterizada por diferenças marcantes entre as faixas etárias. A distribuição dos subtipos FAB e de alterações genéticas foi altamente correlacionada com a idade. Nas crianças com idade ≤ 24 meses, predominou o subtipo FAB M4 (42,0%), e nas crianças com idade $>24-120$ meses e >120 meses predominou o subtipo FAB M3 (18,9% e 26,3%, respectivamente). WEBB et al. (2001) relata os subtipos M5 e M7 como os mais frequentes nas crianças com ≤ 2 anos-idade e os subtipo M2 como o mais frequente em todas as outras faixas etárias ($>2-5$ anos-idade, $>5-10$ anos-idade e $>10-15$ anos-idade). A frequência das alterações tipo II observada refletiu a frequência dos subtipos morfológicos. Nas crianças com idade ≤ 24 meses, predominou o *MLL-r* (29,2%), que esteve associado aos subtipos mielomonocíticos e está de acordo com o descrito por BIONDI et al. (2000). Apesar de predominar o subtipo FAB M4 nesta faixa etária, nenhum destes casos apresentou a fusão *CBF β -MYH11*. A alteração *CBF β -MYH11* é descrita como associada ao subtipo FAB M4 (VON NEUHOFF et al., 2010), mas principalmente entre as crianças >24 meses-idade (BALGOBIND et al., 2011). Além disto, em 5,0% dos casos *MLL-r*, esta alteração esteve associada ao subtipo megacarioblástico (M7). VON NEUHOFF et al. (2010) também identificaram alterações no *MLL* principalmente nos subtipos FAB M4/M5, sendo que em 2,0% dos casos M7, o *MLL-r* foi observado. Entretanto, a frequência do *MLL-r* nesta faixa etária foi inferior à descrita por outros autores, que afirmam que nas crianças ≤ 24 meses-idade, o *MLL-r* é observado em mais de 50% das LMAs (HARRISON et al., 2010;

VON NEUHOFF et al., 2010; BALGOBIND et al., 2011; CREUTZIG et al., 2012). EMERENCIANO et al. (2013), reportaram a presença do *MLL-r* em 25,6% das LMAs ≤ 2 anos-idade na mesma série de casos analisada neste estudo.

Conforme o esperado, nas crianças com idade $>24-120$ meses e >120 meses, predominaram as fusões *RUNX1-RUNXIT1* (18,3% e 15,1%, respectivamente) e *PML-RAR α* (15,5% e 16,4%, respectivamente), sendo que a maioria dos pacientes com *RUNX1-RUNXIT1* foram classificados como FAB M2 (39,3%) e todos aqueles com *PML-RAR α* como FAB M3. VON NEUHOFF et al. (2010) associa todos os casos apresentando a fusão *RUNX1-RUNXIT1* aos subtipos FAB M1/M2 com ou sem bastonetes de Auer. A fusão *PML-RAR α* é exclusiva do subtipo M3 (revisado em CREUTZIG et al., 2012). Os subtipos FAB M0, M1 e M6 não apresentaram nenhuma mutação tipo II recorrente.

Em 19,0% dos casos cujo subtipo morfológico não pôde ser estabelecido, a presença de uma alteração genética recorrente permitiu a inclusão destes casos na estratificação de risco proposta pela OMS (VARDIMAN et al., 2009). Entretanto, 32,0% destes casos, inicialmente sem especificação de linhagem, permaneceram sem a determinação da linhagem mielóide comprometida. Estes casos serão revistos morfológica e imunofenotipicamente na tentativa de estabelecer o subtipo FAB para possível caracterização genética, incluindo a pesquisa das alterações raras nas LMAs, como a $t(6;9)(p23;q34)/DEK-NUP214$, a $t(1;22)(p13;q13)/RBM15-MKLI$, a $t(7;12)(q36;p13)/ETV6-HLXB9$ e a $t(5;11)(q35;p15.5)/NUP98-NSD1$.

Em relação às alterações tipo I, mutações em *FLT3* foram mais frequentes nas crianças >120 meses-idade e as mutações em *KRAS* nas crianças $>24-120$ meses-idade. A frequência de mutações de ativação em genes de RTKs, como *FLT3*, é descrita como predominante nos grupos de cariótipo normal, com a fusão *PML-RAR α* ou *NUP98-NSD1*, e aumenta com a idade (MESHINCHI et al., 2006; PUI et al., 2011). Alterações *FLT3-DTK* foram identificadas em 2,0% do total de casos. Mutações pontuais no domínio de ativação de *FLT3* ocorrem em 2-8% dos casos pediátricos e são mutualmente exclusivos das outras alterações no gene (MESHINCHI et al., 2006; BALGOBING et al., 2011). Para as alterações *FLT3-ITD*, estas corresponderam a 13,2% do total de casos. MESHINCHI et al. (2001) descrevem alterações *FLT3-ITD* com prevalência de 16,5% dos pacientes pediátricos, BALGOBING et al. (2011) relatam 18,0%. As alterações no *FLT3* não foram associadas a um subtipo FAB específico, mas parecem ser mais frequentes entre os casos *RUNX1-RUNXIT1* e *PML-RAR α* positivos. BALGOBING et al. (2011) e MESHINCHI et al. (2001) descreveram as alterações em *FLT3*, principalmente do tipo ITD, associadas aos subtipos *PML-RAR α* e ao grupo de

LMA citogeneticamente normal. SCHLENK et al. (2008) relatam que estas anormalidades submicroscópicas podem estar associadas com características clínicas, morfológicas e/ou fenotípicas que permitem a identificação de uma entidade leucêmica específica, servindo como indicadores de prognóstico ainda que não estejam inseridos em um subtipo morfológico específico. O número de casos limitado para as análises moleculares e estatísticas dificultou a observação de uma associação estatisticamente significativa. Mutações *FLT3*-ITD são descritas em 30-40% dos casos com cariótipo normal e quando apenas a presença da mutação é considerada, a taxa de sobrevida em 4 anos é de 20-25% em pacientes adultos (MROZEK et al., 2007; SCHLENK et al., 2008). Nos pacientes pediátricos, a *FLT3*-ITD não demonstrou significância prognóstica independente na análise multivariada no estudo de BALGOBING et al. (2011), mas apresentou grande influência no prognóstico no estudo de ZWAAN et al., 2003.

Em LMA pediátrica, a incidência de alguns marcadores moleculares é muito baixa, e a pesquisa destas alterações é necessária para fornecer o conhecimento a respeito de suas características clínico-biológicas e sua associação com a sobrevida. Dentre os casos incluídos no estudo, 15 deles apresentavam eritrofagocitose e foram selecionadas para o rastreamento da fusão *MYST3-CREBBP*, uma vez que HAFERLACH et al. (2009) caracterizaram a *t(8;16)(p11;p13)/MYST3-CREBBP* em pacientes adultos com LMA e relataram a presença de eritrofagocitose ao diagnóstico morfológico em 53,8% dos casos. A sequência do genoma humano disponível na Internet disponibiliza BACs localizadas próximas a um ponto de quebra, tornando a investigação por FISH possível para todo o genoma. A técnica de FISH utilizando BACs marcados foi utilizada para a pesquisa inicial e se mostrou eficaz, porém demonstrou resultados falso-positivos em 40,0% dos casos analisados. Os BACs RP11-231D20 (centromérico) e RP11-108L9 (telomérico) selecionados para *MYST3* e o BAC RP11-387O21 (centromérico) para *CREBBP* são externos aos genes. O BAC RP11-461A8 está localizado no terminal telomérico de *CREBBP* e inclui dos éxons 1-3, sendo que o códon de início ATG está localizado no éxon 2. Estes BACs foram selecionados por permitirem a amplificação do sinal visualizado. O gene *CREBBP* apresenta 31 éxons e os pontos de quebra são descritos entre os éxons 1-5. Em relação ao gene *MYST3*, os pontos de quebra nos íntrons 15-16 e nos éxons 16-17 são os mais frequentes. SCHMIDT et al. (2004) e ROZMAN et al. (2004) sugerem que a maioria dos casos *t(8;16)(p11;p13)/MYST3-CREBBP* é caracterizada pelos transcritos quiméricos *MYST3* éxon16/*CREBBP* éxon 3 e *CREBBP* éxon 2/*MYST3* éxon 17. Assumindo-se que o códon ATG é necessário para a criação de uma proteína de fusão, o padrão de sinais do tipo dupla fusão (*dual fusion*) na FISH caracteriza a fusão envolvendo os

genes *MYST3* e *CREBBP*. A alteração t(8;16)(p11;p13)/*MYST3-CREBBP* foi descrita em apenas 62 casos de LMA pediátrica, com a maioria destes com idade ≤ 2 anos (COENEN et al., 2013). Três casos (20,0%) apresentaram o percentual de células com o padrão acima dos valores do ponto de corte estabelecido em um doador saudável. Entretanto, através da técnica de RT-PCR o transcrito de fusão mais frequente não foi visualizado e a falta de controles positivos para as reações e a disponibilidade de material limitada impossibilitaram o rastreamento dos demais transcritos descritos.

Durante os últimos anos, os resultados do tratamento da LMA melhoraram consideravelmente, uma vez que o tratamento adaptado ao risco passou a ser realizado nos diversos centros de diagnóstico ao redor do mundo (KASPERS; CREUTZIG, 2005). A definição de grupos de risco é baseada principalmente nas características genéticas dos pacientes, que representam marcadores de diagnóstico e prognóstico e estão relacionados ao desenvolvimento da doença. A análise destes marcadores na série de casos brasileira é de extrema importância uma vez que estudos robustos envolvendo LMA pediátrica são raros no Brasil. Portanto, a próxima etapa deste estudo envolve a coleta de dados nos diversos centros que participam do estudo para a possível avaliação da resposta terapêutica em relação aos marcadores genético-moleculares.

7. CONCLUSÕES

- A frequência das anormalidades tipo II nas LMA pediátricas brasileiras foi de 40,2% e, das alterações tipo I, de 26,2%;
- As técnicas de RT-PCR e FISH se mostraram eficazes na pesquisa das alterações tipo II recorrentes e aplicáveis à rotina diagnóstica;
- A identificação das fusões gênicas propostas pela OMS e recomendadas por grupos especialistas internacionais permitiu a reclassificação de 19,0% dos casos e estratificação destes nos grupos de risco;
- A frequência das alterações tipo II observada refletiu a frequência dos subtipos morfológicos.
- Nas crianças com idade ≤ 2 anos, predominou o *MLL-r*, que esteve associado aos subtipos FAB M4, M5 e M7; a fusão *RUNX1-RUNX1T1* foi observada nos subtipos FAB M2 e M4; a fusão *CBF β -MYH11* foi exclusiva dos casos FAB M4; a fusão *PML-RAR α* foi exclusiva dos casos FAB M3;
- As mutações no gene *FLT3* foram encontradas em 15,1% dos casos, predominando a DIT (87,0%); mutações no *KRAS* foram identificadas em 6,7% dos casos; mutações em *c-KIT* foram identificadas em 2,0% dos casos.
- Mutações em *c-KIT* parecem ser eventos raros nos casos de LMA pediátrica no Brasil e o baixo número de casos positivos impediu o estabelecimento de associações entre esta alteração e as características clínico-laboratoriais;
- Três casos (20,0%) apresentaram valores para o padrão de sinais sugestivo da fusão entre 18-37%. Entretanto, limitações técnicas impediram a confirmação da presença do transcrito de fusão. Novas abordagens precisam ser estabelecidas para o estudos destes casos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSSON J et al. **Response-guided induction therapy in pediatric acute myeloid leukemia with excellent remission rate.** *J Clin Oncol*, 29(3):310-315, 2011.

ADJEI AA. **Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy.** *J Natl Cancer Inst*, 93(14):1062-74, 2001.

AKASHI K, et al. **A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages.** *Nature*, 404(6774):193-7, 2000.

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

ALCALAY M et al. **Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia.** *Oncogene*, 20(40):5680-94, 2001.

APLAN PD et al. **Site-specific DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors.** *Blood*, 87:2649–2658, 1996.

APLENC R et al. **Ethnicity and survival in childhood acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group.** *Blood*, 108:74–80, 2006.

BALGOBIND BV et al. **Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study.** *Blood*, 114(12):2489-96, 2009.

BALGOBIND BV et al. **Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia.** *Haematologica*, 96(10):1478-87, 2011.

BALLY C et al. **Outcome of acute promyelocytic leukemia (APL) in children and adolescents: an analysis in two consecutive trials of the European APL Group.** *J Clin Oncol*, 30(14):1641-6, 2012.

BARABÉ F et al. **Modeling the Initiation and Progression of Human Acute Leukemia in Mice.** *Science*, 316:600-604, 2007.

- BARLETTA E et al. **RAS gene mutations in patients with acute myeloid leukaemia and exposure to chemical agents.** *Carcinogenesis*, 25:749-755, 2004.
- BARR FG. **Translocations, cancer and the puzzle of specificity.** *Nat Genet*, 19(2):121-4, 1998.
- BEERAM M; PATNAIK A; ROWINSKY EK. **Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer.** *J Clin Oncol*, 23(27):6771-90, 2005.
- BÉNÉ MC et al. **Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL).** *Leukemia*, 9(10):1783-1786, 1995.
- BÉNÉ MC et al. **The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL).** *Blood*, 92:596–599, 1998.
- BÉNÉ MC et al. **Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10.** *Leukemia*, 5(4):567-74, 2011.
- BENNETT JM et al. **Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0).** *Br J Haematol*, 78:325-329, 1991.
- BETTS DR et al. **The prognostic significance of cytogenetic aberrations in childhood acute myeloid leukaemia: a study of the Swiss Paediatric Oncology Group (SPOG).** *Eur J Haematol*, 78(6):468-476, 2007.
- BIONDI A et al. **Biological and therapeutic aspects of infant leukemia.** *Blood*, 96(1):24-33, 2000.
- BORNHOLDT J et al. **K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure.** *BMC Cancer*, 8:53-63, 2008.
- BORROW J et al. **The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein.** *Nat Genet*, 14:33–41, 1996.
- BOYES J et al. **Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation.** *Nature*, 396:594–8, 1998.

