



**Ministério da Saúde**  
Instituto Nacional de Câncer  
Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Oncologia

**Expressão gênica em leucemia linfoblástica aguda pediátrica de células precursoras B (LLA-CPB) com perfil iAMP21-like, 3-4 sinais de *RUNX1* e com  $\geq 5$  sinais de *RUNX1***

JÚLIO CÉSAR SANTORO DE OLIVEIRA ASSIS

Orientadora: Dra Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá

Co-orientador: Dr. Gerhard Fuka

Rio de Janeiro

2016

**Expressão gênica em leucemia linfoblástica aguda pediátrica de células precursoras B (LLA-CPB) com perfil iAMP21-*like*, 3-4 sinais de *RUNX1* e com  $\geq 5$  sinais de *RUNX1***

JÚLIO CÉSAR SANTORO DE OLIVEIRA ASSIS

Dissertação de mestrado  
Apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação *Stricto Sensu*  
em Oncologia do Instituto  
Nacional de Câncer como parte  
dos requisitos necessários para  
a obtenção do título de Mestre  
em Oncologia.

Orientadora: Dra Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá

Co-orientador: Dr. Gerhard Fuka

Rio de Janeiro

2016

## FICHA CATALOGRÁFICA

A 848 Assis, Júlio César Santoro de Oliveira.

Expressão gênica em leucemia linfoblástica aguda pediátrica de células precursoras B (LLA-CPB) com perfil iAMP21-like, 3-4 sinais de RUNX1 e com  $\geq 5$  sinais de RUNX1. / Júlio César Santoro de Oliveira Assis. - Rio de Janeiro: INCA, 2016.

101 f.: il.; tab.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer, 2016.

Orientador (a): Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá.

Co-Orientador: Gerhand Fuka.

1. Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B. 2. Expressão Gênica. 3. Genes ETS2. 4. Genes ERG1. I. Sá, Mariana Emerenciano Cavalcanti (orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99419

**Expressão gênica em leucemia linfoblástica aguda pediátrica de células precursoras B (LLA-CPB) com perfil *iAMP21-like*, 3-4 sinais de *RUNX1* e com  $\geq 5$  sinais de *RUNX1***

JÚLIO CÉSAR SANTORO DE OLIVEIRA ASSIS

Orientadora: Dra Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá

Co-orientador: Dr. Gerhard Fuka

Rio de Janeiro, 29 de março de 2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Membro: Dr. Martin Hernan Bonamino  
Instituto Nacional de Câncer-RJ

---

Membro: Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba  
Instituto Nacional de Câncer-RJ

---

Membro: Dra. Elaine Sobral da Costa  
Universidade Federal do Rio de Janeiro-RJ

---

Suplente interno: Dra. Renata Binato Gomes  
Instituto Nacional de Câncer-RJ

---

Suplente externo: Dra. Luciana Pizzatti Barboza  
Universidade Federal do Rio de Janeiro-RJ

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Mariana Emerenciano pela oportunidade e orientação concedidas para o desenvolvimento deste trabalho acadêmico, pelo incentivo ao meu crescimento e amadurecimento profissional, ao qual norteou a realização do mesmo.

À Dra. Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira pela oportunidade de ingressar no programa deste a iniciação científica, por tornar possível a captação de amostras, além de contribuir para o engrandecimento científico do estudo.

Ao Dr. Gehard Fuka, pela amizade e orientação dentro e fora do programa, a quem devo muito a oportunidade de concluir esta etapa acadêmica.

À Dra. Marcela Mansur por reservar um tempo da sua vida profissional e, me selecionar para ser um aluno de iniciação científica deste programa.

Aos tecnólogos, tecnologistas e alunos Alessandra de Jesus Faro, Bruna Kelly Santos de Souza, Msc. Bruno Alves de Aguiar Gonçalves, Camila Fernandes Gomes Andrade, Msc. Caroline Zampier, Dra. Eugenia Terra Granado Pina, Dra. Gisele Vasconcelos, Dra. Ingrid Koster, Msc. Elda Pereira Noronha e Msc. Carol Barbieri que contribuíram com o diagnóstico laboratorial da leucemia aguda e apoio ao comitê de ética, além de todos os médicos que participaram com dados clínicos e demográficos dos pacientes.

Aos pacientes e seus responsáveis, pela confiança e credibilidade por aceitarem a participar deste estudo.

À Deus e a Nossa Senhora de Fátima, que através de minha fé, obtive serenidade, equilíbrio e sabedoria para conduzir e enfrentar as adversidades.

Aos meus pais, Apolonia Santoro e José de Assis, bem como meus irmãos e sobrinho, Sandra Santoro, Sérgio Henrique e Jonas Santoro, pelo incentivo e admiração depositados, aos quais são minha fonte de motivação e alegria.

A todos do PHOP, pela amizade e companheirismo que tornam o nosso programa mais alegre e produtivo, em especial destaque Bruno Lopes, Carol Barbieri, Elda Noronha, Francianne Andrade, Thayana Barboza e Dra. Eugênia Granado pelo incentivo e amizade de longa data.

Ao Programa de Pós-graduação em oncologia do INCA, por proporcionar um aprendizado de excelência na área.

Aos outros programas de pesquisa, que contribuíram com maquinários e/ou insumos em etapas importantes no decorrer do estudo.

Aos funcionários da recepção, segurança, limpeza entre outros, que tornam o CPQ um ambiente propício ao desenvolvimento dos diversos estudos de pesquisa.

As agências de fomento CNPq, FAPERJ e INCA, pelo financiamento do projeto e bolsa de estudo.

“Verás que um filho teu  
não foge à luta.”

(Joaquim Osório Duque Estrada)

## RESUMO

**Introdução:** A leucemia linfoblástica aguda de células precursora B (LLA-CPB) pediátrica é caracterizada por alterações citogenético-moleculares recorrentes. A amplificação intracromossômica do cromossomo 21 (iAMP21) tem sido descrita em 2-3% das LLA-CPB e foi associada a um maior risco de recaída. A técnica de FISH é o método universal para identificar a iAMP21 com sondas dirigidas para o gene *RUNX1*. A identificação da iAMP21 através de cópias adicionais de *RUNX1* pode ocasionar resultados duvidosos. Foi demonstrado por análise genômica a presença de uma região comum de amplificação (RCA) a qual estão presentes os genes *GART*, *IFNGR2*, *DSCR1*, *DYRK1A*, *RUNX1*, *ERG* e *ETS2* em pacientes com iAMP21. Alguns destes genes estão envolvidos na leucemogênese ou na resposta terapêutica de outros subtipos de leucemia. Recentemente, sugerimos um grupo com perfil "iAMP21-like" (iAMP21-like). Além disso, as análises de FISH detectaram dois grupos com base no ganho de cópias adicionais de *RUNX1*: 1) 3-4 sinais e 2)  $\geq 5$  sinais de *RUNX1*.

**Objetivo:** Identificar genes potencialmente relevantes para a patogênese das LLA-CPB com amplificações recorrentes no cromossomo 21. **Metodologia:** Aspirados de medula óssea (MO) de pacientes com LLA-CPB com amplificações recorrentes no cromossomo 21 (perfil iAMP21-like; 3-4 sinais *RUNX1* e  $\geq 5$  sinais *RUNX1*), com a fusão *ETV6-RUNX1*, sem fusões gênicas recorrentes, síndrome de Down (SD), hiperdiploidia com cópias do cromossomo 21 (HD+21) e um perfil normal do cromossomo 21 pela técnica de MLPA foram submetidos à algumas análises. A análise da expressão gênica foi realizada por RT-qPCR. Os valores de *fold-change* foram comparados entre os grupos de LLA-CPB tendo como controle uma amostra calibradora do grupo controle MLPA normal. O número de cópias gênicas foi determinado por *TaqMan Copy Number*. A análise estatística foi realizada pelo *Student's t-test*. As análises de correlação foram avaliadas pelo teste de *Pearson*.

**Resultados:** Nas análises de expressão gênica observamos que todos os genes avaliados nos casos com alterações no cromossomo 21 estavam pelo menos uma vez mais expresso em comparação ao grupo sem alterações no cromossomo 21. Posteriormente, identificamos um aumento de expressão estatisticamente significativo do gene *ERG* no grupo LLA-CPB iAMP21-like quando comparados aos grupos sem fusões gênicas e *ETV6-RUNX1*, do gene *DSCR1* no grupo LLA-CPB com 3-4 sinais de *RUNX1* em relação ao grupo *ETV6-RUNX1* e do gene *GART* no grupo LLA-CPB com 3-4 sinais de *RUNX1* quando comparados aos grupos s/ fusões gênicas e *ETV6-RUNX1* respectivamente. Além disso, notamos que apenas os genes *ERG* e *ETS2* tinham uma expressão gênica elevada nos subtipos com amplificações recorrentes. Nas análises de número de cópias foram observados cópias adicionais dos genes *ERG* e *ETS2* na maioria dos subtipos LLA-CPB incluindo SD, HD+21, 3-4 sinais *RUNX1*,  $\geq 5$  sinais *RUNX1* e iAMP21-like. Entretanto, alguns casos com  $\geq 5$  cópias adicionais foram detectados no grupo 3-4 sinais *RUNX1*. Foram observados uma correlação positiva entre o número de cópias e os níveis transcricionais de *ETS2* e *ERG*. Na combinação entre os dois parâmetros sugerimos oito casos como possíveis iAMP21. **Conclusões:** Aqui, identificamos níveis elevados de transcritos e número de cópias de *ERG* e *ETS2* nos casos com amplificações recorrentes no cromossomo 21.

**Palavras-chave:** LLA-CPB, *ERG*, *ETS2*, expressão gênica



## ABSTRACT

**Introduction:** Childhood B-cell precursor acute is characterized by recurrent and molecular alterations. The identification of these abnormalities is important for risk stratification therapeutic, and provides appropriate treatment. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) has been described in 2-3% of BCP-ALL and was associated with an increased risk of relapse. The FISH technique is the universal method for identifying iAMP21 using probes directed to RUNX1 gene. The identification of iAMP21 through additional copies of RUNX1 may cause unreliable results. It was demonstrated by genomic analysis the presence of common region of amplification (RCA) which are present GART, IFNGR2, DSCR1, DYRK1A, RUNX1, ERG and ETS2 genes in iAMP21 patients. Some of these genes are involved in leukemogenesis or other therapeutic response leukemia subtypes. Recently, we suggest a group "iAMP21-like" profile (iAMP21-like). In addition, FISH analysis detected two groups based on the gain additional copies of RUNX1: 1) 3-4 signals RUNX1 and 2)  $\geq 5$  signals RUNX1. **Objective:** To identify potentially relevant genes to the pathogenesis of BCP-ALL with recurrent amplifications on chromosome 21. **Methodology:** Bone marrow aspirates (BM) of BCP-ALL patients with recurrent amplifications on chromosome 21 (iAMP21-like profile, 3-4 signals RUNX1 and  $\geq 5$  signals RUNX1) with ETV6-RUNX1 fusion, without recurring gene fusions, Down syndrome (SD), hyperdiploidy with copies of chromosome 21 (HD+21), a normal profile for MLPA chromosome 21 underwent the analysis. Gene expression analysis was performed by RT-qPCR. The fold-change values were compared between groups of BCP-ALL to a control sample calibradoria normal MLPA control group. The copy number of the genes was performed by TaqMan Copy Number technique. Statistical analysis was performed by Student's t-test. Correlation analyzes were evaluated by Pearson test. **Results:** In the analysis of gene expression we observed that all genes evaluated in cases with changes in chromosome 21 were at least once more expressed as compared to without changes group on chromosome 21. Subsequently, we identified an expression increased statistically significant ERG gene in iAMP21-like BCP-ALL group when compared to groups without gene fusions and ETV6-RUNX1, of DSCR1 gene in BCP-ALL group with 3-4 RUNX1 signals relative to ETV6-RUNX1 group and GART gene in BCP-ALL group with 3-4 RUNX1 signals when compared to groups without gene fusions and ETV6-RUNX1 respectively. Moreover, we note that only the ERG and ETS2 genes had a high gene expression in subtypes with recurrent amplifications. Were observed additional copies of ERG and ETS2 genes in most BCP-ALL subtypes including SD, HD+21, 3-4 signals RUNX1,  $\geq 5$  signals RUNX1 and iAMP21-like. However, some cases with  $\geq 5$  additional copies were detected in the 3-4 signals RUNX1 group. A positive correlation between copy number and transcriptional levels ETS2 and ERG was observed. The combination of copy number and gene expression suggest eight cases as possible iAMP21. **Conclusions:** Here, we identified high levels of transcripts and copy number ERG and ETS2 in cases with recurrent amplifications on chromosome 21.

**Key words:** BCP-ALL, ERG, ETS2, gene expression.

## ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
ÍNDICE.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Leucemia aguda pediátrica.....	1
1.2 Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B.....	2
1.3 Identificação das LLAs-CPB.....	4
1.3.1 Estudos de perfil de expressão gênica em LLA-CPB.....	4
1.3.2 Grupos citogenético-moleculares das LLAs-CPB de acordo com o risco prognóstico.....	7
1.3.2.1 Grupo citogenético de risco favorável.....	9
1.3.2.1.1 t(12;21)(p13;q22)/ <i>ETV6-RUNX16-RUNX1</i> .....	9
1.3.2.1.2 Alta hiperdiploidia.....	9
1.3.2.2 Grupo citogenético de risco alto.....	10
1.3.2.2.1 Rearranjos do gene <i>KMT2A (MLL)</i> .....	10
1.3.2.2.2 t(9;22)(q34;q11)/ <i>BCR-ABL1</i> .....	10
1.3.2.2.3 Hipodiploidia.....	11
1.3.2.2.4 “Quase haploides” (<30 cromossomos).....	11
1.3.2.3 Alterações moleculares submicroscópicas adicionais em LLA-CPB.....	12
1.3.2.4 Grupo citogenético de risco intermediário.....	14
1.3.2.4.1 t(1;19)(q23;p13)/ <i>TCF3/PBX1</i> .....	14
1.3.2.4.2 Translocações no locus <i>IGH</i> intermediário.....	15
1.3.2.4.3 LLAs de células precursoras Outras-B ( <i>B-others</i> ).....	16
1.3.2.4.4 Novos subtipos de LLA-CPB <i>IGH</i> .....	16
1.3.2.4.5 t(17;19)(q22; p13)/ <i>TCF3-HLF</i> .....	17
1.3.2.4.6 Deleção do gene <i>ERG</i> .....	18
1.3.2.4.7 Rearranjos do gene <i>CRLF2</i> .....	18
1.3.2.4.8 <i>BCR-ABL1-like (Ph-Like)</i> .....	19

1.3.2.4.9	Amplificação intracromossômica do cromossomo 21.....	19
1.3.2.4.9.1	Região comum de amplificação em iAMP21.....	23
1.3.2.4.9.2	Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B com perfil iAMP21-like.....	26
2.	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	29
3.	OBJETIVO.....	31
3.1	Objetivo principal.....	31
3.2	Objetivos secundários.....	31
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	Casuística.....	32
4.2	Desenho de estudo.....	33
4.3	Identificação e caracterização dos subtipos LLA-CPB.....	34
4.4	Preparo das amostras para a avaliação da expressão gênica.....	34
4.4.1	Extração de RNA.....	34
4.4.2	Síntese de DNA complementar RNA.....	36
4.4.3	Integridade do cDNA por PCR.....	36
4.4.4	RT-qPCR.....	37
4.4.4.1	Seleção do gene constitutivo.....	37
4.4.4.2	Desenho dos oligonucleotídeos.....	39
4.4.4.3	Eficiência de amplificação.....	39
4.4.4.4	Reações de RT-qPCR.....	40
4.5	Preparo das amostras para a avaliação das variações no número de cópias.....	42
4.5.1	Extração de DNA.....	42
4.5.2	Reações de PCR quantitativo das variações do número de cópias.....	43
4.5.3	Critérios para as análises combinadas de expressão gênica e número de cópias.....	44
4.5.4	Análises estatísticas.....	45
5.	RESULTADOS.....	46
5.1	Características clínico-demográficas e laboratorias dos pacientes.....	46
5.2	Níveis de transcritos entre as LLAs-CPB <i>versus</i> controle não-leucêmico.....	48

5.3	Níveis de transcritos entre as LLAs-CPB com alterações no cromossomo 21 <i>versus</i> as outras LLAs-CPB.....	49
5.4	Análise dos níveis de transcritos por subgrupo de LLA-CPB.....	50
5.5	Identificação de genes diferencialmente expressos.....	52
5.6	Análise do número de cópias gênicas de subtipos específicos de LLA-CPB.....	54
5.7	Análise de correlação entre os níveis de transcritos e número de cópias de <i>ERG</i> e <i>ETS2</i> .....	55
5.8	Combinação entre níveis de transcritos e número de cópias... ..	56
6.	DISCUSSÃO.....	60
7.	CONCLUSÕES.....	65
8.	REFERÊNCIAS.....	66
9.	ANEXOS.....	78
9.1	Anexo I.....	78
9.2	Anexo II.....	80
9.3	Anexo III.....	82
9.4	Anexo IV.....	88
9.5	Anexo V.....	91
9.6	Anexo VI.....	92

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Genes pertencentes a RCA de todos os pacientes com iAMP21.	pág. 24
Tabela 3.1	Genes de referência utilizados para avaliação quanto à estabilidade da expressão.	pág. 38
Tabela 3.2	Oligonucleotídeos utilizados para a avaliação da expressão gênica por RT-qPCR.	pág. 39
Tabela 5.1	Variáveis demográficas e laboratoriais de 82 pacientes LLA-CPB pediátricos.	pág. 47
Tabela 5.2	Principais características dos pacientes sugestivos os para iAMP21 (n = 8) de acordo com a expressão gênica e status do número de cópias de <i>ERG</i> e <i>ETS2</i> .	pág. 58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Incidência das LLAs por faixa etária.	Pág. 2
Figura 1.2	Visão geral das alterações adicionais mais frequentes de acordo com distintos subtipos genéticos das leucemias linfoblásticas agudas de células precursoras B	Pág. 3
Figura 1.3	Distintos subtipos de leucemias agudas definidas a partir dos perfis de expressão gênica e algoritmos de agrupamento e análises de componentes principais.	Pág. 5
Figura 1.4	Perfil de expressão gênica a partir de blastos de medula ossea com diagnóstico de LLA pediátrica.	Pág. 6
Figura 1.5	Análises de agrupamento hierárquico e componente principal com a utilização de genes que discriminam entre sensibilidade ou resistência aos fármacos prednisolona, vincristina, asparaginase ou a daunorrubicina nas LLAs B pediátricas.	Pág. 7
Figura 1.6	Frequência de anomalias cromossômicas primárias em crianças com leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B.	Pág. 8
Figura 1.7	Distribuição dos subtipos citogenético-moleculares das leucemias linfoblásticas agudas de células precursoras B pediátricas.	Pág. 17
Figura 1.8	Identificação de pacientes iAMP21 por FISH.	Pág. 20
Figura 1.9	Frequência dos subtipos citogenéticos das leucemias linfoblásticas agudas pediátricas.	Pág. 21
Figura 1.10	Dados do perfil iAMP21 a partir do sequenciamento de próxima geração.	Pág. 22
Figura 1.11	Resumo das anormalidades no cromossomo 21 em pacientes iAMP21 resultantes dos dados de aCGH.	Pág. 23
Figura 1.12	<i>Heat map</i> dos picos de MLPA e sinais de RUNX1	Pág. 27
Figura 1.13	Análise de componentes principais dos pacientes agrupados.	Pág. 28

Figura 4.1	Fluxograma do estudo.	Pág. 33
Figura 4.2	Gel de eletroforese sobre a integridade do RNA	Pág. 35
Figura 4.3	Gel de eletroforese da PCR para a detecção dos produtos de 419pb do gene GAPDH para a comprovação da presença do cDNA amplificado de amostras representativas do estudo.	Pág. 37
Figura 4.4	Análise de seleção do gene constitutivo por RT-qPCR.	Pág. 38
Figura 4.5	Representação gráfica de uma curva padrão. Gráfico da curva de ERG realizada entre o log da concentração e o Ct.	Pág. 40
Figura 4.6	Representação gráfica de amplificação por PCR em tempo real.	Pág. 42
Figura 4.7	Representação gráfica de amplificação por PCR em tempo real a partir de um limiar informado pelo fabricante (CT=0,2).	Pág. 44
Figura 5.1	Quantificação dos níveis de expressão relativa por RT-qPCR dos genes <i>RUNX1</i> , <i>IFNGR2</i> , <i>ERG</i> , <i>ETS2</i> , <i>DYRK1A</i> , <i>DSCR1</i> e <i>GART</i> .	Pág. 48
Figura 5.2	Quantificação dos níveis de expressão relativa por RT-qPCR dos genes <i>RUNX1</i> , <i>IFNGR2</i> , <i>ERG</i> , <i>ETS2</i> , <i>DYRK1A</i> , <i>DSCR1</i> e <i>GART</i> entre os grupos LLA-CPB com e sem alterações no cromossomo 21.	Pág. 49
Figura 5.3	Quantificação dos níveis de expressão relativa por RT-qPCR dos genes <i>RUNX1</i> , <i>IFNGR2</i> , <i>ERG</i> , <i>ETS2</i> , <i>DYRK1A</i> , <i>DSCR1</i> e <i>GART</i> entre os subgrupos de LLA-CPB.	Pág. 51
Figura 5.4	Quantificação dos níveis de expressão relativa por RT-qPCR dos genes <i>RUNX1</i> , <i>IFNGR2</i> , <i>ERG</i> , <i>ETS2</i> , <i>DYRK1A</i> , <i>DSCR1</i> e <i>GART</i> entre os grupos LLA-CPB sem alterações no cromossomo 21, com cópias adicionais no cromossomo 21 e com amplificações recorrentes no cromossomo 21.	Pág. 53
Figura 5.5	Quantificação do número de cópias dos genes <i>ERG</i> e <i>ETS2</i> nos diferentes subtipos específicos de LLA-CPB.	Pág. 54

Figura 5.6	Quantificação do número médio de cópias gênicas de <i>ERG</i> e <i>ETS2</i> nos diferentes subtipos de LLA-CPB.	Pág. 55
Figura 5.7	Figura representativa do impacto marginal do número de cópias gênicas sobre os níveis de RNAm do subtipo LLA-CPB <i>iAMP21-like</i> .	Pág. 56
Figura 5.8	Caracterização das LLAs-CPB com 3-4 sinais de <i>RUNX1</i> , $\geq 5$ sinais <i>RUNX1</i> e com perfil <i>iAMP21-like</i> a partir da relação entre número de cópias e os níveis de transcritos dos genes <i>ERG</i> e <i>ETS2</i> .	Pág. 57



## LISTA DE ABREVIATURAS

µl	Microlitro
21q	Braço longo do cromossomo 21
18S	RNA ribossômico 18S
<i>ABL1</i>	Gene ABL proto-oncogene 1
aCGH	<i>Array Comparative Genomic Hybridization</i>
AcMo	Anticorpos monoclonais
ACTB	β-actina
<i>AFF1</i>	<i>AF4/FMR2 family member 1 (AF4)</i>
ARA-C	<i>Arabinofuranosyl cytidine</i>
BCL	<i>B-Cell Lymphoma</i>
<i>BCR</i>	Gene <i>Breakpoint cluster region</i>
BFB	<i>Breakage-fusion-bridge</i>
BTG1	<i>B-Cell Translocation Gene 1</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDKN2A/B	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A/B</i>
cyIgM	Imunoglobulina M citoplasmática
cDNA	DNA complementar
CEBP	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein</i>
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CG	Glicocorticóides
CNA	Alterações em número de cópias
CNV	Variações em número de cópias
CPq	Centro de pesquisas
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CREBBP	<i>CREB-binding protein</i>
<i>CRLF2</i>	Gene <i>Cytokine receptor-like factor 2</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTH	Células-tronco hematopoiéticas
cyTDT	<i>Terminal Deoxynuceotidyl Transferase</i> citoplasmática
dCT	<i>delta Cycle Threshold</i>
del	Deleção

DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPS	<i>De novo purine synthesis</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DSCR	<i>Down Syndrome critical region</i>
dT	<i>Deoxy-thymine</i>
DTT	Ditiotreitol
<i>DYRK1A</i>	<i>Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A</i>
<i>E2A</i>	Gene fator de transcrição 3 (TFPT)
EBF1	<i>Early B-Cell Factor 1</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPO-R	Receptor da eritropoietina
<i>ERG</i>	Gene <i>ETS-related gene</i>
ETS	<i>Erythroblast transformation-specific</i>
<i>ETS2</i>	Gene <i>ets proto-oncogene 2</i>
<i>ETV6</i>	Gene <i>ets variant 6</i>
FISH	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
<i>GART</i>	Gene <i>Phosphoribosylglycinamide formyltransferase</i>
<i>GATA1</i>	<i>GATA binding Protein 1</i>
H3K4	Histona 3 lisina 4
HD+21	Hiperdiploidia com cópias adicionais do cromossomo 21
HLF	<i>Hepatic Leukemia Factor</i>
<i>HOX</i>	Genes <i>homeobox</i>
iAMP21	Amplificação intracromossômica do cromossomo 21
ID4	<i>Inhibitor of DNA binding 4</i>
IFN	Interferon
IFNG	Interferon gama
<i>IFNGR2</i>	Gene <i>Interferon gamma receptor 2</i>
IGH	Imunoglobulina
<i>IKZF1</i>	Gene <i>ikaros family zinc finger 1</i>

<i>IKZF2</i>	Gene <i>ikaros family zinc finger 2</i>
<i>IKZF3</i>	Gene <i>ikaros family zinc finger 3</i>
IL7R	Receptor de interleucina 7
INCA	Instituto Nacional de Câncer
JAK1	Janus quinase 1
JAK2	Janus quinase 2
<i>KMT2A</i>	<i>Lysine (K)-specific methyltransferase 2A</i>
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
r- <i>KTM2A</i>	Rearranjos do <i>KMT2A</i>
L	Litro
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-CPB	Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
<i>LMO2</i>	<i>LIM domain only 2</i>
Mb	Mega bases
MECOM	MDS1 And EVI1 Complex Locus
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
mL	Mililitro
<i>MLLT1</i>	<i>Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to,</i>
<i>1 (ENL)</i>	
<i>MLLT10</i>	<i>Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated</i>
<i>to, 10 (AF10)</i>	
<i>MLLT3</i>	<i>Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated</i>
<i>to, 3 (AF9)</i>	
<i>MLLT4</i>	<i>Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated</i>
<i>to, 4 (AF6)</i>	
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
mM	Milimolar
MO	Medula óssea
MPO	Mieloperoxidase
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>

ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
NF1	Neurofibromin 1
<i>NFAT</i>	Fator nuclear de células T ativadas
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Oncogene Homolog</i>
NT5C2	<i>5'-nucleotidase, cytosolic 2</i>
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
P2RY8	<i>Purinergic receptor P2Y8</i>
PAR-1	<i>Região Pseudoautossômica 1</i>
PAX5	Gene <i>Paired Box 5</i>
pb	Pares de bases
PBS	Solução tampão fosfato
<i>PBX1</i>	Gene <i>pre B cell leukemia homeobox 1</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDE9A	<i>Phosphodiesterase 9A</i>
PDGFRB	<i>Platelet derived growth factor receptor beta</i>
Ph	Potencial hidrogeniônico
PHOP	Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico
R <sup>2</sup>	Regressão linear
RB1	Retinoblastoma 1
RCA	Região comum de amplificação
RCBP	Registro de câncer de base populacional
RCD	Região comum de deleção
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotação por minuto
RQ	Quantidade relativa
RT-qPCR	Transcrição reversa-Reação em cadeia da polimerase
quantitativo em tempo real	
<i>RUNX1</i>	Gene <i>Runt-related transcription factor 1 (AML1)</i>
<i>RUNX1T1</i>	Gene <i>Runt-related transcription factor 1; translocated To, 1</i>
SD	Síndrome de Down
SFB	Soro fetal bovino

SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SP	Sangue periférico
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
t	Translocação
TBLXR1	<i>Transducin (beta)-like X-linked receptor 1</i>
TCF3	<i>Transcription factor 3</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e assistido
TERT	Gene <i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
trxG	Grupo <i>trithorax</i>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Leucemia aguda pediátrica

As neoplasias de crianças e adolescentes com idade entre 0 e 18 anos representam aproximadamente de 1-3% das anormalidades malignas entre todas as idades. No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o câncer pediátrico já representa a primeira causa de morte, com 7% do total, e estima-se para o ano de 2016 e 2017 cerca 12.600 novos casos por anos de câncer infanto-juvenil (Estimativa INCA, 2016).

Segundo a classificação internacional do câncer infantil (*International Classification of Childhood Cancer*), existem doze subtipos de tumores pediátricos: (1) leucemias agudas, doenças mieloproliferativas e mielodisplásicas, (2) linfomas e neoplasias reticuloendoteliais, (3) neoplasias do sistema nervoso central (SNC), intracraniais intraespinhais, (4) neuroblastoma e tumores de outras células nervosas periféricas, (5) retinoblastoma, (6) tumores renais, (7) tumores hepáticos, (8) tumores ósseos malignos, (9) sarcomas de tecido mole e outros tumores extra ósseas, (10) tumores de célula germinativa, trofoblásticos e gonadais, (11) outras neoplasias malignas epiteliais e melanomas malignos, e (12) outras neoplasias e tumores não especificados. Dentre estes, as leucemias são as mais frequentes na infância e adolescência, correspondendo a cerca de 30% de todas as neoplasias identificadas até os 15 anos de idade. De acordo com o registro brasileiro de câncer de base populacional (RCBP), a taxa de incidência mediana ajustada por idade é de 53,3 casos de leucemia infantil por milhão de habitantes (0-14 anos de idade) (PUI *et al.*, 2004; VARDIMAN, 2010; DE SOUZA REIS *et al.*, 2011).

As leucemias acometem o sistema hematológico e são classificadas como agudas ou crônicas e, podem ser de origem linfoide ou mieloide. As leucemias agudas caracterizam-se pela presença de células imaturas ou blastos, enquanto as leucemias crônicas atingem as células mais diferenciadas. Com base nisso, as leucemias de forma geral podem ser subclassificadas como leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia mieloide crônica (LMC) (PUI, 2006).

## 1.2 Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLA-CPB)

A LLA-CPB é um subtipo leucêmico heterogêneo e multifatorial que afeta progenitores linfoides imaturos caracterizados pelo acúmulo de linfoblastos na medula óssea (MO) e supressão da hematopoese normal. Esta desordem maligna se destaca por ser o tipo leucêmico mais comum na infância, com um pico de incidência entre 2 a 5 anos de idade. Entretanto, no Brasil este pico ocorre aos três anos de idade, com um segundo pico observado ano sexto ano de vida, como pode ser observado na figura 1.1. (PUI *et al.*, 2004; DE SOUZA REIS *et al.*, 2011).