- BRAUN BS et al. **Somatic activation of oncogenic Kras in hematopoietic cells initiates a rapidly fatal myeloproliferative disorder.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:597–602, 2004.
- BROEKER PL et al. **Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites.** *Blood*, 87:1912-1922, 1996.
- BROWN D et al. **A PML/RARalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 18:2551-2556, 1997.
- CAMARGO B et al. **Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14 population-based cancer registries.** *International Journal of Cancer*, 126:715–720, 2010.
- CAMÓS M et al. **Gene expression profiling of acute myeloid leukemia with translocation t(8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement reveals a distinctive signature with a specific pattern of HOX gene expression.** *Cancer Res*, 66:6947–6954, 2006.
- CASTILLA LH et al. **Failure of embryonic hematopoiesis and lethal hemorrhages in mouse embryos heterozygous for a knock-in leukemia gene CBFb-MYH11.** *Cell*, 87:687–696, 1996.
- CASTILLA LH et al. **The fusion gene CBFb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia.** *Nat Genet*, 23:144–146, 1999.
- CHAN PM et al. **Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region.** *Mol Cell Biol*, 23(9):3067-78, 2003.
- CHAN NPH et al. **Childhood acute myeloid leukaemia with CBFb-MYH11 rearrangement: study of incidence, morphology, cytogenetics, and clinical outcomes of Chinese in Hong Kong.** *Am J Hematology*, 76:300–3, 2004.
- CIMINO G et al. **Infant acute leukemias show the same biased distribution of ALL1 gene breaks as topoisomerase II related secondary acute leukemias.** *Cancer Res*, 57:2879-2883, 1997.

CLASSEN CF et al. **Spontaneous complete and sustained remission of a rearrangement CBP (16p13)-positive disseminated congenital myelosarcoma.** *Ann Hematol*, 84(4):274-275, 2005.

CO NN et al. **Oncogene AF1q enhances doxorubicin-induced apoptosis through BAD-mediated mitochondrial apoptotic pathway.** *Mol Cancer Ther*, 7:3160-3168, 2008.

COENEN EA et al. **Pediatric acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13), a distinct clinical and biological entity: a collaborative study by the International-Berlin-Frankfurt-Munster AML-study group.** *Blood*, 122(15):2704-13, 2013.

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.

CORRAL J et al. **An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes.** *Cell*, 85:853–861, 1996.

CREUTZIG U et al. **Definition of a standard-risk group in children with AML.** *Br J Haematol*, 104:630–639, 1999.

CREUTZIG U et al. **AML patients with Down syndrome have a high cure rate with AML-BFM therapy with reduced dose intensity.** *Leukemia*, 19(8):1355-1360, 2005.

CREUTZIG U et al. **Significance of age in acute myeloid leukemia patients younger than 30 years: a common analysis of the pediatric trials AML-BFM 93/98 and the adult trials AMLCG 92/99 and AMLSG HD93/98A.** *Cancer*, 112(3):562-71, 2008.

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, 2012a.

CREUTZIG U et al. **Favorable outcome in infants with AML after intensive first- and second-line treatment: an AML-BFM study group report.** *Leukemia*, 26(4):654-61, 2012b.

- DASH A; GILLILAND DG. **Molecular genetics of acute myeloid leukaemia.** *Best Pract Res Clin Haematol*, 14(1):49-64, 2001.
- DE LA SERNA J et al. **Causes and prognostic factors of remission induction failure in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and idarubicin.** *Blood*, 111(7):3395-402, 2008.
- DE SALVO L et al. **Acute promyelocytic leukemia in the west of Venezuela.** *Sangre (Barc)*, 34:329-331, 1989.
- DENAYER E; de Ravel Th; Legius E. **Clinical and molecular aspects of RAS related disorders.** *Journal of Medical Genetics*, 45:695-703, 2008.
- DINULOS JG et al. **Spontaneous remission of congenital leukemia.** *J Pediatr*, 131(2):300-303, 1997.
- DICKSON GJ et al. **Hoxa6 potentiates short-term hemopoietic cell proliferation and extended selfrenewal.** *Exp Hematol*, 37(3):322-333, 2009.
- DOBSON CL et al. **The mll-AF9 gene fusion in mice controls myeloproliferation and specifies acute myeloid leukaemogenesis.** *EMBO J*, 18:3564–3574, 1999.
- DONOVAN S; SHANNON KM; BOLLAG G. **GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling.** *Biochim Biophys Acta*, 1602:23–45, 2002.
- DORES GM et al. **Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007.** *Blood*, 119(1):34-43, 2012.
- DOWNING JR; SHANNON KM. **Acute leukemia: a pediatric perspective.** *Cancer Cell*, 2(6):437-45, 2002.
- DOWNING JR. **The core-binding factor leukemias: lessons learned from murine models.** *Curr Opin Genet Dev*, 13:48-54, 2003.
- DRABKIN HA et al. **Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia.** *Leukemia*, 16:186–195, 2002.
- EGUCHI M; EGUCHI-ISHIMAE M; GREAVES M. **Molecular pathogenesis of MLL-associated leukemias.** *Int J Hematol*, 82:9-20, 2005.

- ELAGIB KE; GOLDFARB AN. **Oncogenic pathways of AML1-ETO in acute myeloid leukemia: multifaceted manipulation of marrow maturation.** *Cancer Lett*, 251(2):179–186, 2007.
- EMERENCIANO M et al. **Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia.** *Pediatr Blood Cancer*, 47:549-554, 2006.
- EMERENCIANO M; KOIFMAN S; POMBO-DE-OLIVEIRA MS. **Acute leukemia in early childhood.** *Braz J Med Biol Res*, 40:749-760, 2007.
- EMERENCIANO M et al. **Clinical relevance of FLT3 gene abnormalities in Brazilian patients with infant leukemia.** *Leuk Lymphoma*, 49(12):2291-7, 2008.
- EMERENCIANO M et al. **Functional analysis of the two reciprocal fusion genes MLL-NEBL and NEBL-MLL reveal their oncogenic potential.** *Cancer Lett*, 332(1):30-4, 2013.
- FENSKI R et al. **Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells.** *Br J Haematol*, 108:322-330, 2000.
- FORD AM et al. **In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias.** *Nature*, 363:358-360, 1993.
- GALE KB et al. **Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:13950–13954, 1997.
- GAMIS AS 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*, 118(26):6752-6759, 2011.
- GERMAIN P et al. **International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors.** *Pharmacol Rev*, 58(4):712-25, 2006.
- GERVAIS C et al. **Acute myeloid leukaemia with 8p11 (MYST3) rearrangement: an integrated cytologic, cytogenetic and molecular study by the groupe francophone de cytogénétique hématologique.** *Leukemia*, 22(8):1567-1575, 2008.
- GILLILAND DG; GRIFFIN JD. **The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia.** *Blood*, 100:1532-1542, 2002.

- GILLILAND DG; TALLMAN MS. Focus on acute leukemias. *Cancer Cell*, 1:417-420, 2002.
- GILLILAND DG; JORDAN CT; FELIX CA. **The Molecular Basis of Leukemia.** *Hematology*, 1:80-97, 2004.
- GOEMANS BF et al. **Mutations in KIT and RAS are frequent events in pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia.** *Leukemia*, 19(9):1536-42, 2005.
- GREAVES M. **Childhood leukaemia.** *BMJ*, 324:283-287, 2002.
- GREAVES MF et al. **Leukemia in twins: lessons in natural history.** *Blood*, 102:2321-2333, 2003.
- GREAVES MF; WIEMELS J. **Origins of chromosome Translocations in Childhood Leukaemia.** *Nature Reviews*, 3:1-11, 2003.
- GREAVES MF; MALEY CC. **Clonal evolution in cancer.** *Nature*, 481(7381):306-313, 2012.
- GREGORY J; FEUSNER J. **Acute promyelocytic leukemia in childhood.** *Curr Oncol Rep*, 11(6):439-45, 2009.
- GRIGNANI F et al. **Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia.** *Nature*, 391:815-818, 1998.
- GRIMWADE D. **The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia.** *Best Pract Res Clin Haematol*, 14(3):497-529, 2001.
- GU W; ROEDER RG. **Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain.** *Cell*, 90:595-606, 1997.
- HAFERLACH T et al. **AML with translocation t(8;16)(p11;p13) demonstrates unique cytomorphicological, cytogenetic, molecular and prognostic features.** *Leukemia*, 23(5):934-43, 2009.
- HALL GW. **Childhood myeloid leukaemias.** *Best Pract Res Clin Haematol*. 14(3):573-591, 2001.

- HAYAKAWA F et al. **Tandem duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines.** *Oncogene*, 19:624-631, 2000.
- HANAHAH D; WEINBERG RA. **Hallmarks of Cancer: The next generation.** *Cell*, 144(5):646-674, 2011.
- HARRIS NL et al. **World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997.** *J Clin Oncol*, 17(12):3835-49, 1999.
- HARRISON CJ et al. **Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials AML 10 and 12.** *J Clin Oncol*, 28(16):2674-2681, 2010.
- HE LZ et al. **Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RARalpha transgenic mice.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:5302-5307, 1997.
- HIGUCHI M et al. **Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia.** *Cancer Cell*, 1:63-74, 2002.
- HITZLER JK et al. **GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome.** *Blood*, 101(11):4301-4304, 2003.
- HORIBE K et al. **Incidence and survival rates of hematological malignancies in Japanese children and adolescents (2006-2010): based on registry data from the Japanese Society of Pediatric Hematology.** *Int J Hematol*, 98(1):74-88, 2013.
- HUNGER SP et al. **Oncogenesis in utero: fetal death due to acute myelogenous leukaemia with an MLL translocation.** *Br J Haematol*, 103:539-542, 1998.
- KAATSCH P. **Epidemiology of childhood cancer.** *Cancer Treat Rev*, 36(4):277-85, 2010.
- KASPERS GJ; CREUTZIG U. **Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions.** *Leukemia*, 19(12):2025-9, 2005.
- KATSUMOTO T et al. **MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells.** *Genes Dev*, 20:1321-30, 2006.

KELLY LM; GILLILAND DG. **Genetics of myeloid leukemias.** *Annu Rev Genom Hum Genet*, 3:179-198, 2002.

KIYOI H et al. **Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia.** Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). *Leukemia*, 11(9):1447-52, 1997.

KIYOI H et al. **Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product.** *Leukemia*, 12:1333-1337, 1998.

KITABAYASHI I et al. **Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation.** *EMBO J*, 17:2994-3004, 1998.

KITABAYASHI I et al. **Activation of AML1-mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ-CBP fusion protein.** *EMBO J*, 20:7184-96, 2001.

KLUSMANN JH et al. **Treatment and prognostic impact of transient leukemia in neonates with Down's syndrome.** *Blood*, 111(6):2991-2998, 2008.

KOH CP et al. **RUNX1 meets MLL: epigenetic regulation of hematopoiesis by two leukemia genes.** *Leukemia*, 27(9):1793-802, 2013.

KOHL TM et al. **KIT exon 8 mutations associated with core-binding factor (CBF)-acute myeloid leukemia (AML) cause hyperactivation of the receptor in response to stem cell factor.** *Blood*, 105(8):3319-21, 2005.

KONOPLEVA MY, JORDAN CT. **Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting.** *J Clin Oncol*, 29(5):591-9, 2011.

KUDO K et al. **Prospective study of a pirarubicin, intermediate-dose cytarabine, and etoposide regimen in children with Down syndrome and acute myeloid leukemia: the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group.** *J Clin Oncol*, 25(34):5442-5447, 2007.

- KUDO K et al. **Mosaic Down syndrome-associated acute myeloid leukemia does not require high-dose cytarabine treatment for induction and consolidation therapy.** *Int J Hematol*, 91(4):630-635, 2010.
- KUNDU M; Liu PP. **Function of the inv(16) fusion gene CBFβ-MYH11.** *Current opinion in hematology*, 8(4):201-5, 2001.
- LENNARTSSON J et al. **C-Kit signal transduction and involvement in cancer.** *Cancer Therapy*, 3:5-28, 2005.
- LENGAUER C. **How do tumors make ends meet?** *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:12331–12333, 2001.
- LEWIN B. **Genes VIII.** New Jersey: *Pearson Education*, 2004.
- LEY TJ et al. **DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia.** *N Engl J Med*, 363(25):2424-33, 2010.
- LI Z et al. **Developmental stage-selective effect of somatically mutated leukemogenic transcription factor GATA1.** *Nat Genet*, 37(6):613-619, 2005.
- LI J et al. **Cancer incidence among children and adolescents in the United States, 2001–2003.** *Pediatrics*, 121:1470–1477, 2008.
- LIANG DC et al. **K-RAS Mutations and N-RAS Mutations in Childhood Acute Leukemias With or Without Mixed-Linage Leukemia Gene Rearrangements.** *Cancer*, 106:950-956, 2006.
- LIE SO et al. **Treatment stratification based on initial in vivo response in acute myeloid leukaemia in children without Down’s syndrome: results of NOPHOAML trials.** *Br J Haematol*, 122:217-225, 2003.
- LINABERY AM; ROSS JA. **Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992-2004).** *Cancer*, 112(2):416-32, 2008.
- LIU H et al. **Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases.** *EMBO J*, 26:891-901, 2007.