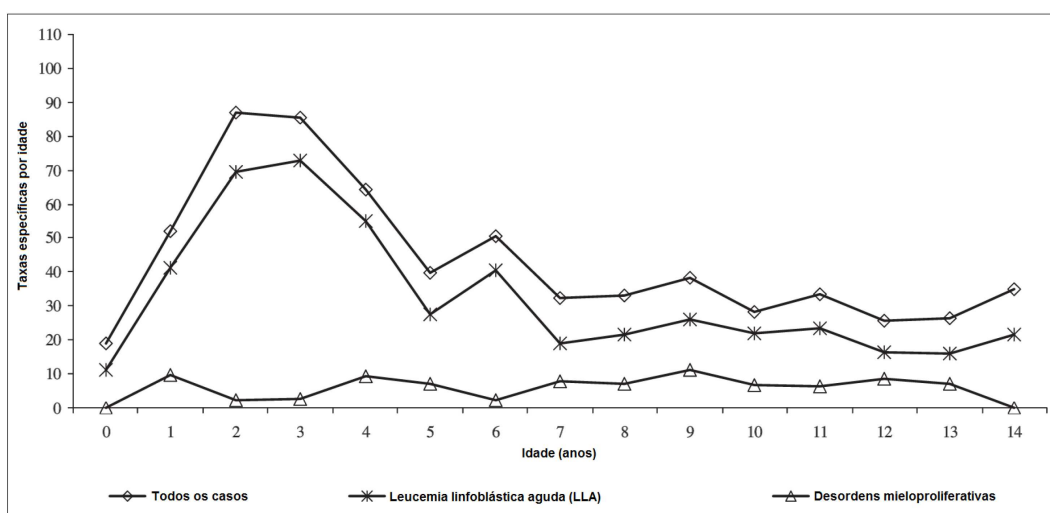


Figura 1.1 Incidência das LLAs por faixa etária.  
[Modificado de DE SOUZA REIS *et al.*, 2011].

Dentre as LLAs, o maior número de casos (75-80%) acomete a linhagem B. Estes podem ser agrupados em quatro diferentes subtipos a partir dos perfis de maturação, tais como LLA-Pró B, LLA comum, LLA-pré B e LLA-B madura, que se diferenciam pela presença ou não de importantes biomarcadores imunológicos, tais como CD10, CD19, TdT entre outros (JAFFE *et al.*, 2002; KEBRIAIEI *et al.*, 2002).

A LLA de células precursoras B (LLA-CPB) é citogeneticamente caracterizada por importantes alterações genômicas resultantes de eventos somáticos primários e secundários nos precursores linfoides B. As anormalidades primárias conduzem a iniciação e manutenção de todas as células que compõem o clone pré-leucêmico, além de frequentemente estarem associadas às características clínicas do paciente. A maioria dos eventos primários são translocações cromossômicas recorrentes que

geram fusões gênicas quiméricas ou aneuploidias com ganho ou perda de múltiplos cromossomos inteiros. Já os eventos secundários são aquisições que colaboram adicionalmente aos clones iniciais, e estão presentes em um subconjunto de células leucêmicas (MOORMAN, 2012; INABA, GREAVES, MULLIGHAN, 2013).

Dados científicos têm evidenciado que os clones pré-leucêmicos têm a capacidade de se manterem latentes por um longo tempo antes do segundo evento (GREAVES, 2006). Além disso, tem sido demonstrado que existe uma forte correlação entre as anomalias cromossômicas primárias e secundárias no desenvolvimento leucêmico dos diversos subtipos LLA-CPB (Figura 1.2) (SCHWAB, 2013).

Anomalia cromossômica primária	Cooperação das anomalias secundárias			
	Diferenciação linfóide	Regulação do ciclo celular	Prolif. e sobreviv. celular	Co-fator de transcrição
t(12;21) <i>ETV6-RUNX1</i>	<i>PAX5</i>			<i>ETV6, BTG1, TBLXR1</i>
Alta hiperdiploidia			<i>KRAS, NRAS</i>	<i>CREBBP</i>
t(1;19) <i>TCF3-PBX1</i>	<i>TCF3, PAX5</i>	<i>CDKN2A/B</i>		
Translocações <i>IGH</i>	<i>IKZF1</i>	<i>CDKN2A/B</i>		
Outras B	<i>PAX5, IKZF1</i>	<i>CDKN2A/B</i>	<i>N/KRAS, CRLF2, JAK2</i>	
t(9;22) <i>BCR-ABL1</i>	<i>IKZF1, PAX5</i>	<i>CDKN2A/B</i>		
Translocações <i>MLL</i>		<i>CDKN2A/B</i>	<i>NRAS, KRAS, FLT3</i>	
<i>iAMP21</i>		<i>RB1</i>	<i>RAS, FLT3, CRLF2</i>	
Cariótipo complexo		<i>TP53</i>		
"Quase haploides"		<i>CDKN2A/B</i>	<i>NRAS, KRAS, NF1</i>	
Baixa hipodiploidia	<i>IKZF2</i>	<i>TP53, RB1</i>		

Leukemogenesis

Figura 1.2 Visão geral das alterações adicionais mais frequentes de acordo com distintos subtipos genéticos das leucemias linfoblásticas agudas de células precursoras B. [Modificado de MOORMAN, 2015].

A maioria das anormalidades consideradas primárias é de baixa penetrância, uma vez que dependem de alterações adicionais para expandir o clone leucêmico.



No entanto, são os biomarcadores de prognóstico mais seguro, visto que estão presentes em todas as células do clone e estão associados com as principais características clínicas de cada subtipo (MOORMAN, 2015). Desta forma, essas anormalidades cromossômicas são importantes para o diagnóstico e para a estratificação de risco clínico que direciona o tratamento (HARRISON, 2009).

### 1.3 Identificação das LLAs-CPB

#### 1.3.1 Estudos de perfil de expressão gênica em LLA-CPB

Nos últimos anos, estudos sobre o perfil de expressão gênica começaram a ser rotineiramente utilizados na pesquisa, o que possibilitou a investigação da expressão de milhares de genes. Com o intuito de entender melhor a grande variedade de alterações genéticas que ocorrem nas leucemias agudas de linhagens mieloide e linfóide, alguns estudos demonstraram a possibilidade de subclassificar as alterações citogenética-moleculares das leucemias agudas através dos níveis de transcritos gênicos, tais como as subclasses que conferem risco prognóstico nas LLA-CPB, além de promover a criação de novos estudos que contribuam na identificação de novos alvos moleculares e terapêuticos (BACHER; KOHLMANN; HAFERLACH, 2009).

Em 2002, Yeoh e colaboradores foram os primeiros a demonstrar que os perfis de expressão gênica poderiam indicar o prognóstico dos subtipos de leucemias (YEOH *et al.* 2002). Já em 2003, Ross e colaboradores confirmaram os resultados anteriores e através de novas plataformas de perfis de expressão gênica identificaram subtipos de leucemias definindo alguns genes a partir de uma proporção do genoma humano. Em seguida, aplicaram análises de componentes principais nas amostras de leucemias agudas pediátricas e observaram que os casos foram agrupados em leucemias linfoblásticas agudas de células T (LLA-T) e seis subtipos diferentes de LLA-CPB, tais como rearranjos do gene *KMT2A*, as fusões *TCF3-PBX1*, *BCR/ABL1* e *ETV6-RUNX1*, hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos, além de um novo subgrupo (Figura 1.3) (ROSS *et al.*, 2003).

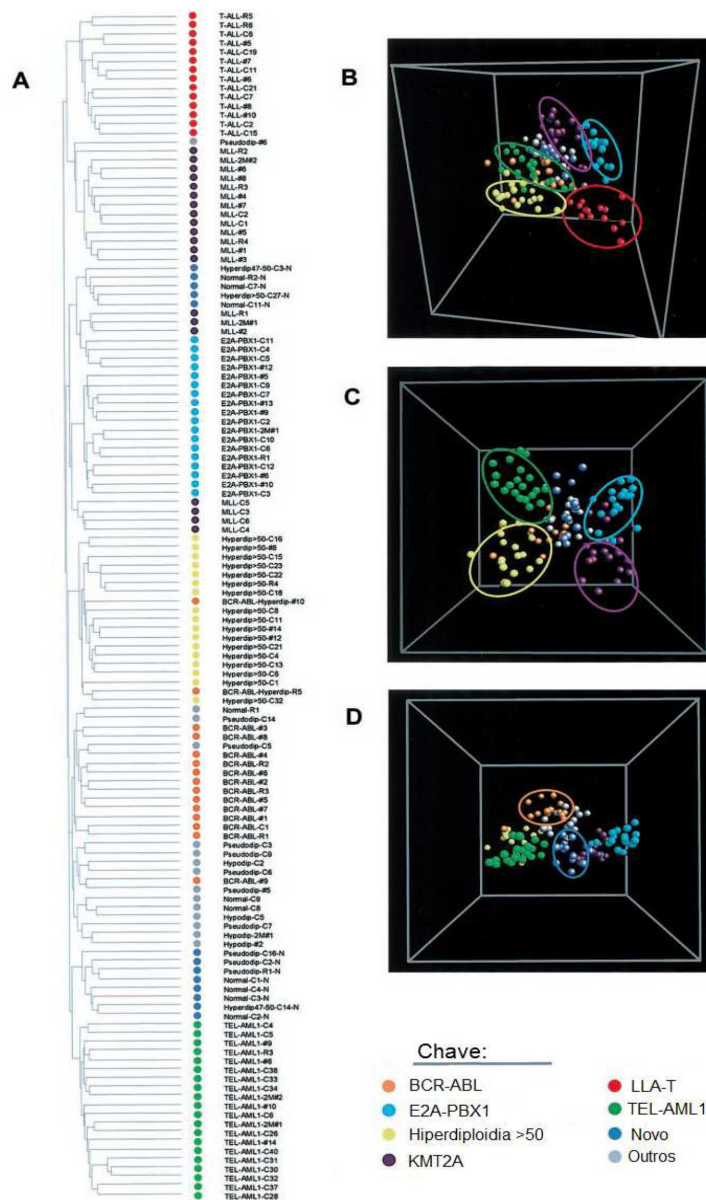


Figura 1.3 Distintos subtipos de leucemias agudas definidas a partir dos perfis de expressão gênica e algoritmos de agrupamento e análises de componentes principais. **(A)** Agrupamento hierárquico Bi-dimensional realizada por meio do coeficiente de correlação de Pearson e método de grupo usando médias aritméticas. **(B)** *Plot* do escalonamento multidimensional de todos os casos usando análises de componentes principais. **(C)** *Plot* do escalonamento multidimensional dos casos LLA-CPB (n=118). **(D)** *Plot* do escalonamento multidimensional idêntico ao indicado no *plot* C, exceto a parcela foi girada em 90°. Cada caso é representado por uma esfera codificada por cores para indicar o subgrupo genético a que pertence: *BCR-ABL1* (laranja), *TCF3-PBX1* (azul), Hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos (amarelo), *KMT2A* (roxo), LLA-T (vermelho), *ETV6-RUNX1* (verde), novos casos (azul), e os casos não classificados (cinza). [Modificado de ROSS *et al.*, 2003]

Usando os mesmos algoritmos de testes, Ross e colaboradores identificaram 100 diferentes genes a partir dos perfis de expressão, e os agruparam entre os seis subgrupos de prognóstico importante nas LLAs-CPB (Figura 1.4).

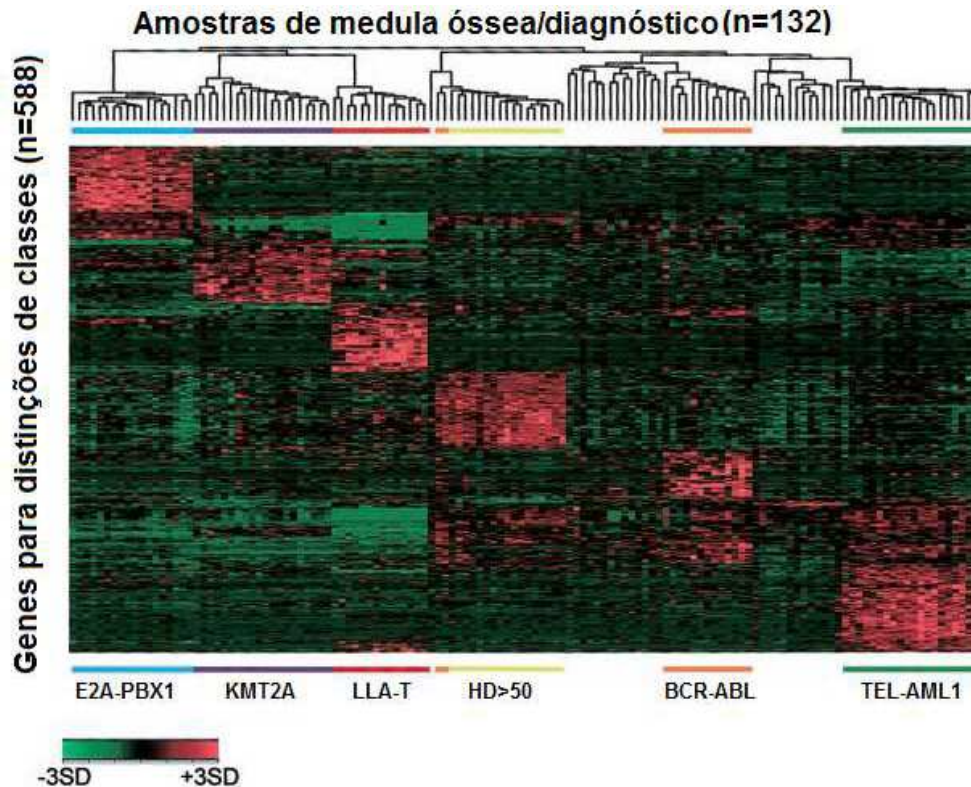


Figura 1.4 Perfil de expressão gênica a partir de blastos de MO com diagnóstico de LLA pediátrica. Agrupamento hierárquico bi-dimensional de 132 amostras de MO de pacientes diagnosticados com LLA (colunas) versus os 100 melhores conjuntos de sondas classificadas pelo teste de qui-quadrado (linhas) para os seis subgrupos de LLA. As cores vermelhas e verdes representam uma expressão gênica acima e abaixo da média respectivamente.

MO, medula óssea; n, número; HD, hiperdiploidia. [Modificado de ROSS *et al.*, 2003]

Em 2004, Holleman e colaboradores avaliaram a sensibilidade ou resistência *in vitro* a prednisolona, vincristina, asparaginase e daunorubicina em 173 amostras de MO de pacientes com LLA-B pediátrica a partir de variações nos perfis de expressão gênica. Os autores identificaram um conjunto de genes que conferem resistência ou sensibilidade (Figura 1.5) a prednisolona (33 genes), vincristina (40 genes), asparaginase (35 genes), ou a daunorubicina (20 genes) (HOLLEMAN *et al.*, 2004).

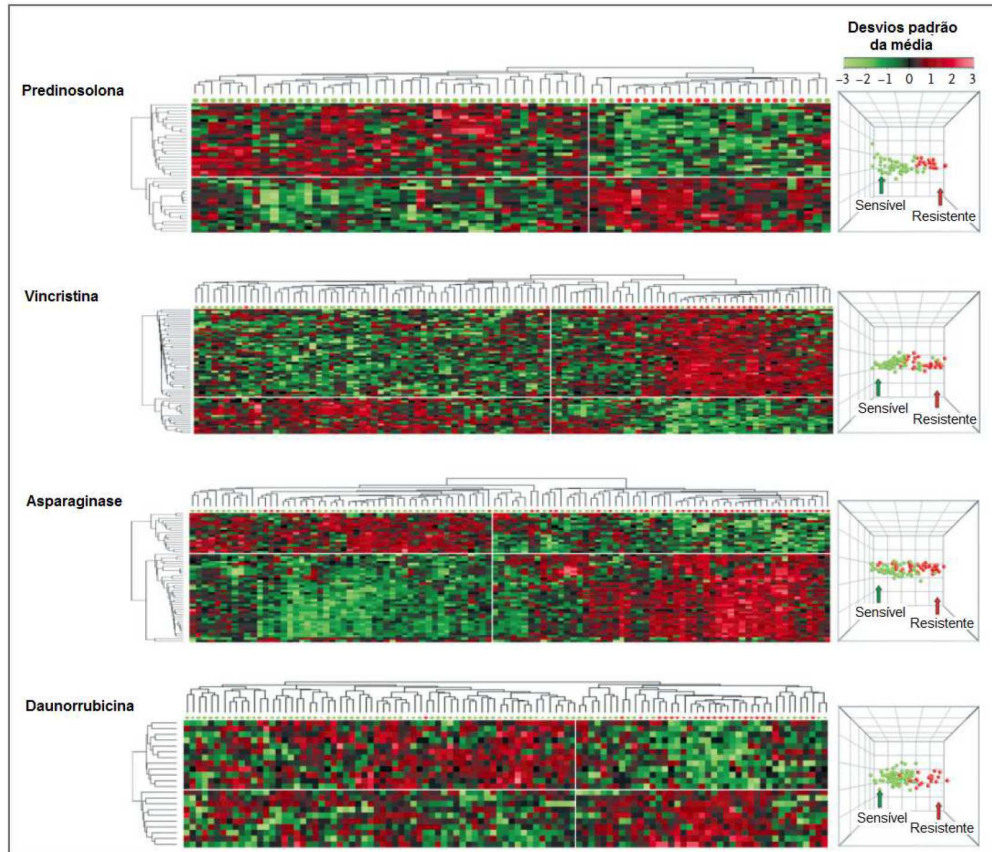


Figura 1.5 Análises de agrupamento hierárquico e componente principal com a utilização de genes que discriminam entre sensibilidade ou resistência aos fármacos prednisonolona, vincristina, asparaginase ou a daunorrubicina nas LLAs B pediátricas. Cada coluna representa uma amostra de LLA, que foram classificadas quando eram sensíveis (verde) ou resistentes (vermelho) a uma determinada droga e, cada linha representa uma sonda. Os “heat maps” indicam um elevado (vermelho) ou baixo (verde) nível de expressão gênica. [Modificado de HOLLEMAN *et al.*, 2004]

### 1.3.2 Grupos citogenético-moleculares das LLAs-CPB de acordo com o risco prognóstico

Com o desenvolvimento das principais técnicas moleculares e citogenéticas, a identificação das alterações cromossômicas citadas anteriormente tornou-se importante para caracterizar e estratificar os pacientes em três diferentes grupos de risco prognóstico: risco favorável, risco intermediário e alto risco (Figura 1.6).

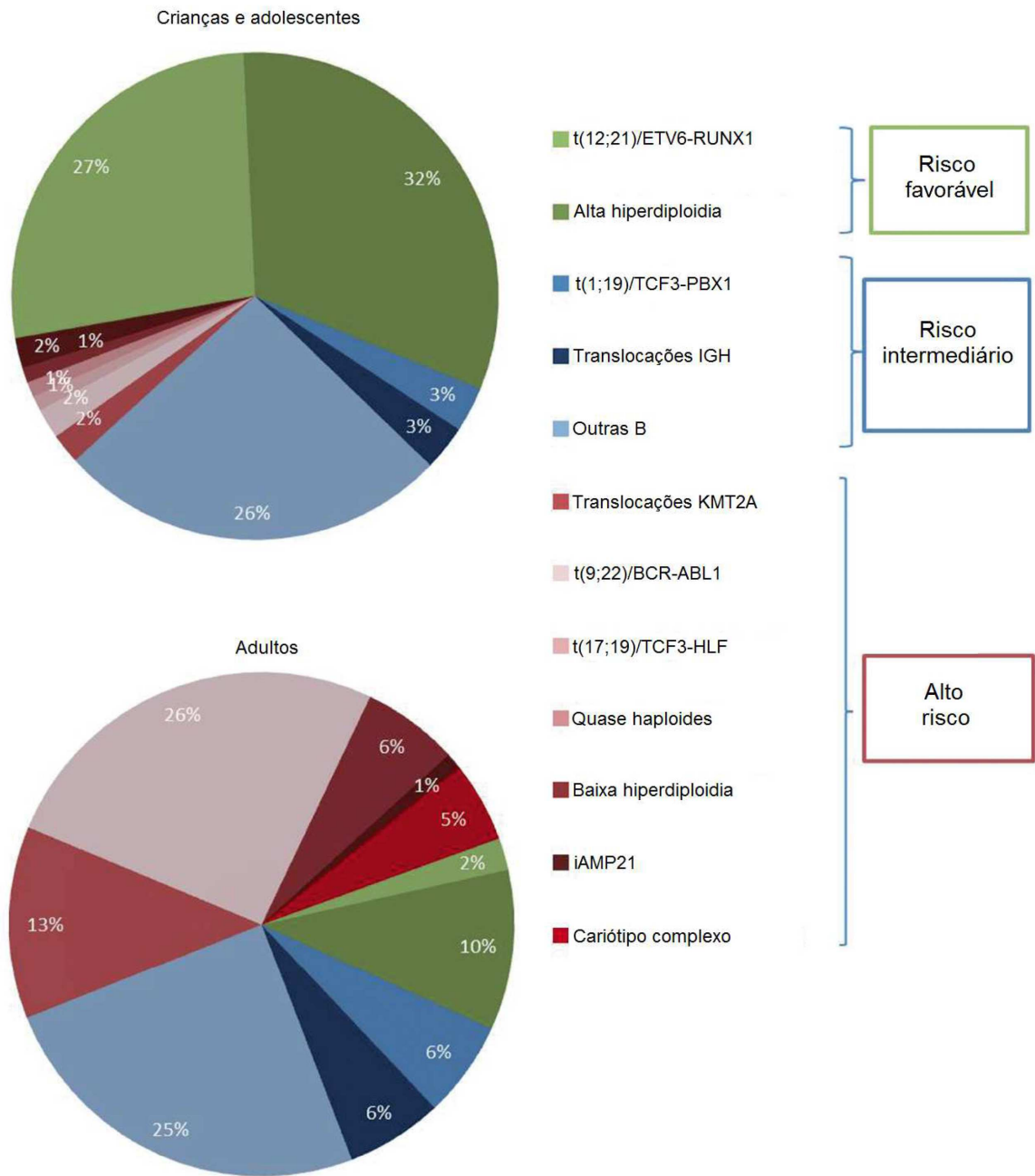


Figura 1.6 Frequência de anomalias cromossômicas primárias em crianças e adultos com leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B correlacionadas com a estratificação de risco prognóstico [Modificado de MOORMAN, 2015].

### 1.3.2.1 Grupo citogenético de risco favorável

A translocação cromossômica  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$  e a alta hiperdiploidia são biomarcadores associados a fatores de risco favoráveis ao prognóstico como idade entre 2-10 anos, contagem leucocitária menor que  $10 \times 10^9/L$  e fenótipo imunológico CD10 positivo. (HARRISON, 2009).

#### 1.3.2.1.1 $t(12;21)(p13;q22)/ ETV6-RUNX1$

A translocação  $t(12;21)(p13;q22)$  gera a fusão *ETV6-RUNX1* que é críptica em análise citogenética convencional, porém prontamente identificada pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e pela reação da transcriptase reversa, seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (SHURTLEFF, *et al.*, 1995; HARRISON, 2009). O gene *ETV6 (TEL)* é um membro da família dos fatores transcricionais *ETS* que é frequentemente envolvido em anomalias no braço curto do cromossomo 12. O *RUNX1*, *runt-related transcription factor 1*, codifica um importante fator transcricional que regula o desenvolvimento das células-tronco hematopoiéticas. A proteína de fusão resultante da combinação desses dois genes pode modificar a expressão normal de outros genes regulados por *RUNX1* (SHURTLEFF *et al.*, 1995; OKUDA, *et al.*, 2001; BOHLANDER, 2005).

#### 1.3.2.1.2 Alta hiperdiploidia

A alta hiperdiploidia (51-65 cromossomos) se caracteriza por conter ganho de 4 ou mais cromossomos, sendo os cromossomos X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 e 21 os mais comprometidos. Apesar das dificuldades como o baixo índice mitótico e/ou cariótipos complexos observados na LLA-CPB, a hiperdiploidia pode ser identificada por citogenética convencional ou análises de FISH através de sondas centroméricas (HARRISON, 2009).

### 1.3.2.2 Grupo citogenético de risco alto

Algumas anomalias cromossômicas de alto risco são importantes biomarcadores de prognóstico nas LLAs-CPB, tais como: rearranjos envolvendo o gene *KMT2A*, *t(9;22)/BCR-ABL1*, “quase haploides” e hipodiploidia (MOORMAN, 2012).

#### 1.3.2.2.1 Rearranjos do gene *KMT2A* (*MLL*)

O *KMT2A* é um gene promíscuo localizado na região 11q23 e pode realizar mais de 100 rearranjos gênicos diferentes, correspondendo a aproximadamente 6% das alterações moleculares das LLAs pediátricas (MEYER, 2009). Os rearranjos que envolvem o gene (*KMT2A-r*) são mais comuns em crianças com idade inferior a 12 meses (lactentes), acometendo aproximadamente 70-80% dos casos nesta faixa etária. Este gene codifica um co-ativador transcricional, pertencente ao grupo *thithorax* (*trxG*), que desempenha função importante na regulação do desenvolvimento hematopoiético (MARSCHALEK, 2011). A proteína codificada induz a transcrição de genes da família *HOX* a partir da metilação da histona 3 lisina 4 (H3K4). A translocação mais comum incluindo o *KMT2A* na LLA-CPB é a *t(4;11)(q21;q23)/KMT2A-AFF1 (AF4)* com aproximadamente 50%, seguida da *t(11;19)(q23;p13.3)/KMT2A-MLLT1(ENL)*. As fusões entre o *KMT2A* e *MLLT4 (AF6)/6q27*, *MLLT10(AF10)/10p12~14* e *MLLT3(AF9)/9p211* são menos frequentes (RINGROSE; PARO, 2004; MEYER *et al.*, 2013).

#### 1.3.2.2.2 *t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1*

A translocação recíproca *t(9;22)(q34;q11)*, cujo cromossomo derivativo é conhecido como cromossomo Filadélfia (Ph), resulta na fusão gênica *BCR-ABL1*. Esta alteração foi a primeira anomalia cromossômica associada com as doenças hematológicas e, inicialmente descrita nas leucemias mieloides crônicas (LMC). Em virtude da heterogeneidade do ponto de quebra do gene *BCR*, podem ocorrer três tamanhos diferentes de fusão, p190, p210 e o menos frequente p230, que resultam num aumento da atividade tirosina quinase da proteína ABL1. Apesar de inicialmente descrita em LMC, a *t(9;22)* igualmente ocorre também na LLA. A sua incidência é de

aproximadamente 2% em crianças e vai aumentando com a idade, com 20% em adultos entre 20-39 anos e 40% entre adultos mais velhos (>40 anos) (HARRISSON, JOHANSSON, 2009).

A presença desta alteração é associada com prognóstico desfavorável para todas as idades. Entretanto, a partir do desenvolvimento dos inibidores das tirosinas quinases, como imatinib, dasatinib e nilotinib, houve uma melhora significativa na sobrevida a longo prazo dos pacientes com a fusão *BCR-ABL1*. (DRUKER, 2008; MULLIGHAN *et al.*, 2008).

#### 1.3.2.2.3 Hipodiploidia

A hipodiploidia é uma aneuploidia presente em 1-3% dos casos de LLA pediátrica caracterizada pela presença de menos de 44 cromossomos. Esta anormalidade numérica pode ser subclassificada de acordo com a gravidade da aneuploidia em “quase haploides” (24-31 cromossomos), baixa hipodiploidia (32-39 cromossomos) e alta hipodiploidia (40 a 43 cromossomos). De modo geral, os pacientes hipodiploides têm elevado risco de falha no tratamento quando seguem protocolos terapêuticos para risco padrão. As LLAs com baixa hipodiploidia têm elevada frequência de mutações com perda de função em *TP53* e *RB1*, assim como nos genes *IKZF2* e *IKZF3* (HARRISON *et al.*, 2004; HOLMFELDT *et al.* 2013).

#### 1.3.2.2.4 “Quase haploides” (<30 cromossomos)

Os pacientes com cariótipo quase haploide constituem um subgrupo distinto dentro das LLAs pediátricas hipodiplóides representando cerca de 1% dos casos, dos quais a maior parte contém monossomias (apenas uma cópia cromossômica). Os cariótipos quase haploides geralmente mantêm os cromossomos sexuais (X/Y) e os cromossomos 10, 14, 18 e 21. Eventualmente, a análise citogenética só identifica um sub-clone resultando em equívocos na sub-classificação. Essas falhas podem comprometer os resultados de diagnóstico, visto que o grupo quase haploide tem um prognóstico desfavorável e devem ser direcionados à terapia de alto risco. Além disso, neste subgrupo é encontrada uma frequência elevada de deleções e algumas mutações pontuais que ativam as vias de sinalização de Ras e de receptores de



tirosina quinase (HARRISON *et al.*, 2004; MOORMAN *et al.* 2010; HOLMFELDT *et al.* 2013).

### 1.3.2.3 Alterações moleculares submicroscópicas adicionais em LLA-CPB

Assim como as alterações citogenético-moleculares primárias, as anormalidades moleculares submicroscópicas adicionais se diversificam de acordo com período de latência das leucemias. Por exemplo, os *KTM2A-r* são alterações ditas de alta penetrância, ou seja, não necessitam muitas alterações adicionais e conferem o fenótipo leucêmico em um curto período de latência, apresentando em média uma única alteração adicional. Por outro lado, a fusão *ETV6-RUNX1* que é mais comum em crianças com idade maior, têm baixa penetrância e necessita em média de aproximadamente 6-8 alterações adicionais (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013; MA *et al.*, 2015).

Com a aquisição de novas tecnologias genômicas como *array comparative genomic hybridisation* (aCGH) e *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) *arrays*, combinado a estudos citogenéticos e o FISH foi possível investigar com mais exatidão o panorama genético global das LLAs. A partir disso, uma série de novos genes começou a ser identificada. Muitos destes são essenciais em várias vias celulares importantes e alvos críticos de alterações em LLA-CPB. Algumas mutações ocorrem em genes que codificam fatores transcricionais envolvidos na hematopoiese e no desenvolvimento normal das linhagens de células B, tais como *ETV6*, *PAX5* e *IKZF1*, assim como os genes relacionados ao controle do ciclo celular, *CDKN2A/B*, *TP53* e *NT5C2*, ativadores de vias de citocina, *CRLF2* e *JAK1/JAK2*, e genes modificadores de histona como o *CREBBP* (MOORMAN *et al.*, 2012; MULLIGHAN *et al.*, 2007).

O gene *PAX5* está localizado na região cromossômica 9p13 e é alvo de várias anormalidades em LLA que incluem translocações, cromossomos discêntricos, ampliações intragênicas, deleções e mutações pontuais em mais de 30% dos casos. Essas alterações resultam na desregulação da expressão de *PAX5* e de seus alvos, tais como CD19, sugerindo que a sua haploinsuficiência pode cooperar para leucemogênese (MULLIGHAN *et al.*, 2007; AN *et al.*, 2008).