- LONGLEY BJ; REGUERA MJ; MA Y. **Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy.** *Leuk Res*, 25(7):571-6, 2001.
- LONKAR P; DEDON PC. **Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates.** *Int J Cancer*, 128(9):1999–2009, 2011.
- LORIAUX MM et al. **High-throughput sequence analysis of the tyrosine kinome in acute myeloid leukemia.** *Blood*, 111(9):4788-96, 2008.
- MACKAREHTSCHIAN K et al. **Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors.** *Immunity*, 3:147-161, 1995.
- MAGLI MC; LARGMAN C; LAWRENCE HJ. **Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation.** *J Cell Physiol*, 173:168–177, 1997.
- MALUMBRES M; BARBACID M. **RAS oncogenes: the first 30 years.** *Nat Rev Cancer*, 3(6):459-65, 2003.
- MANOLA KN. **Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia.** *Eur J Haematol*, 83(5):391-405, 2009.
- MARCUCCI G. **Core binding factor acute myeloid leukemia.** *Clin Adv Hematol Oncol*, 4(5):339–341, 2006.
- MARTELLI MP et al. **Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: biological and clinical implications.** *Blood Rev*, 27(1):13-22, 2013.
- MCCUBREY JA et al. **Differential abilities of activated Raf oncoproteins to abrogate cytokine dependency, prevent apoptosis and induce autocrine growth factor synthesis in human hematopoietic cells.** *Leukemia*, 12(12):1903-29, 1998.
- MCHALE CM et al. **Prenatal origin of childhood acute myeloid leukemias harboring chromosomal rearrangements t(15;17) and inv(16).** *Blood*, 101(11):4640-1, 2003.
- MELO RA et al. **PML-RARalpha fusion gene transcripts and biological features in acute promyelocytic leukemia patients.** *Clin Lab Haematol*, 28:126-129, 2006.

- MENDES WL et al. **The apparent excess of acute promyelocytic leukemia in infant acute leukemias in Brazil.** *Haematologica*, 89:ELT16-ELT16, 2004.
- MESHINCHI S et al. **Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia.** *Blood*, 97(1):89-94, 2001.
- MESHINCHI S et al. **Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML.** *Blood*, 108(12):3654-61, 2006.
- MESHINCHI S; ARCECI RJ. **Prognostic Factors and Risk-Based Therapy in Pediatric Acute Myeloid Leukemia.** *The Oncologist*, 12:341-355, 2007.
- MEYER C et al. **Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(2):449-54, 2005.
- MEYER C et al. **The MLL recombinome of acute leukemias in 2013.** *Leukemia*, 27(11):2165-76, 2013.
- MEYERS S; LENNY N; HIEBERT SW. **The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation.** *Mol Cell Biol*, 15:1974-1982, 1995.
- MILNE TA et al. **MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters.** *Mol Cell*, 10:1107–1117, 2002.
- MIZUKI M et al. **Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways.** *Blood*, 96:3907-3914, 2000.
- MOL CD et al. **Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase.** *J Biol Chem*, 279(30):31655-63, 2004.
- MORI H et al. **Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12):8242-7, 2002.
- MRÓZEK K et al. **Adult patients with de novo acute myeloid leukemia and t(9; 11)(p22; q23) have a superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: a cancer and leukemia group B study.** *Blood*, 90:4532-4538, 1997.

MRÓZEK K; HEEREMA NA; BLOOMFIELD CD. **Cytogenetics in acute leukemia.** *Blood Rev*, 18(2):115-136, 2004.

MRÓZEK K et al. **Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification?** *Blood*, 109:431-448, 2007.

MUINDI J et al. **Continuous treatment with all-trans retinoic acid causes a progressive reduction in plasma drug concentrations: implications for relapse and retinoid "resistance" in patients with acute promyelocytic leukemia.** *Blood*, 79(2):299-303, 1992.

NAKAO M et al. **Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia.** *Leukemia*, 10:1911–1918, 1996.

NAOE T; KIYOI H. **Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era.** *Int J Hematol*, 97(2):165-74, 2013.

NIEBUHR B et al. **Gatekeeper function of the RUNX1 transcription factor in acute leukemia.** *Blood Cells Mol Dis*, 40:211-218, 2008.

NEUBAUER A et al. **Patients with acute myeloid leukemia and RAS mutations benefit most from postremission high-dose cytarabine: a Cancer and Leukemia Group B study.** *J Clin Oncol*, 26(28):4603-9, 2008.

OMMEN HB et al. **Strikingly different molecular relapse kinetics in NPM1c, PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, and CBFβ-MYH11 acute myeloid leukemias.** *Blood*, 115(2):198-205, 2010.

ORTEGA JJ et al. **Treatment with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy for children with acute promyelocytic leukemia: a multicenter study by the PETHEMA Group.** *J Clin Oncol*, 23(30):7632-40, 2005.

OTERO JC; SANTILLANA S; FERREYROS G. **High frequency of acute promyelocytic leukemia among Latinos with acute myeloid leukemia.** *Blood*, 88:377-377, 1996.

PAIETTA E. **Expression of cell-surface antigens in acute promyelocytic leukaemia.** *Best Pract Res Clin Haematol*, 16:369–385, 2003.

- PARK SH et al. **Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor acute myeloid leukemia.** *Leuk Res*, 35(10):1376-83, 2011.
- PASCHKA P et al. **Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study.** *J Clin Oncol*, 24(24):3904-11, 2006.
- PASCHKA P. **Core binding factor acute myeloid leukemia.** *Semin Oncol*, 35(4):410–417, 2008.
- PASCHKA P et al. **IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication.** *J Clin Oncol*, 28(22):3636-43, 2010.
- PATEL JP et al. **Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia.** *New Engl J of Med*, 366(12):1079-89, 2012.
- PENA SD et al. **The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected.** *PLoS One*, 6(2):17063, 2011.
- PERENTESIS JP et al. **RAS oncogene mutations and outcome of therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Leukemia*, 18:685–692, 2004.
- PIMENTA JR et al. **Color and genomic ancestry in Brazilians: A study with forensic microsatellites.** *Hum Hered*, 62:190–195, 2006.
- POLLARD JA et al. **Prevalence and prognostic significance of KIT mutations in pediatric patients with core binding factor AML enrolled on serial pediatric cooperative trials for de novo AML.** *Blood*, 115(12):2372-9, 2010.
- POMBO-DE-OLIVEIRA MS; KOIFMAN S; BRAZILIAN COLLABORATIVE STUDY GROUP OF INFANT ACUTE LEUKEMIA. **Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15:2336-2341, 2006.
- POMBO-DE-OLIVEIRA MS et al. **Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia.** *Blood Cells Mol Dis*, 42(2):121-5, 2009.

- PUI CH et al. **Prognostic factors in infants with acute myeloid leukemia.** *Leukemia*, 14(4):684-7, 2000.
- PUI CH et al. **Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update.** *J Clin Oncol*, 29(5):551-65, 2011.
- RADHI M; MESHINCHI S; GAMIS A. **Prognostic factors in pediatric acute myeloid leukemia.** *Curr Hematol Malig Rep*, 5(4):200-6, 2010.
- RADTKE I et al. **Genomic analysis reveals few genetic alterations in pediatric acute myeloid leukemia.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(31):12944-9, 2009.
- RAFFINI LJ et al. **Panhandle and reverse-panhandle PCR enable cloning of der(11) and der(other) genomic breakpoint junctions of MLL translocations and identify complex translocation of MLL, AF-4, and CDK6.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(7):4568–4573, 2002.
- RAVINDRANATH Y et al. **Pediatric Oncology Group (POG) studies of acute myeloid leukemia (AML): a review of four consecutive childhood AML trials conducted between 1981 and 2000.** *Leukemia*, 19(12):2101-16, 2005.
- REGO EM; JÁCOMO RH. **Epidemiology and treatment of acute promyelocytic leukemia in latin America.** *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 3(1):2011049, 2011.
- REIS RS et al. **Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions.** *Pediatr Blood Cancer*, 56(1):58-64, 2011.
- RENNEVILLE A et al. **Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature.** *Leukemia*, 22:915–931, 2008.
- RICHARDSON C; JASIN M. **Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks.** *Nature*, 405:697–700, 2000.
- ROSS JA. **Environmental and Genetic Susceptibility to MLL-Defined Infant Leukemia.** *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 39:83-86, 2008.
- ROWLEY JD. **The critical role of chromosome translocations in human leukemias.** *Annu Rev Genet*, 32:495–519, 1998.

ROZMAN M et al. **Type I MOZ/CBP (MYST3/CREBBP) is the most common chimeric transcript in acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13) translocation.** *Genes Chromosomes Cancer*, 40(2):140-5, 2004.

RUBNITZ JE et al. **Favorable impact of the t(9;11) in childhood acute myeloid leukemia.** *J Clin Oncol*, 20:2302-2309, 2002.

RUBNITZ JE. **How I treat pediatric acute myeloid leukemia.** *Blood*, 119(25):5980-8, 2012.

RUBNITZ JE; INABA H. **Childhood acute myeloid leukaemia.** *Br J Haematol*, 159(3):259-76, 2012.

RULINA AV; SPIRIN PV; PRASSOLOV VS. **Activated leukemic oncogenes AML1-ETO and c-kit: role in development of acute myeloid leukemia and current approaches for their inhibition.** *Biochemistry (Mosc)*, 75(13):1650-66, 2010.

RUIZ-ARGÜELLES GJ. **Promyelocytic leukaemia in Mexican mestizos.** *Blood*, 89:348–349, 1997.

RUTHARDT M et al. **Opposite effects of the acute promyelocytic leukemia PML-retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and PLZF-RAR alpha fusion proteins on retinoic acid signalling.** *Mol Cell Biol*, 17(8):4859-69, 1997.

SABNIS AJ et al. **Oncogenic Kras initiates leukemia in hematopoietic stem cells.** *PLoS Biol*, 7(3):59, 2009.

SCHLENK RF et al. **Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia.** *N Engl J Med*, 358(18):1909-18, 2008.

SCHMIDT HH et al. **RT-PCR and FISH analysis of acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13) and chimeric MOZ and CBP transcripts: breakpoint cluster region and clinical implications.** *Leukemia*, 18:1115–1121, 2004.

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

- SCHUBBERT S; SHANNON K; BOLLAG G. **Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer.** *Nat Rev Cancer*, 7(4):295-308, 2007.
- SHIH AH et al. **The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies.** *Nat Rev Cancer*, 12(9):599-612, 2012.
- SIERRA J et al. **The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes.** *Genes Dev*, 20:586–600, 2006.
- SPECTOR L et al. **Maternal Diet and Infant Leukemia: The DNA Topoisomerase II Inhibitor Hypothesis: A Report from the Children’s Oncology Group.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(3):651–655, 2005.
- STANULLA M et al. **Topoisomerase II inhibitors induce DNA double-strand breaks at a specific site within the AML1 locus.** *Leukemia*, 11:490–496, 1997.
- STARK B et al. **Classical and molecular cytogenetic abnormalities and outcome of childhood acute myeloid leukaemia: report from a referral centre in Israel.** *Br J Haematol*, 126(3):320-337, 2004.
- STIREWALT DL et al. **FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia.** *Blood*, 97(11):3589-95, 2001.
- STIREWALT DL; RADICH JP. **The role of FLT3 in haematopoietic malignancies.** *Nat Rev Cancer*, 3:650-665, 2003.
- STRISSEL PL et al. **DNA structural properties of AF9 are similar to MLL and could act as recombination hot spots resulting in MLL/AF9 translocations and leukemogenesis.** *Hum Mol Genet*, 9:1671–1679, 2000.
- SUPER HJ et al. **Rearrangements of the MLL Gene in Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia in Patients Previously Treated With Agents Targeting DNA-Topoisomerase II.** *Blood*, 82(12):3705-3711, 1993.
- SWERDLOW SH. **International Agency for Research on Cancer. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.** International Agency for Research on Cancer, IARC *press*, Lyon, France, 2008.

- TABORI U et al. **Toxicity and outcome of children with treatment related acute myeloid leukemia.** *Pediatr Blood Cancer*, 50:17–23, 2008.
- TAKEDA S et al. **Proteolysis of MLL family proteins is essential for taspase1-orchestrated cell cycle progression.** *Genes Dev*, 20:2397–2409, 2006.
- TAUB JW; Ge Y. **Down syndrome, drug metabolism and chromosome 21.** *Pediatr Blood Cancer*, 44(1):33-39, 2005.
- TENEN DG. **Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way.** *Nature Reviews*, 3:89-101, 2003.
- THIEDE C et al. **Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis.** *Blood*, 99(12):4326-35, 2002.
- TORRENT M et al. **Analysis of the activating mutations within the activation loop of leukemia targets Flt-3 and c-Kit based on protein homology modeling.** *J Mol Graph Model*, 23(2):153-65, 2004.
- TORRES L et al. **Acute megakaryoblastic leukemia with a four-way variant translocation originating the RBM15-MKL1 fusion gene.** *Pediatr Blood Cancer*, 56(5):846-849, 2011.
- TOWATARI M et al. **Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathway in acute leukemia cells.** *Leukemia*, 11(4):479-84, 1997.
- TURNER AM et al. **Identification and characterization of a soluble c-kit receptor produced by human hematopoietic cell lines.** *Blood*, 85(8):2052-8, 1995.
- TURNER AM et al. **FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells.** *Blood*, 88(9):3383-90, 1996.
- TYNER JW et al. **High-throughput sequencing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients.** *Blood*, 113(8):1749-55, 2009.
- USHER SG et al. **RAS, FLT3, and C-KIT mutations in immunophenotyped canine leukemias.** *Exp Hematol*, 37(1):65-77, 2009.