Cerca de 13-15% dos pacientes com LLA-CPB são acometidos com deleções

focais, completas ou mutações em *IKZF1*, localizado na região cromossômica 7p12, que resulta na expressão desregulada do fator transcricional Ikaros, necessário para o desenvolvimento linfoide. De modo geral, as alterações neste gene são associadas com um desfecho desfavorável e confere risco triplicado de falhas no tratamento dos casos LLAs-CPB de alto risco, sendo mais prevalentes em pacientes positivos para *BCR-ABL1*.

Deleções envolvendo o gene *ETV6*, localizado na região cromossômica 12p13, ocorrem em cerca de 50% dos casos com a fusão *ETV6-RUNX1* e em aproximadamente 10% dos casos negativos para a fusão. O gene *ETV6* é um membro da família de fatores transcricionais Ets, importante para o desenvolvimento hematopoiético das linhagens celulares na MO. Um estudo associou as deleções de *ETV6* a resultados desfavoráveis em adultos, entretanto, ainda carecem de dados mais representativos. (MULLIGHAN *et al.*, 2009; GÓMEZ-SEGUI *et al.*, 2011; SCHWAB *et al.*, 2013).

Aproximadamente 30-40% das LLA-CPB possuem deleções recorrentes nos genes *CDKN2A/B*, localizados na região cromossômica 9p. Estas deleções podem ocorrer junto com a deleção no *IKZF1*. A frequência da presença das duas deleções juntas aumenta progressivamente com a idade em que o paciente é diagnosticado (MULLIGHAN *et al.*, 2007; SCHWAB *et al.*, 2013).

Deleções no gene *TP53*, localizado na região cromossômica 17p13, são raras ao diagnóstico com cerca de 2-3% das LLAs pediátricas. Entretanto, a presença desta alteração está fortemente associada aos casos de recaídas, sendo, portanto preditivas de falha na resposta ao tratamento e desfecho desfavorável. O gene *NT5C2* é responsável pela codificação da 5' nucleotidase no metabolismo intracelular das purinas. Mutações neste gene estão associadas com resistência a quimioterápicos com análogos de purina em até 20% das recaídas de LLAs (HOF *et al.* 2011; MA *et al.*, 2015; TZONEVA *et al.* 2013).

As alterações no gene *CRLF2* ocorrem em cerca de 5-7% das LLAs pediátricas, e estão associadas com a presença de mutações nos genes Janus quinase 1 e 2 (*JAK1* e *JAK2*). Estas alterações estão associadas a 50% dos casos de LLA-CPB com síndrome de Down. O *CRLF2* está localizado na região pseudoautosômica 1 (PAR1), entre Xp22.3/Yp11.3 e codifica o receptor da linfopietina estromal tímica. Além de reservarem resultado desfavorável, as alterações em *CRLF2* podem ocorrer a partir da translocação envolvendo o locus da cadeia pesada da imunoglobulina (*IGH-CRLF2*), ou pela deleção intersticial no cromossomo X/Y, a qual leva a fusão com o gene *P2RY8* (*P2RY8-CRLF2*) (GAIKWAD *et al.* 2009; RUSSELL *et al.* 2009; HARVEY *et al.*, 2010).

O gene *CREBBP*, localizado na região cromossômica 16p13, está envolvido na co-ativação da transcrição através da remodelação da cromatina de uma proteína de ligação à *CREB* a vários fatores transcricionais. Algumas mutações e deleções focais neste gene ocorrem em cerca de 20% das recaídas de LLA-CPB. Estas alterações são associadas com mecanismos de resistência aos tratamentos com glicocorticoides (MULLIGHAN *et al.* 2011; INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013).

#### 1.3.2.4 Grupo citogenético de risco intermediário

Entre 25-30% dos pacientes com LLA-CPB são classificados com um prognóstico intermediário e de diagnóstico não definitivo. Os casos que compõem este grupo necessitam de uma melhor investigação, pois as anormalidades citogenéticas primárias não predizem com precisão o risco prognóstico, uma vez que alterações genéticas submicroscópicas envolvendo alguns genes, como o *IKZF1*, podem alterar o status do prognóstico. As alterações cromossômicas mais frequentes neste subgrupo são a translocação t(1;19)(q23;p13)/*TCF3/PBX1*, as translocações envolvendo o locus *IGH* e o grupo chamado de “Outras-B” (PUI; RELLING; DOWNING, 2004; MULLIGHAN *et al.*, 2009; MOORMAN, 2015).

##### 1.3.2.4.1 t(1;19)(q23;p13)/*TCF3/PBX1*

A translocação t(1;19)(q23;p13) ocorre em aproximadamente 3% e 6% das crianças/adolescentes e dos adultos com LLA-CPB respectivamente, resultando na fusão gênica *TCF3/PBX1* (*E2A/PBX1*) (BARBER K.E *et al.*, 2007). O gene *TCF3*

codifica os fatores transcricionais *E12* e *E47*, importantes no desenvolvimento linfóide inicial, e o gene *PBX1* codifica uma proteína nuclear da família de fatores de transcrição homeobox essenciais no desenvolvimento dos precursores linfóides (ZHUANG; SORIANO; WEINTRAUB, 1994; SANYAL *et al.*, 2007).

Estudos recentes vêm demonstrando resultados discordantes na classificação de risco das LLAs pediátricas e adultas com a translocação t(1;19)(q23;p13). Alguns estudos relataram que a fusão *TCF3/PBX1* era de pior prognóstico, e outros com protocolos de tratamentos mais agressivos mostraram um prognóstico mais favorável, tanto em crianças quanto em adultos. Estes dados indicam uma heterogeneidade substancial e sugerem que exista a presença de outras anormalidades adicionais neste subgrupo (KAGER *et al.*, 2007; MOORMAN *et al.*, 2010).

#### 1.3.2.4.2 Translocações no locus *IGH*

Algumas translocações encontradas em LLA-CPB envolvem o locus da região cromossômica 14q32 da cadeia pesada de imunoglobulina (*IGH*), a qual altera os padrões de expressão de vários oncogenes importantes (DYER *et al.*, 2010). Um dos rearranjos mais comuns envolve o gene *Cytokine receptor-like factor 2* (*CRLF2*) e resulta na fusão quimérica do gene purinérgico *P2RY8* com a região codificante de *CRLF2*, levando a superexpressão de *CRLF2* na superfície celular (RUSSELL *et al.*, 2009). Os rearranjos de *CRLF2* estão presentes em 50% dos casos de LLA-CPB com síndrome de Down e do subtipo de alto risco *BCR-ABL1-like*, respectivamente. Outras translocações recorrentes neste subgrupo incluem cinco membros da família *CEBF* e *ID4* com aproximadamente 10% e 7%, respectivamente. As translocações *IGH* são menos frequentes em pacientes com menos de 10 anos de idade do que em adolescentes e adultos jovens entre 25-24 anos (MULLIGHAN *et al.*, 2009; HARVEY *et al.*, 2010; RUSSELL *et al.*, 2014).

#### 1.3.2.4.3 LLAs de células precursoras *B-others*

De modo geral, cerca de 70% dos casos de LLA-CPB pediátrica são agrupados pela presença de alguma alteração genética ou submicroscópica, que pode ser utilizada como biomarcador ao diagnóstico e/ou para risco prognóstico. As LLAs Outras-B (do inglês, *B-others*) são um subgrupo caracterizado pela ausência de qualquer uma destas alterações. Nos últimos anos o cenário genético e molecular das Outras-B vem se tornando alvo de investigação para muitos estudos, com a intenção de melhor descrever e definir possíveis biomarcadores (BHOJWANI *et al.*, 2015).

Recentemente, alguns estudos avaliaram o grande número de pequenas deleções que acometem vários genes importantes nas principais vias celulares, tais como *CDKN2A*, *PAX5*, *IKZF1*, *ETV6*, *RB1* e *EBF1*, e investigaram alterações no perfil de número de cópias como biomarcadores de prognóstico. Além disso, análises do perfil de expressão gênica vêm sendo exploradas para atribuir risco e definir novos subgrupos dentre os pacientes agrupados como Outras-B (PAULSSON *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2008; HARVEY *et al.*, 2010).

#### 1.3.2.4.4 Novos subtipos de LLA-CPB

A partir de uma melhor caracterização dos perfis genético-moleculares do grupo Outras-B foi possível a identificação de novos subtipos importantes em LLA-CPB, tais como *BCR-ABL1-like*, *TCF3-HLF (E2A/HLF)*, deleção de *ERG*, rearranjo de *CRLF2* e *iAMP21* (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015) (Figura 1.7).

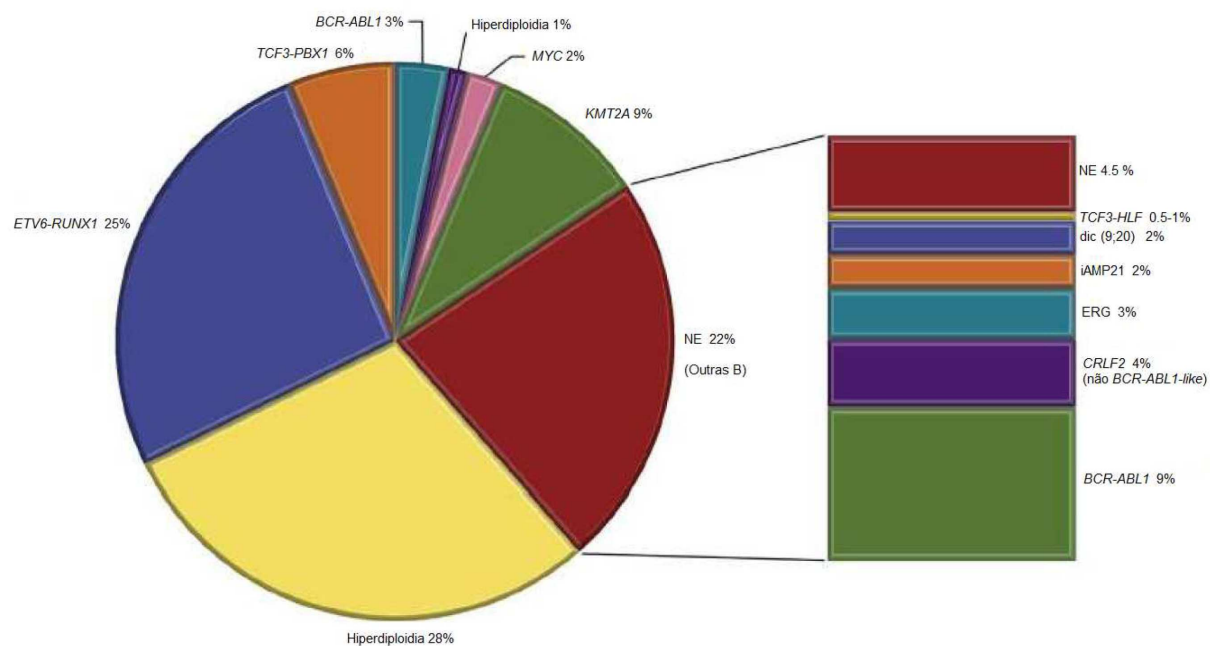


Figura 1.7 Distribuição dos subtipos citogenético-moleculares das leucemias linfoblásticas agudas de células precursoras B pediátricas. O gráfico à esquerda mostra os subtipos que foram identificados antes de 2004. Atualmente são utilizados na estratificação de risco. NE, não especificados. [Modificado de BHOJWANI; YANG; PUI, 2015].

#### 1.3.2.4.5 t(17;19)(q22; p13)/TCF3-HLF

A translocação t(17;19)(q22; p13) é uma variante rara da t(1;19) que resulta na fusão do gene *HLF*, localizado na posição 17q22 com o gene *TCF3*. Existem dois tipos de rearranjos que geram oncoproteínas, uma do tipo 1 outra do tipo 2, que englobam exons de 1 a 13 ou 1 a 12 de *TCF3* respectivamente, e 4 exons de *HLF*. A fusão *TCF3-HLF* regula de forma aberrante alguns genes importantes em vias de morte celular de progenitores linfoides, tais como *LMO2* e *BCL*. Os pacientes com esta fusão apresentam desfecho desfavorável e idade avançada (INABA *et al.*, 1992; BOER *et al.*, 2010).

#### 1.3.2.4.6 Deleção do gene *ERG*

Aproximadamente 3-5% das LLAs-CPB têm deleção focal no gene *ERG*, localizado na região cromossômica 21q22, que codifica importantes fatores transcricionais da família *ETS*. Entretanto, os pacientes com esta deleção tem um excelente resultado com mais de 90% de sobrevida em cinco anos, embora tenha uma alta incidência (cerca de 40%) de deleções em *IKZF1* concomitantes. Evidências apontam que, apesar da presença da deleção definir um distinto subgrupo em LLA-CPB, esta alteração pode ser um evento subclonal adquirido ou perdido entre o diagnóstico e recaída (MULLIGHAN *et al.*, 2007; CLAPPIER *et al.*, 2013).

#### 1.3.2.4.7 Rearranjos do gene *CRLF2*

A frequência global de rearranjos do gene *CRLF2* em LLAs-CPB são 5% e, podem surgir a partir de translocações cromossômicas crípticas, t(X;14)(p22;q32) ou t(Y;14)(p11;q32), deleções intersticiais crípticas dentro da região pseudo-autossômica (PAR-1), del(x)(p22.33p22.33) ou del(Y)(p11.32p11.32), e por mutações ativadoras raras, *CRLF2-F232C*, respectivamente. A superexpressão de *CRLF2* pode surgir a partir das translocações envolvendo os exons codificadores de *CRLF2* com o *enhancer IGH*, gerando a fusão *IGH-CRLF2* ou com o promotor *P2RY8*, originando a fusão *P2RY8-CRLF2*. Estudos têm associado a superexpressão de *CRLF2* com a ativação das vias *JAK-STAT*, *ERK* e *mTOR*, as quais podem alterar progenitores de células B. A frequência da desregulação de *CRFL2* entre os pacientes com síndrome de Down é alta, com cerca de 50% dos casos de LLA-CPB (HERTZBERG *et al.*, 2009; MULLIGHAN *et al.*, 2009; RUSSELL *et al.*, 2009).

Com base nos estudos iniciais, o impacto da desregulação de *CRLF2* no prognóstico dos pacientes ainda é duvidoso. Alguns estudos concluíram que a presença dos rearranjos de *CRLF2* conferia um prognóstico desfavorável, enquanto outros concluíram que os mesmos não eram relevantes como fatores de risco (CARIO *et al.*, 2010; ATTARBASCHI *et al.*, 2012).

#### 1.3.2.4.8 *BCR-ABL1-like (Ph-Like)*

Através de estudos de perfil de expressão gênica global identificou-se um novo subtipo de LLA-CPB de alto risco em aproximadamente 10-15% das LLAs-CPB. Este grupo exibe níveis de transcritos gênicos semelhante as LLA-CPB Ph-positivo, com alta frequência de deleções em *IKZF1* e ausência da proteína de fusão *BCR-ABL1*. Os pacientes *BCR-ABL1-like* são caracterizados pelo elevado nível de doença residual mínima ao fim da indução, resistência a quimioterápicos como asparaginase e daunorrubicina e, resultado desfavorável (MULLIGHAN *et al.*, 2009; DEN BOER *et al.* 2009).

Cerca de 50% dos casos *BCR-ABL1-like* contêm rearranjos do gene *CRLF2*, o qual promove a superexpressão do mesmo e a ativação da via JAK-STAT neste subgrupo. Além disso, ocorrem algumas mutações pontuais em genes que ativam receptores de citocinas e de sinalização das quinases em células leucêmicas, tais como *ABL1*, *EPO-R* (receptor de eritropoietina), *IL7R*, *JAK2*, e *PDGFRB* (ROBERTS *et al.*, 2012; ROBERTS *et al.*, 2014).

#### 1.3.2.4.9 Amplificação intracromossômica do cromossomo 21

A amplificação intracromossômica do cromossomo 21 (iAMP21) foi caracterizada ao diagnóstico por triagem para a detecção da fusão gênica *ETV6-RUNX1* de pacientes pediátricos com LLA-CPB, a partir da hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sondas dirigidas para o gene *runt related transcription factor 1* (*RUNX1*). Apesar de ser negativo para a fusão, as células blásticas da iAMP21 apresentavam a presença de cinco ou mais cópias adicionais desse gene, como aglomerados em núcleos interfásicos ou duplicação em tandem de um cromossomo 21 em metáfase (Figura 1.8) (HAREWOOD *et al.*, 2003; MOORMAN *et al.*, 2007; HARRISON, 2015).



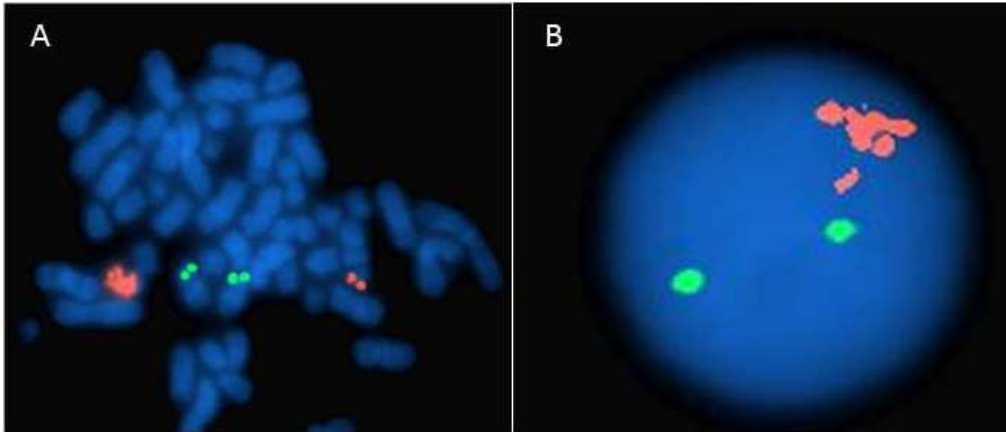


Figura 1.8 Identificação de pacientes iAMP21 por FISH. Os sinais vermelhos indicam cópias de *RUNX1* e os sinais verdes indicam cópias de *ETV6* com sondas para a detecção da fusão *ETV6-RUNX1*. (A) Célula em metáfase: Dois pares de sinais verdes indicam a localização normal de *ETV6* no braço curto de dois cromossomos 12 homólogos normais. O par individual de sinais vermelhos no lado direito da célula indica a localização de *RUNX1* no cromossomo 21 normal. No lado esquerdo da célula, o conjunto de sinais vermelhos indica uma amplificação de *RUNX1* no cromossoma 21 anormal. (B) Célula em interfase: Os dois sinais verdes indicam a presença de duas cópias de *ETV6*. O conjunto de sinais vermelhos indica a amplificação de *RUNX1*. [Modificado de HARRISON, 2015].

Em comparação a outros subtipos, os pacientes iAMP21 são geralmente mais velhos, com uma idade média de nove anos, diagnóstico imunofenotípico de LLA-comum, baixa contagem leucocitária e um mau prognóstico, associado com alto risco de recaída, pior sobrevida global e sobrevida livre de eventos. Sua frequência é de aproximadamente 2% quando comparados a outros subtipos citogenéticos de LLA-CPB (Figura 1.9) (INABA, 2013; MOORMAN *et al.*, 2013).

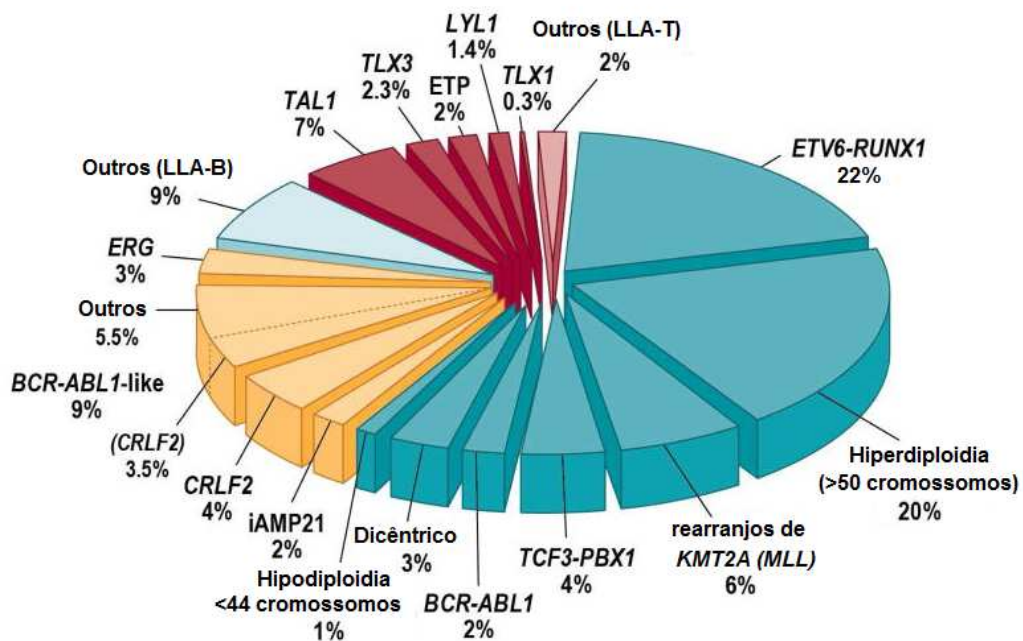


Figura 1.9 Frequência dos subtipos citogenéticos das leucemias linfoblásticas agudas pediátricas. [Modificado de INABA *et al.* 2013]

Recentes estudos vêm sugerindo possíveis mecanismos que poderiam iniciar o processo leucemogênico da iAMP21. Um deles propôs um modelo evolutivo denominado *breakage-fusion-bridge* (BFB), na qual ocorre uma quebra da dupla fita na região telomérica duplicada, seguida de reparo de DNA em um processo denominado *non-homologous end joining*. Esses eventos geram um cromossomo dicêntrico no qual os dois centrômeros são puxados para os polos opostos durante a mitose, se repetindo nos ciclos celulares subsequentes. Os ciclos de BFB podem ocasionar eventos catastróficos em regiões cromossômicas levando a fragmentação e a um grande número de rearranjos genômicos em um processo denominado *chromotripsis* (Figura 1.10). O reparo incorreto de alguns desses rearranjos, com perda e/ou ganho de material genômico, pode contribuir para a patogênese da iAMP21. Além disso, essas anormalidades culminam em alterações dentro do gene *PDE9A* e translocações Robertsonianas entre os cromossomos 15 e 21 (SINCLAIR *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014; HARRISON, 2015).

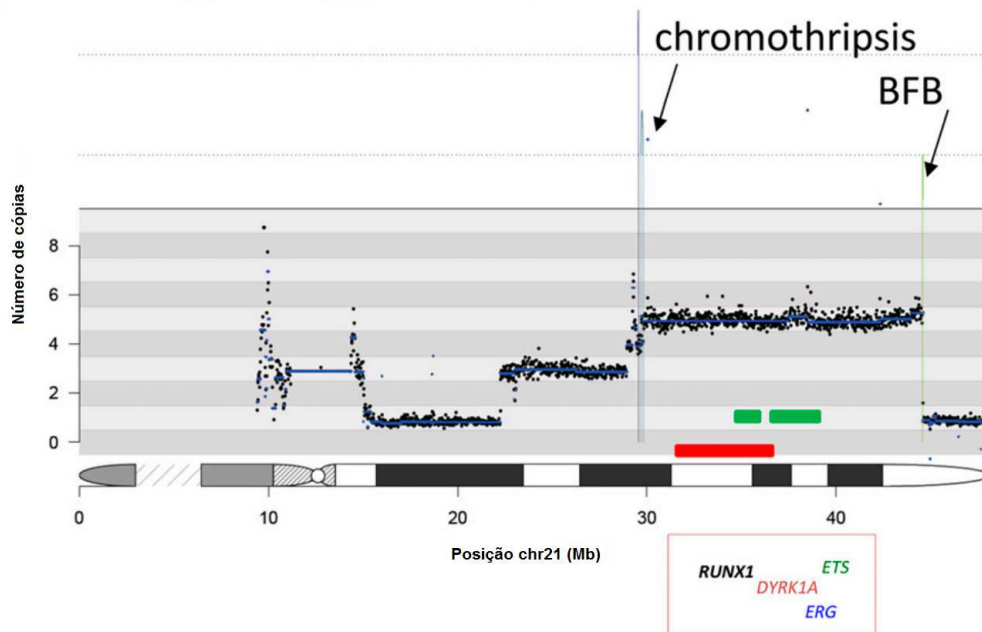


Figura 1.10 Dados do perfil iAMP21 a partir do sequenciamento de próxima geração. Mudanças graduais no número de cópias ao longo do cromossomo 21 representa o perfil típico gerado em virtude dos ciclos BFB, com uma região mais altamente amplificada justaposta à região telomérica excluída. Há um pequeno número de rearranjos resultantes de *chromothripsis*. [Modificado de HARRISON, 2015]

O diagnóstico preciso da iAMP21 é crucial para a melhor conduta terapêutica. Mudanças conformacionais inviabilizam a identificação da iAMP21 pela citogenética convencional. O FISH é considerado a técnica padrão ouro para a detecção dessa anormalidade na rotina de diagnóstico. No entanto, a identificação dos casos com perfil iAMP21 a partir de cópias adicionais de apenas um gene pode estar sujeito a erros sempre que os núcleos metafásicos estiverem ausentes e/ou exista uma baixa integridade do DNA da célula, visto que as cópias adicionais do gene *RUNX1* também estão presentes em cariótipos hiperdiploides. Dessa forma, o uso de outras técnicas como *arrays* vem sendo utilizadas para avaliar alterações em número de cópias (CNA) de DNA e caracterizar melhor esses pacientes (ROBINSON *et al.*, 2003; HARRISON *et al.*, 2005).

### 1.3.2.4.9.1 Região comum de amplificação em iAMP21

Com a escassez de evidências moleculares ligadas aos mecanismos que podem promover a leucemogênese e/ou alto risco de recaída do subgrupo LLA-CPB com iAMP21, os primeiros estudos baseados em análise genômica com *array based comparative genomic hybridisation* (aCGH) começaram a caracterizar melhor essa anormalidade. Um deles identificou a presença de uma região comum de amplificação (RCA) e uma região comum de deleção (RCD) na região telomérica (Figura 1.11), os quais abrangem regiões de aproximadamente 6 e 9 Mega bases (Mb), respectivamente, principalmente no braço longo do cromossomo 21 de todos os pacientes com iAMP21, representando a única anormalidade recorrente (STREFFORD *et al.*, 2006; RAND *et al.*, 2011).

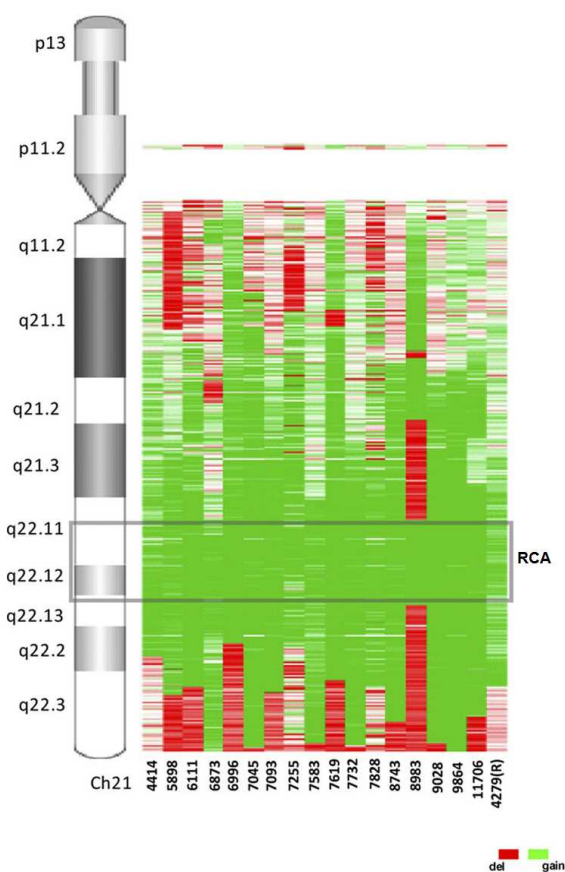


Figura 1.11 Resumo das anormalidades no cromossomo 21 em pacientes iAMP21 resultantes dos dados de aCGH. *Heat map* detalhando as regiões de deleção (vermelho), ganho (verde) e cópias normais (branca) em relação à localização genômica. [Modificado de RAND *et al.* 2011]

Na RCA (entre 33,192 e 39,796 Mb) foram detectados a presença de 47 genes que

codificam proteínas (Tabela Anexo 1.1), incluindo o gene *RUNX1* e outros genes pertencentes a *Down Syndrome critical region* (DSCR), assim como 20 pseudogenes, 18 RNAs não-codificantes e um único miRNA (miR-802). Através de análise de perfil de expressão gênica global, foi demonstrado uma expressão diferencial de 66% dos genes localizados nesta região. Entretanto, os mecanismos de ação desses genes na patogênese das LLA-CPB com iAMP21, até este momento, permanecem desconhecidas (STREFFORD *et al.*, 2006). Tal expressão foi atribuída ao aumento no ganho de material genético. Dentre os genes pertencentes a RCA, constam *GART* (21q22.11), *IFNGR2* (21q22.11), *DSCR1* (21q22.12), *DYRK1A* (21q22.13), *RUNX1* (21q22.13) *ETS2* (21q22.2) e *ERG* (21q22.2) que conhecidamente desempenham funções importantes no desenvolvimento e/ou na resposta terapêutica de vários subtipos leucêmicos (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Genes pertencentes a RCA de todos os pacientes com iAMP21

Gene	Localização	Função biológica	Referências
<i>GART</i>	q22.11	Codifica proteínas na DNPS	Zaza, 2004
<i>IFNGR2</i>	q22.11	Transdução de sinais das células-tronco	Kim <i>et al.</i> , 2010
<i>DSCR1</i>	q22.12	Possivelmente na apoptose induzida por GC	U,M <i>et al.</i> 2004
<i>DYRK1A</i>	q22.13	Inibidor da via NFAT	Birger; Izraeli, 2012
<i>RUNX1</i>	q22.13	Atua no desenvolvimento das CTHs	Okuda <i>et al.</i> , 2001
<i>ETS2</i>	q22.2	Regulador transcricional da família <i>ETS</i>	Ge <i>et al.</i> , 2007
<i>ERG</i>	q22.2	Regulador transcricional da família <i>ETS</i>	Chen <i>et al.</i> , 2012

DNPS, *de novo purine synthesis*; CG, glicocorticóides; NFAT, fator nuclear de células-T ativadas; CTHs, células-tronco hematopoiéticas.

O gene *RUNX1* codifica um importante fator transcricional que regula o desenvolvimento das células-tronco hematopoiéticas em todos os tipos de células sanguíneas maduras (OKUDA *et al.*, 2001). O *IFNGR2*, *interferon gamma receptor 2*, desempenha um papel na transdução de sinais das células-tronco, que regulam a proliferação celular. Em 2010, Kim e colaboradores tentaram investigar alguns polimorfismos em genes que foram associados com um resultado desfavorável de imatinib na LMC. Um dos resultados mostrou que a resposta ao imatinib foi associada a alterações no gene *IFNGR2*, o qual está envolvido na via de sinalização de IFN. (KIM *et al.* 2010; HOLZER *et al.*, 2013).

Os fatores de transcrição *ERG* e *ETS2* são membros da família *ETS* que tem sido

associado a alguns tipos de neoplasias, incluindo algumas malignidades hematológicas (STANKIEWICZ; CRISPINO, 2013). Em 2013, Chen e colaboradores realizaram um estudo comparativo em linhagens celulares de LLA sensíveis e resistentes a glicocorticóides (CG), aos quais observaram padrões distintos de expressão gênica. Os autores descobriram que o gene *ERG* estava diferencialmente regulado nas LLAs sensíveis e resistentes. Os níveis de proteína *ERG* eram substancialmente mais elevados em células CEM-C1-15 resistentes. A inibição de *ERG* levava a um aumento da apoptose em ambas linhagens sensíveis e resistentes. Em 2008, Ge e colaboradores demonstraram que *ETS2* pode desempenhar um papel fundamental na biologia da leucemia aguda megacarioblástica. Os transcritos de *ETS2* medidos por PCR em tempo real (RT-qPCR) foram 1,8 e 4,1 vezes, respectivamente, mais elevados em leucemia aguda com síndrome de Down e megacarioblástica. Além disso, a indução experimental de *ETS2* conferiu diferenças de sensibilidades à ARA-C e daunorrubicina, dependendo dos níveis de GATA1 (GE *et al.*, 2007; CHEN *et al.* 2012).

O gene *DYRK1A* codifica um dos dois inibidores da via NFAT na “*DS-critical region*”. Em 2012, Birger e colaboradores publicaram um comentário sobre *DYRK1A* na síndrome de Down (SD). As evidências experimentais e matemáticas sugerem que a via NFAT é inibida em indivíduos com SD devido à superexpressão de *DYRK1A*, o que leva ao aumento significativamente no risco de desenvolver leucemia aguda megacarioblástica. (BIRGER; IZRAELI, 2012).

Em 2004, Shen e colaboradores demonstraram que o gene *Down syndrome critical region gene 1 (DSCR1)*, dentre um pequeno grupo de genes, é regulado positivamente em células leucêmicas após tratamento com glicocorticóides (GCs) e, portanto, é sugerido estarem envolvidos na apoptose induzida por GC *upstream* a família de proteínas Bcl-2 (U,M *et al.* 2004).

Em 2004, Zaza e colaboradores descobriram que a taxa de síntese “*de novo purine synthesis*” (DNPS) e a expressão de genes envolvidos nesta via, incluindo o *Phosphoribosyl glycinamide formyltransferase (GART)* foram menores nos pacientes LLA *ETV6-RUNX1* positivo quando comparados com outros subtipos de LLA. A DNPS é um alvo dos agentes antileucêmicos amplamente utilizados e uma menor taxa de DNPS poderia tornar os pacientes LLA *ETV6-RUNX1* positivos mais sensíveis a

agentes antileucêmicas que inibem DNPS. Portanto, uma maior expressão de *GART* em pacientes iAMP21 positivos, poderia contribuir para o mau prognóstico (ZAZA, 2004).

#### 1.3.2.4.9.2 Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B com perfil iAMP21-like

Recentemente, geramos evidências de que a técnica de *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) poderia contribuir para uma melhor identificação de casos sugestivos para iAMP21, ao compararmos os picos de material genômico entre os pacientes LLA-CPB. Tais pacientes foram agrupados de acordo com o número de sinais de *RUNX1* pelo FISH e denominados como: Grupo1 [ $\geq 5$  sinais *RUNX1* (n=8)], Grupo 2 [2-4 sinais *RUNX1* (n=31)], Grupo 3 [Sem dados disponíveis de FISH (n=10)], Grupo 4 [Pacientes que tinham, pelo menos, uma cópia adicional do cromossomo 21, tais como SD e hiperdiploidia (Hyp+21) (n=8)] [Modificado de FUKA *et al.* 2015].

Após as análises do MLPA foram observados um perfil semelhante de ganho de material genômico (quadrantes vermelhos) em alguns pacientes pertencentes aos grupos 1, 2 e 3. Já no grupo 4, nos quais estavam os casos com SD e hiperdiploidia com adição do cromossomo 21 (Hyp+21), notaram-se os menores sinais e picos de ganho no material genômico. O grupo 5, foi denominado ao conjunto de casos que tiveram picos de material genômico considerado normal pelo MLPA (MLPA normal) (n=12)] (Figura 1.12) [Modificado de FUKA *et al.* 2015].

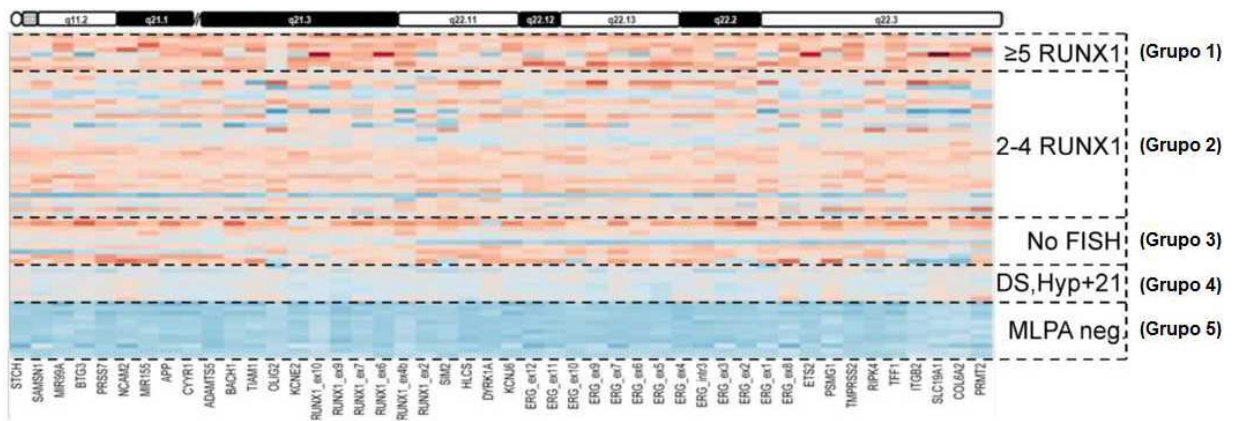


Figura 1.12 *Heat map* dos picos de material genômico das análises de MLPA obtidos a partir de um conjunto de sondas. Os pacientes descritos são com  $\geq 5$  sinais *RUNX1* (n=8/Grupo 1), 2-4 sinais *RUNX1* (n=31/Grupo 2), sem dados disponíveis de FISH (n=10/Grupo 3) e os casos com SD e hiperdiploidia com adição do cromossomo 21 (Hyp+21 (n=8), bem como material genômico considerado normal pelos picos de MLPA (n=12). [Modificado de FUKA *et al.* 2015]

Com base na similaridade do ganho de materiais genômicos observados em alguns pacientes pertencentes principalmente nos grupos 1, 2 e 3, realizamos as análises de agrupamento hierárquico e componentes principais entre os cinco grupos estudados e identificamos três novas categorias de acordo com os picos do MLPA: A terceira categoria continha os casos com os menores picos de material genômico, e constavam todos os casos pertencentes ao grupo 5 e um caso do grupo 3. A segunda categoria incluía os casos com picos intermediários de material genômico, sendo todos os casos do grupo 4 e um grande número de casos dos grupos 2 e 3, respectivamente. Já a primeira categoria continha os casos com os maiores picos de materiais genômicos e reuniu todos os casos do grupo 1 e uma mistura de casos dos grupos 2 e 3 (Figura 1.13). Diante disso, a primeira categoria reuniu uma mescla de casos que exibiam picos semelhantes de material genômico e alguns casos com características de pacientes iAMP21 ( $\geq 5$  sinais *RUNX1* pelo FISH), além dos casos que não preenchiam estes critérios para iAMP21. Apoiado nestes dados, denominamos esta primeira categoria como LLA-CPB de perfil "iAMP21-like" a partir das semelhanças entre os picos de material genômico pelo MLPA [Modificado de FUKA *et al.* 2015].



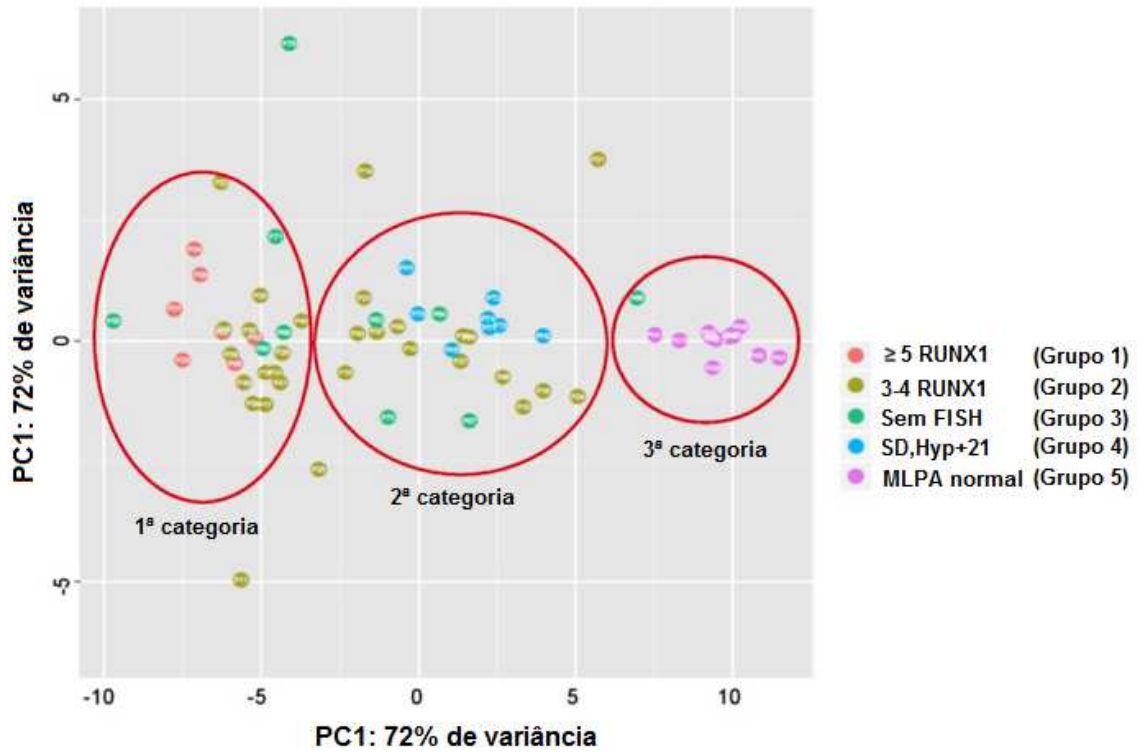


Figura 1.13 Análise de componentes principais dos pacientes agrupados. Os indivíduos estão distribuídos de acordo com as semelhanças entre os perfis de material genômico através dos picos de MLPA e representado por círculos codificados por cores que designam certos grupos de pacientes. Círculos vermelhos demonstram a presença de três categorias principais. [Modificado de FUKA *et al.* 2015]

## 2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Conforme descrito anteriormente, os pacientes com leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B com iAMP21 tem um pior prognóstico, alto risco de recaída e uma sobrevida inferior em comparação a outros subtipos leucêmicos. Além disso, existem poucos estudos que caracterizem este grupo. Sendo assim, faz-se necessário uma melhor investigação sobre as suas particularidades para o melhor entendimento biológico e clínico.

Para a identificação da iAMP21, a técnica de FISH vem sendo considerada o método de escolha para o diagnóstico laboratorial. Entretanto, a utilização de apenas um gene na sua detecção pode gerar resultados incorretos, visto que este procedimento requer uma adequada integridade do DNA ou presença de núcleos metafásicos. Esses pré-requisitos são fundamentais para que clones ocultos sejam detectados, minimizando assim conflitos de resultados com cariótipos hiperdiploides, por exemplo.

A Região comum de amplificação (RCA) de aproximadamente 6 Mb detectada no braço longo do cromossomo 21 de todos os pacientes com iAMP21, representa até este momento a única anormalidade recorrente neste subtipo. Dentre os genes presentes nesta região, destacamos *GART*, *IFNGR2*, *DSCR1*, *DYRK1A*, *RUNX1*, *ETS2* e *ERG*, os quais realizam funções importantes no desenvolvimento celular e/ou na resposta terapêutica de vários subtipos leucêmicos. Entretanto, o papel desempenhado por estes genes nas LLAs-CPB com iAMP21 não está bem estabelecido.

Recentemente, demonstramos que a técnica de MLPA poderia auxiliar na identificação de casos sugestivos para iAMP21 ao diagnóstico. Neste contexto, através de análises de agrupamento hierárquico e componentes principais baseadas nos picos de MLPA sugerimos um grupo com perfil "iAMP21-like" (iAMP21-like) em casos que não teriam sido identificadas apenas por FISH.

Com base nisso, nossa hipótese é de que os níveis diferenciais dos transcritos de genes localizados na RCA poderiam contribuir na biologia e/ou auxiliar na melhor caracterização dos casos *iAMP21-like* e, casos com 3-4 sinais e  $\geq 5$  sinais de *RUNX1* pelo FISH, aos quais são sugestivos para o diagnóstico de hiperdiploidia e *iAMP21*, respectivamente.

Este tipo de abordagem nas LLA-CPB são de grande relevância, visto que o subgrupo *iAMP21-like* requer validação de dados gerados por estudos de escala genômica global, e os grupos vistos por FISH carecem de dados que confirmem o seu status. Além disso, as informações obtidas neste estudo podem direcionar futuras investigações que contribuam com a avaliação de risco, visto que a literatura ainda necessita de trabalhos que identifiquem genes importantes para a leucemogênese destes subgrupos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo principal

Identificar genes que possam ser potencialmente relevantes para a patogênese e/ou caracterização das LLAs de células precursoras B com ampliações recorrentes no cromossomo 21.

#### 3.2 Objetivos secundários

- Avaliar os níveis transcricionais dos genes *GART*, *IFNGR2*, *DSCR1*, *DYRK1A*, *RUNX1*, *ETS2* e *ERG* nos subgrupos de LLA-CPB;
- Analisar o número de cópias dos genes com níveis diferenciais de transcritos nos subgrupos *iAMP21-like*, 3-4 sinais e  $\geq 5$  sinais de *RUNX1* pelo FISH;
- Examinar a correlação entre os níveis transcricionais e o status do número de cópias gênicas nos subgrupos *iAMP21-like*, 3-4 sinais e  $\geq 5$  sinais de *RUNX1* pelo FISH dos genes com níveis diferenciais de transcritos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Casuística

Os sujeitos deste estudo são crianças e adolescentes (0-18 anos) com diagnóstico de LLA-CPB de acordo com os critérios da OMS, recebidas no Programa de Hematologia-Oncologia Pediátricos (PHOP) do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Rio de Janeiro do período de 2002 a 2015 que tinham percentual de blastos  $\geq 30\%$ . A partir de 364 aspirados de MO, foram incluídos neste estudo 74 casos que tinham ganho de material genômico pelos perfis de MLPA. Estes casos foram analisados por FISH, aos quais foram identificados 13 casos com 3-4 sinais de *RUNX1* e 9 casos com  $\geq 5$  sinais de *RUNX1*, além de 13 casos com perfil *iAMP21-like* detectados pelas análises de agrupamento hierárquico e componentes principais (FUKA *et al.*, 2015). Como grupo comparativo, foram incluídos 46 casos de subtipos de LLA-CPB identificados com a fusão *ETV6-RUNX1* (n=13) e sem fusões gênicas recorrentes (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* e *KMT2Ar*; n=15) pelas análises de RT-PCR, com a anomalia SD (n=7), com cariótipo hiperdiploide com adição do cromossomo 21 (HD+21; n=5) e com um perfil considerado normal pelo MLPA (MLPA normal; n=6) como grupo normalizador. Estes dados estão representados na figura 4.1.

Os dados clínicos dos pacientes foram enviados pelos médicos participantes do estudo através da rede de colaboração do PHOP pelo preenchimento do formulário (Anexo I) e plataforma eletrônica ([imunomolecular.inca.gov.br](http://imunomolecular.inca.gov.br)).

Critérios de exclusão: Foram excluídos casos com percentual de blastos inferior a 30% e/ou baixa viabilidade celular.

Para a utilização destas amostras no estudo foi solicitada aos responsáveis legais a autorização através da concordância expressa pela assinatura do termo de consentimento livre e assistido (TCLE) (Anexo II). O projeto foi devidamente aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do INCA sob o número de protocolo CAAE #626.268 em 28 de abril de 2014 (Anexo III).

## 4.2 Desenho de estudo

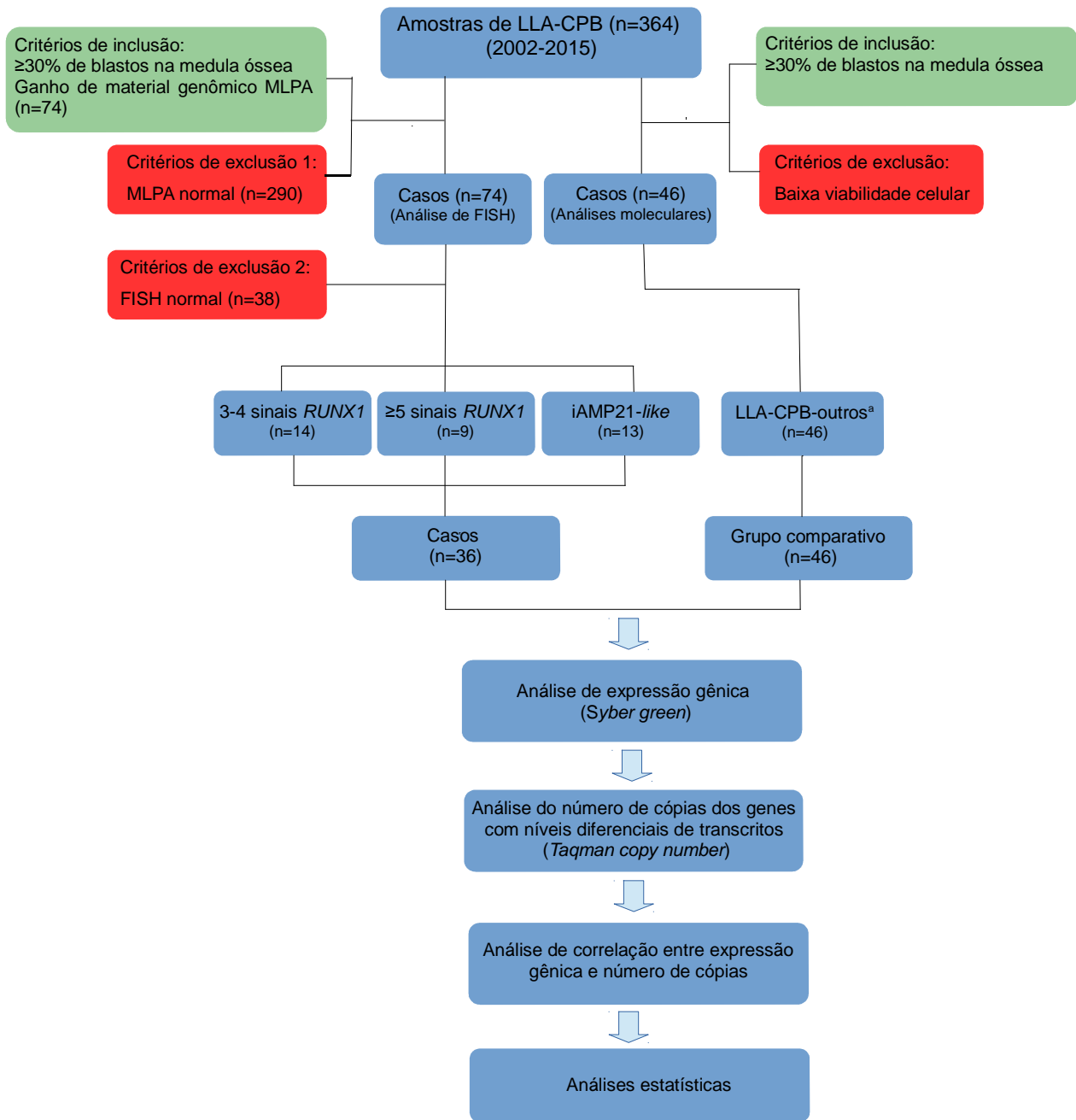


Figura 4.1 Fluxograma do estudo.

**a**, Outros subgrupos de LLA-CPB: fusão *ETV6-RUNX1* (n=13), sem fusões gênicas recorrentes (*ETV6-RUNX1*, *BCR-ABL1*, *TCF3-PBX1*, *r-KMT2A*; n=15), SD (n=7), hiperdiploidia com cópias adicionais do cromossomo 21 (HD+21; n=5) e casos sem alterações no número de cópias do cromossomo 21 pelos picos de MLPA (normal MLPA; n=6).

### 4.3 Identificação e caracterização dos subtipos LLA-CPB

Segundo a logística do PHOP, as amostras seguiram um algoritmo de testes até a sua caracterização e diagnóstico ([www.inca.gov.br/phop](http://www.inca.gov.br/phop); POMBO-DE-OLIVEIRA *et. al.*, 2008).

Em resumo, foram realizadas análises morfológicas em lâminas de medula óssea e/ou sangue periférico através da coloração pelas substâncias “*May-Grunwald-Giemsa*” para distinção entre as linhagens mieloide e linfoide.

Posteriormente as avaliações citomorfológicas as amostras foram submetidas a análises imunofenotípicas com anticorpos monoclonais (AcMos) conjugados e direcionados para antígenos intracelulares e de superfície. A caracterização imunofenotípica incluiu um painel de triagem com os AcMos intracelulares anti-mieloperoxidase (MPO), CD79<sup>a</sup> e CD3 e AcMos para superfície celular CD45, CD19 e CD34. Após a definição de linhagem pela triagem, foi realizada identificação do subtipo LLA-CPB com um painel que contempla os AcMos anti-*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase* (cyTDT), CD20, CD45, CD19, CD10, CD9, cIgM, CD58, CD66c, CD123, CD38 e CD13+CD33. Em seguida, as células marcadas com os AcMos foram adquiridas e analisadas pelo citômetro de fluxo FACScanto II 2350 da BD Biosciences, San Jose, CA.

A caracterização citogenética-molecular foi realizada após a confirmação leucêmica pelas análises morfológicas e imunofenotípicas. As alterações que são frequentemente encontradas neste subgrupo, tais como *ETV6-RUNX1*, hiperdiploidia, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1*, *KTM2A-r* e *iAMP21* foram rastreadas utilizando técnicas importantes como RT-PCR, citogenética convencional e FISH.

### 4.4 Preparo das amostras para a avaliação da expressão gênica

#### 4.4.1 Extração de RNA

O RNA das amostras de MO leucêmicas foram extraídos e purificados após a caracterização imunofenotípica e o armazenamento em trizol. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções descritas no protocolo do fabricante.

Em cada tubo de 1,5 mL contendo as células armazenadas com trizol, foram adicionados 200µl de clorofórmio, e agitado por cerca de 15 segundos, sendo em seguida incubada a temperatura ambiente por 3 minutos. Os tubos, então, foram centrifugados a uma temperatura de 4°C, a 1.400 rpm por 15 minutos. Após essa centrifugação, a fase líquida, separada pela centrifugação, foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e, a ela foram adicionados 500µL de isopropanol, e incubando em seguida a temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C. O sobrenadante separado pela centrifugação é desprezado e, ao tubo foi adicionado 1mL de Etanol a 75%, sendo centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm a 4°C. Mais uma vez o sobrenadante foi desprezado por inversão e, os tubos foram deixados abertos para uma melhor evaporação do etanol. O *pellet* foi ressuspensão com 20µL de H<sub>2</sub>O DEPC (dietil pirocarbonato) e então, incubados por 10 minutos no banho seco a 60 °c.

Para avaliar a qualidade e a viabilidade do RNA extraído foi feita uma eletroforese com 1µl do produto da extração em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed (Uniscience). Prosseguiram no estudo, todos os RNAs aos quais foram possíveis observar as duas bandas ribossomais de 28S (superior) e 18S (inferior), o que assegura a integridade do mesmo e pode ser observado na figura 4.2. Os RNAs que não tinham esse padrão foram excluídos.

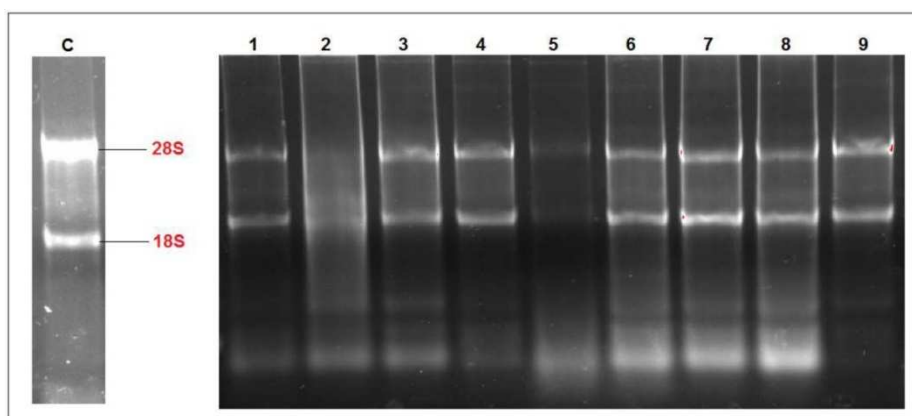


Figura 4.2 Gel de eletroforese sobre a integridade do RNA. Foto do gel corado com GelRed, mostrando a presença das duas bandas ribossomais 28S e 18S. C: RNA controle; (1-9): RNAs representativos do estudo. Foram excluídos do estudo os RNAs aos quais não tinham as bandas ribossomais semelhantes aos observados no controle.



Os que apresentaram uma boa viabilidade nos géis de eletroforese foram quantificados com 1,0 µl de RNA através de um espectrofotômetro (*NanoDrop1000*), ajustando-se o fator de diluição para a unidade de concentração ng/µl. As absorvâncias foram de 260nm e 280nm.

#### 4.4.2 Síntese de DNA complementar

Após a avaliação do RNA extraído foi realizado a síntese do DNA complementar (cDNA) seguindo o protocolo da Invitrogen (Kit Invitrogen) a partir de 3µg de RNA.

A primeira etapa da síntese de cDNA consiste na adequação da quantidade do volume da reação. O volume total para cada tubo foi de 8,2µL, sendo 3µg de RNA e o restante em H<sub>2</sub>O DEPC. Em seguida foram adicionados 1µL de tampão 10x e 0,8µL da DNase II, enzima utilizada para eliminar qualquer contaminação por DNA residual na amostra. Em seguida as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 1µL de EDTA (25mM), e seguidamente incubado a 65 °C por 15 minutos e, resfriado no gelo por 1 minuto. A segunda etapa da síntese consiste na transcrição do RNA. Para tal, foram adicionados 1µL de oligo dT e 1µL de dNTP incubando novamente a 65 °C e colocado no gelo por 1 minuto. Logo depois foram adicionados 4µL de tampão 5x, 2µL de DTT e 1µL de H<sub>2</sub>O DEPC, incubando em seguida a 42 °C por 2 minutos. Após esse intervalo, foi adicionada 1µL da enzima *SuperScript*, incubando a 42° por 50 minutos, seguido de 15 minutos a 70°C. Ao final o cDNA foi diluído em 30 µL de H<sub>2</sub>O DEPC.

#### 4.4.3 Integridade do cDNA por PCR

A reação de síntese do cDNA foi verificada através da amplificação do gene constitutivo *GAPDH* (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) pela técnica de RT-PCR. Em um tubo de 1,5 mL foram preparadas as soluções com o volume final de 20µL. Foram adicionados 2,0 µL do cDNA sintetizado e os seguintes reagentes: solução tampão 1x (Invitrogen), cloreto de magnésio 2,5mM (Invitrogen), dNTPs 200mM (Qiagen), *primers* iniciadores 400mM cada, 1 unidade de *Taq DNA polymerase* (Invitrogen) e água estéril para completar o volume da reação. Essas reações foram realizadas em um termociclador PCR-System 9700 e seguiram os seguintes ciclos e

temperaturas: desnaturação inicial a 95°C por 30 segundos, desnaturação de 94°C por 30 segundos, anelamento de 60°C por 30 segundos, extensão de 72°C por 45 segundos e após 35 ciclos uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos do PCR da síntese do cDNA foram confirmadas por uma corrida de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed. Seguiram no estudo, todos os cDNAs aos quais foram possíveis observar a banda amplificada do gene constitutivo GAPDH com aproximadamente 419 pb, como pode ser observado na figura 4.3.

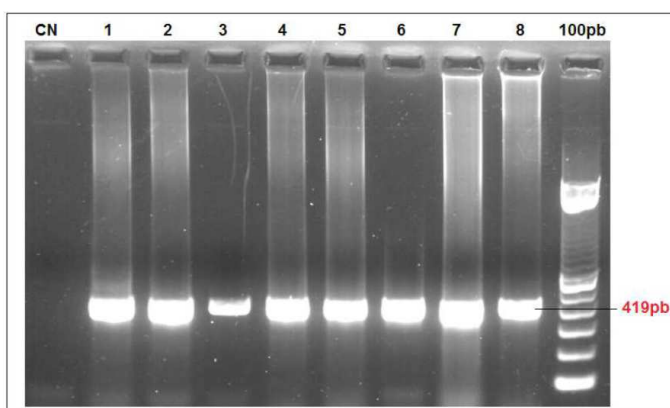


Figura 4.3 Gel de eletroforese da PCR para a detecção dos produtos de 419pb do gene *GAPDH* para a comprovação da presença do cDNA amplificado de amostras representativas do estudo. (**CN**) Controle negativo – água; (**1-8**) Amostras representativas do estudo; (100pb) Marcador de peso molecular.