VALSECCHI MG; STELIAROVA-FOUCHER E. **Cancer registration in developing countries: Luxury or necessity?** *Lancet Oncol*, 9:159–167, 2008.

VAN DONGEN JJ et al. **Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia.** *Leukemia*, 13(12):1901-28, 1999.

VARDIMAN JW; HARRIS NL; BRUNNING RD. **The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms.** *Blood*, 100:2292–2302, 2002.

VARDIMAN JW et al. **The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.** *Blood*, 114(5):937-51, 2009.

VARDIMAN JW. **The World Health Organization classification.** *Chem Biol Interact*, 184(1-2):16-20, 2010.

VIEHMANN S et al. **Monitoring of minimal residual disease (MRD) by real-time quantitative reverse transcription PCR (RQ-RT-PCR) in childhood acute myeloid leukemia with AML1/ETO rearrangement.** *Leukemia*, 17(6):1130-1136, 2003.

VOGELSTEIN B et al. **Cancer genome landscapes.** *Science*, 339(6127):1546-58, 2013.

VON NEUHOFF C et al. **Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98.** *J Clin Oncol*, 28(16):2682-2689, 2010.

WANDZIOCH E et al. **Activation of the MAP kinase pathway by c-Kit is PI-3 kinase dependent in hematopoietic progenitor/stem cell lines.** *Blood*, 104(1):51-7, 2004.

WANG Q et al. **Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis.** *Proc Nat Acad Sci USA*, 93:3444-3449, 1996.

WEBB DK et al. **Relationships between age at diagnosis, clinical features, and outcome of therapy in children treated in the Medical Research Council AML 10 and 12 trials for acute myeloid leukemia.** *Blood*, 98(6):1714-20, 2001.

- WEINER HL; ZAGZAG D. **Growth factor receptor tyrosine kinases: cell adhesion kinase family suggests a novel signaling mechanism in cancer.** *Cancer Invest*, 18(6):544-54, 2000.
- WELLS RJ et al. **Prognostic variables in newly diagnosed children and adolescents with acute myeloid leukemia: Children's Cancer Group Study 213.** *Leukemia*, 16(4):601-7, 2002.
- WIEMELS JL et al. **In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia.** *Blood*, 99(10):3801-5, 2002.
- WIEMELS J. **Perspectives on the causes of childhood leukemia.** *Chem Biol Interact*, 196(3):59-67, 2012.
- WONG KF et al. **t(8;16)(p11;p13) predisposes to a transient but potentially recurring neonatal leukemia.** *Hum Pathol*, 39(11):1702-1707, 2008.
- WU X et al. **Spontaneous remission of congenital acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;13).** *Pediatr Blood Cancer*, 56(2):331-332, 2011.
- WWW.ENSEMBL.ORG. Acessado em Junho/2012.
- YAMAMOTO Y et al. **Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies.** *Blood*, 97(8):2434-9, 2001.
- YATSENKO Y et al. **NPM1, FLT3, and c-KIT mutations in pediatric acute myeloid leukemia in Russian population.** *J Pediatr Hematol Oncol*, 35(3):100-8, 2013.
- YOKOYAMA A et al. **Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression.** *Mol Cell Biol*, 24:5639–5649, 2004.
- YUAN Y et al. **AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations.** *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10398–10403, 2001.
- ZAGO MA; FALCÃO RP; PASQUINI R. **Hematopoese. Regulação e Microambiente.** Em: *Hematologia Fundamentos e Prática*. 2ª Reimp. 1ª ed. São Paulo, *Atheneu*, 15-73, 2004.

ZAKER F; MOHAMMADZADEH M; MOHAMMADI M. **Detection of KIT and FLT3 mutations in acute myeloid leukemia with different subtypes.** *Arch Iran Med*, 13(1):21-5, 2010.

ZHANG Y et al. **Genomic DNA breakpoints in AML1/RUNX1 and ETO cluster with topoisomerase II DNA cleavage and DNase I hypersensitive sites in t(8;21) leukemia.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:3070–3075, 2002.

ZHANG Y et al. **Disordered epigenetic regulation in MLL related leukemia.** *Int J Hematol*, 96:428–437, 2012.

ZUNA J et al. **Covert Preleukemia Driven by MLL Gene Fusion.** *Genes, Chromosomes; Cancer*, 48:98–107, 2009.

ZWAAN CM 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*, 99(1):245-251, 2002.

ZWAAN CM et al. **FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance.** *Blood*, 102(7):2387-94, 2003.

10. ANEXOS

10.1. ANEXO A. Instituições participantes do projeto com o envio de amostras dos casos de LMA pediátrica.

| Instituição | Número de amostras enviadas |
|---|-----------------------------|
| ÁGAPE INSTITUTO MÉDICO CUIABÁ - MT | 2 |
| CENTRO DE TRATAMENTO FABIANA DE MORAES, SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - SP | 2 |
| FUNDAÇÃO PIO XII - HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS - SP | 1 |
| HEMORIO - INSTITUTO DE HEMATOLOGIA - RJ | 1 |
| HOSPITAL AMARAL CARVALHO, JAÚ - SP | 26 |
| HOSPITAL ARAÚJO JORGE - ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS -GO | 14 |
| HOSPITAL ARISTIDES MALTEZ - ONCO-PEDIATRIA, SALVADOR - BA | 7 |
| HOSPITAL BOM JESUS - ISPON, PONTA GROSSA - PR | 1 |
| HOSPITAL DE APOIO - NÚCLEO DE ONCOLOGIA E HEMATOLOGIA PEDIÁTRICA - DF | 29 |
| HOSPITAL DE CLÍNICAS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - CURITIBA - PR | 2 |
| HOSPITAL DO AÇÚCAR E ÁLCOOL, MACEIÓ - AL | 8 |
| HOSPITAL DOS SERVIDORES DO ESTADO - HSE - RJ | 4 |
| HOSPITAL INFANTIL DARCY VARGAS - SP | 2 |
| HOSPITAL INFANTIL JOANA DE GUSMÃO, FLORIANÓPOLIS - SC | 7 |
| HOSPITAL MARTAGÃO GESTEIRA, SALVADOR - BA | 29 |
| HOSPITAL NAPOLEÃO LAUREANO, JOÃO PESSOA - PB | 17 |
| HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE, CURITIBA -PR | 1 |
| HOSPITAL REGIONAL DE MATO GROSSO DO SUL ROSA PEDROSSIAN - CETOHI-HRMS - MS | 27 |
| HOSPITAL SANTA CASA DE MISERICORDIA DE GOIÂNIA - GO | 1 |
| HOSPITAL SANTA IZABEL - SCM, SALVADOR - BA | 20 |
| HOSPITAL SANTA MARCELINA, SÃO PAULO - SP | 6 |
| HOSPITAL SÃO MARCOS - ASSOCIAÇÃO PIAUIENSE DE COMBATE AO CÂNCER – APCC - PI | 5 |
| HOSPITAL SÃO RAFAEL, SALVADOR - BA | 18 |
| HOSPITAL SARINA ROLIN, SOROCABA - SP | 13 |
| HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ALCIDES CARNEIRO, CAMPINA GRANDE - PB | 9 |
| HOSPITAL UNIVERSITÁRIO OSWALDO CRUZ – CEON, RECIFE - PE | 3 |
| INSTITUTO DA CRIANÇA - PROF PEDRO DE ALCANTARA – USP - SP | 1 |
| INSTITUTO DE HEMATOLOGIA DA PARAÍBA - PB | 1 |
| INSTITUTO DE ONCOLOGIA PEDIÁTRICA - IOP/GRAAC - SP | 1 |
| INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA - RJ | 9 |
| SANTA CASA - HOSPITAL MANOEL NOVAES, ITABUNA - BA | 10 |
| SANTA CASA DE BELO HORIZONTE - MG | 5 |

10.2. ANEXO B. Ficha de encaminhamento dos pacientes preenchida através do 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 | |

10.3. ANEXO C. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INCA, número de protocolo #186.688.



INSTITUTO NACIONAL DE
CÂNCER/ INCA/ RJ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 05241112.5.1001.5274

Instituição Proponente: Coordenação de Pesquisa

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 186.688

Data da Relatoria: 18/02/2013

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203

Bairro: CENTRO

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

CEP: 20.231-092

Telefone: (21)3207-4550

Fax: (21)3207-4556

E-mail: cep@inca.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
CÂNCER/ INCA/ RJ



Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apresentadas nos Pareceres Consubstanciados precedentes foram adequadamente respondidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

RIO DE JANEIRO, 18 de Janeiro de 2013

Assinador por:
Carlos Henrique Debenedito Silva
(Coordenador)

10.4. ANEXO D. Modelo do laudo liberado com os resultados gerados pelo laboratório do Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricos, Centro de Pesquisa, INCA.



Ministério
da Saúde



CENTRO DE PESQUISA- CPq PROGRAMA DE HEMATOLOGIA-ONCOLOGIA PEDIATRICOS

| | | | |
|---------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------|
| Nº Exame: | Tipo de Exame: | Data da Entrada: | |
| Paciente: | | Idade: | Sexo: |
| Procedência: | | | |
| Médico: | | | |
| Material: | | Data do envio da amostra: | |

I - ANÁLISE MORFOLÓGICA:

II - ANALISE IMUNOFENOTÍPICA:

Método: Citometria de Fluxo/ FACSCalibur-BD;

Viabilidade da Amostra: %

II.1 - MARCAÇÃO CD45

II.2 - MARCADORES ANTIGÊNICOS CITOPLASMÁTICOS

| <i>Marcador e Especificidade</i> | % | Resultados |
|----------------------------------|---|------------|
|----------------------------------|---|------------|

II.3 - MARCADORES ANTIGÊNICOS DE MEMBRANA

| <i>Marcador e Especificidade</i> | % | Resultados* |
|----------------------------------|---|-------------|
|----------------------------------|---|-------------|

(*) CONCLUSÃO DA CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA*:

(*) Os resultados mencionados foram obtidos utilizando a estratégia de análises nas regiões de aquisição, cujas células apresentam na superfície da membrana, uma baixa expressão de CD45, ou seja, células BLÁSTICAS. [Ref. Bene Mc ET al., Leukemia,1995;9:1783-86]

CONCLUSÃO FINAL:

OBSERVAÇÃO:

ASSISTÊNCIA TÉCNICA:

Dra. Eugênia Terra Granado Pina, CRBM 16948
Dr. Leandro de Souza Thiago, CRBM 17053

RESPONSÁVEL: Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira, CRM 52 21876-0

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

RAS mutations in early age leukaemia modulated by NQO1 rs1800566 (C609T) are associated with second-hand smoking exposures

BMC Cancer 2014, **14**:133 doi:10.1186/1471-2407-14-133

Francianne Gomes Andrade (fandrade@inca.gov.br)
Juliana Montibeller Furtado-Silva (julianamfs@yahoo.com.br)
Bruno Alves Gonçalves (baguiar@inca.gov.br)
Luiz Claudio Thuler (lthuler@inca.gov.br)
Thayana Conceição Barbosa (tbarbosa@inca.gov.br)
Mariana Emerenciano (memerenciano@inca.gov.br)
André Siqueira (amsiqueira@gmail.com)
Maria S Pombo-de-Oliveira (mpombo@inca.gov.br)

ISSN 1471-2407

Article type Research article

Submission date 2 July 2013

Acceptance date 17 February 2014

Publication date 26 February 2014

Article URL <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/14/133>

Like all articles in BMC journals, this peer-reviewed article can be downloaded, printed and distributed freely for any purposes (see copyright notice below).

Articles in BMC journals are listed in PubMed and archived at PubMed Central.

For information about publishing your research in BMC journals or any BioMed Central journal, go to

<http://www.biomedcentral.com/info/authors/>

© 2014 Andrade *et al.*

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited.

***RAS* mutations in early age leukaemia modulated by *NQO1* rs1800566 (C609T) are associated with second-hand smoking exposures**

Francianne Gomes Andrade¹
Email: fandrade@inca.gov.br

Juliana Montibeller Furtado-Silva^{1,2}
Email: julianamfs@yahoo.com.br

Bruno Alves de Aguiar Gonçalves¹
Email: baguiar@inca.gov.br

Luiz Claudio Santos Thuler³
Email: lthuler@inca.gov.br

Thayana Conceição Barbosa¹
Email: tbarbosa@inca.gov.br

Mariana Emerenciano¹
Email: memerenciano@inca.gov.br

André Siqueira⁴
Email: amsiqueira@gmail.com

Maria S Pombo-de-Oliveira^{1*}
* Corresponding author
Email: mpombo@inca.gov.br

Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukaemia

¹ Paediatric Haematology-Oncology Program, Research Centre, Instituto Nacional de Câncer - INCA, Rua André Cavalcanti, 37, Rio de Janeiro/RJ 20231-050, Brasil

² Great Ormond Street Hospital, London, United Kingdom

³ Clinical Research Program, Research Centre, Instituto Nacional de Câncer, INCA, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brazil

Abstract

Background

Deregulation of the MAPK genes signalling caused by somatic mutations have been implied in leukaemia pathogenesis, including *RAS* mutation (*RAS*^{mut}) in acute myeloid leukaemia (AML), which has been associated with intra-uterine chemical exposures. A case-case study was conducted in order to explore maternal and child exposures to tobacco smoking associations with early age leukaemia (EAL).