#### 4.4.4 RT-qPCR

##### 4.4.4.1 Seleção do gene constitutivo

Para identificar o gene constitutivo mais estável foram selecionados três genes conhecidamente utilizados como controle endógeno. A estabilidade dos mesmos foram avaliadas por RT-qPCR a partir de cinco amostras de LLA-CPB. Os genes selecionados foram: GAPDH, ACTB ( $\beta$ -actina) e o 18S (RNA ribossômico 18S) conforme informado na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Genes de referência utilizados para avaliação quanto à estabilidade da expressão

Gene candidato	Sentido	Sequência (5' → 3')	Amplicon (pb)
<i>GAPDH</i>	Senso	TGACCCCTTCATTGACCTCA	419
	Anti-senso	AGTCCTTCCACGATACCAAA	
<i>ACTB</i>	Senso	CAGCAGATGTGGATCAGCAAG	151
	Anti-senso	GCATTTGCGGTGGACGAT	
18S	Senso	ATGATAACTCGACGGATCGC	105
	Anti-senso	CTTGGATGTGGTAGCCGTTT	

Após as análises foram observados que os genes *GAPDH* e *ACTB* tinham as médias de dCTs semelhantes entre os casos avaliados, como podem ser observados na figura 4.4.

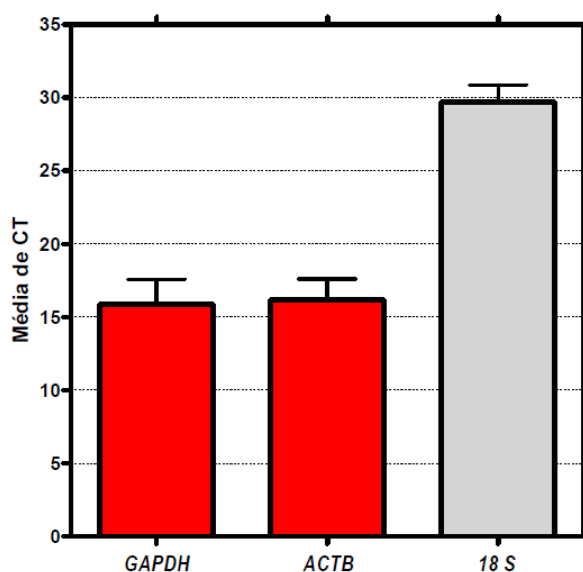


Figura 4.4 Análise de seleção do gene constitutivo por RT-qPCR.

Com base nestes dados e nos relatos da literatura, o *GAPDH* foi eleito como gene constitutivo para as análises dos níveis de transcritos gênicos deste estudo, visto que existem trabalhos que utilizam o mesmo gene nas avaliações de expressão gênica (STREFFORD *et al.*, 2006).

#### 4.4.4.2 Desenho dos oligonucleotídeos

Os *primers* iniciadores para cada transcrito avaliado foram desenhados usando a ferramenta *Primer3* e estão listados na tabela 3.2 abaixo.

Tabela 3.2 Oligonucleotídeos utilizados para a avaliação da expressão gênica por RT-qPCR

Oligo	Sentido	Sequência (5' → 3')	Amplicon (pb)
GART	Senso	GGTCTTGCAGCTGGAAAA	140
	Anti-senso	TTGTTTCTCCAGCTGCCC	
IFNGR2	Senso	GAGCTGGGAGCACTCCATT	100
	Anti-senso	CTGGGGTCACCTCAATGTTT	
DSCR1	Senso	ATGCGACCCCAGTCATAAA	120
	Anti-senso	CTGGGAGTGGTGTCAAGTCG	
DYRK1A	Senso	TGTAACCCCAAACGCAGTG	100
	Anti-senso	CCGATAAAAGCGACTCTGAA	
RUNX1	Senso	GAGCTGAGAAATGCTACCGC	120
	Anti-senso	GTCAGAGTGAAGCTTTTCCC	
ETS2	Senso	TTCCAAAGAACCCCTGGCTG	160
	Anti-senso	GAACCTCTGCAGATTCACG	
ERG	Senso	AGTAGCCGCCTTGCAAAT	108
	Anti-senso	GTGCCTTCCCAGGTGATG	

([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi))

#### 4.4.4.3 Eficiência de amplificação

Para avaliar a eficiência de amplificação dos *primers* utilizados no estudo foram feitas curvas padrão. O cDNA foi submetido a diluições seriadas, partindo da concentração estoque de 60ng/μL, e depois nas razões de 1:10 (6,0ng/μL), 1:100 (0,60ng/μL), 1:1000 (0,060ng/μL) e 1:10000 (0,0060ng/μL), e avaliados por RT-qPCR. As reações foram realizadas em duplicatas para cada uma das diluições do cDNA. Os valores da eficiência de amplificação de cada *primer* foram determinadas através dos Cts (*Cycle threshold*), os quais devem estar entre 95-100% de eficiência. Uma curva padrão de qualidade necessita que o coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) tenha os valores >0,99 e o slope próximo de 3.33 (BUSTIN *et al.*, 2009). As condições de

ciclagem das reações estão descritas nas reações de RT-qPCR.

A construção do gráfico foi entre o log da concentração e o Ct. O grau de ajuste da linearidade da reta ( $R^2$ ) das reações de *RUNX1*, *ERG*, *ETS2*, *IFNGR2*, *DYRK1A*, *DSCR1* e *GART* foram entre 0,99-1,0 e o coeficiente de inclinação da reta (*slope*) foram entre 3.337-3.398. A eficiência de amplificação para cada *primer* utilizado foi entre 95-100%, sendo assim considerados aceitáveis para os ensaios de RT-qPCR, como demonstra a figura representativa 4.5.

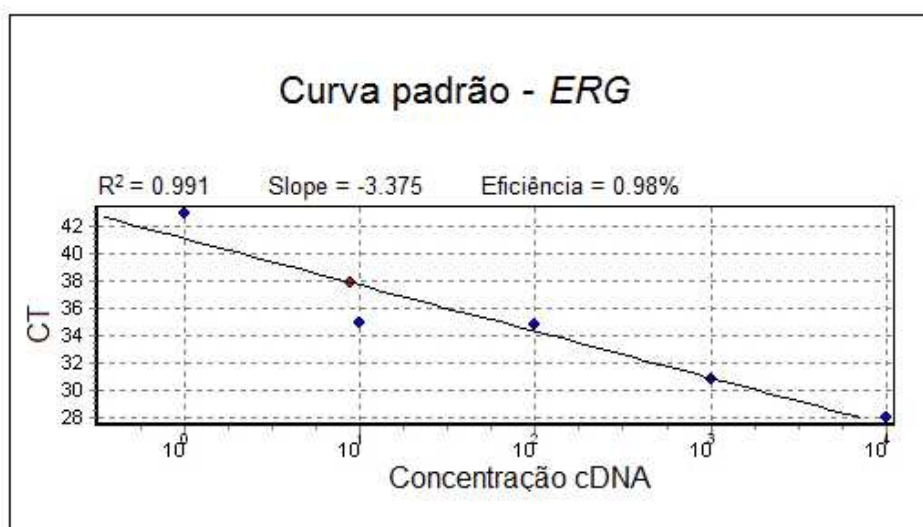


Figura 4.5 Representação gráfica de uma curva padrão. Gráfico da curva de *ERG* realizada entre o log da concentração e o Ct.

CT, *threshold cycle*;  $R^2$ , grau de ajuste da linearidade da reta; *Slope*, coeficiente de inclinação da reta.

#### 4.4.4.4 Reações de RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram realizadas em duplicatas no termociclador Rotor Gene Q 2plex HRM Platform System (Qiagen, Hilden, Alemanha) com a incorporação do marcador fluorescente *SYBR Green* na dupla fita de cDNA em cada ciclo. O volume final da reação foi de 15 $\mu$ L, dos quais continham 100-500 ng de cDNA, 100 nM de cada primer e o *SYBR® Green* do kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega BioSciences, LLC, San Luis Obispo, CA), de acordo com o protocolo do fabricante. As condições de termociclagem continham uma incubação de 2 minutos a 50°C, seguida por uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C. Depois as reações seguiram 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C para o anelamento

dos *primers* e extensão das cadeias respectivamente, seguida de 30 segundos a 72°C para a coleta do sinal. A curva de *melting* ou de dissociação foi gerada após a amplificação gênica e compreendeu uma etapa de 5 segundos a 95°C, seguido por outra de 5 segundos a 55°C e finalmente uma nova etapa de 5 segundos a 95°C.

Para a análise dos níveis transcricionais foram calculados os valores do *Cycle Threshold* (CT) de cada amostra, utilizando-se as médias das duplicatas, como ilustra a figura 4.6A. Em seguida, foram calculados os valores de *delta Cycle Thresholds* (dCTs) a partir das diferenças médias entre cada sequência de interesse (*RUNX1*, *ERG*, *ETS2*, *IFNGR2*, *DYRK1A*, *DSCR1* e *GART*) pela constitutiva (*GAPDH*) ( $dCT = CT_{\text{interesse}} - CT_{\text{constitutivo}}$ ). Para calcular o *delta delta Cycle Thresholds* (ddCT =  $dCT_{\text{alvo}} - dCT_{\text{referência}}$ ) foi realizada a diferença entre os valores dos dCTs dos genes de interesse em cada grupo alvo (3-4 sinais de *RUNX1*,  $\geq 5$  sinais de *RUNX1* e *iAMP21-like*) e os dCTs da amostra calibradora selecionada no grupo de referência (MLPA normal) para cada gene avaliado (MLPA normal =  $dCT_{\text{calibrador } RUNX1}$ ,  $dCT_{\text{calibrador } IFNGR2}$ ,  $dCT_{\text{calibrador } ERG}$ ,  $dCT_{\text{calibrador } ETS2}$ ,  $dCT_{\text{calibrador } DYRK1A}$ ,  $dCT_{\text{calibrador } DSCR1}$ ,  $dCT_{\text{calibrador } GART}$ ). Posteriormente, para medir as alterações nos níveis dos transcritos gênicos, foi utilizado o método do *fold-change* nos valores de ddCT de cada grupo alvo e de referência respectivamente, através do cálculo matemático  $2^{-(ddCT)}$ . Os genes dos grupos alvos foram considerados diferencialmente expressos, quando os valores de *fold-change* foram maiores ou menores que o corte pré-estabelecido de 1. Além disso, utilizamos a curva de *melting* para a identificação e distinção dos diferentes fragmentos amplificados através das temperaturas específicas de dissociação (temperatura de *melting*), como também ilustrado na figura 4.6B. O valor de CT é o ciclo no qual os duplicados atingem o melhor ponto de detecção da fluorescência pelo equipamento (BUSTIN *et al.*, 2009).

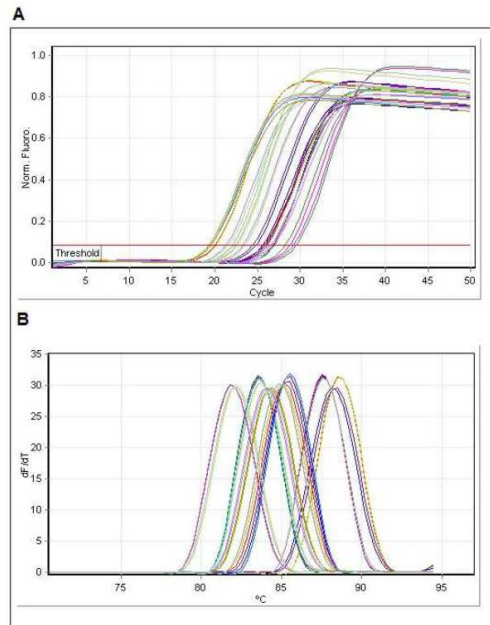


Figura 4.6 Representação gráfica de amplificação por PCR em tempo real. (A) Amplificação dos níveis de transcritos dos genes localizados na RCA. A linha de *threshold* detecta o ciclo na qual a reação atinge a mais alta eficiência de amplificação. (B) Curva de *melting* na distinção dos diferentes fragmentos amplificados.

## 4.5 Preparo das amostras para a avaliação das variações no número de cópias

### 4.5.1 Extração de DNA

Para os ensaios de avaliação do número de cópias gênicas, os DNAs foram obtidos a partir de células mononucleadas após a exclusão das hemácias. As extrações foram realizadas por meio do *kit Blood DNA isolation* (Qiagen, Hilden, Holanda), de acordo com as instruções descritas no protocolo do fabricante. Em seguida, foram utilizados 1,0  $\mu$ l do DNA para a quantificação através de um espectrofotômetro (*NanoDrop1000*), no qual ajustou-se o fator de diluição e a concentração em ng/ $\mu$ l. As absorvâncias avaliadas foram de 260nm e 280nm.

#### 4.5.2 Reações de PCR quantitativo das variações do número de cópias

As alterações no número de cópias dos genes diferencialmente expressos foram realizadas em triplicatas no termociclador ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando os ensaios de *TaqMan*® (Applied Biosystems, EUA) para as regiões específicas. O gene *Telomerase reverse transcriptase (TERT)* localizado no cromossomo 5 na região 5p15.33, foi recomendado pelo fabricante como controle interno de referência para calcular o número de cópias dos genes alvos e, para confirmar que a reação foi amplificada com sucesso.

Os ensaios de qPCR foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante e, continha 4ng/μl de DNA, 10μl de Master mix do ensaio *TaqMan*® *Copy Number Reference* (2x) (Applied Biosystems, EUA), 1μl de *TaqMan copy number* das regiões específicas de *ERG* e *ETS2* (20x solução de uso) e 1μl de *TaqMan reference* para as regiões específicas do controle endógeno *TERT* (20x working stock), além de 4μl de água ultrapura livre de nuclease, completando o volume final total para 20 μL. As ciclagens das reações tinham uma temperatura inicial de 95° C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Para as análises do número de cópias foram calculados os valores de dCT a partir de um limiar pré-determinado pelo fabricante (CT threshold = 0,2), como ilustrado na figura 4.7, entre a diferença dos valores de CTs dos genes de interesse e o gene referência (*TERT*). Para o cálculo do ddCT ( $ddCT = dCT_{alvo} - dCT_{referência}$ ) foi realizada a diferença entre os valores dos dCTs dos genes alvos em cada grupo de interesse (3-4 sinais de *RUNX1*, ≥5 sinais de *RUNX1* e *iAMP21-like*) e os dCTs da amostra calibradora selecionada no grupo de referência (MLPA normal) para cada gene avaliado, usando o software CopyCaller™ PN 4412907 (Applied BioSystems, EUA). Além disso, foram utilizados um controle negativo (água ultrapura) e amostras de pacientes com SD e HD+21 como controle positivo de amplificação, visto que os mesmos sabidamente apresentam pelo menos uma cópia de material genômico a mais.



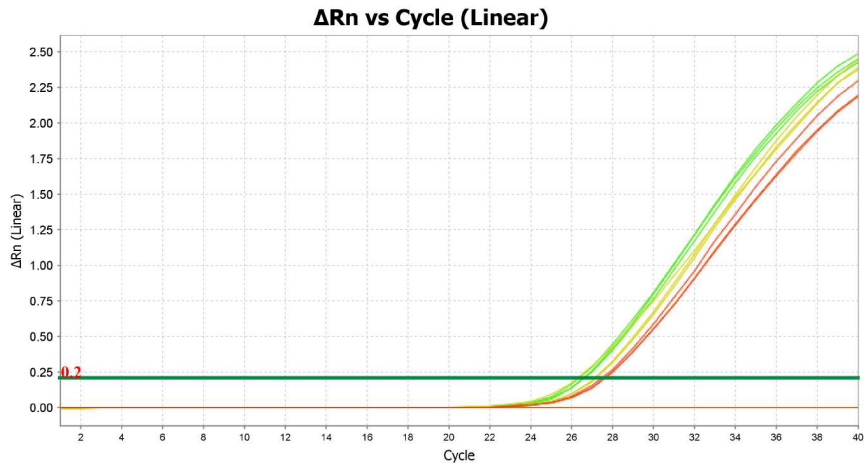


Figura 4.7

Representação gráfica de amplificação por PCR em tempo real a partir de um limiar informado pelo fabricante (CT=0,2). A linha de *threshold* detecta o ciclo na qual a reação atinge a mais alta eficiência de amplificação.

#### 4.5.3 Critérios para as análises combinadas de expressão gênica e número de cópias.

Para realizar as análises combinadas entre os níveis de transcritos e status do número de cópias gênicas foram estabelecidos alguns critérios importantes para classificar os casos dos subgrupos de LLA-CPB com amplificações recorrentes no cromossomo 21. Os níveis de expressão foram classificados em alto ou baixo de acordo com a média dos transcritos (média dCT=5,8) de todos os genes avaliados entre os 82 casos de LLA-CPB analisados no estudo [fusão *ETV6-RUNX1* (n=13); sem fusões gênicas recorrentes (*ETV6-RUNX1*, *BCR-ABL1*, *TCF3-PBX1*, *r-KMT2A*; n=15); SD (n=7); hiperdiploidia com cópias adicionais do cromossomo 21 (HD+21; n=5); casos sem alterações no número de cópias do cromossomo 21 pelos picos de MLPA (normal MLPA; n=6); 3-4 sinais de *RUNX1* (n=14); ≥5 sinais de *RUNX1* (n=9); iAMP21-like (n=13);]. Sendo assim, foram considerados casos com níveis de expressão relativa elevada aqueles com o dCT acima ou igual a 5,8 e, expressão reduzida aqueles casos com dCT menor que 5,8. O status do número de cópias foi estabelecido de acordo com o critério internacionalmente conhecido para designar amplificações gênicas, a qual considera uma amplificação os casos com mais de cinco (2 normais + 3 adicionais) cópias gênicas.

#### 4.5.4 Análises estatísticas

As análises de expressão gênica e de variações do número de cópias gênicas entre os grupos comparativos foram realizadas usando o teste t de *Student*. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significantes usando o programa *Graph Pad Prism* 4.02 (La Jolla. CA), com intervalos de confiança de 95%. A correlação entre os transcritos gênicos e as alterações no número de cópias foi avaliada usando os testes de *Pearson*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Características clínico-demográficas e laboratoriais dos pacientes

O presente estudo incluiu 82 casos de LLA-CPB sendo 6 casos com um perfil considerado normal pelo MLPA (MLPA normal; n=6) como grupo normalizador, com idade entre 0-18 anos que foram diagnosticados no período de 2002 a 2015 no PHOP. As características clínico-demográficas e laboratoriais dos três grupos de pacientes com amplificações recorrentes no cromossomo 21 encontram-se descritas na Tabela 5.1, tais como com 3-4 sinais de *RUNX1* (n=14),  $\geq 5$  sinais de *RUNX1* (n=9) e com perfil iAMP21-like (n=13).

A distribuição dos grupos de gênero, idade, contagem leucocitária, imunofenotipagem e de risco foi semelhante entre pacientes com 3-4 sinais de *RUNX1*,  $\geq 5$  sinais de *RUNX1* e com perfil iAMP21-like. A proporção de pacientes do sexo masculino foi maior nos três grupos com amplificações recorrentes. A maioria dos pacientes dos grupos iAMP21-like, 3-4 sinais de *RUNX1* e  $\geq 5$  sinais *RUNX1* foram diagnosticados com idades entre um e dez anos, com idade média de 6,9, 6,1 e 3,6 anos, respectivamente. A contagem leucocitária foi  $<50 \times 10^9/l$  nos três grupos. No entanto, a média foi ligeiramente menor no grupo de pacientes com perfil iAMP21-like ( $18,7 \times 10^9/l$ ). O imunofenotipo predominante foi LLA-comum, 10/14 (71,4%), 9/9 (100,0%) e 12/13 (92,3%) em pacientes com 3-4 sinais *RUNX1*,  $\geq 5$  sinais *RUNX1* e iAMP21-like, respectivamente.

O grupo comparativo dos pacientes com outras LLAs-CPB incluem os casos com *ETV6-RUNX1* (n=13), sem fusões gênicas conhecidas (n=15), hiperdiploidia com cópias adicionais do cromossomo 21 (n=5), síndrome de Down (n=7) e sem alterações no número de cópias do cromossomo 21 pelos picos de MLPA (n=6). Estes grupos estão descritos na tabela 5.1. Foram observados resultados semelhantes aos três grupos de pacientes amplificações recorrentes no cromossomo 21. De modo geral, o grupo comparativo tinha um número maior de casos de sexo masculino (54,4%), idade média entre 1-10 anos (71,7%) e contagem leucocitária  $<50 \times 10^9/l$  (71,7%).

Tabelas 5.1 Variáveis demográficas e laboratoriais de 76 pacientes LLA-CPB pediátricos

Características	3-4 <i>RUNX1</i> <sup>a</sup> Sinais	≥5 <i>RUNX1</i> <sup>a</sup> sinais	iAMP21 <sup>b</sup> <i>like</i>	Outras LLA-CPB
Total n (%)	14 (100.0)	9 (100.0)	13 (100.0)	46 (100.0)
Gênero				
Feminino	6 (42.9)	3 (33.3)	3 (23.1)	21 (45.6)
Masculino	8 (57.1)	6 (66.7)	10 (76,9)	25 (54.4)
Faixa etária (anos)				
Média	6.1 (0.5-10)	3.6 (0.5-10)	6.9 (0.5-10)	7.3 (0.5-10)
<1	0 (0.0)	1 (11.1)	0 (0.0)	1 (2.2)
1-10	11 (78.6)	8 (88.9)	10 (76,9)	33 (71.7)
>10	3 (21.4)	0 (0.0)	3 (23.1)	12 (26.1)
Cont. leucocit. (x 10 <sup>9</sup> /l)				
Mediana <sup>c</sup>	19.5 (10-100)	23.8 (10-100)	18.7 (10-100)	76.6 (10-100)
<50	10 (71.4)	6 (66.7)	9 (69.2)	33 (71.7)
≥50	4 (28.6)	3 (33.3)	4 (30.8)	13 (28.3)
LLA-CPB SD	-	-	-	7 (15.2)
Sub.citog. Mol.				
S/ fusões conhecidas	-	-	-	15 (32.6)
<i>ETV6-RUNX1</i>	1	1	-	13 (28.3)
HD+21	-	-	-	5 (10.9)
N. de cópias normais <sup>d</sup>	-	-	-	6 (13.0)
Subtipo LLA-CPB				
LLA-comum	10 (71.4)	9 (100.0)	12 (92.3)	41 (89.1)
LLA-pré B	4 (28.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (10.9)

<sup>a</sup> Definido por análise de FISH.

<sup>b</sup> Definido por análises de agrupamento hierárquico e de componentes principais dos dados MLPA.

<sup>c</sup>10.000-100.000); <sup>d</sup> Definido pelo de conjunto de sondas SALSA MLPA P327.

n, número; s, sem; SD, síndrome de Down; LLA-CPB, leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B; HD+21, hiperdiploidia com cópias adicionais do cromossomo 21.

## 5.2 Níveis de transcritos entre as LLAs-CPB *versus* amostra calibradora (MLPA normal)

Primeiramente foram comparados os níveis de RNAm dos genes *RUNX1*, *IFNGR2*, *ERG*, *ETS2*, *DYRK1A*, *DSCR1* e *GART* entre os aspirados de MO dos pacientes diagnosticados com LLA-CPB (n=76) e da amostra calibradora (n=1) do grupo controle LLA-CPB com um perfil considerado normal pelo MLPA. Conforme esperado e, em virtude à heterogeneidade molecular dos casos LLA-CPB incluídos, foram observadas grandes variações na expressão gênica. Os dados mostraram que todos os genes avaliados nos casos com LLA-CPB estavam, pelo menos, uma vez mais expresso em comparação à amostra calibradora do grupo controle, como demonstrado na figura 5.1.

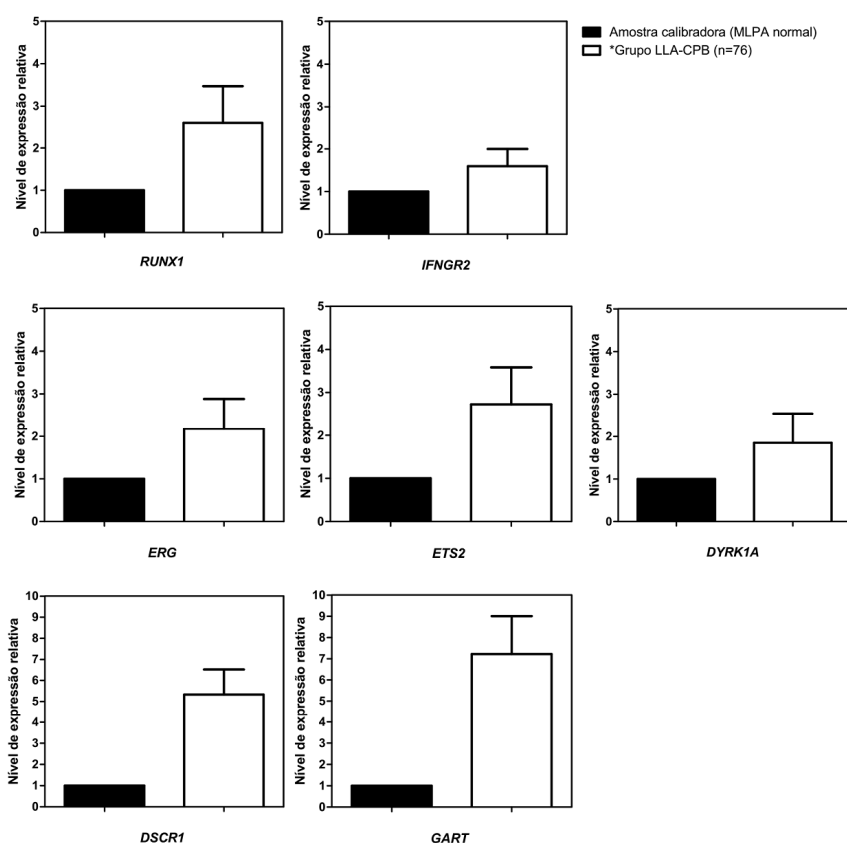


Figura 5.1 Quantificação dos níveis de expressão relativa por RT-qPCR dos genes *RUNX1*, *IFNGR2*, *ERG*, *ETS2*, *DYRK1A*, *DSCR1* e *GART*. Os diagramas *Box plot* retratam os valores de *Fold-change* dos pacientes com LLA-CPB [s/ fusões gênicas (n=15), *ETV6-RUNX1* (n=13), c/ síndrome de Down (n=7), c/ hiperdiploidia cromossomo 21 (n=5), *iAMP21-like* (n=13),  $\geq 5$  sinais *RUNX1* (n=9) e 3-4 sinais *RUNX1* (n=14)] e da amostra calibradora do grupo controle (MLPA normal).

### 5.3 Níveis de transcritos entre as LLAs-CPB com alterações no cromossomo 21 *versus* as outras LLAs-CPB.

Em seguida, foram comparados os níveis de transcritos entre os subgrupos de LLA-CPB com cópias adicionais ou ampliações no cromossomo 21 (3-4 sinais de *RUNX1*;  $\geq 5$  sinais de *RUNX1*; iAMP21-like; SD; HD+21) e os outros subtipos de LLA-CPB sem alterações no cromossomo 21 (*ETV6-RUNX1* e sem fusões gênicas recorrentes). Foram observados que todos os genes avaliados nos casos com alterações no cromossomo 21 estavam pelo menos uma vez mais expresso, em comparação aos casos do grupo sem alterações no cromossomo 21, como demonstrado na figura 5.2.

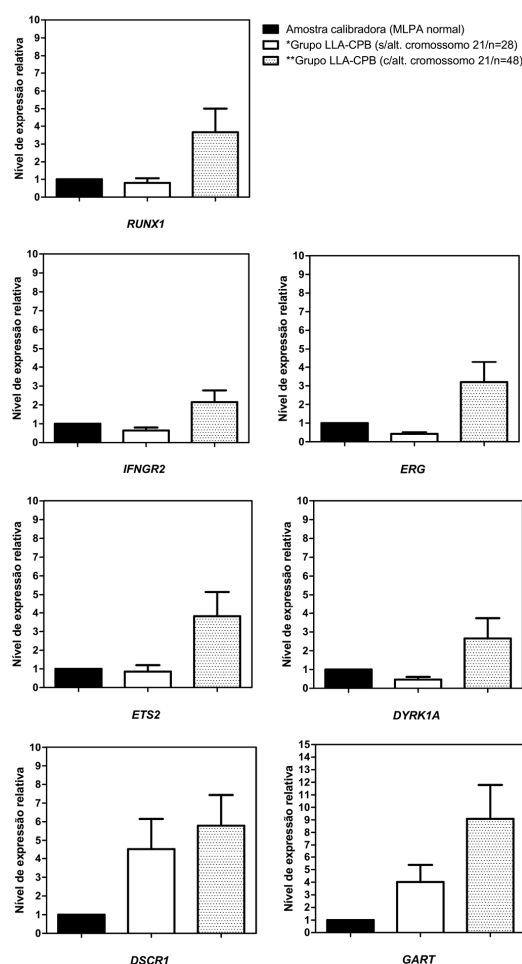


Figura 5.2 Quantificação dos níveis de expressão relativa dos genes *RUNX1*, *IFNGR2*, *ERG*, *ETS2*, *DYRK1A*, *DSCR1* e *GART* entre os grupos de LLA-CPB sem alterações no cromossomo 21 [s/ fusões gênicas (n=15) e *ETV6-RUNX1* (n=13)] e com alterações no cromossomo 21 [c/ síndrome de Down (n=7), c/ hiperdiploidia cromossomo 21 (n=5), iAMP21-like (n=13),  $\geq 5$  sinais *RUNX1* (n=9) e 3-4 sinais *RUNX1* (n=14)] e da amostra calibradora do grupo controle (MLPA normal).

#### 5.4 Análise dos níveis de transcritos por subgrupo de LLA-CPB

Para melhor caracterizar os casos de LLA-CPB (n=76), foram os níveis transcricionais dos genes incluídos neste estudo, entre os diferentes subtipos de LLA-CPB, tais como s/ fusões gênicas (n=15), *ETV6-RUNX1* (n=13), c/ síndrome de Down (n=7), c/ hiperdiploidia do cromossomo 21 (n=5), *iAMP21-like* (n=13),  $\geq 5$  sinais *RUNX1* (n=9) e 3-4 sinais *RUNX1* (n=14). As análises demonstraram diferenças nos níveis de transcritos entre os subtipos leucêmicos de células precursoras B, no qual alguns genes estavam pelo menos uma vez mais expresso em um determinado subtipo que outro. Foi observado um aumento de expressão estatisticamente significativo do gene *ERG* no grupo LLA-CPB *iAMP21-like* quando comparados aos grupos s/ fusões gênicas (\*\*p=0.01) e *ETV6-RUNX1* (\*\*p=0.01), do gene *DSCR1* no grupo LLA-CPB com 3-4 sinais de *RUNX1* em relação ao grupo *ETV6-RUNX1* (\*p=0.03) e do gene *GART* no grupo LLA-CPB com 3-4 sinais de *RUNX1* quando comparados aos grupos s/ fusões gênicas (\*p=0.04) e *ETV6-RUNX1* (\*p=0.04) respectivamente, como demonstrado na figura 5.3.

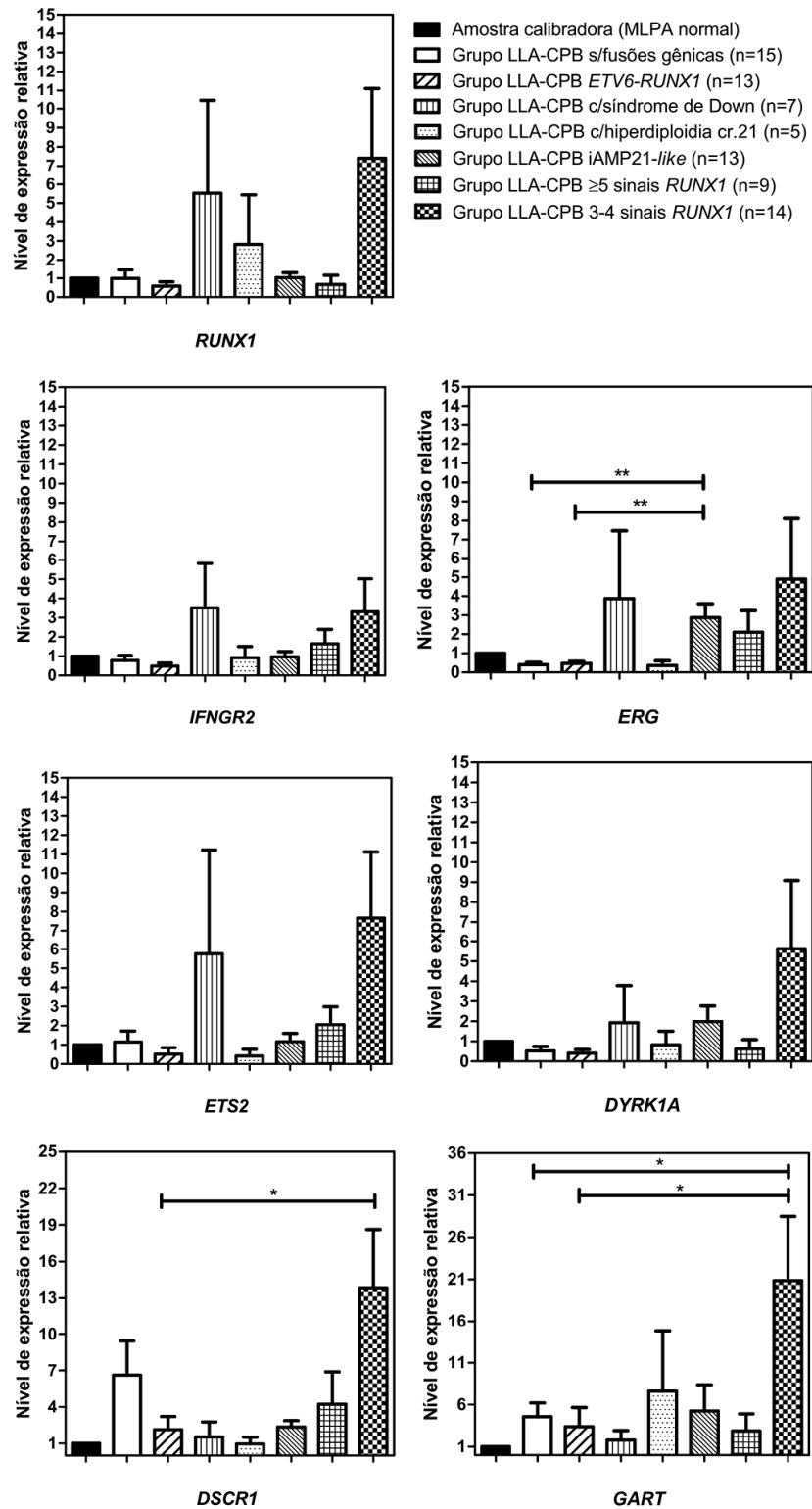


Figura 5.3 Quantificação dos níveis de expressão relativa dos genes *RUNX1*, *IFNGR2*, *ERG*, *ETS2*, *DYRK1A*, *DSCR1* e *GART* entre os subgrupos de LLA-CPB. Os diagramas *Box plot* retratam os valores de *Fold-change* dos diferentes subgrupos de LLA-CPB.



## 5.5 Identificação de genes diferencialmente expressos

Com a intenção de identificar genes com expressão diferencial no grupo com ampliações recorrentes no cromossomo 21 [iAMP21-*like* (n=13),  $\geq 5$  sinais *RUNX1* (n=9) e 3-4 sinais *RUNX1* (n=14)], os níveis transcricionais dos genes deste grupo foram avaliados e comparados entre os mesmos dos grupos sem alterações no cromossomo 21 [s/ fusões gênicas (n=15) e *ETV6-RUNX1* (n=13)] e com cópias adicionais do cromossomo 21 [síndrome de Down (n=7) e hiperdiploidia cromossomo 21 (n=5)], respectivamente.

Nestas análises foram observados um aumento de expressão relativa estatisticamente significativa dos genes *RUNX1* (\*p=0.015), *IFNGR2* (\*p=0.033), *ETS2* (\*\*p=0.008), *DYRK1A* (\*p=0.04), *DSCR1* (\*p=0.03) e *GART* (\*p=0.005) no subtipo LLA-CPB com 3-4 sinais de *RUNX1* quando comparado ao grupo LLA-CPB sem alterações no cromossomo 21, dos genes *ERG* (\*\*p=0.001) e *DYRK1A* (\*p=0.011) no subtipo LLA-CPB com perfil iAMP21-*like* quando comparado ao grupo LLA-CPB sem alterações no cromossomo 21, do gene *ERG* (\*p=0.013) no subtipo LLA-CPB com  $\geq 5$  sinais *RUNX1* quando comparado ao grupo LLA-CPB sem alterações no cromossomo 21 e do gene *DSCR1* (\*p=0.024) no subtipo LLA-CPB com 3-4 sinais de *RUNX1* quando comparado ao grupo LLA-CPB com cópias adicionais do cromossomo 21.

Entretanto, tomando como base os níveis transcricionais observados no grupo LLA-CPB com cópias adicionais no cromossomo 21, o qual nota-se que todos os genes avaliados estão pelo menos uma vez mais expresso que a amostra calibradora (figura 5.4), entendemos que os mesmos genes avaliados nos subtipos com ampliações recorrentes no cromossomo 21 que estivessem com um perfil de expressão semelhante ao grupo com cópias adicionais, poderiam ser considerados diferencialmente expressos. Sendo assim, identificamos que os genes *ERG* e *ETS2* estavam com um perfil de expressão semelhante ao grupo LLA-CPB com cópias adicionais nos três subtipos com ampliações recorrentes, iAMP21-*like*,  $\geq 5$  sinais *RUNX1* e 3-4 sinais *RUNX1*, respectivamente (figura 5.4). O mesmo pôde ser observado com os genes *DSCR1* e *GART*. No entanto, também notamos que os mesmos genes, *DSCR1* e *GART*, estavam com expressão elevada no grupo LLA-CPB sem alterações no cromossomo 21. Em virtude disso, compreendemos que apenas os genes *ERG* e *ETS2* tinham uma expressão gênica elevada nos subtipos com

amplificações recorrentes, e os elegemos para a avaliação do status do número de cópias gênicas, como pode ser observado na figura 5.4.

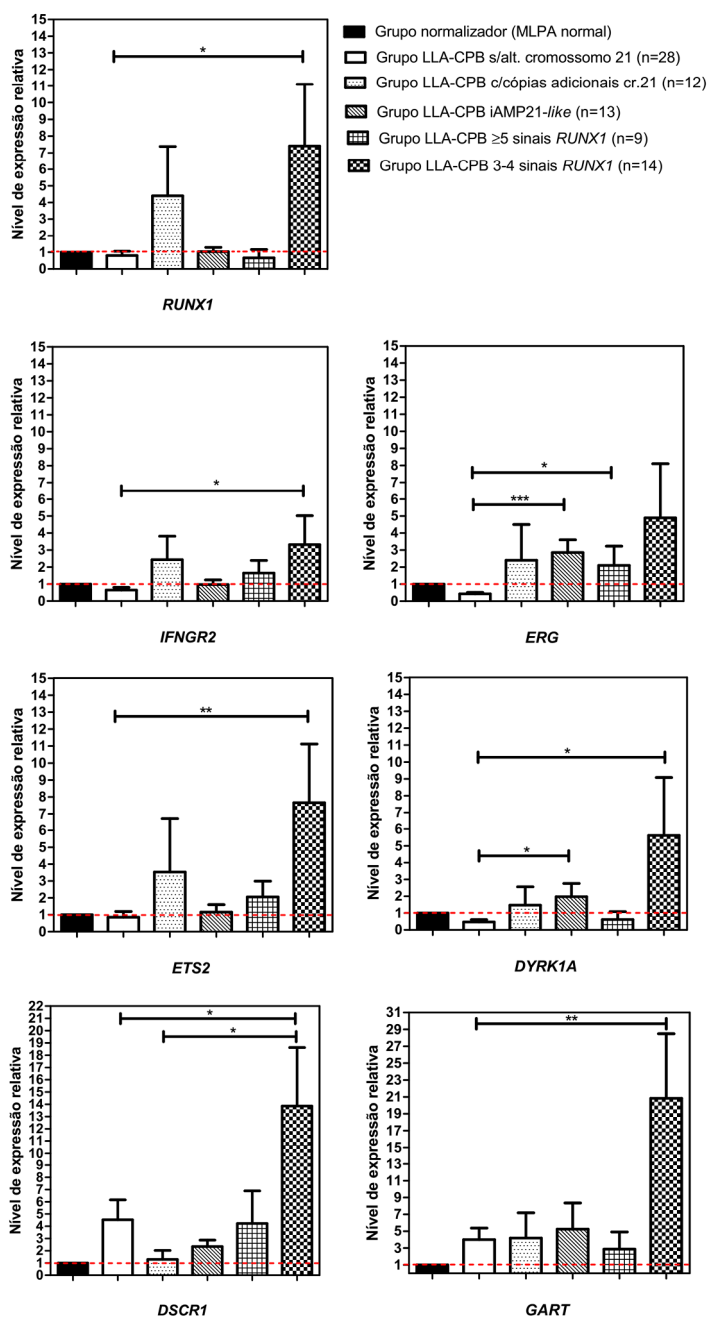


Figura 5.4 Quantificação dos níveis de expressão relativa dos genes *RUNX1*, *IFNGR2*, *ERG*, *ETS2*, *DYRK1A*, *DSCR1* e *GART* entre os grupos de LLA-CPB sem alterações no cromossomo 21, com cópias adicionais no cromossomo 21 e com amplificações no cromossomo 21 [iAMP21-like, ≥5 sinais *RUNX1* e 3-4 sinais *RUNX1*]. Os diagramas *Box plot* retratam os valores de *Fold-change* dos diferentes grupos de LLA-CPB.

## 5.6 Análise do número de cópias gênicas de subtipos específicos de LLA-CPB

Após as análises por RT-qPCR que demonstraram uma expressão diferencial dos genes *ERG* e *ETS2* no grupo com amplificações recorrentes, foram realizadas avaliações nos perfis de número de cópias destes genes entre os grupos de LLA-CPB sem alterações no número de cópias do cromossomo 21 (MLPA normal), SD, HD+21 e com amplificações recorrentes, tais como 3-4 sinais de *RUNX1*,  $\geq 5$  sinais *RUNX1* e *iAMP21-like*.

Segundo o critério internacionalmente conhecido para designar amplificações gênicas, as análises das variações no número de cópias dos genes *ERG* e *ETS2* primeiramente foram realizadas separadamente. Todos os casos do grupo MLPA normal revelaram um status normal do número de cópias para ambos os genes. Para os subgrupos com SD e HD+21 foram observadas cópias adicionais de *ERG* e *ETS2*. Seguindo a mesma linha, foram verificadas amplificações nos genes *ERG* e *ETS2* na maioria dos casos com 3-4 sinais *RUNX1*,  $\geq 5$  sinais *RUNX1* e *iAMP21-like*. Além disso, foram detectados alguns casos com cinco ou mais cópias de ambos os genes (figura 5.5), o que sugere que tais casos possam ser *iAMP21*.

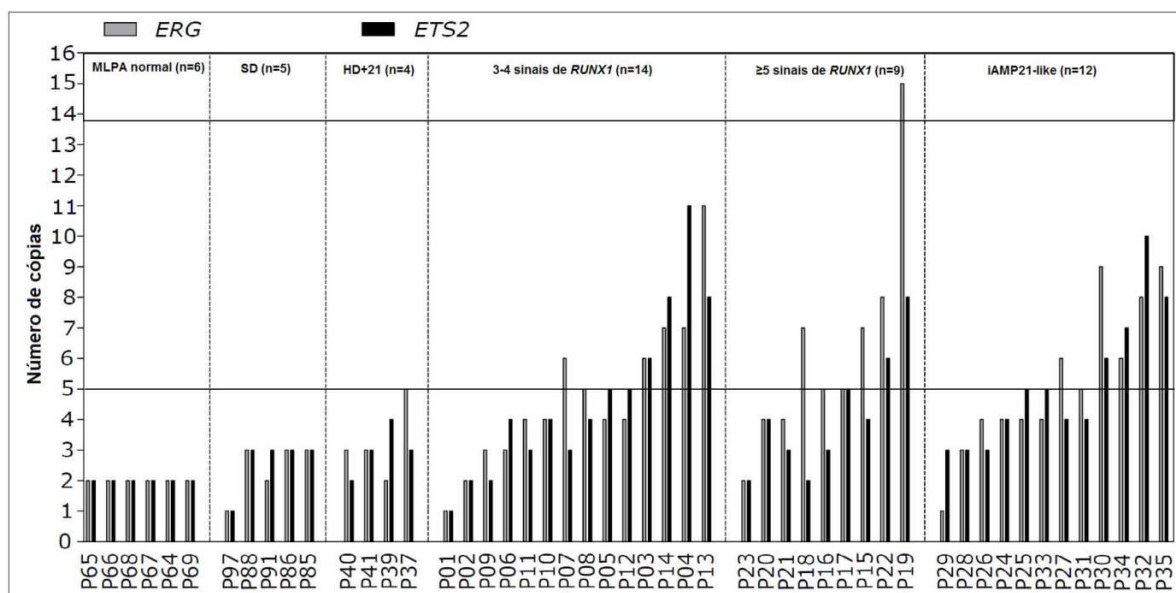


Figura 5.5 Quantificação do número de cópias dos genes *ERG* e *ETS2* nos diferentes subtipos de LLA-CPB. A linha horizontal divide os números de cópias dos genes *ERG* e *ETS2* abaixo e acima de cinco respectivamente.

Em seguida, as variações no número de cópias foram avaliadas pela média de ambos os genes descritos. Mais uma vez os casos do subgrupo MLPA normal revelaram um status normal, com duas cópias gênicas. A maioria dos casos dos subgrupos com SD e HD+21 tinham três cópias gênicas. Os subgrupos com 3-4 sinais *RUNX1*,  $\geq 5$  sinais *RUNX1* e iAMP21-like exibiam entre duas e quatro cópias dos genes *ERG* e *ETS2* na maior parte dos casos. Entretanto, foram observados vários casos que tinham cinco ou mais cópias gênicas entre os três subgrupos com ampliações recorrentes no cromossomo 21, 3-4 sinais *RUNX1*,  $\geq 5$  sinais *RUNX1* e iAMP21-like (figura 5.6). Estes dados mais uma vez mostram que estes casos podem ser iAMP21, visto que apresentam cinco ou mais cópias de *ERG* e *ETS2*, o que não foi visto para o gene *RUNX1* por FISH.

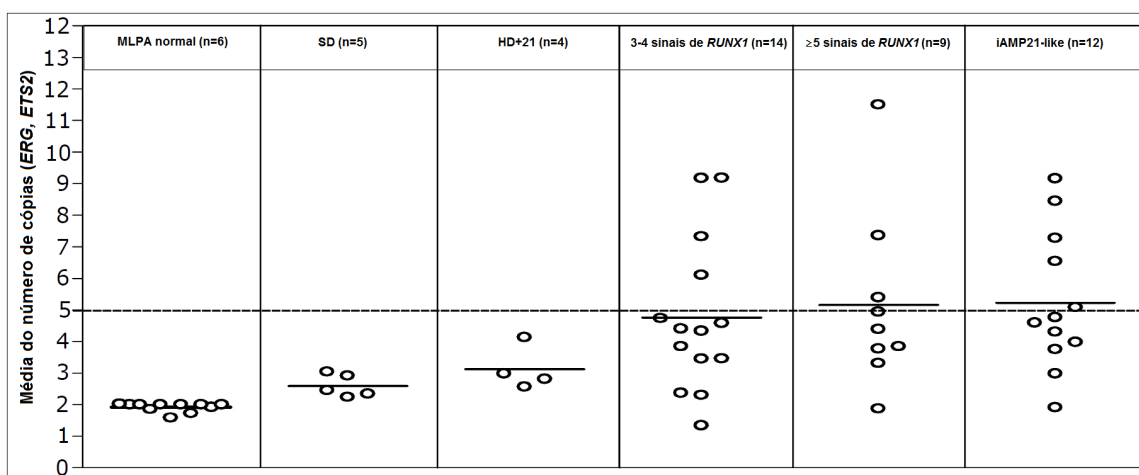


Figura 5.6 Quantificação do número médio de cópias gênicas de *ERG* e *ETS2* nos diferentes subtipos de LLA-CPB. Círculos abertos definem o número médio dos casos entre os subgrupos e a linha horizontal tracejada divide os pacientes com números médios de cópias dos genes *ERG* e *ETS2* abaixo e acima de cinco respectivamente.

### 5.7 Análise de correlação entre os níveis de transcritos e número de cópias de *ERG* e *ETS2*.

Com o intuito de averiguar se os níveis elevados de transcritos dos genes *ERG* e *ETS2* eram consequência do ganho de material genético nos três subgrupos de LLA-CPB, 3-4 sinais *RUNX1*,  $\geq 5$  sinais *RUNX1* e iAMP21-like respectivamente, foram realizadas análises de correlação dos status do número de cópias *versus* os valores de expressão gênica relativa (*fold-change*) dos genes avaliados para ambos os

parâmetros. Os resultados demonstraram uma correlação positiva moderada ( $r^2 = 0,3333$ ) e ( $r^2 = 0,1047$ ) entre o número de cópias e expressão dos genes *ETS2* e *ERG*, respectivamente, como pode ser observado na figura 5.7.

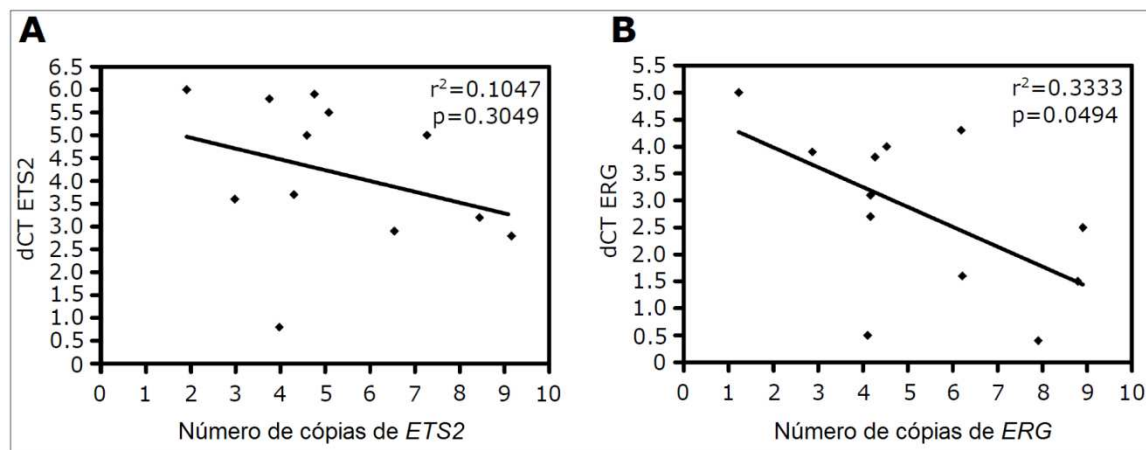


Figura 5.7 Figura representativa do impacto marginal do número de cópias gênicas sobre os níveis de RNAm do subtipo LLA-CPB iAMP21-*like* (n=12). Os gráficos de dispersão demonstram a influência entre o número de cópias dos genes *ETS2* (A) e *ERG* (B) sobre o nível de expressão gênica. Cada quadrado representa os dados de cada paciente. Semelhanças entre as variáveis são expressas por regressão linear (linhas), os coeficientes de correlação de Pearson ( $R^2$ ) e valores de p.

## 5.8 Combinações entre níveis de transcritos e número de cópias

Em virtude da dificuldade de se identificar com precisão os subtipos de LLA-CPB com amplificações recorrentes no cromossomo 21 e, diante da necessidade de se caracterizar melhor o grupo com amplificações recorrentes, os níveis de expressão gênica e o status do número de cópias gênicas de *ERG* e *ETS2* foram combinados com a finalidade de propor um algoritmo de teste que facilite a identificação dos pacientes com esta característica de amplificação recorrente. Com base nisso, foram analisados os dados de expressão gênica e número de cópias dos subgrupos de LLA-CPB com amplificações recorrentes no cromossomo 21, 3-4 sinais *RUNX1* (n=14),  $\geq 5$  sinais *RUNX1* (n=9) e iAMP21-*like* (n=12) e, classificados em um gráfico *dot plot* de acordo com critérios já descritos anteriormente, como demonstra a figura 5.8.

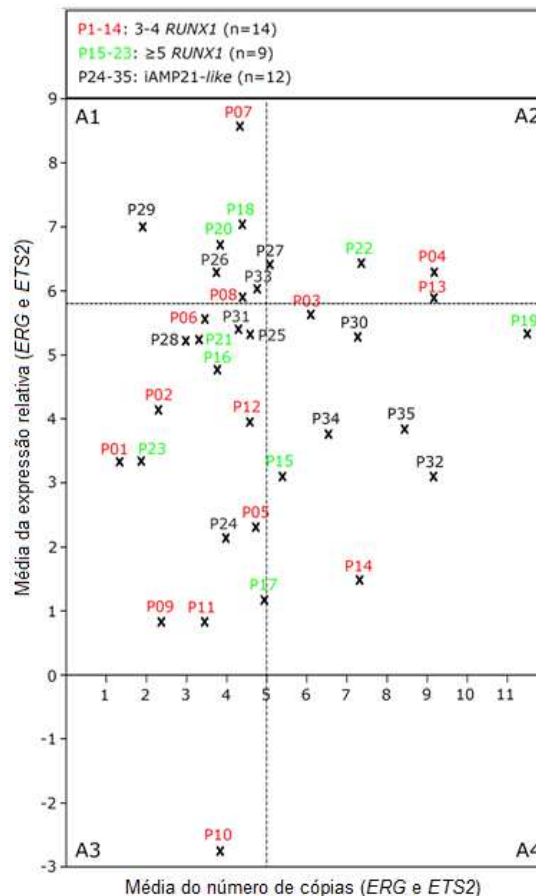


Figura 5.8 Caracterização das LLAs-CPB com 3-4 sinais de *RUNX1*,  $\geq 5$  sinais *RUNX1* e com perfil *iAMP21-like* a partir da relação entre número de cópias e os níveis de transcritos dos genes *ERG* e *ETS2*. Cada cruz representa um paciente (P). A linha tracejada vertical distingue as LLAs-CPB com média de número de cópias de *ERG* e *ETS2* abaixo (quadrantes A1, A3) e acima de cinco (quadrantes A2, A4), sugestivos de cópias extras do cromossomo 21 e de uma *iAMP21*. A linha horizontal tracejada marca o valor médio de dCT dos pacientes LLA-CPB identificados com expressão elevada (quadrantes A3, A4) e diminuída (quadrantes A1 e A2) no diagrama.

Na combinação dos dados foram identificados oito (22,9%) casos com expressão gênica elevada e número de cópias gênicas maior ou igual a 5 (quadrante A4). As características destes pacientes estão detalhadas na tabela 5.2. Entre estes casos, quatro pertenciam ao subgrupo *iAMP21-like* (P30, P32, P34 e P35), dois ao subgrupo com 3-4 sinais de *RUNX1* (P03 e P14), e dois do subgrupo com  $\geq 5$  sinais de *RUNX1* (P15 e P19). Estes dados mostram que esta abordagem que concilia expressão gênica e número de cópias possibilita identificar casos sugestivos de *iAMP21*, o que pode auxiliar na melhor caracterização dos casos pertencentes a estes subgrupos com ampliações recorrentes.

Tabela 5.2 Principais características dos pacientes sugestivos para iAMP21 (n=8) de acordo com os níveis de expressão gênica e status do número de cópias de *ERG* e *ETS2*

Pacientes	Faixa etária (anos)	WBC x 10 <sup>9</sup> /l	Subtipo LLA-CPB <sup>a</sup>	Grupo de risco <i>NCI</i>	Status <i>RUNX1</i>
P03	2,1	91,1	LLA-Pré B	Alto risco	3-4 sinais <i>RUNX1</i> <sup>b</sup>
P14	5,1	4,7	LLA-comum	Risco padrão	3-4 sinais <i>RUNX1</i> <sup>b</sup>
P15	2,3	7,3	LLA-comum	Risco padrão	≥5 sinais <i>RUNX1</i> <sup>b</sup>
P19	6,7	41,4	LLA-comum	Risco padrão	≥5 sinais <i>RUNX1</i> <sup>b</sup>
P30	3,5	44,6	LLA-comum	Risco padrão	iAMP21-like <sup>c</sup>
P32	15,9	5,9	LLA-comum	Alto risco	iAMP21-like <sup>c</sup>
P34	6,0	21,1	LLA-comum	Risco padrão	iAMP21-like <sup>c</sup>
P35	9,2	5,6	LLA-comum	Risco padrão	iAMP21-like <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Definido por análise imunofenotípica.

<sup>b</sup>Definido por análise de FISH.

<sup>c</sup>Definido por dados de agrupamento hierárquico e análise de componentes principais a partir do perfil de MLPA;

WBC, contagem de células brancas do sangue x 10<sup>9</sup>/l; LLA-CPB, leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B; *NCI*, Instituto Nacional do Câncer.

Um total de quatro (11,4%) pacientes tiveram menor expressão gênica e número de cópias números maior ou igual a cinco, sendo estes um caso iAMP21-like (P 27), dois casos com 3-4 sinais *RUNX1* (P04 e P13) e um caso com ≥5 sinais *RUNX1* grupos (P22) (quadrante A2). Além disso, 15 (45,7%) pacientes tiveram alta expressão do gene e número de cópias menor que cinco. Destes, quatro pacientes eram do subgrupo iAMP21-like (P24, P25, P28 e P31), oito casos eram do subgrupo com 3-4 sinais *RUNX1* (P01, P02, P05, P06, P09, P10, P11 e P12) e quatro do subgrupo com ≥5 sinais *RUNX1* (P16, P17, P21 e P23) (quadrante A3). Por último, foram identificados sete (20,0%) pacientes com uma expressão gênica baixa e número de cópias menor que cinco, dos quais três eram iAMP21-like (P26, P29 e

P33), dois eram com 3-4 sinais *RUNX1* (P07 e P08) e dois eram do subgrupo com  $\geq 5$  sinais *RUNX1* (P18 e P20). Não foi possível avaliar o status do número de cópias do paciente 36 (P36) (A1).



## 6. DISCUSSÃO

A amplificação intracromossômica do cromossomo 21 é a marca de um subgrupo distinto de LLA-CPB infantil, que apresenta um mau prognóstico quando são tratados com regimes terapêuticos padrão por razões que ainda permanecem obscuras (MOORMAN *et al.*, 2013). Aqui, identificamos uma expressão diferencial de alguns genes em pacientes com características de amplificação no cromossomo 21, que podem estar relacionados com a biologia e evolução da doença.

A iAMP21 foi inicialmente caracterizada pela presença de cinco (dois normais + três adicionais) ou mais sinais do gene *RUNX1* pela técnica de FISH, como aglomerados em núcleos interfásicos ou duplicação em tandem de um cromossomo 21 em metáfase (HAREWOOD *et al.*, 2003; MOORMAN *et al.*, 2007; HARRISON, 2015). A técnica de FISH foi, portanto, considerada o método universal de detecção e identificação deste subtipo, entretanto a caracterização desta anormalidade somente por esta técnica e, com base apenas em um gene pode resultar em erros, uma vez que núcleos interfásicos podem ocultar clones que são sugestivos de um cariótipo hiperdiploide com 3-4 cópias do gene *RUNX1* (ROBINSON *et al.*, 2003; HARRISON *et al.*, 2005).

Além disso, recentemente identificamos um grupo denominado iAMP21-*like* a partir dos picos de material genômico pela técnica de MLPA e, das análises de agrupamento hierárquico e componentes principais que reunia uma mescla de casos de LLA-CPB com outras características, dentre estes, os casos identificados por FISH em interfase com 3-4 cópias do gene *RUNX1*, sugestivos para hiperdiploidia, e com  $\geq 5$  sinais *RUNX1*, sugestivos para iAMP21 pelo critério internacional (FUKA *et al.*, 2015).

Estudos baseados na análise genômica da iAMP21 identificou uma RCA entre 33,192 e 39,796 Mb no braço longo do cromossomo 21 de todos os pacientes iAMP21. Nesta região foi identificada a presença de vários genes importantes no desenvolvimento e diferenciação celular, tais como o *RUNX1*, *IFNGR2*, *ERG*, *ETS2*, *DYRK1A*, *DSCR1* e *GART* (STREFFORD *et al.*, 2006; RAND *et al.*, 2011). Sendo a RCA a única anormalidade recorrente no subgrupo iAMP21. Diante da necessidade de se avaliar com precisão os grupos classificados pelo FISH em interfase e, da

ausência de informações do subgrupo recém-identificado pelo MLPA, utilizamos os genes pertencentes nesta região com o objetivo de caracterizar esses grupos com ampliações recorrentes no cromossomo 21 e, fornecer dados que possam ser úteis na identificação clínica da iAMP21.

Com base nisso, avaliamos os níveis transcricionais de genes localizados na RCA e o status do número de cópias dos genes diferencialmente expressos entre os subtipos de LLA-CPB e uma amostra calibradora. Primeiramente, comparamos a expressão gênica entre a amostra calibradora do grupo controle LLA-CPB com um perfil considerado normal pelo MLPA e os subtipos de LLAs-CPB agrupados e, observamos um aumento nos transcritos de todos os genes avaliados *RUNX1*, *IFNGR2*, *ERG*, *ETS2*, *DYRK1A*, *DSCR1* e *GART* nas LLAs-CPB. Estes resultados corroboram relatos anteriores que sugerem que os produtos destes genes exercem papéis importantes no desenvolvimento da célula ou na resposta terapêutica de vários subtipos de leucemia (OKUDA *et al.*, 2001; SHEN *et al.*, 2004; ZAZA *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2010; YEHUDIT; SHAI, 2012; HOLZER *et al.*, 2013).