Methods

Covariables of reference were *MLL* rearrangements (*MLL-r*), *RAS*^{mut} and *NQO1* rs1800566 (C609T). Samples from 150 acute lymphoblastic leukaemia (ALL) and 85 AML were included. Maternal exposures were assessed using a structured questionnaire with demographic, personal habits and residence history information. Restriction fragment length polymorphism and denaturing high performance liquid chromatography were used to screen *FLT3*, *KRAS*, and *NRAS* mutations; direct sequencing was performed to validate the results. *NQO1* polymorphism was detected by real-time allelic discrimination technique.

Results

Overall, *RAS*^{mut} were detected in 28.7% of EAL cases; *BRAF*^{mut} was found only in one AML patient. Higher rate of *KRAS*^{mut} was found in ALL (30.3%) compared to AML (20.8%) with *MLL-r*; *RAS*^{mut} showed an association with second-hand tobacco smoking exposures (OR, 3.06, 95%CI, 1.03-9.07). A considerable increased risk for EAL with the combination of *RAS*^{mut} and *NQO1* 609CT (OR, 4.24, 95%CI, 1.24-14.50) was observed.

Conclusions

Our data demonstrated the increased risk association between maternal smoking and EAL with *MLL-r*. Additionally, suggests that children second-hand tobacco exposures are associated with increased risk of EAL with *RAS*^{mut} modulated by *NQO1* rs1800566 (C609T).

Keywords

RAS mutation, NQO1, MLL, Tobacco smoking exposures, Childhood leukaemia

Background

Leukaemia that occurs in early childhood consists of one of the best models to study gene-environment exposures interactions because of the leukaemia-associated somatic mutations, the short time-frame between the environmental exposure to putative risk factors, and the clinical onset of the disease. The knowledge of leukaemogenic pathways in early age leukaemia (EAL) has improved since the consistently identified somatic gene mutations occurring during in utero life such as *MLL* rearrangements (*MLL-r*) and *ETV6-RUNX1* fusion genes [1]. These somatic mutations might be related to the effects of error in cellular

differentiation during the early life, modulated by some inherited susceptibility factors [2,3]. Environmental exposures with reproducible findings and their biological plausibility add insights into the cause of childhood leukaemia.

A variety of chemical carcinogens as cigarette smoke, hydrocarbons, medications, and methylnitrosurea [4-6] have been shown to induce mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway mutations in both human and animal models [6]. Deregulated MAPK signalling is commonly found in cancer cells and is often caused by mutations in *FLT3*, *RAS* family, *PTPN11*, and *BRAF*, which result in constitutive activation of pathway [7,8]. Mutations in *FLT3*, *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* genes have been observed with variable prevalence (5-20%) in acute myeloid (AML) and lymphoblastic leukaemias (ALL) [9-16]. Very few investigations addressed questions regarding the associations between *FLT3*, *RAS* family mutations, and parental smoking exposures in the childhood leukaemia pathogenesis [12,17,18]. The tobacco smoke content, besides nitrogen and oxygen, include toxic gases such as carbon monoxide, formaldehyde, hydrogen cyanide, acrolein, nitrogen oxides, toluene and phenolic substances that are classified as carcinogenic [19].

Additionally, some of these substances contain chemical compounds, which are substrates for the detoxification enzyme NAD(P)H: quinone oxidoreductase (*NQO1*), a flavoenzyme that detoxifies benzene metabolites, quinones, and other topoisomerase II inhibitors. The *NQO1* gene polymorphism has been associated with smoking and acute leukaemia. A study conducted in Japanese patients demonstrated that individuals with *NQO1* 609TT had a 7.6 higher risk to develop acute leukaemia [20]. In a more recent study we have observed that children with at least one *NQO1* rs1800566 (C609T) variant allele were at lower risk for developing infant AML, whereas no association was detected for ALL [21]. We have also investigated whether maternal tobacco smoking during pregnancy and lactation were associated with EAL. The association was restricted to women that reported to have smoked 20 or more cigarettes per day [22].

The aim of this study was to evaluate the association of *KRAS*, *NRAS*, *FLT3*, and *BRAF* gene mutations with EAL and also to explore whether parental smoking would be associated with acute leukaemia modulated by *NQO1* rs1800566 polymorphism.

Methods

Study population and samples

Diagnostic samples from 235 Brazilian children with acute leukaemia (ALL or AML) aged ≤ 24 months were selected for molecular analyses depending upon availability of biological material. Cases were included when the diagnostic material had good-quality DNA isolated from bone marrow aspirates with at least 50% of blast cells [23-25].

Cases were diagnosed according to morphology, immunophenotyping, and molecular characterization. The exclusion criteria were patients with clinical phenotypes resulting from genetic syndromes (Down, Ataxia Teleangectasia, Noonan, chromosome 7 monosomy) and/or acute leukaemia with biological material $\leq 49\%$ of blast cells. The absence of a confirmed diagnosis and inaccessibility to the biological mother were also exclusion criteria for study enrolment.

All co-participants approved the study according to Brazilian National Research and Ethics Committees (CONEP) followed by the Instituto Nacional de Câncer Research and Ethics Committees (CEP) under the registry: (CEP #005/06, Multi-institutional Study of Infant Leukemia: Contribution of Immunomolecular Markers in Distinguishing Different Etiopathogenic Factors); and CEP #024/10-CONEP #707/2010: Genomic study of infant leukemia with MLL rearrangements). Written consent was obtained from the parents for both polymorphisms and maternal questionnaire procedures.

RNA and DNA extraction

RNA was purified using TRIZOL reagent (Invitrogen, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized applying the transcriptase reverse enzyme. The cDNAs quality was verified throughout *GAPDH* gene amplification. The DNA extraction was performed using the QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for identifying fusion genes

All patients diagnosed with one of the childhood ALL or AML subtypes were screened for common genetic abnormalities (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1*, *AML1-ETO*, *CBF β -MYH11*, *PML-RAR α*) according to the BIOMED-1 Concerted Action [26].

MLL rearrangements

RT-PCR was performed to identify the more common fusion transcripts of *MLL* gene (*AFF1/AF4*, *MLLT3/AF9*, *MLLT1/ENL*, *MLLT10/AF10*, and *ELL*), according to methods previously described [27]. For patients younger than 12 months, an extended detection of *MLL-r* was performed with fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with a commercial DNA probe (LSI MLL Dual Colour Break Apart Rearrangement Probe, Vysis Inc. IL, USA) according to manufacturer's instructions.

RAS gene amplifications and detection of mutations

Codons 12 and 13 of *KRAS* and *NRAS* genes were amplified of genomic DNA according to methods described by Bornholdt *et al.* and Liang *et al.*, respectively [10,28]. Both PCR reactions were carried out on a GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Controller (Applied Biosystems, Foster City, CA). Two different techniques were used to detect point mutations of *K-* and *N-RAS*:

1- For *KRAS* amplification, the cycling conditions followed the conditions of denaturation at 94°C for 1 min, taken through 35 cycles at 94°C for 30 sec, 60°C for 45 sec, 72°C for 45 sec; and a final incubation at 72°C for 10 min. All PCR products were visualized using a 1.5% agarose gel and ethidium bromide staining. The restriction fragment length polymorphism (RFLP) was performed to detect *KRAS* mutations. For codon 12, 5–16 μ l of PCR product were treated with the restriction enzyme *BstNI* (Biolabs, New England, UK); PCR products of codon 13 were treated with *PfIMI*. The digested PCR fragments were visualized on a 3% agarose gel. Two types of negative controls were used: blank reaction without DNA addition and amplification reaction with DNA from a healthy person. For positive controls, in the

codon 12 assay, sample from a juvenile myelomonocytic leukaemia which contains a homozygous GGT → AGT mutation was used; for codon 13, the MDA-MB231 cell line with a heterozygous GGC → GAT mutation was used.

2- Denaturing high-pressure liquid chromatography (dHPLC) was used to screen *NRAS* mutations by using a Transgenomic Wave machine (Transgenomic, NE, UK). The PCR assay was performed using 70-100 ng of genomic DNA with 0,625U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1x PCR buffer (50 mM KCl, 20nM Tris-HCl pH 8,4); 1,5 mM MgCl₂; dNTPs 0,2 mM and 0.4 μM each forward and reverse primer. PCR amplification with the protocol of initial preheating at 94 °C for 5 min, 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 57°C for 1 min, and 72°C for 1 min; and a final extension at 72°C for 10 min. The fragments were visualized on a 1.5% agarose gel staining with ethidium bromide. Prior to dHPLC analysis these products were denaturated at 95°C for 5 min and subsequently cooled down using a temperature's gradient until 50°C using a thermal cycler. Forty μL of the PCR product were injected into the DNASep HT column for analysis. The products were eluted at a flow rate constant of 1,5 mL/min with a linear gradient of acetonitrile and annealing profiles for PCR products were determined by the Navigator software (Transgenomic, NE, UK) based on the size and GC content of the amplicons.

Finally, mutations found in *K-* and *N-RAS* throughout both methods (RFLP and DHPLC) were confirmed by DNA sequencing according to manufacturer's instructions (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, CA, USA) in the ABI3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) as previously described [28].

Mutation detection of *BRAF* gene

Detection of mutations of *BRAF* gene was performed using pyrosequencing (PSQ), which is based on 'sequencing by synthesis' principle [29]. PCR reaction using the PyroMark Q24 BRAF Kit (Qiagen, CA, USA) allowed the amplification of exons 11 and 15 of the gene. The biotinylated PCR products was immobilized onto streptavidin-coated sepharose beads (Amersham Biosciences, NJ, USA) and processed to obtain a single strand DNA through the PyroMark Q24 Vacuum Prep Workstation (Qiagen, CA, USA). The strands were separated using 0.1 mol/l NaOH. The supernatant was then discarded and 0.3 μM of the PSQ primer added annealed to the captured strand and incubated at 80°C for 2 minutes on the PSQ plate. The biotinylated DNA with annealed sequence primer was released from the streptavidin surface according to the manufacturer's instructions (Qiagen, CA, USA). The primed single-stranded DNA templates were subjected to real-time sequencing of the region surrounding codons 464–469 in exon 11 and codon 600 in exon 15. The optimal nucleotide dispensation order was determined by assessing the theoretical outcome of a number of dispensation orders. Identified mutations were confirmed by PSQ of an independent PCR [30].

Screening of *FLT3* alterations

The presence of *FLT3* mutations were screened according to methods previously described [31]. *FLT3* D835 point mutations were detected by genomic amplification of *FLT3* exon 17 and further digestion with *EcoRV* enzyme. PCR products were separated by electrophoresis in agarose gel stained with ethidium bromide. *FLT3* internal tandem duplication (ITD) was screened by amplification of the juxtamembrane domain in exons 11 and 12 and further visualized in 3% agarose gel. Samples with altered pattern and available biological material were also sequenced.

***NQO1* Genotyping**

The EAL potential risk association with *NQO1*C609T genotypes were previously investigated in a case–control study [21], in which, a control group of selected children without malignancies, from the same regions as the cases were age-matched. *NQO1* rs1800566 (C609T) polymorphism was detected by allelic discrimination using TaqMAN® probes (TaqMAN® SNP Genotyping Assays; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the BioRad C1000 Thermal Cycler (CFX96 Real Time System). The primer/probe system and the reaction protocol used are described elsewhere [21].

Collection of information and assessment of smoking exposure

Cases were assessed throughout the study [Multi-institutional Study of Infant Leukemia: Contribution of Immunomolecular Markers in Distinguishing Different Etiopathogenic Factors] that focuses on the investigation of EAL [22,23]. Participants were ascertained from different Brazilian regions (shown in Additional file 1: Table S1) from January 2000 to December 2010. Exposure information was obtained with the aid of a well-structured questionnaire throughout face-to-face interview with case and control mothers, after signing a written informed consent. Briefly, the mother's questionnaires included questions about family income, maternal age, education level, illness previous history, medications use, occupation, personal recreate habits, and the child's birth characteristics. The exposure assessment regarding smoking was first determined by the qualitative analysis (yes/no) during the three months before the index pregnancy, the three trimesters of the pregnancy, as well as, after birth during the breastfeeding period. Regarding the affirmativeness of maternal smoking antecedents and /or other person living at home, additional information were included, such as, the usual amount of daily smoked cigarettes during preconception, pregnancy and breastfeeding. Usual smoking frequency at these time windows were also collected as: no primary hand smokers; moderate smokers as less than 20 smoked cigarettes per day; and heavy smokers as 20 or more smoked cigarettes per day [22].