Entre os casos de LLA-CPB com cópias extras ou ampliações no cromossomo 21, notamos que todos os genes selecionados tinham níveis de expressão gênica elevada quando comparados com o grupo que tinham os casos sem alterações no cromossomo 21. Estes dados foram considerados como a primeira evidência de que o ganho de material genômico de genes pertencentes no cromossomo 21 está correlacionado positivamente com a expressão do gene.

Nas análises comparativas entre os níveis transcricionais dos casos pertencentes aos grupos com ampliações recorrentes, sem alterações no cromossomo 21 e com cópias adicionais do cromossomo 21, notamos que os genes *ERG* e *ETS2* eram, pelo menos, uma vez mais expressos nos três subtipos com ampliações recorrentes do que os mesmos genes do grupo sem alterações no cromossomo 21. Também observamos que estes genes tinham um perfil de expressão semelhante aos mesmos genes dos casos do grupo LLA-CPB com cópias adicionais do cromossomo 21, dado que auxiliou na identificação de *ERG* e *ETS2* como os genes com os maiores níveis de transcritos nos subtipos de LLA-CPB com ampliações recorrentes, 3-4 sinais *RUNX1*,  $\geq 5$  sinais *RUNX1* e iAMP21-like respectivamente. Observamos também, elevados níveis de expressão dos genes

*DSCR1* e *GART* nos subtipos com ampliações recorrentes. Entretanto, o mesmo foi visto no grupo sem alterações recorrentes, o que sugere que estes níveis de transcritos ocorrem em outros subtipos leucêmicos, não sendo assim característica dos casos com amplificação.

A presença de cinco ou mais cópias adicionais do gene *RUNX1* é, segundo o método universal, uma característica do subtipo de LLA-CPB com iAMP21. Entretanto, a presença destas cópias adicionais não refletiu em níveis elevados de transcritos gênicos no subtipo LLA-CPB com  $\geq 5$  sinais *RUNX1*, o que nos sugere que a expressão deste gene não está correlacionada com as características biológicas deste subtipo leucêmico. Este dado está de acordo com um relato anterior de Strefford e colaboradores, no qual foi proposto que *RUNX1* não está especificamente relacionado com mecanismos de condução da doença nas LLAs-CPB com iAMP21 (STREFFORD *et al.*, 2006), e portanto, somente a sua utilização como gene marcador para a iAMP21 pode não ser a mais adequada.

Estes nossos dados estão em consonância com as observações anteriores que mostraram uma expressão aberrante de *ERG* e *ETS2*, entre outros genes localizados na RCA, e as associaram com um ganho de material genômico em casos com iAMP21 positiva (STREFFORD *et al.*, 2006). Sendo assim, entendemos que a expressão aberrante de *ERG* e *ETS2* pode ser uma característica importante na diferenciação e/ou identificação dos subtipos com ampliações recorrentes no cromossomo 21.

A superexpressão destes genes também já foi observada em outras doenças neoplásicas. Em 2013, um estudo comparativo de sensibilidade e resistência em LLA mostrou padrões distintos de expressão gênica de *ERG*. Os níveis de proteína *ERG* eram substancialmente mais elevados em células CEM-C1-15 resistentes. A inibição de *ERG* e a ativação do receptor glicocorticoide levou ao aumento da apoptose em ambas LLAs sensíveis e resistente (CHEN *et al.*, 2013). Outro estudo apresentou provas de que o aumento dos níveis de mRNA de *ERG* causou impacto negativo na sobrevida global e livre de eventos em pacientes com leucemia mieloide aguda (MARCUCCI *et al.*, 2007). O gene *ETS2* pode desempenhar um papel fundamental na biologia da leucemia megacarioblástica aguda. Um estudo mostrou que os níveis de *ETS2* estavam 1,8 e 4,1 vezes mais elevados em pacientes com leucemia aguda com

síndrome de Down e megacarioblástica (GE *et al.*, 2007). Recentemente, uma nova investigação apresentou que a indução experimental de *ETS2* conferiu diferenças na sensibilidade das drogas ARA-C e daunorrubicina (CHEN *et al.*, 2012).

Sendo assim, com base nos nossos dados e nos achados da literatura, e na necessidade de melhor caracterizar os grupos com ampliações recorrentes no cromossomo 21, avaliamos o status do número de cópias de *ERG* e *ETS2* nos casos com 3-4 sinais de *RUNX1*,  $\geq 5$  sinais *RUNX1* e iAMP21-like, juntamente com os subgrupos MLPA normal, SD, HD+21, que auxiliaram nas análises por serem bons controles comparativos, sem alterações no número de cópias (MLPA normal) e com cópias já sabidamente conhecidas, como os casos com SD e hiperdiploides com cópias adicionais do cromossomo 21 (HD+21).

Inicialmente analisamos em separado o perfil de número de cópias de *ERG* e *ETS2* e, depois avaliamos a média dos dois genes em cada subgrupo. Como esperado, os casos dos grupos MLPA normal, SD e HD+21 tiveram o status do número de cópias normais e com cópias adicionais respectivamente, para ambos os genes e análises. As mesmas ampliações foram observadas na maioria dos casos com 3-4 sinais de *RUNX1*,  $\geq 5$  sinais *RUNX1* e iAMP21-like. No entanto, em alguns casos foram detectados  $\geq 5$  cópias dos genes avaliados, principalmente nos grupos com 3-4 sinais de *RUNX1* e iAMP21-like. Surpreendentemente, poucos casos no subgrupo com  $\geq 5$  sinais *RUNX1* tiveram cinco ou mais cópias dos genes *ERG* e *ETS2*. Nossos dados mostram a complexidade destes três grupos com ampliações recorrentes no cromossomo 21, a qual casos que são sugestivos para hiperdiploidia (3-4 sinais de *RUNX1*) demonstra um perfil sugestivo para iAMP21, e casos com perfil iAMP21 ( $\geq 5$  sinais *RUNX1*) pela nossa análise é indicativo para hiperdiploidia. Além disso, esses resultados se assemelham a outros dados nossos, que identificaram o grupo iAMP21-like a partir dos perfis apontados por MLPA (FUKA *et al.*, 2015), e mostra a importância da identificação de novos genes que caracterizem estes subtipos, com a intenção de auxiliar em novas abordagens ao diagnóstico.

A partir dos dados de expressão gênica e número de cópias, verificamos no grupo iAMP21-like se os níveis elevados dos transcritos de *ERG* e *ETS2* eram consequência do ganho de material genômico. Fizemos uma correlação entre as médias dos dCTs e status do número de cópias dos casos pertencentes neste grupo

pelo método de *Pearson*. Como esperado, observamos uma correlação positiva moderada e uma correlação positiva forte de *ERG* e *ETS2* respectivamente. Com base nestas análises, realizamos uma nova abordagem que envolveu a combinação entre o número de cópias e os níveis de expressão gênica de *ERG* e *ETS2* nos grupos com ampliações recorrentes no cromossomo 21, com a proposta de identificar casos sugestivos para a iAMP21. Observamos que a maioria dos casos com  $\geq 5$  sinais *RUNX1* e sugestivos pela técnica “padrão ouro” para serem iAMP21 não estavam no quadrante que combina expressão gênica e número de cópias. Entretanto, dois casos com 3-4 sinais de *RUNX1*, sugestivos para hiperdiploidia foram identificadas como possíveis iAMP21 por esta proposta. Além disso 1/3 dos casos iAMP21-like foram sugestivos para a iAMP21. Essa abordagem com estes dois genes se mostra muito interessante no que se diz respeito a caracterização dos grupos com ampliações recorrentes, principalmente os casos analisados em interfase por FISH, uma vez que pode auxiliar na avaliação dos casos sugestivos para hiperdiploidia e/ou iAMP21.

Os genes *ERG* e *ETS2* estão como *RUNX1* localizado na RCA do cromossomo 21. Portanto, aplicando os critérios internacionais da presença de cinco ou mais cópias do gene pode-se considerar tais pacientes também positivos para esta anomalia cromossômica. Neste contexto, os nossos dados reforçam a necessidade de se analisar o estado do número de cópias de mais de um gene localizado na RCA para diagnosticar precisamente uma iAMP21.

Ao todo, com base em nossos resultados e informações da literatura, a expressão diferencial dos genes *ERG* e *ETS2* poderia desempenhar um papel importante na LLA-CPB com uma iAMP21 e justifica a realização de experimentos *in vitro* de resposta a drogas, a fim de avaliar a relevância destes genes nesta entidade leucemia. Nós também propusemos um novo algoritmo para rastrear uma iAMP21 a partir dos subgrupos de LLA-CPB com ampliações recorrentes no cromossomo 21, 3-4 sinais de *RUNX1*,  $\geq 5$  sinais *RUNX1* e iAMP21-like e, sugerimos a reclassificação de oito pacientes. Tais pacientes devem idealmente ser ainda caracterizados para a presença de uma iAMP21 por outras metodologias.

## 7. CONCLUSÕES

- Aqui, identificamos uma expressão gênica elevada e número de cópias  $\geq 5$  de *ERG* e *ETS2* nos casos com ampliações recorrentes no cromossomo 21;
- Observamos uma expressão estatisticamente diferencial dos genes *IFNGR2*, *ERG*, *ETS2* e *GART* nos subgrupos de LLAs-CPB com alterações no cromossomo 21 em relação às outras LLAs-CPB;
- Os genes *ERG* e *ETS2* tinham os maiores níveis de transcritos dentro do subgrupo iAMP21-like quando comparados aos outros genes avaliados;
- O número de cópias gênicas de *ERG* e *ETS2* foram iguais ou maiores que cinco cópias nos grupos com ampliações gênicas no cromossomo 21, tais como iAMP21-like, 3-4 sinais e  $\geq 5$  sinais de *RUNX1* pelo FISH;

## 8. REFERÊNCIAS

AN, Q. *et al.* Variable breakpoints target PAX5 in patients with dicentric chromosomes: A model for the basis of unbalanced translocations in cancer. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 105, n. 44, p.17050-17054, 28 out. 2008. DOI: 10.1073/pnas.0803494105.

ATTARBASCHI, A. *et al.*, Treatment outcome of CRLF2-rearranged childhood acute lymphoblastic leukaemia: a comparative analysis of the AIEOP-BFM and UK NCRI-CCLG study groups. **Br J. Haematol.** [s.l.], v.158, n. 6, p. 772-777, Set. 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09221.x.

BACHER, U.; KOHLMANN, A.; HAFERLACH, T. Perspectives of gene expression profiling for diagnosis and therapy in haematological malignancies. **Briefings In Functional Genomics And Proteomics**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.184-193, 1 maio 2009. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/bfgp/elp011

BARBER, K.E, *et al.*, Molecular cytogenetic characterization of TCF3 (E2A)/19p13.3 rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**. [s.l.], v. 46, n.5, p.478-486. Maio 2007.

BHOJWANI, D.; YANG, J.J.; PUI, C. Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatric Clinics Of North America**, [s.l.], v. 62, n. 1, p.47-60, fev. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.pcl.2014.09.004.

BIRGER, Y.; IZRAELI, S. DYRK1A in Down syndrome: an oncogene or tumor suppressor?. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 122, n. 3, p.807-810, 1 mar. 2012. American Society for Clinical Investigation. DOI: 10.1172/jci62372.

BOER, J. *et al.* The E2A-HLF oncogenic fusion protein acts through Lmo2 and Bcl-2 to immortalize hematopoietic progenitors. **Leukemia**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.321-330, 12 nov. 2010. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/leu.2010.253

BOHLANDER, S.K. ETV6: A versatile player in leukemogenesis. **Seminars In Cancer Biology**, [s.l.], v.15, n.3, p.162-174, jun. 2005. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.semcancer.2005.01.008.

BUSTIN, S.A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, [s.l.], v. 55, n. 4, p.611-622, 26 fev. 2009. American Association for Clinical Chemistry (AACC). DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.

CARIO, G. *et al.* Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. **Blood**, [s.l.], v.115, n.26, p.5393-5397, 8 abr. 2010. American Society of Hematology. DOI: 10.1182/blood-2009-11-256131.

CHEN, D.W. *et al.* Erg and AP-1 as determinants of glucocorticoid response in acute lymphoblastic leukemia. **Oncogene**, [s.l.], v. 32, n. 25, p.3039-3048, 6 ago. 2012. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/onc.2012.321.

CLAPPIER, E. *et al.* An intragenic ERG deletion is a marker of an oncogenic subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a favorable outcome despite frequent IKZF1 deletions. **Leukemia**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.70-77, 25 set. 2013. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/leu.2013.277.

DEN BOER, M.L. *et al.* A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. **Lancet Oncol**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.125–134, Fev. 2009.

DRUKER, B.J. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. **Blood**, [s.l.], v. 112, n. 13, p.4808-4817, 15 dez. 2008. American Society of Hematology. DOI: 10.1182/blood-2008-07-077958.

DYER, M.J. *et al.* Immunoglobulin heavy chain locus chromosomal translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: rare clinical curios or potent genetic drivers?. **Blood**, [s.l.], v. 115, n. 8, p.1490-1499, 30 dez. 2009. American Society of Hematology. DOI: 10.1182/blood-2009-09-235986.



FUKA, G. *et al.* Evaluation of multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) for identification of acute lymphoblastic leukemia with an intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) in a Brazilian population. **Mol Cytogenet**, [s.l.], v.8, n.1, p.1-10, 10 jun. 2015. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1186/s13039-015-0147-2.

GAIKWAD, A. *et al.* Prevalence and clinical correlates of JAK2 mutations in Down syndrome acute lymphoblastic leukemia. **Br. J. Haematol.**, [s.l.], v.144, n.6, p. 930-2, Mar 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07552.x

GE, Y. *et al.* The role of the proto-oncogene ETS2 in acute megakaryocytic leukemia biology and therapy. **Leukemia**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.521-529, 20 dez. 2007. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/sj.leu.2405066.

GREAVES, Mel. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.193-203, 9 fev. 2006. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/nrc1816.

HAREWOOD, L *et al.* Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases. **Leukemia**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.547-553, mar. 2003. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/sj.leu.2402849.

HARRISON, C.J. *et al.* Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 125, n. 5, p.552-559, jun. 2004. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.04948.x.

HARRISON, C.J. *et al.* Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a UK Cancer Cytogenetics Group Study. **British Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 129, n.4, p.520–530, Maio 2005. Wiley-Blackwell. DOI. 10.1111/j.1365-2141.2005.05497.x

HARRISON, C.J. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 144, n. 2, p.147-156, jan. 2009. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07417.x.

HARRISSON, C.J., JOHANSSON, B. Acute Lymphoblastic Leukaemia. In: Heim S, Mitelman F, editors. Cancer Cytogenetics. Third Edition. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2009. p. 233–96.

HARRISON, C.J. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. **Blood**, [s.l.], v. 125, n. 9, p.1383-1386, 21 jan. 2015. American Society of Hematology. DOI: 10.1182/blood-2014-08-569228.

HARVEY, RC, *et al.* Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, [s.l.], v. 115, n. 26, p. 5321–5321, 1 Jul. 2010. DOI: 10.1182/blood-2009-09-245944.

HARVEY, R.C. *et al.* Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. **Blood**, [s.l.], v. 116, n. 23, p. 4874-4884, 2 Dez. 2010. DOI: 10.1182/blood-2009-08-239681.

HEEREMA, N.A. *et al.* Intrachromosomal Amplification of Chromosome 21 Is Associated With Inferior Outcomes in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated in Contemporary Standard-Risk Children's Oncology Group Studies: A Report From the Children's Oncology Group. **J Clin Oncol**, [s.l.], v. 31, n. 27, p.3389-3396, 12 Ago 2013. DOI: 10.1200/JCO.2013.48.9377.

HERTZBERG, L. *et al.* Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM Study Group. **Blood**, [s.l.], v. 115, n. 5, p.1006-1017, 24 nov. 2009. American Society of Hematology. DOI: 10.1182/blood-2009-08-235408.

HOF, J. *et al.* Mutations and Deletions of the TP53 Gene Predict Nonresponse to Treatment and Poor Outcome in First Relapse of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 29, n. 23, p.3185-3193, 11 jul. 2011. American Society of Clinical Oncology (ASCO). DOI:10.1200/jco.2011.34.8144.

HOLLEMAN, A. *et al.* Gene Expression Patterns in Drug-Resistant Acute Lymphoblastic Leukemia Cells and Response to Treatment. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 351, n. 6, p.533-542, 5 ago. 2004. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). DOI: 10.1056/nejmoa033513.

HOLMFELDT, L. *et al.* The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet**, [s.l.], v. 45, n. 3, p. 242-252, Mar 2013. DOI: 10.1038/ng.2532

HOLZER, U. *et al.*, Influence of a mutation in IFN- $\gamma$  receptor 2 (IFNGR2) in human cells on the generation of Th17 cells in memory T cells. **Hum. Immunol**, [s.l.], v. 74, n. 6, p. 693-700. Jun. 2013. DOI: 10.1016/j.humimm.2013.02.002

INABA, T. *et al.* Fusion of the leucine zipper gene HLF to the E2A gene in human acute B-lineage leukemia. **Science**, [s.l.], v. 257, n. 5069, p. 531–534. 24 Jul. 1992. DOI: 10.1126/science.1386162.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C.G. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, [s.l.], v. 381, n. 9881, p.1943-1955, jun. 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0140-6736(12)62187-4.

JAFFE, E.S., *et al.* World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. **Ann Oncol**, [s.l.], v.13, n. 3, p. 490-491. 2002; DOI:10.1093/annonc/mdf146.

KAGER, L., *et al.*, Incidence and outcome of TCF3-PBX1 positive acute lymphoblastic leukemia in Austrian children. **Haematologica**, [s.l.], v. 92, n. 11, p. 1561-1564, Nov. 2007. DOI: 10.3324/haematol.11239.

KEBRIAEI, P.; ANASTASI, J.; LARSON, R.A. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, [s.l.], v.15, n.4, p.597-621, Dez. 2002. Elsevier BV. DOI: 10.1053/beh.2002.0224.

KIM D.H. *et al.* The IFNG (IFN-gamma) genotype predicts cytogenetic and molecular response to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. **Clin Cancer Res**, [s.l.], v. 16, n. 21, p. 5339-5350. 1 Nov. 2010. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1638.

KOH, C.P. *et al.* RUNX1 meets MLL: epigenetic regulation of hematopoiesis by two leukemia genes. **Leukemia**, [s.l.], v. 27, n. 9, p.1793-1802, 2 jul. 2013. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/leu.2013.200.

LI, Y. *et al.* Constitutional and somatic rearrangement of chromosome 21 in acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, [s.l.], v. 508, n. 7494, p.98-102, 23 mar. 2014. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/nature13115.

MARSCHALEK, R. Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins. **British Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 152, n. 2, p.141-154, Jan. 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08459.x

MA, X. *et al.*, Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric in B-acute lymphoblastic leukemia. **Nat Commun**, [s.l.], v.6, p. 6604, 19 Mar. 2015. DOI: 10.1038/ncomms7604.

MEYER, C. *et al.* New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. **Leukemia**, [s.l.], v. 23, n. 8, p. 1490-1499, Ago 2009. DOI: 10.1038/leu.2009.33.

MEYER, C. *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. **Leukemia**, [s.l.], v. 27, n.11, p. 2165-76, Nov 2013. DOI: 10.1038/leu.2013.135.

MIYOSHI, H. *et al.* t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. **Proc Natl Acad Sci U S A**. [s.l.], v.88, p.10431-10434, Dez. 1991.

MOORMAN, A.V. *et al.* Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). **Blood**, [s.l.], v. 109, n. 6, p.2327-2330, 15 mar. 2007. American Society of Hematology. DOI: 10.1182/blood-2006-08-040436.

MOORMAN, A.V. *et al.* Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. **Lancet Oncol**, [s.l.], v.11, n. 5, p. 429-438, Maio 2010. DOI:10.1016/S1470-2045(10)70066-8.

MOORMAN, A.V. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Reviews*, [s.l.], v. 26, n. 3, p.123-135, Maio 2012. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.blre.2012.01.001.

MOORMAN, A.V. *et al.* IGH@ Translocations, CRLF2 Deregulation, and Microdeletions in Adolescents and Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal Of Clinical Oncology*, [s.l.], v. 30, n. 25, p.3100-3108, 30 jul. 2012. American Society of Clinical Oncology (ASCO). DOI: 10.1200/jco.2011.40.3907.

MOORMAN, AV. *et al.* Risk-directed treatment intensification significantly reduces the risk of relapse among children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia and intrachromosomal amplification of chromosome 21: a comparison of the MRC ALL97/99 and UKALL2003 trials. *J. Clin. Oncol*, [s.l.], v. 31, n. 27, p. 3389-3396, Set. 2013. DOI: 10.1200/JCO.2013.48.9377.

MOORMAN, A.V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, [s.l.], v. 9, n.1, 7-16, 12 jun 2015.

MULLIGHAN, C.G. *et al.* Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, [s.l.], v. 446, n. 7137, p.758-764, 12 abr. 2007. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/nature05690.

MULLIGHAN, C.G. *et al.* ERG deletions define a novel subtype of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia [abstract]. *Blood*, [s.l.], v. 110, n. 2007. Abstract 691.

MULLIGHAN, C.G. *et al.* BCR–ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*, [s.l.], v. 453, n. 7191, p.110-114, 13 abr. 2008. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/nature06866.

MULLIGHAN, C.G. *et al.* Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal Of Medicine*, [s.l.], v. 360, n. 5, p.470-480, 29 jan. 2009. *New England Journal of Medicine (NEJM/MMS)*. DOI: 10.1056/nejmoa0808253.

MULLIGHAN, C.G. *et al.* Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, [s.l.], v. 41, n. 11, p.1243-1246, 18 out. 2009. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/ng.469.

MULLIGHAN, C.G. *et al.* CREBBP mutations in relapse acute lymphoblastic leukemia. *Nature*, v.471, n. 7337, p.235-9, 10 Mar 2011. DOI: 10.1038/nature09727.

NUCIFORA, G.; ROWLEY, J.D. AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. *Blood*. [s.l.], v.86, p.1-14, Jul. 1995.

OKUDA, T. *et al.* RUNX1/AML1: a central player in hematopoiesis. **Int. J. Hematol**, [s.l.], v. 74, n. 3, p.252-257, Out. 2001.

PAULSSON, K. *et al.* Microdeletions are a general feature of adult and adolescent acute lymphoblastic leukemia: Unexpected similarities with pediatric disease. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 105, n. 18, p.6708-6713, 5 maio 2008. Proceedings of the National Academy of Sciences. DOI: 10.1073/pnas.0800408105.

POMBO-DE-OLIVEIRA, MS. *et al.*, Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases** [s.l.], v. 42, n. 2, p.121-125, 16 Out. 2008.

PUI, C.; RELLING, M.V.; DOWNING, J.R. Acute Lymphoblastic Leukemia. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 350, n. 15, p.1535-1548, 8 abr. 2004. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). DOI: 10.1056/nejmra023001

PUI, C.H. **Childhood Leukemias**. Cambridge University Press, 2006 ISBN 9780521825191.

RAND V. *et al.* Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, [s.l.], v. 117, n. 25, p. 6848-6855. 23 Jun. 2011. DOI: 10.1182/blood-2011-01-329961

REICHARD, K.K; KANG, H.; ROBINETT, S. Pediatric B-lymphoblastic leukemia with RUNX1 amplification: clinicopathologic study of eight cases. **Mod Pathol**, [s.l.], v. 24, n. 12, p.1606-1611, 5 ago. 2011. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/modpathol.2011.118.

REIS, R.S. *et al.* Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. **Pediatr. Blood Cancer**, [s.l.], v. 56, n. 1, p.58-64, 24 nov. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.22736>.

RINGROSE, L; PARO, R. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. **Annu Rev. Genet**, [s.l.], v. 38, p. 413-443, 8 Jul. 2004. DOI: 10.1146/annurev.genet.38.072902.091907.

ROBINSON, H.M., *et al.* Amplification of AML1 in acute lymphoblastic leukemia is associated with a poor outcome. **Leukemia**, [s.l.], v. 17, n. 11, p.2249-2250, 18 set. 2003. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/sj.leu.2403140

ROSS, M.E. *et al.* Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. **Blood**, [s.l.], v. 102, n. 8, p.2951-2959, 15 out. 2003. American Society of Hematology. DOI: 10.1182/blood-2003-01-0338.

ROBERTS, K.G. *et al.* Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Cell**. [s.l.], v.22, n. 2, p. 153-166, p. 153–166, 14 ago 2012.

ROBERTS, K.G. *et al.* Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, [s.l.], v. 371, n.11, p. 1005-1015, 11 Set. 2014. DOI: 10.1056/NEJMoa1403088.

RUSSELL, L. J. *et al.* Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, [s.l.], v. 114, n. 13, p.2688-2698, 29 jul. 2009. American Society of Hematology. DOI: 10.1182/blood-2009-03-208397.

RUSSELL, L.J. *et al.* IGH@ Translocations Are Prevalent in Teenagers and Young Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia and Are Associated With a Poor Outcome. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 32, n. 14, p.1453-1462, 7 abr. 2014. American Society of Clinical Oncology (ASCO). DOI: 10.1200/jco.2013.51.3242.

SANYAL, M. *et al.* B-cell development fails in the absence of the Pbx1 proto-oncogene. *Blood*, [s.l.], v. 109, n. 10, p.4191-4199, 15 maio 2007. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-10-054213>.

SCHWAB, C. J. *et al.* Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: association with cytogenetics and clinical features. **Haematologica**, [s.l.], v. 98, n. 7, p.1081-1088, 18 mar. 2013. Ferrata Storti Foundation (Haematologica). DOI: 10.3324/haematol.2013.085175.

SINCLAIR, P.B. *et al.* Analysis of a breakpoint cluster reveals insight into the mechanism of intrachromosomal amplification in a lymphoid malignancy. **Human Molecular Genetics**, [s.l.], v. 20, n. 13, p.2591-2602, 12 abr. 2011. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/hmg/ddr159.

SOULIER, J., *et al.* Amplification of band q22 of chromosome 21, including AML1, in older children with acute lymphoblastic leukemia: an emerging molecular cytogenetic subgroup. **Leukemia**, [s.l.], v. 17, n. 8, p.1679-1682, ago. 2003. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/sj.leu.2403000.

SHURTLEFF, S.A, *et al.* TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. **Leukemia**, [s.l.], v. 9, n. 12, p.1985-1689. Dez. 1995.

STANKIEWICZ, M. J.; CRISPINO, J. D.. ETS2 and ERG promote megakaryopoiesis and synergize with alterations in GATA-1 to immortalize hematopoietic progenitor cells. *Blood*, [s.l.], v. 113, n. 14, p.3337-3347, 23 jan. 2009. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-08-174813>.



STREFFORD, J.C. *et al.* Complex genomic alterations and gene expression in acute lymphoblastic leukemia with intrachromosomal amplification of chromosome 21. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 103, n. 21, p.8167-8172, 15 maio 2006. Proceedings of the National Academy of Sciences. DOI: 10.1073/pnas.0602360103.

TZONEVA, G. *et al.* Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.368-371, 3 fev. 2013. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/nm.3078.

U, M. *et al.* Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor. **Leukemia**, [s.l.], v. 18, n. 11, p.1850-1856, 23 set. 2004. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/sj.leu.2403516.

USVASALO, A. *et al.* CDKN2A deletions in acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults—An array CGH study. **Leuk Res**, [s.l.], v. 32, n. 8, p. 1228-1235, Ago 2008. DOI: 10.1016/j.leukres.2008.01.014.

VARDIMAN, J.W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, [s.l.], v. 114, n. 5, p.937-951, 8 abr. 2009. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-03-209262>.

YANG, J.J. *et al.* Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, [s.l.], v. 112, n. 10, p.4178-4183, 15 nov. 2008. American Society of Hematology. DOI: 10.1182/blood-2008-06-165027.

YEOH, E.J. *et al.* Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. **Cancer Cell**. [s.l.], v. 1, n.2, p. 133-143, Mar. 2002.

WEAVER, S. *et al.* Taking qPCR to a higher level: Analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution. **Methods**, v.50, [s.l.], v. 50, n. 4, p.271-276, Abr 2010. DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.01.003

ZAZA, G. Acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion has lower expression of genes involved in purine metabolism and lower de novo purine synthesis. **Blood**, [s.l.], v. 104, n. 5, p.1435-1441, 1 set. 2004. American Society of Hematology. DOI: 10.1182/blood-2003-12-4306.