Statistical analyses

The design is a case-case study in which ALL were compared with AML according to distribution of gene mutations, age at onset of the disease, parental's demographics and maternal exposures to tobacco smoking. The Pearson's chi-square and Fisher exact tests and child profile were used to assess differences in discrete variables. Crude and adjusted odds ratio (OR) and their 95% confidence intervals (CI) for selected variables (age, gene mutations, leukaemia subtype) were assessed using unconditional logistic regression in order to estimate the magnitude of associations. Association tests between biological variables and parental smoking habits before, during and after pregnancy were performed. The *NQO1* status was considered as at least one T allele variant for analysis [21].

Following previous studies exploring the association of different variables with the occurrence of paediatric leukaemia [17], a multivariable log-linear model was built including the variables *RAS* mutation, *NQO1*609CT, presence of *MLL-r* and presence of smoker within the household (SMOKER) and two-by-two interaction terms between them. Full log-linear model: $\text{Log}(\text{count}) = a + b_1(\text{Var1}) + \dots + b_4(\text{Var4}) + c_1(\text{Var1} * \text{Var2}) + c_2(\text{Var1} * \text{Var3}) + c_3(\text{Var1} * \text{Var4}) + d_1(\text{Var2} * \text{Var3}) + d_2(\text{Var2} * \text{Var4}) + e_1(\text{Var3} * \text{Var4})$. A sub model without each of the interaction terms was compared to the full model containing all the pairwise interactions by performing the log-likelihood test and generating a P- value,

allowing testing if the pairwise associations between the variables was relevant in the study population. The log-linear analysis is an extension of the Pearson's χ^2 test, consisting of an additive part of each variable main effects combined with the pairwise multiplicative interaction terms. For all analyses, the p values <0.05 were considered statistically significant.

An estimate of overall survival (OS) was determined using the Kaplan–Meier and log rank tests in order to verify the association of RAS^{mut} and RAS wild-type (RAS^{wt}) in the children outcome. Patients lost to follow-up were censored at their date of last known contact. The statistical Software SPSS Version 18.0 was used (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Results

Clinical characteristics of the study population

The demography and clinical characteristics of EAL are shown in Table 1. There were 150 ALL and 85 AML patients. The majority of them were infants (≤ 12 months) and the median age at diagnosis was 11 months; with slight predominance of male, although without statistical significance. The difference of proportion of children with very high white blood cell (WBC) count was statistically significant ($p = 0.014$); with ALL cases presenting very high WBC count compared to AML. Regarding immunophenotype, ALL cases were mainly pro-B (CD10-) subtype, whereas the myelomonocytic differentiated leukaemia subtype (FAB M4-M5) was present in 63.2% of the AML (data not shown).

Table 1 Demography and clinical characteristics of early age acute leukaemia subtypes, Brazil, 2000-2010

| | Total, n(%) | ALL (%) (n = 150) | AML (%) (n = 85) | P |
|-------------------------------------|-------------|----------------------|------------------------|-------|
| Age (months) | | | | |
| ≤12 | 120 (51.1) | 82 (54.7) | 38 (44.7) | 0.14 |
| 13-24 | 115 (48.9) | 68 (45.3) | 47 (55.3) | |
| Gender | | | | |
| Male | 131 (55.7) | 78 (52.0) | 53 (62.4) | 0.12 |
| Female | 104 (44.3) | 72 (48.0) | 32 (37.6) | |
| Skin colour | | | | |
| White | 139 (59.9) | 92 (61.7) | 47 (56.6) | 0.44 |
| Non-White | 93 (40.1) | 57 (38.3) | 36 (43.4) | |
| WBC (x10⁹/L) | | | | |
| ≤50 | 106 (46.5) | 59 (40.4) | 47 (57.3) | 0.01 |
| >50 | 122 (53.5) | 87 (59.6) | 35 (42.7) | |
| Chromosomal alterations | | | | |
| <i>MLL</i> ¹ | 102 (77.3) | 73 (78.5) | 29 (74.4) | 0.006 |
| <i>ETV6-RUNX1</i> | 7 (5.3) | 7 (7.5) | 0 (0.0) | |
| Hyperdiploidy | 6 (4.5) | 6 (6.5) | 0 (0.0) | |
| Others | 17 (12.9) | 7 (7.5) ^a | 10 (25.6) ^b | |
| RAS^c | | | | |
| Wild-type | 175 (74.5) | 105 (70.0) | 70 (82.4) | 0.03 |
| Mutated | 60 (25.5) | 45 (30.0) | 15 (17.6) | |
| BRAF | | | | |
| Wild-type | 124 (99.2) | 61 (100.0) | 63 (98.4) | 1.00 |
| Mutated | 1 (0.8) | 0 (0.0) | 1 (1.6) | |
| FLT3 | | | | |
| Wild-type | 148 (93.1) | 88 (91.7) | 60 (95.2) | 0.52 |
| Mutated | 11 (6.9) | 8 (8.3) | 3 (4.8) | |
| NQO1 (rs1800566)^d | | | | |
| CC | 97 (54.2) | 67 (53.6) | 30 (55.6) | 0.91 |
| CT | 70 (39.1) | 50 (40.0) | 20 (37.0) | |
| TT | 12 (6.7) | 8 (6.4) | 4 (7.4) | |

^a Four pre-B ALL cases presenting the fusion transcript *TCF3-PBX1*, one pre-B ALL case presenting the cytogenetics t(2;14)(p10;q23), one pre-B ALL case presenting the cytogenetics t(5;15)(q12;q13) and one common ALL case presenting complex karyotype. ^b One M4-AML presenting *RUNX1-RUNX1T1* fusion transcript. Five M4-AML cases presenting *CBFB-MYH11* fusion transcript. One M3-AML presenting *PML-RARα* fusion transcript. One M0-AML, one M7-AML case and one AML case not otherwise specified presenting complex karyotype. AML subtypes according to FAB classification; ^c Mutations in either *KRAS* or *NRAS*. ^d Genotype frequencies of *NQO1* polymorphism. ALL: acute lymphoblastic leukaemia; AML: acute myeloid leukaemia; n: number of cases; WBC: white blood cell; *MLL*¹: rearranged *MLL*.

In 102 out of 138 cases (73.9%) the presence of an *MLL-r* could be detected; the *MLL* status indeterminate category includes those with insufficient biological material (n, 24); the remaining 109 cases had the *MLL* status defined as negative. Somatic chromosomal aberrations, such as hyperdiploidy (n, 10), translocation with the fusion transcript *ETV6-RUNX1* (n, 7) *TCF3-PBX1* (n, 4), t(2;14)(p10;q23) and t(5;15)(q12;q13) and complex karyotype (n, 3) were found in ALL cases older than 12 months of age at the diagnosis. *RUNX1-RUNX1T1* and *CBFβ-MYH11* fusion transcripts were found in 6 AML cases; one child with AML-M3 presented *PML-RARα* fusion transcript.

MAPK gene mutations in EAL

RAS mutations were found in 60 (25.5%) of the acute leukaemia cases, whereas *FLT3* mutations were found in 11 patients (6.9%) predominantly among ALL and not statistically significant. One hundred twenty-five cases were successfully analysed for *BRAF* mutations and only one AML case harboured a mutation located at c.1799 T > A (V600E). Concurrent mutations in *FLT3* and *RAS* in the same patient were detected in six patients; two of these cases harboured an *MLL-AFF1* fusion gene. The demographic characteristics and the distributions of *KRAS*, *NRAS*, and *FLT3* mutations were not statistically different according to age strata (shown in Additional file 2: Table S2). *KRAS* mutations (*KRAS^{mut}*, n = 47) represented 20.0% and *NRAS* (n, 14) 16.1%. While *FLT3* mutations (n, 11) were equally distributed in infants and children older than 12 months, *KRAS^{mut}* was strongly associated with age less than 12 months and *MLL-r* (p = 0.001), as shown in Additional file 3: Table S3.

We have tested acute leukaemia subtypes associated with *MLL-r* and the frequencies of *RAS* and *FLT3* mutations in EAL (Additional file 4: Table S4). *KRAS^{mut}* were detected in 28.6% of patients with infant B-precursor ALL harbouring *MLL-r* and in 20.7% of patients with AML and *MLL-r*. The association of *KRAS^{mut}* and *MLL-r* was OR, 2.16, 95%CI, 1.07-4.38; children with AML were more prone to have *MLL-r* with *KRAS^{mut}*, although not statistically significant. The frequencies in *FLT3* mutations (n, 3) in ALL and in AML (n, 2) were not significant to be included in further analysis. Only one case presented a *BRAF* mutation, demonstrating that is a rare alteration in EAL.

The OS analysis showed no differences between the *RAS^{mut}* and *RAS^{wt}* among ALL and AML according to patient age at diagnosis (Additional file 5: Figure S1). *RAS^{mut}* cases presented a poorer median survival outcome (14.0 months, 95%CI, 4.01-23.93 for patients aged ≤12 months and 24.6 months, 95% CI, 0–72.46 for patients aged 13–24 months) in ALL (Additional file 5: Figure S1A and C) similar to *MLL-r* as a single genetic aberration in ALL cases (12.2 months, 95% CI, 2.63-21.77 and 41.0 months, 95%CI, 2.34-79.73), shown in Additional file 5: Figure S1B and D. Among AML cases, the combination of *RAS^{mut}* and *MLL-r* showed a similar poorer outcome; high OS for *RAS^{mut}* cases presenting *MLL* wild type (*MLL^{wt}*) was also found (Additional file 5: Figure S1E and F).

***NQO1* gene polymorphism**

The distributions of the *NQO1* rs1800566 (C609T) allele frequencies in early age ALL and AML are shown in Table 1 and the frequency association between *RAS* mutations and *NQO1* rs1800566 (C609T) genotype are presented in Additional file 6: Table S5. There was an association with *NQO1*T609T and *RAS* mutation (OR, 1.60 95%CI 0.47-5.44) without statically significance. The association of *NQO1* 609CT, *RAS* and *MLL* status in these settings of childhood leukaemia were further tested and results are presented in Additional

file 7: Table S6. The effect of at least one *NQO1* rs1800566 (C609T) variant presented an increased risk association with ALL with *MLL-r*, although not statistically significant ($p = 0.09$).

Maternal exposures to tobacco smoking and *RAS* mutation

Information on the lifelong length of tobacco exposure, smoking during pregnancy and second-hand smoking were obtained and reported previously; no dose–response effect was found [22]. The cohort with the addition of molecular markers was re-visited. Analysis of demographic and clinical distribution of cases according to available data from mother interview showed no statistical differences between variables (Additional file 1: Table S1);

the risk association of tobacco smoking exposure during pregnancy, with the *RAS* status, *NQO1* polymorphism, and EAL with *MLL-r* are shown in Table 2. Maternal tobacco smoking ever smoked, maternal smoked 3 months before and, maternal smoked during the index pregnancy were increased associated with *MLL-r* (OR, 2.90, 95%CI, 1.09-7.71).

Table 2 The risk of association of smoking exposures during pregnancy with *RAS* status, *NQO1* and *MLL* rearrangements, EAL cases, in a case-case analysis Brazil, 2000-2010

| | <i>RAS</i> ^{wt} n (%) | <i>RAS</i> ^{mut} n (%) | OR (95%CI) | <i>NQO1</i> ^{wt} n (%) | <i>NQO1</i> ^{mut} n (%) | OR (95%CI) | <i>MLL</i> ^{wt} n (%) | <i>MLL</i> ^{mut} n (%) | OR (95%CI) |
|---|-----------------------------------|------------------------------------|------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------|
| Mother ever smoked | | | | | | | | | |
| No | 55 (65.5) | 24 (60.0) | 1 ^b | 39 (57.4) | 40 (71.4) | 1 ^b | 45 (76.3) | 30 (52.6) | 1 ^b |
| Yes | 29 (34.5) | 16 (40.0) | 1.26 (0.58-2.75) | 29 (42.6) | 16 (28.6) | 0.54 (0.25-1.14) | 14 (23.7) | 27 (47.4) | 2.89 (1.31-6.40) |
| Mother smoked 3 months before pregnancy | | | | | | | | | |
| No | 59 (70.2) | 28 (70.0) | 1 ^b | 44 (64.7) | 43 (76.8) | 1 ^b | 48 (81.4) | 34 (59.6) | 1 ^b |
| Yes | 25 (29.8) | 12 (30.0) | 1.01 (0.44-2.30) | 24 (35.3) | 13 (23.2) | 0.55 (0.25-1.23) | 11 (18.6) | 23 (40.4) | 2.95 (1.27-6.85) |
| Mother smoked during pregnancy | | | | | | | | | |
| No | 67 (79.8) | 31 (77.5) | 1 ^b | 52 (76.5) | 46 (82.1) | 1 ^b | 52 (88.1) | 41 (71.9) | 1 ^b |
| Yes | 17 (20.2) | 9 (22.5) | 1.14 (0.46-2.85) | 16 (23.5) | 10 (17.9) | 0.71 (0.29-1.71) | 7 (11.9) | 16 (28.1) | 2.90 (1.09-7.71) |
| Someone in the house ever smoked^c | | | | | | | | | |
| No | 46 (59.0) | 16 (42.1) | 1 ^b | 38 (62.3) | 24 (43.6) | 1 ^b | 30 (53.6) | 29 (53.7) | 1 ^b |
| Yes | 32 (41.0) | 22 (57.9) | 1.98 (0.90-4.34) | 23 (37.7) | 31 (56.4) | 2.13 (1.02-4.49) | 23 (46.4) | 25 (46.3) | 1.00 (0.47-2.11) |

^a *NQO1* genotype status included allele variants CT and TT. ^b 1 as a reference. ^c Mothers reported the presence of someone smoking at home during the index pregnancy (second-hand smoking). *MLL*^{wt}: Wild type *MLL*; *MLL*^{mut}: Rearranged *MLL*; n: number of cases; wt: wild type.

Moreover, 54 (45.5%) mothers reported the presence of someone smoking at home during the index pregnancy (second-hand smoking). No risk associations with mothers who ever smoked (before and/or during pregnancy) were observed with *RAS* status and *NQO1* polymorphism. However, an increased risk association was observed with *NQO1609CT* and the presence of someone smoking at home during the EAL pregnancy (OR, 2.13, 95%CI, 1.02-4.49).

The risk association of smoking exposures during pregnancy combining *NQO1* and *RAS* status was tested (Table 3). The presence of someone in the house who ever smoked (second-hand smoking) in children with EAL with *NQO1* wild-type /*RAS*^{mut} (OR, 3.06, 95%CI, 1.03-9.07); the association of second-hand smoking during pregnancy and children with *NQO1* rs1800566 (C609T) polymorphism increased 2.97 folds the risk of developing leukaemia (95%CI, 1.16-7.60); *RAS*^{mut} and the presence of at least one variant allele of *NQO1* rs1800566 (C609T) showed an increased risk developing leukaemia (OR, 4.24, 95%CI, 1.24-14.50). No associations were observed with *FLT3* mutations and maternal exposures (data not shown). The results of the multivariable log-linear model and to measure the association with selective variables shown in Table 4, confirmed the association of *RAS*^{mut} and second-hand smoking and the *NQO1* rs1800566 (C609T) polymorphism and second-hand smoking as EAL risk factors.

Table 3 The risk of association of smoking exposures during pregnancy, combining *NQO1* and *RAS* status, in a case-case analysis Brazil, 2000–2010

| | <i>NQO1</i> ^{wt} / <i>RAS</i> ^{wt} n (%) | <i>NQO1</i> ^{wt} / <i>RAS</i> ^{mut} n (%) | OR (95%CI) | <i>NQO1</i> 609CT ^{wt} / <i>RAS</i> ^{wt} n (%) | OR (95%CI) | <i>NQO1</i> 609CT ^{wt} / <i>RAS</i> ^{mut} n (%) | OR (95%CI) |
|---|---|--|------------------|---|------------------|--|-------------------|
| Mother ever smoked | | | | | | | |
| No (n,79) | 26 (57.8) | 13 (56.5) | 1 ^b | 29 (74.4) | 1 ^b | 11 (64.7) | 1 ^b |
| Yes (n,45) | 19 (42.2) | 10 (43.5) | 1.05 (0.38-2.90) | 10 (25.6) | 0.47 (0.19-1.20) | 6 (35.3) | 0.75 (0.24-2.38) |
| Mother smoked 3 months before pregnancy | | | | | | | |
| No (n,87) | 29 (64.4) | 15 (65.2) | 1 ^b | 30 (76.9) | 1 ^b | 13 (76.5) | 1 ^b |
| Yes (n,37) | 16 (35.6) | 8 (34.8) | 0.97 (0.34-2.77) | 9 (23.1) | 0.54 (0.21-1.42) | 4 (23.5) | 0.56 (0.16-2.00) |
| Mother smoked during pregnancy | | | | | | | |
| No (n,98) | 35 (77.8) | 17 (73.9) | 1 ^b | 32 (82.1) | 1 ^b | 14 (82.4) | 1 ^b |
| Yes (n,26) | 10 (22.2) | 6 (26.1) | 1.24 (0.39-3.97) | 7 (17.9) | 0.77 (0.26-2.25) | 3 (17.6) | 0.75 (0.18-3.14) |
| Someone in the house ever smoked^c | | | | | | | |
| No (n,62) | 28 (71.8) | 10 (45.5) | 1 ^b | 18 (46.2) | 1 ^b | 6 (37.5) | 1 ^b |
| Yes (n,54) | 11 (28.2) | 12 (54.5) | 3.06 (1.03-9.07) | 21 (53.8) | 2.97 (1.16-7.60) | 10 (62.5) | 4.24 (1.24-14.50) |

^a *NQO1* genotype status included allele variants CT and TT. ^b 1 as a reference. ^c Mothers reported the presence of someone smoking at home during the index pregnancy (second-hand smoking). N: number of cases; wt: wild-type; mut: mutation.

Table 4 Multivariable log-linear model and selective associations in leukaemia cases

| Measure of association terms | DF | χ^2 -value ^a | P-value ^b |
|---------------------------------------|----|------------------------------|----------------------|
| <i>RAS</i> * <i>NQO1</i> ^c | 1 | 1.11 | 0.29 |
| <i>RAS</i> * <i>MLL</i> | 1 | 0.15 | 0.70 |
| <i>RAS</i> *SMOKER | 1 | 4.61 | 0.03 |
| <i>NQO1</i> * <i>MLL</i> | 1 | 0.24 | 0.62 |
| <i>NQO1</i> *SMOKER | 1 | 4.84 | 0.03 |
| <i>MLL</i> *SMOKER | 1 | 0.12 | 0.73 |

^a χ^2 -value from the log-likelihood ratio test comparing the submodel without the interaction term with the full model. ^b P-value from the log-likelihood ratio test – Low values indicate that the interaction between the two variables are meaningful in the given population. ^c *NQO1* genotype status included allele variants CT and TT. SMOKER: Presence of any smoker in the household; DF: Degrees of Freedom.

Discussion

Childhood leukaemia is resultant of a multiple causation factors. The exogenous or endogenous exposures, the intrinsic susceptibility of the child given by single-nucleotide polymorphism may increase the chances of childhood leukaemia [3,8]. This unique study group comprises a series of EAL children with ALL and AML in which somatic mutations arise at the stem-cell level during fetal hematopoiesis [2,31]. EAL represents an epidemiological particular group, because transplacental exposures to DNA damaging substances is proposed to be associated with an increased risk of such leukaemias [23,32-34]. Very few studies have tested the association between smoking and the presence of selected genetic characteristics in childhood.

First of all, the analyses took into account the relatively high prevalence of MAPK mutations (mainly *RAS*^{mut} 25.5%) in these EAL settings associated with *MLL-r*. The prognostic value *RAS*^{mut} in childhood leukaemia with or without *MLL-r* was described and demonstrated the poor risk associations [10,32]. This effect was also demonstrated in the present setting, despite of week statistical power.

Albeit, the frequency of *KRAS*^{mut} is higher in patients aged ≤ 12 months with *MLL-r* than in patients with *MLL*^{wt}, few studies explored the association of *RAS*^{mut}, as a prenatal event in addition to *MLL-r* leukaemogenesis [35].

Previous studies suggest that *RAS*^{mut} may be associated with chemical exposures. A strong statistical association between *RAS*^{mut} and AML patients with prior exposures to chemotherapy and X-ray was described [9]. Mutagenic chemicals from maternal smoking cross the placenta enhancing the plausibility of an effect of parental tobacco smoking on childhood leukaemia risk [36]. Our data showed a strong association between *RAS*^{mut} and the presence of someone smoking in the house during the pregnancy or the early life of the child with acute leukaemia.

In a previous study, maternal tobacco smoking during pregnancy was reported by 17.5% of case mothers and 20.6% of controls and no association with ALL or AML was observed [22]. This null association between maternal smoking and EAL risk regardless the period of

exposure during pregnancy is consistent with the literature [37]. All analysed data were dependent on maternal report, which may have introduced incorrect exposure estimates, with some exposures possibly being under-reported [38]. It is important to remark that an increased risk association was observed with heavy smoker mothers. In these former studies, the presence of somatic RAS^{mut} and/or genetic susceptibility was not attempted to.

Someone in the house ever smoked, but mothers, is characterized by relatives such as husband, grandparents and/or nanny “smokers” living in the house and taking care of the child. The interpretation for this counter intuitiveness [first” hand smoke has no effect whereas second hand smoke does] would be considered (or implied) that some mothers might had denied being a smokers due to guilt. This is one pitfall of epidemiological studies based on questionnaire responses. Censored topics and variables such drug and/or tobacco users values are depending upon the commitment of different actors under social pressures. However, the biologic plausibility for the present findings is that cigar metabolites compounds carcinogens’ substances such phenols, formaldehyde, toluene and others co-carcinogens (catechol and related compounds), toxic agents (acrolein and other aldehydes) and free radical species (nitric oxide and others) that are spread in the air by the smokers are contaminants with DNA damage power. The carcinogenesis pathways of these substances have already been determined [19]. Metayer et al. have just published that children with history of paternal smoking combined with postnatal passive smoking were at 1.5 fold-increased risk of ALL [39]. Other factors such as genetic susceptibility that modulate the risk need to be considered.

Molecular epidemiology suggests that the risk conferred by gene variants have decreased the expression of specific products, but contribute to the intrinsic vulnerability of immature cells to initiate an abnormal clone. In this context, the polymorphism of *NQO1* gene involved in benzene activation and participating in benzoquinone detoxification and reactivating benzene intermediates, might contribute to outgrowth extrinsic effect in exposed cells [20]. *NQO1* rs1800566 heterozygous individuals (C/T) have intermediate enzyme activity, and homozygotes for the variant allele (T/T) are deficient in *NQO1* activity [40]. According to some studies (mainly of subjects of European white ancestry), lower *NQO1* activity was associated with an increased risk of infant ALL carrying *MLL/AFF1* fusion genes [41-44]. The differences in the distribution of *NQO1* rs1800566 (C609T) according to age strata in EAL and control groups in Brazilian settings were tested and the genetic susceptibility data regarding *NQO1* variants are described elsewhere [21]. In brief, an increased crude risk for *NQO1* C609T was detected in children older than 1 year, although this association lacked statistical significance (OR, 1.83, 95%CI, 0.82-4.06), whereas, a protective effect of the *NQO1* C609T variant was found for infants with *MLL* germ line acute leukaemia (OR, 0.36, 95%CI, 0.16-0.81) [21].

The observation that the combination of RAS^{mut} and *NQO1* variants showed a crescent association with the presence of someone smoking in the house suggests the synergistic effect of both genetic alterations contributing for leukaemogenesis. At such age strata, with a short postnatal life span of exposures, the importance of exploring gene mutations and environmental exposures is of paramount importance, because it allows to speculate that despite of the timing of tobacco smoked during pregnancy the dose-effect was modulated by genetic susceptibility with the potential of causing EAL. These results add evidence to our hypothesis that RAS^{mut} might be consequence of hazardous exposures in individual with genetic susceptibility.

The current investigation has some limitations, as consequence of case-case study in such rare disease. First, the reduced numbers of children with low frequency of maternal exposures make odds ratios unstable and may have incurred in insufficient statistical power to detect significant differences. Second, the selection of cases due to biological material available may have introduced selection bias. However, the comparison of the analysis of the biological samples from children with and without maternal interview was similar. Another weakness of our study that should be pointed out is the missing assess of parental occupational exposures that involve chemical substances such as dyes, polycyclic aromatic hydrocarbons, organic powder/industrial dust, in which, *KRAS*^{mut} was observed to be strongly associated.

On the other hand, the study presents strong points. At first, it allowed the collection of maternal data exposure to smoking in a very rare disease setting such as infant leukaemia and combines the results with somatic gene mutations and inherited predisposition via gene variant related to smoking exposure.

Finally, to our knowledge, this is the first study exploring the association between maternal exposure to tobacco smoking during pregnancy and *RAS* and *NQO1* polymorphism in EAL with *MLL-r*.

Conclusions

The present data demonstrated the increased risk association between maternal smoking and EAL with *MLL-r*. Additionally, suggests that second-hand tobacco smoking exposures are associated with increased risk of EAL with *RAS*^{mut} modulated by *NQO1* rs1800566 (C609T). The significant associations found here could guide the design of other etiological studies in childhood leukaemia, emphasizing the critical role of genetic susceptibility with somatic mutations in the mechanistic pathway leading to leukaemia in childhood.

Abbreviations

ALL, Acute lymphoblastic leukaemia; AML, Acute myeloid leukaemia; CI, Confidence intervals; dHPLC, Denaturing high-pressure liquid chromatography; EAL, Early age leukaemia; FISH, Fluorescence in situ hybridisation; ITD, Internal tandem duplication; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; *MLL-r*, *MLL* rearrangements; *MLL*^{wt}, *MLL* wild type; *NQO1*, Detoxification enzyme NAD(P)H: quinone oxidoreductase; OR, Odds ratio; OS, Overall survival; PSQ, Pyrosequencing; *RAS*^{mut}, *RAS* mutation; *RAS*^{wt}, *RAS* wild-type; RFLP, Restriction fragment length polymorphism; RT-PCR, Reverse transcriptase polymerase chain reaction; WBC, White blood cell

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

FGA, JMFS, BAAG and ME analyzed and interpreted the data and wrote the manuscript. FGA, JMFS, BAAG and TCB performed the laboratory work of this study. FGA, JMFS and

LCST participated in the statistical analysis. MSPO contributed to the conception and the design of the study, revised the article critically, and made the final approval of the version to be submitted. BCSGIAL contributed with samples. All authors' read and approved the final manuscript.

Authors' information

Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukaemia that contributed to the study as co-authors: Alessandra Faro¹, Camilla Andrade¹, Caroline Barbieri Blunck¹, Gisele M. Vasconcelos¹, Luna Bernstein¹, Sergio Koifman², Arnaldo Couto², Jennifer D. Ferreira², Isis Q. Magalhães³, Terezinha de Jesus Marques Salles⁴, Marcelo S. Santos⁵, Virginia Cóser⁶, Mara Pianovski.⁷

Affiliations:

¹Research Centre of Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil; ²Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; ³Hospital da Criança de Brasília José Alencar, Brasília, Brazil; ⁴Centro de Oncologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife, Brazil; ⁵Centro de Tratamento Onco Hematológico Infantil, Campo Grande, Brazil; ⁶Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, Brazil; ⁷Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil;

Acknowledgments

Fundings

MSPO is supported by CNPq research scholarship #309091/2007. The project was granted FAPERJ E-026/2008.

References

1. Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB, Greaves MF: **Backtracking leukemia to birth: Identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(25):13950–13954.
2. Greaves MF, Wiemels J: **Origins of chromosome Translocations in Childhood Leukaemia.** *Nat Rev* 2003, **3**(9):1–11.
3. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG: **Acute lymphoblastic leukaemia.** *Lancet* 2013, **381**(9881):1943–1955.
4. Shu XO, Perentesis JP, Wen W, Buckley JD, Boyle E, Ross JA, Robison LL, Children's Oncology Group: **Parental exposure to medications and hydrocarbons and ras mutations in children with acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004, **13**(7):1230–1235.
5. Porta M, Malats N, Jarrod M, Grimalt JO, Rifà J, Carrato A, Guarner L, Salas A, Santiago-Silva M, Corominas JM, *et al*: **Serum concentrations of organochlorine compounds and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. PANKRAS II Study Group.** *Lancet* 1999, **354**(9196):2125–2129.

6. Mangués R, Pellicer A: **Ras activation in experimental carcinogenesis.** *Semin Cancer Biol* 1992, **3**(4):229–239.
7. Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA: **Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention.** *Leukemia* 2003, **17**(7):1263–1293.
8. Case M, Matheson E, Minto L, Hassan R, Harrison CJ, Bown N, Bailey S, Vormoor J, Hall AG, Irving JA: **Mutation of gene affecting the RAS pathway is common in childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Cancer Res* 2008, **68**(16):6803–6809.
9. Barletta E, Gorini G, Vineis P, Miligi L, Davico L, Mugnai G, Ciolli S, Leoni F, Bertini M, Matullo G, *et al*: **RAS gene mutations in patients with acute myeloid leukaemia and exposure to chemical agents.** *Carcinogenesis* 2004, **25**(5):749–755.
10. Liang DC, Shih LY, Fu JF, Li HY, Wang HI, Hung IJ, Yang CP, Jaing TH, Chen SH, Liu HC: **K-RAS mutations and N-RAS mutations in childhood acute leukemias with or without mixed-lineage leukemia gene rearrangements.** *Cancer* 2006, **106**(4):950–956.
11. Balgobind BV, Hollink IH, Arentsen-Peters ST, Zimmermann M, Harbott J, Beverloo HB, von Bergh AR, Cloos J, Kaspers GJ, de Haas V, *et al*: **Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia.** *Haematologica* 2011, **96**(10):1478–1487.
12. Perentesis JP, Bhatia S, Boyle E, Shao Y, Shu XO, Steinbuch M, Sather HN, Gaynon P, Kiffmeyer W, Envall-Fox J, *et al*: **RAS oncogene mutations and outcome of therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Leukemia* 2004, **18**(4):685–692.
13. Lee JW, Soung YH, Park WS, Kim SY, Nam SW, Min WS, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH: **BRAF mutations in acute leukemias.** *Leukemia* 2004, **18**(1):170–172.
14. Gustafsson B, Angelini S, Sander B, Christensson B, Hemminki K, Kumar R: **Mutations in the BRAF and N-ras genes in childhood acute lymphoblastic leukaemia.** *Leukemia* 2005, **19**(2):310–312.
15. Davidsson J, Lilljebjörn H, Panagopoulos I, Fioretos T, Johansson B: **BRAF mutations are very rare in B- and T-cell pediatric acute lymphoblastic leukemias.** *Leukemia* 2008, **22**(8):1619–1621.
16. Beaupre DM, Kurzrock R: **RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy.** *J Clin Oncol* 1999, **17**(3):1071–1079.
17. Wiemels JL, Zhang Y, Chang J, Zheng S, Metayer C, Zhang L, Smith MT, Ma X, Selvin S, Buffler PA, *et al*: **RAS mutation is associated with hyperdiploidy and parental characteristics in pediatric acute lymphoblastic leukemia.** *Leukemia* 2005, **19**(3):415–419.
18. Chang JS: **Parental smoking and childhood leukemia.** *Methods Mol Biol* 2009, **472**:103–137.

19. Alavanja M, Baron JA, Brownson RC, Buffler PA, DeMarini DM, Djordjevic MV, Doll R, Fontham ETH, Gao YT, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Publication no 83: **Tobacco smoke and involuntary smoking**. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Lyon: IARC press; 2004:1–1438.
20. Zhang J, Yin L, Liang G, Liu R, Pu Y: **Detection of quinone oxidoreductase 1 (NQO1) single-nucleotide polymorphisms (SNP) related to benzene metabolism in immortalized B lymphocytes from a Chinese Han population**. *J Toxicol Environ Health* 2010, **73**(7):490–498.
21. de Aguiar Gonçalves BA, Vasconcelos GM, Thuler LC, Andrade C, Faro A, Pombo-de-Oliveira MS, Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia: **NQO1 rs1800566 (C609T), PON1 rs662 (Q192R), and PON1 rs854560 (L55M) polymorphisms segregate the risk of childhood acute leukemias according to age range distribution**. *Cancer Causes Control* 2012, **23**(11):1811–1819.
22. Ferreira JD, Couto AC, Pombo-de-Oliveira MS, Koifman S, Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia: **Pregnancy, maternal tobacco smoking, and early age leukemia in Brazil**. *Front Oncol* 2012, **2**:151.
23. Pombo-de-Oliveira MS, Koifman S, Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia: **Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006, **15**(12):2336–2341.
24. Emerenciano M, Meyer C, Mansur MB, Marschalek R, Pombo-de-Oliveira MS, Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukaemia: **The distribution of MLL breakpoints correlates with outcome in infant acute leukaemia**. *Br J Haematol* 2013, **161**(2):224–236.
25. de Oliveira MS P, Koifman S, Vasconcelos GM, Emerenciano M, de Oliveira Novaes C, Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia: **Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia**. *Blood Cells Mol Dis* 2009, **42**(2):121–125.
26. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, *et al*: **Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia**. *Leukemia* 1999, **13**(12):1901–1928.
27. Emerenciano M, Agudelo Arias DP, Coser VM, de Brito GD, Macedo Silva ML, Pombo-de-Oliveira MS, Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia: **Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia**. *Pediatr Blood Cancer* 2006, **47**(5):549–554.
28. Bornholdt J, Hansen J, Steiniche T, Dictor M, Antonsen A, Wolff H, Schlünssen V, Holmila R, Luce D, Vogel U, *et al*: **K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure**. *BMC Cancer* 2008, **8**:53–63.

29. Sivertsson A, Platz A, Hansson J, Lundeberg J: **Pyrosequencing as an alternative to single-strand conformation polymorphism analysis for detection of N-ras mutations in human melanoma metastases.** *Clin Chem* 2002, **48**(12):2164–2170.
30. Ronaghi M: **Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing.** *Genome Res* 2001, **11**(1):3–11.
31. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, Saha V, Biondi A, Greaves MF: **Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children.** *Lancet* 1999, **354**(9189):1499–1503.
32. Emerenciano M, Menezes J, Vasquez ML, Zalcborg I, Thuler LC, Pombo-de-Oliveira MS, Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia: **Clinical relevance of FLT3 gene abnormalities in Brazilian patients with infant leukemia.** *Leuk Lymphoma* 2008, **49**(12):2291–2297.
33. Ross JA, Potter JD, Reaman GH, Pendergrass TW, Robison LL: **Maternal exposure to potential inhibitors of DNA topoisomerase II and infant leukemia (United States): a report from the Children's Cancer Group.** *Cancer Causes Control* 1996, **7**(6):581–590.
34. Alexander FE, Patheal SL, Biondi A, Brandalise S, Cabrera ME, Chan LC, Chen Z, Cimino G, Cordoba JC, Gu LJ, *et al*: **Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion.** *Cancer Res* 2001, **61**(6):2542–2546.
35. Ono R, Kumagai H, Nakajima H, Hishiya A, Taki T, Horikawa K, Takatsu K, Satoh T, Hayashi Y, Kitamura T, *et al*: **Mixed-lineage-leukemia (MLL) fusion protein collaborates with Ras to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation.** *Leukemia* 2009, **23**(12):2197–209.
36. Milunsky A, Carmella SG, Ye M, Hecht SS: **A tobacco-specific carcinogen in the fetus.** *Prenat Diagn* 2000, **20**(4):307–310.
37. Milne E, Greenop KR, Scott RJ, Bailey HD, Attia J, Dalla-Pozza L, de Klerk NH, Armstrong BK: **Parental prenatal smoking and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Am J Epidemiol* 2012, **175**(1):43–53.
38. Menegaux F, Ripert M, Hémon D, Clavel J: **Maternal alcohol and coffee drinking, parental smoking and childhood leukaemia: a French population-based case-control study.** *Paediatr Perinat Epidemiol* 2007, **21**(4):293–299.
39. Metayer C, Zhang L, Wiemels JL, Bartley K, Schiffman J, Ma X, Aldrich MC, Chang JS, Selvin S, Fu CH, *et al*: **Tobacco smoke exposure and the risk of childhood acute lymphoblastic and myeloid leukemias by cytogenetic subtype.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013, **22**(9):1600–1611.
40. Traver RD, Siegel D, Beall HD, Phillips RM, Gibson NW, Franklin WA, Ross D: **Characterization of a polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase (DT-diaphorase).** *Br J Cancer* 1997, **75**(1):69–75.

41. Smith MT, Wang Y, Skibola CF, Slater DJ, Lo Nigro L, Nowell PC, Lange BJ, Felix CA: **Low NAD(P)H: quinone oxidoreductase activity is associated with increased risk of leukemia with MLL translocations in infants and children.** *Blood* 2002, **100**(13):4590–4593.
42. Wiemels JL, Pagnamenta A, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF: **A lack of a functional NAD(P)H: quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators.** *Cancer Res* 1999, **59**(16):4095–4099.
43. Guha N, Chang JS, Chokkalingam AP, Wiemels JL, Smith MT, Buffler PA: **NQO1 polymorphisms and de novo childhood leukemia: a HuGE review and meta-analysis.** *Am J Epidemiol* 2008, **168**(11):1221–1232.
44. Vijayakrishnan J, Houlston RS: **Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis.** *Haematologica* 2010, **95**(8):1405–1414.

Additional files

Additional_file_1 as DOC

Additional file 1: Table S1 Demographic and clinical distribution of variables analysed in childhood acute leukaemia according to maternal enquires, Brazil, 2000-2010.

Additional_file_2 as DOC

Additional file 2: Table S2 Demography and laboratorial characteristics of early age leukaemia according to age groups, Brazil.

Additional_file_3 as DOC

Additional file 3: Table S3 The demography and laboratorial differences in the distribution of *RAS* mutations, according to age strata, Brazil, 2000-2010.

Additional_file_4 as DOC

Additional file 4: Table S4 The association of *RAS* and *FLT3* mutations in early age leukaemia according to *MLL* status, Brazil 2000-2010.

Additional_file_5 as JPEG

Additional file 5: Figure S1 Overall survival of *RAS* mutations (*K*- or *N-RAS*) and *RAS* (*K*- or *N-RAS*) wild-type among ALL and AML according to patients age at the diagnosis. (A) *RAS* mutations in ALL cases aged ≤ 12 months. (B) *RAS* mutations and *MLL* rearrangements in ALL cases aged ≤ 12 months. (C) *RAS* mutations in ALL cases aged 13–24 months. (D) *RAS* mutations and *MLL* rearrangements in ALL cases aged 13–24 months. (E) *RAS* mutations in AML cases aged ≤ 24 months. (F) *RAS* mutations and *MLL* rearrangements in AML cases aged ≤ 24 months. ALL: acute lymphoblastic leukaemia; AML: acute myeloid leukaemia.

Additional_file_6 as DOC

Additional file 6: Table S5 The frequency association between *RAS* mutations and *NQO1* genotype in EAL.

Additional_file_7 as DOC

Additional file 7: Table S6 The *NQO1*, *RAS* and *MLL* status in childhood leukaemia, Brazil 2000-2010.

Additional files provided with this submission:

Additional file 1: 5017454011027187_add1.doc, 48K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/7970855131225352/supp1.doc>

Additional file 2: 5017454011027187_add2.doc, 45K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/6888199501225352/supp2.doc>

Additional file 3: 5017454011027187_add3.doc, 54K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/4633092271225352/supp3.doc>

Additional file 4: 5017454011027187_add4.doc, 40K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/3149224731225352/supp4.doc>

Additional file 5: 5017454011027187_add5.jpeg, 216K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/1655901234122535/supp5.jpeg>

Additional file 6: 5017454011027187_add6.doc, 33K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/1795645581122535/supp6.doc>

Additional file 7: 5017454011027187_add7.doc, 35K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/2013825885122535/supp7.doc>