ZHUANG, Y, SORIANO P, WEINTRAUB, H. The helix-loophelix gene E2A is required for B cell formation. **Cell**, v. 79, n. 5, p. 875-884, 2 Dez 1994.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Anexo I

Gene	Localização	Descrição
ORF66	NC_001348.1 (113037..114241)	Orf66
OLIG2	21q22.11	Oligodendrocyte lineage transcription factor 2
IFNAR2	21q22.1 21q22. 11	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2
IL10RB	21q22.11	Interleukin 10 receptor, beta
IFNAR1	21q22.11	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1
IFNGR2	21q22.11	Interferon gamma receptor 2
ORF4	NC_002816.1 (2173..2739, complement)	Orf4
ORF55	NC_002816.1 (45415..46395)	Orf55
GART	21q22.11	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase,
SON	21q22.1-q22.2 21q22.11	SON DNA binding protein
DONSON	21q22.1	Downstream neighbor of SON
CRYZL1	21q21.3	Crystallin, zeta (quinone reductase)-like 1
ITSN1	21q22.1-q22.2	Intersectin 1
ATP5O	21q22.1- q22.2 21q22.11	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit
MRPS6	21q22.11	Mitochondrial ribosomal protein S6
SLC5A3	21q22.12	Solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3 (SLC5A3)
KCNE2	21q22.12	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 2
KCNE1	21q22.12	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1
DSCR1	21q22.12	Down syndrome critical region gene 1
RUNX1	21q22.3	Runt-related transcription factor 1 (acute myeloid leukemia 1)
ORF18	NC_001826.2 (29918..30773)	Orf18
CBR1	21q22.13	Carbonyl reductase 1
CBR3	21q22.2	Carbonyl reductase 3
ORF5		Orf5
ZCWCC3	21q22.13	Zinc finger, CW-type with coiled-coil domain 3
CHAF1B	21q22.13	Chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)

<i>CLDN14</i>	21q22.3	<i>Claudin 14</i>
<i>PSMD15</i>	21q22.13	<i>Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 15</i>
<i>SIM2</i>	21q22.13	<i>Single-minded homolog 2 (Drosophila) (SIM2)</i>
<i>HLCS</i>	21q22.13	<i>Holocarboxylase synthetase</i>
<i>DSCR6</i>	21q22.2	<i>Down syndrome critical region gene 6</i>
<i>DSCR5</i>	21q22.2	<i>Down syndrome critical region gene 5</i>
<i>TTC3</i>	21q22.2	<i>Tetratricopeptide repeat domain 3</i>
<i>DSCR3</i>	21q22.2	<i>Down syndrome critical region gene 3</i>
<i>DYRK1A</i>	21q22.13	<i>Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A</i>
<i>Orf</i>	NC_000933.1	<i>Open reading frame</i>
<i>KCNJ6</i>	21q22.1	<i>Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6</i>
<i>DSCR4</i>	21q22.2	<i>Down syndrome critical region gene 4</i>
<i>KCNJ15</i>	21q22.2	<i>Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15</i>
<i>ERG</i>	21q22.2	<i>V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene</i>
<i>ETS2</i>	21q22.2	<i>V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2</i>
<i>DSCR2</i>	21q22.3	<i>Down syndrome critical region gene 2</i>
<i>WDR9</i>	21q22.2	<i>WD repeat domain 9, chromosome 21 open reading frame 107</i>
<i>HMGN1</i>	21q22.3 21q22. 2	<i>High-mobility group nucleosome binding domain 1</i>
<i>WRB</i>	21q22.3	<i>Tryptophan rich basic protein</i>
<i>OLIG1</i>	21q22.11	<i>Oligodendrocyte transcription factor 1</i>
<i>SH3BGR</i>	21q22.3	<i>SH3 domain binding glutamic acid-rich protein</i>

## 9.2 Anexo II

### Formulário de inclusão de amostras do PHOP, INCA, Cpq (Parte I)

14/03/2016

Diagnostico Imunomolecular

**Diagnóstico Imunomolecular**

Bem vindo »

SAIR



Acesso  
Tabelas  
Exames  
Relatórios  
Manual de Acesso  
Envio de amostras  
Amostras /  
Anticoagulantes  
Fale Conosco  
Alterar Senha

Exames - Requisição - Incluir

enviar cancelar

VOLTAR

Tipo de Exame  Hematológico  Tumor Pediátrico

Dados do Paciente

Nome Paciente\*

Nome da Mãe\*

Identificação da Mãe\*

Telefone da Mãe

Nome do Pai

Data nascimento\*

[ buscar paciente ]

Idade

Data diagnóstico\*

Sexo\*

SEXO

COR

Registro Hospitalar

Síndrome Down\*

Sim  Não

Outras Síndromes Genéticas\*

Sim  Não

Logradouro Residência\*

Número Residência\*

Complemento Residência

CEP Residência\*

Bairro Residência\*

Estado Residência\*

estado

Município Residência\*

município

Região Residência

região

Estado Naturalidade\*

estado

Município Naturalidade\*

município

Dados da Instituição/Médico

Instituição\*

instituições UF

Médico\*

medicos

Dados Clínicos

Suspeita Diagnóstica

Tratamento Utilizado

Outras Informações Clínicas

Baço\*

Sim  Não

Fígado\*

Sim  Não

Linfonodos\*

Sim  Não

Tumoração\*

Sim  Não

Sistema Nervoso Central Comprometido\*

Sim  Não

Alargamento de Mediastino\*

Sim  Não

Medicamentos sendo usados pelo paciente\*

Sim  Não

Uso Prévio de Corticóide\*

Sim  Não

Tem irmã(o) gemelar?\*

Sim  Não

Tem irmã(o) não gemelar ou primo de 1º grau com câncer?\*

Sim  Não

Dados Laboratoriais

Leucometria\*

Hematócrito

 %

Hemoglobina

Plaquetas

Blastos\*

 %

Dados da Amostra

Amostra Enviada\*

Sangue Periférico

Anticoagulante:  EDTA

Heparina

<https://imunomolecular.inca.gov.br/Marcadores/formularioInserirRequisicao.action>

1/2

## Formulário de inclusão de amostras do PHOP, INCA, Cpq (Parte II)

14/03/2016

**Diagnostico Imunomolecular**

Anticoagulante:  EDTA  Heparina

Medula Óssea  
 Outros

Lâminas Medula Óssea  Lâminas Sangue Periférico

**Motivo da Coleta\***

Diagnóstico  Recaída  DRM  
 Amostra da Mãe  Outros

Data da Coleta\*  Projeto

Data do Envio da Amostra\*

**Dados da Entrevista**

Entrevista com a mãe Data da entrevista com a mãe

**Follow-up**

Data  Observação

**Observação**

**\*Itens de preenchimento obrigatório**

[ [enviar](#) ]

Copyright © 1996-2007 INCA - Ministério da Saúde  
A reprodução, total ou parcial, das informações contidas nessa página é permitida sempre e quando for citada a fonte.  
Gerenciado pelas divisões de Comunicação Social e Tecnologia da Informação.

## 9.3 Anexo III

PROJETO EmiLI – Aprovado pelo Comitê de  
Ética em Pesquisa em \_\_/\_\_/\_\_\_\_.

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

**Responsável pelo Paciente Pediátrico (Idade < 18 anos)**

**NOME DO PROJETO DE PESQUISA: “ESTUDOS MULTI- INSTITUCIONAL DAS LEUCEMIAS INFANTIS: CONTRIBUIÇÃO DOS MARCADORES IMUNO-MOLECULARES NA DISTINÇÃO DE SEUS SUBTIPOS E DE FATORES DE RISCOS ETIOPATOGENICOS”.**

Seu (sua) filho (a) está sendo convidado (a) a participar de um estudo porque ele (ela) tem diagnóstico de leucemia aguda. . Estamos consultando você sobre a possibilidade de que as amostras excedentes de sangue e/ou medula óssea de seu (sua) filho (a), que seriam descartadas normalmente, possam ser utilizadas neste projeto de pesquisa. Para você decidir se estamos autorizados a usar estas sobras de amostras biológicas nas investigações propostas neste projeto de pesquisa, você precisa conhecer os objetivos deste projeto de pesquisa, os benefícios, riscos e consequências para seu (sua) filho (a) envolvidos em sua autorização. Após receber todas as informações abaixo você poderá fornecer o seu consentimento por escrito para a participação do seu (sua) filho (a), através de sua assinatura e data neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

#### **PROPÓSITO (OBJETIVOS) DO PROJETO DE PESQUISA**

O objetivo deste projeto de pesquisa é de identificar os defeitos que ocorreram no DNA (material genético) que fica dentro das células leucêmicas. A leucemia aguda afeta o DNA de células presentes no sangue. Dependendo do tipo de defeito encontrado, pretendemos avaliar se esse defeito pode estar associado com a doença. Para isso, se você concordar com a participação do seu (sua) filho (a), serão realizados os testes genéticos nas amostras biológicas que já foram coletadas para diagnóstico e acompanhamento do seu (sua) filho (a). Estes testes genéticos permitem identificar os defeitos adquiridos na doença.

#### **PROCEDIMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Se você concordar a participação do seu (sua) filho (a) neste projeto de pesquisa, os pesquisadores consultarão os dados clínicos dele (a), para identificar se poderão utilizar uma parte do material biológico, já obtida para realização de exames rotineiros do diagnóstico e acompanhamento da doença do seu (sua) filho (a). Este material biológico somente será usado se estiver disponível e não interferir nas amostras biológicas necessárias ao diagnóstico clínico, de acordo com o médico responsável do seu (sua) filho (a). A partir deste material biológico retiraremos o material genético (chamado de DNA) das células doentes (leucêmicas), e realizaremos exames laboratoriais que nos permitam identificar os defeitos das células leucêmicas. Avaliaremos também o papel desses defeitos na evolução da doença do seu (sua) filho (a). Para isto pretendemos estudar os seguintes genes, que são identificados através de letras e números pelos pesquisadores, tais como: *ETV6, RUNX1, RUNX3, NUP98, HOXD13, ETO, PML, RARA, MTHFR, TS, SHMT1, RFC1, CYPs, GSTs, STIL, HOX, c-Kit, FLT3, PTPN11, RAS, MYH11, CBFb, MYST3, CREBBP, MLL, PLZF, NPM1, STAT5b, NuMA, FIP1L1 e BCOR*. O médico do seu (sua) filho (a) poderá explicar funcionalidade ou efeito do gene caso seja de se interesse.

Página 1 de 6

\_\_\_\_\_  
Rubrica do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Rubrica do responsável pelo participante da pesquisa

TCLE para responsável pelo paciente Pediátrico (< 18 anos) - Versão Final de 18 de Dezembro de 2015.

### **USO E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO**

Após a primeira etapa de identificação dos defeitos das células leucêmicas, o restante do material biológico poderá ser devidamente armazenado e utilizado para possíveis desdobramentos deste projeto de pesquisa. Todas as amostras de sangue e/ou medula óssea de seu (sua) filho (a) serão utilizadas apenas para os propósitos descritos neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Se você autorizar, estas amostras biológicas serão enviadas para o Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrica no Instituto Nacional de Câncer – INCA, e armazenado no Laboratório desta Instituição. Nós pesquisadores vamos ter o controle destes envios, assim como o local de armazenamento e a pessoa que devemos fazer contato para qualquer mudança em sua opinião. Você será comunicado sempre que possível, e na impossibilidade de comunicarmos a você este envio, vamos apresentar uma justificativa ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) de nossa Instituição. Estas amostras biológicas serão armazenadas por até 10 anos para serem utilizadas em pesquisas futuras. Quando houver necessidade de outros estudos, diferentes dos explicados aqui, você será contatado novamente para consentir ou não, o uso das amostras biológicas armazenadas de seu (sua) filho (a). Estes novos estudos deverão ser aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desta instituição e você receberá um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para autorizar essas novas pesquisas. Os Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) são formados por vários profissionais que avaliam todas as propostas de pesquisas em seres humanos, e foram criados para defender os interesses dos participantes das pesquisas em sua integridade e dignidade, e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. É importante ressaltar que seu (sua) filho (a) poderá participar deste projeto de pesquisa mesmo que você não autorize o armazenamento das amostras biológicas que sobraram. Para isto, no final deste documento você poderá escolher entre estas alternativas. Gostaríamos de ressaltar também que, caso haja perda ou destruição das amostras biológicas do seu (sua) filho (a), você será informado. Após a realização das análises propostas neste Projeto de Pesquisa, e considerando 10 anos a contar da data do recebimento no laboratório do Instituto Nacional de Câncer (INCA), estas amostras ali armazenadas serão integralmente destruídas, de acordo com procedimentos internos e regulamentações nacionais de formação de biorepositórios.

### **RISCOS**

Toda pesquisa com seres humanos tem alguma possibilidade de risco. Mas como não está previsto nenhum exame ou procedimento invasivo neste projeto de pesquisa, então não estão previstos riscos imediatos para seu (sua) filho (a) pela participação neste projeto de pesquisa, por causa da utilização de apenas uma parte das amostras biológicas que já foram coletadas rotineiramente para o diagnóstico dele (dela). A possibilidade de qualquer tipo de dano, de dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural, ou espiritual, por causa da participação do seu (sua) filho (a) neste projeto de pesquisa, é mínima, seja individual ou coletiva. As punções venosas (retiradas de sangue da veia) coletadas como parte do tratamento regular do seu (sua) filho (a), podem resultar em dor no local da punção ou manchas roxas transitórias chamadas de equimoses, conforme já foi explicado pelo médico. Nenhum dano imediato ou tardio, que comprometa a saúde do seu (sua) filho (a) está previsto neste projeto de pesquisa. O pesquisador responsável por este projeto de pesquisa se compromete a suspender a pesquisa imediatamente ao perceber qualquer risco ou dano significativo à saúde do seu (sua) filho (a), previstos ou não neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O problema será comunicado diretamente ao médico responsável pelo diagnóstico do seu (sua) filho (a), que comunicará a você, assim como também ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da sua Instituição, ao Comitê de Ética em Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Rubrica do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Rubrica do responsável pelo participante da pesquisa

TCLE para responsável pelo paciente Pediátrico (< 18 anos) - Versão Final de 18 de Dezembro de 2015.



do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA) e a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e as devidas providências serão tomadas em caráter imediato.

#### **TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS**

Todo e qualquer dano decorrente, diretamente ou não, da participação do seu (sua) filho (a) neste projeto de pesquisa, e que venha acompanhado da necessidade de atendimento médico, ficará a cargo da Instituição de origem, aquela onde o seu (sua) filho (a) tem o diagnóstico e tratamento. Ressaltamos que o tratamento do seu (sua) filho (a) será exatamente o mesmo, caso você decida pela participação dele (dela), ou não, neste projeto de pesquisa.

#### **BENEFÍCIOS**

Este projeto de pesquisa não oferece benefícios diretos a seu (sua) filho (a). O benefício principal da participação do seu (sua) filho (a) é possibilitar que no futuro, com os resultados alcançados com esta pesquisa, o diagnóstico e tratamento para esta doença possam beneficiar outras pessoas com leucemia (crianças, adolescentes e adultos jovens).

#### **CUSTOS**

Se você concordar com o uso de uma parte da amostra biológica do seu (sua) filho (a), como descrito acima, esclarecemos que você não terá quaisquer custos ou forma de pagamento por autorizar a participação do seu (sua) filho (a) neste projeto de pesquisa. A participação dele (dela) neste projeto de pesquisa é voluntária, nem você ou seu (sua) filho (a) sofrerão nenhuma penalidade caso não autorize a utilização da amostra biológica dele (dela) neste projeto de pesquisa. Novamente, reforçamos que o tratamento do seu (sua) filho (a) e acompanhamento médico serão os mesmos, independentes de sua decisão de autorizar ou não, a utilização da amostra biológica neste projeto de pesquisa.

#### **ASSISTÊNCIA INTEGRAL GRATUITA E INDENIZAÇÃO - DANO DIRETO OU INDIRETO**

Caso concorde com o uso de parte das amostras biológicas do seu (sua) filho (a) para este projeto de pesquisa, mesmo estas sendo sobras de material biológico para diagnóstico e acompanhamento, por favor esteja ciente de que vamos garantir o direito do seu (sua) filho (a) à assistência imediata/tardia integral gratuita e indenização, em caso de qualquer dano/evento adverso decorrente direta ou indiretamente com a participação dele (dela) nesta pesquisa. Sendo assim, por favor fazer contato com o médico responsável pelo diagnóstico e acompanhamento do seu (sua) filho (a) para identificar as melhores opções e os detalhes sobre esta assistência imediata/tardia integral gratuita e indenização

#### **CONFIDENCIALIDADE**

Como medidas de proteção de dados individuais, contra qualquer tipo de discriminação ou estigmatização, seja esta individual ou coletiva, todos os documentos referentes ao acompanhamento clínico de seu (sua) filho (a), tais como resultados de exames, testes, TCLE ou prontuário por exemplo, serão acessíveis somente ao médico responsável e/ou equipe autorizada na Instituição onde realiza este acompanhamento, e quando aplicável, aos pesquisadores, sendo proibido o acesso a terceiros. Todas as informações deste projeto de pesquisa serão confidenciais, nem você ou seu (sua) filho (a) serão identificados em nenhum momento durante o desenvolvimento desta pesquisa, nem na divulgação dos dados da mesma. O material biológico do seu (sua) filho (a) será processado de forma que a privacidade e identidade do seu (sua) filho (a) sejam totalmente preservadas. O nome de seu (sua) filho (a) não será

Página 3 de 6

\_\_\_\_\_  
Rubrica do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Rubrica do responsável pelo participante da pesquisa

TCLE para responsável pelo paciente Pediátrico (< 18 anos) - Versão Final de 18 de Dezembro de 2015.

divulgado em nenhuma circunstância, mesmo que as informações do registro médico de seu (sua) filho (a) sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independente dos resultados obtidos. Para manter esta confidencialidade, a equipe do pesquisador responsável arquivará uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado em sigilo absoluto, e atribuirá um número de identificação para a amostra biológica do seu (sua) filho (a). Todas as informações pessoais do seu (sua) filho (a) serão guardadas na Instituição de origem onde o seu (sua) filho (a) teve o diagnóstico e acompanhamento. Além da equipe de saúde envolvida, os registros médicos do seu (sua) filho (a) poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) de sua instituição de atendimento, e /ou pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), e também pela equipe de pesquisadores envolvidos neste projeto de pesquisa. Pretendemos desta forma, garantir medidas de proteção de dados individuais, resultados de exames e testes, bem como do prontuário, que somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos, e nunca será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos etc.), e assim também garantir que venha a existir qualquer tipo de discriminação ou estigmatização, individual ou coletiva.

#### **BASES DA PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA (direito a recusa ou abandono)**

É importante que você saiba que a participação do seu (sua) filho (a) neste projeto de pesquisa, através da utilização de parte do material biológico, é completamente voluntária. Você pode recusar autorizar o uso do material e das informações para este projeto de pesquisa, ou interromper a participação do seu (sua) filho (a) a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios aos quais o seu (sua) filho (a) tem direito, ou mudança no tratamento dele (dela) na instituição. Ressaltamos que você pode retirar o seu consentimento para permanecer com a guarda do material biológico do seu (sua) filho (a), a qualquer tempo, e sem quaisquer ônus ou prejuízo, com validade a partir da data da comunicação da decisão. A retirada do consentimento deverá ser feita através da sua manifestação, por escrito, assinada por você, e entregue ao médico responsável pelo diagnóstico e tratamento do seu (sua) filho (a). Assim podemos proceder com a devolução do material existente para a Instituição onde seu (sua) filho (a) tem o diagnóstico e o tratamento. Caso você não autorize a utilização de parte do material biológico do seu (sua) filho (a), basta que você não assine este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) na última página, e nem rubrique as demais páginas, no canto inferior direito.

#### **GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS**

Você também tem todo o tempo que precisar para ler este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A pessoa responsável por explicar todo o conteúdo destas informações e obter as assinaturas neste documento, também se coloca à disposição para responder todas as suas perguntas sempre que precisar e tiver novas dúvidas. Você também tem a liberdade de consultar outros pesquisadores envolvidos neste projeto de pesquisa toda vez que sentir necessário. Nós estimulamos a você, ou seus familiares a fazerem perguntas a qualquer momento. Nós garantimos a você o acesso completo aos resultados de testes realizados no material biológico do seu (sua) filho (a), que pode ser obtido através do médico responsável pelo acompanhamento, independente da participação do seu (sua) filho (a), nesta pesquisa, e com total liberdade para optar em tomar conhecimento ou não dessas informações. Não está previsto o aconselhamento genético neste projeto de pesquisa. Mas, quando for o caso, o médico responsável pelo acompanhamento clínico do seu (sua) filho (a) poderá lhe explicar, e providenciar, se necessário, e sem nenhum prejuízo ou custo para você. O médico responsável pelo seu (sua) filho (a) também poderá contactar você, a qualquer momento, para obter atualização dos resultados obtidos. O pesquisador responsável por este projeto de pesquisa será avisado, e está disponível através dos seguintes contatos:

Página 4 de 6

\_\_\_\_\_  
Rubrica do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Rubrica do responsável pelo participante da pesquisa

TCLE para responsável pelo paciente Pediátrico (< 18 anos) - Versão Final de 18 de Dezembro de 2015.

**Pesquisador Responsável:**

Nome: Dra. Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira

E-mail: [mpombo@inca.gov.br](mailto:mpombo@inca.gov.br)

Telefone: (21) 3207-6532 (direto ou a cobrar)

Fax.: (21) 3207-6566

Endereço: Instituto Nacional de Câncer – INCA/MS.

Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico/ Cpq-Instituto Nacional de Câncer

Rua André Cavalcanti, 37 – 6º andar – CEP 20231050 – Rio de Janeiro, Brasil.

Este pesquisador responsável também se compromete em oferecer informações atualizadas ao longo do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, caso este seja o seu desejo. Você pode optar em tomar conhecimento, ou não, dos resultados dos exames realizados no material biológico do seu (sua) filho (a). Para isto, você deve fazer contato sempre que precisar, com o médico responsável na Instituição onde seu (sua) filho (a) tem o diagnóstico e acompanhamento, através das seguintes informações abaixo:

**Nome do Médico responsável pelo diagnóstico e acompanhamento:**

\_\_\_\_\_.

**Telefones:** \_\_\_\_\_.

**Endereço do Centro de Pesquisa participante:**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_.

Se tiver perguntas com relação aos direitos do seu (sua) filho (a), como participante deste projeto de pesquisa, também pode contar com um contato imparcial, no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) de sua Instituição, através dos seguintes contatos e durante o horário de funcionamento:

**Nome do CEP e Endereço:**

**E-mail:**

**Telefones:**

Horário de funcionamento:

\_\_\_\_\_

**Este documento será elaborado em duas vias originais, sendo que uma via original será arquivado com o pesquisador responsável, e a segunda via original deve ser entregue a você.**

### **PÁGINA DE ASSINATURAS E CONSENTIMENTO**

Eu, declaro que li as informações acima, entendi o propósito deste projeto de pesquisa, bem como os benefícios e riscos potenciais da utilização das amostras biológicas do meu (minha) filho (a). As informações foram fornecidas para mim de forma clara e acessível, eu tive a oportunidade de fazer perguntas, e todas foram respondidas. Ficou claro para mim que não terei qualquer despesa por autorizar a participação do meu (minha) filho (a), e que se eventualmente elas ocorrerem por causa deste projeto de pesquisa, eu serei ressarcido (a) mediante comprovação adequada dos gastos. Eu entendi que não receberei nenhuma compensação monetária por permitir a utilização das amostras biológicas do meu (minha) filho (a) neste projeto de pesquisa. Entendi também que tenho todas as informações necessárias neste documento aqui apresentado para o meu consentimento na participação do meu (minha) filho (a), e, em caso de qualquer dúvida ou desistência eu posso procurar os pesquisadores através dos contatos registrados. Também ficou claro para mim que eu posso desistir a qualquer momento da participação do meu (minha) filho(a) neste projeto de pesquisa, sem nenhum prejuízo para o seu diagnóstico e acompanhamento. Sendo assim, eu, por intermédio deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE):

(  ) Autorizo a participação de meu (minha) filho(a) neste projeto de pesquisa e **CONCORDO** que suas amostras de sangue e/ou medula óssea sejam armazenadas para uso em pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desta instituição e para isto deverei assinar no futuro, um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), se eu concordar.

**OU**

(  ) Autorizo a participação de meu (minha) filho (a) neste projeto de pesquisa, mas **NÃO CONCORDO** em que suas amostras de sangue e/ou medula óssea sejam armazenadas para uso em pesquisas futuras.

**Nome do Paciente (com idade < 18 anos):**

\_\_\_\_\_ / /

**Nome e Assinatura do Responsável pelo Paciente**

**Data**

\_\_\_\_\_ / /

**Nome e Assinatura da Testemunha Imparcial**

**Data**

Eu, como médico responsável pelo diagnóstico e acompanhamento deste paciente, e também delegado pelo pesquisador responsável por este projeto de pesquisa, confirmo que expliquei completamente os detalhes relevantes deste projeto de pesquisa ao responsável pelo paciente menor de idade, e/ou a pessoa autorizada em consentir pelo mesmo. Declaro que obtive, de forma apropriada e voluntária, as devidas assinaturas neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para a participação deste paciente neste projeto de pesquisa.

\_\_\_\_\_ / /

**Nome e Assinatura do Pesquisador (a)**

**Data**

Página 6 de 6

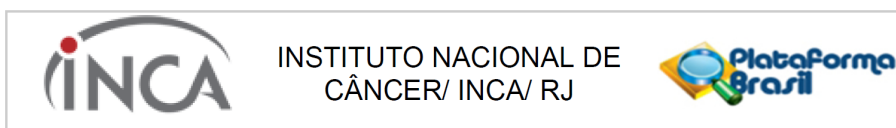
\_\_\_\_\_  
**Rubrica do Pesquisador**

\_\_\_\_\_  
**Rubrica do responsável pelo participante da pesquisa**

**TCLE para responsável pelo paciente Pediátrico (< 18 anos) - Versão Final de 18 de Dezembro de 2015.**

## 9.4 Anexo IV

### Parecer do Comitê de Ética em pesquisa do INCA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDOS DE POLIMORFISMOS DE GENES DO METABOLISMO DE FOLATO E METILAÇÃO GLOBAL EM LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS

**Pesquisador:** Maria do Socorro Pombo de Oliveira

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 4

**CAAE:** 12255913.6.0000.5274

**Instituição Proponente:** Coordenação de Pesquisa

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO  
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 986.698

**Data da Relatoria:** 05/04/2015

##### Apresentação do Projeto:

- Projeto de Pesquisa Aprovado pelo Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 626.268, datado de 25 de Abril de 2014.

- A presente Emenda trata da solicitação da Pesquisadora Principal de realizar um projeto dentre as LLA-cpB identificados com iAMP21 [pelas metodologias através de técnicas diagnosticas FISH e PCR quantitativo], aquelas com numero de copias genômicas alteradas (MLPA) e verificar correlacionar com os polimorfismos dos genes de folatos realizados com os do projeto "ESTUDOS DE POLIMORFISMOS DE GENES DO METABOLISMO DE FOLATO E METILAÇÃO GLOBAL EM LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS". Apresenta o arquivo "Sub-projeto\_iAMP21" e o arquivo "TCLE para subprojeto iAMP21\_versão final.doc".

##### Objetivo da Pesquisa:

- A presente Emenda trata da solicitação da Pesquisadora Principal de realizar um projeto dentre as LLA-cpB identificados com iAMP21 [pelas metodologias através de técnicas diagnosticas FISH e PCR quantitativo], aquelas com numero de copias genômicas alteradas (MLPA) e verificar correlacionar com os polimorfismos dos genes de folatos realizados com os do projeto "ESTUDOS

**Endereço:** RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203  
**Bairro:** CENTRO **CEP:** 20.231-092  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3207-4550 **Fax:** (21)3207-4556 **E-mail:** cep@inca.gov.br



Continuação do Parecer: 986.698

DE POLIMORFISMOS DE GENES DO METABOLISMO DE FOLATO E METILAÇÃO GLOBAL EM LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS". Apresenta o arquivo "Sub-projeto\_iAMP21" e o arquivo "TCLE para subprojeto iAMP21\_versão final.doc".

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

- A presente Emenda trata da solicitação da Pesquisadora Principal de realizar um projeto dentre as LLA-cpB identificados com iAMP21 [pelas metodologias através de técnicas diagnosticas FISH e PCR quantitativo], aquelas com numero de copias genômicas alteradas (MLPA) e verificar correlacionar com os polimorfismos dos genes de folatos realizados com os do projeto "ESTUDOS DE POLIMORFISMOS DE GENES DO METABOLISMO DE FOLATO E METILAÇÃO GLOBAL EM LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS". Apresenta o arquivo "Sub-projeto\_iAMP21" e o arquivo "TCLE para subprojeto iAMP21\_versão final.doc".

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

- A presente Emenda trata da solicitação da Pesquisadora Principal de realizar um projeto dentre as LLA-cpB identificados com iAMP21 [pelas metodologias através de técnicas diagnosticas FISH e PCR quantitativo], aquelas com numero de copias genômicas alteradas (MLPA) e verificar correlacionar com os polimorfismos dos genes de folatos realizados com os do projeto "ESTUDOS DE POLIMORFISMOS DE GENES DO METABOLISMO DE FOLATO E METILAÇÃO GLOBAL EM LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS". Apresenta o arquivo "Sub-projeto\_iAMP21" e o arquivo "TCLE para subprojeto iAMP21\_versão final.doc".

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- A presente Emenda trata da solicitação da Pesquisadora Principal de realizar um projeto dentre as LLA-cpB identificados com iAMP21 [pelas metodologias através de técnicas diagnosticas FISH e PCR quantitativo], aquelas com numero de copias genômicas alteradas (MLPA) e verificar correlacionar com os polimorfismos dos genes de folatos realizados com os do projeto "ESTUDOS DE POLIMORFISMOS DE GENES DO METABOLISMO DE FOLATO E METILAÇÃO GLOBAL EM LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS". Apresenta o arquivo "Sub-projeto\_iAMP21" e o arquivo "TCLE para subprojeto iAMP21\_versão final.doc".

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não se aplica.

**Endereço:** RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203  
**Bairro:** CENTRO **CEP:** 20.231-092  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3207-4550 **Fax:** (21)3207-4556 **E-mail:** cep@inca.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE  
CÂNCER/ INCA/ RJ



Continuação do Parecer: 986.698

**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 466/12 e na Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da Emenda ao projeto de pesquisa proposto.

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

RIO DE JANEIRO, 16 de Março de 2015

---

**Assinado por:**

**Carlos Henrique Debenedito Silva  
(Coordenador)**

**Endereço:** RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 20.231-092

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3207-4550

**Fax:** (21)3207-4556

**E-mail:** cep@inca.gov.br

Página 03 de 03

## 9.5 Anexo V

Prêmio de melhor pôster na categoria Mestrado na VII Jornada de Pós-Graduação do INCA 2015.





## 9.6 Anexo VI

### Publicações recentes

Fuka et al. *Molecular Cytogenetics* (2015) 8:35  
DOI 10.1186/s13039-015-0147-2



#### METHODOLOGY

#### Open Access



## Evaluation of multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) for identification of acute lymphoblastic leukemia with an intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) in a Brazilian population

Gerhard Fuka, Tállita M. Farias-Vieira, Leticia Hummel, Caroline B. Blunck, Júlio C. Santoro, Eugênia Terra-Granado, Thayana Conceição Barbosa, Mariana Emerenciano and Maria S. Pombo-de-Oliveira\*

#### Abstract

**Background:** An intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) defines a unique subgroup of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). The finding of three or more extra copies of the *RUNX1* gene by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is internationally used to define an iAMP21. Genomic profiling of chromosome 21 has been suggested for assisting diagnostic case identification. Due to limitations of comparative genomic hybridization, in terms of a routine application as first line-screening tests we evaluated the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) SALSA P327\_A1 and P327\_B1 probe sets for detecting chromosome 21 copy number alterations in Brazilian childhood BCP-ALL.

**Results:** In 74 out of 368 patients gain of genetic material was detected. For data confirmation *RUNX1* directed FISH was performed. Cells with  $\geq 5$  *RUNX1* signals ( $n = 9$ ) were considered as "true iAMP21" while  $< 5$  *RUNX1* signals ( $n = 41$ ) were counted as evidence for additional copies of intact chromosomes 21. All patients with an iAMP21 had high MLPA peak ratios ( $\geq 1.8$ ), while the majority of patients with  $< 5$  *RUNX1* presented low MLPA peak ratios ( $< 1.8$ ). Observed differences gained statistical strength by comparing probes located within the common region of amplification. Next, a principal component analysis was performed in order to illustrate distribution of cases according to their MLPA peak profile in two dimensions. Cases with an iAMP21 mostly clustered together, however additional cases with  $< 5$  *RUNX1* signals or no available FISH data located in proximity.

**Conclusions:** MLPA qualified as a high throughput technique that could be employed in future studies for a critical comparison with data obtained by FISH, especially in cases where metaphase nuclei are not available. Taking submicroscopic aberrations into account examined by MLPA, cases exhibiting an "iAMP21 like" peak ratio profile but  $< 5$  *RUNX1* signals should be considered as candidates for this chromosomal abnormality.

**Keywords:** B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL), Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21), Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA), Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

\* Correspondence: mpombo@inca.gov.br  
Pediatric Hematology-Oncology Program, Research Center, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rua André Cavalcanti, 37, Rio de Janeiro, RJ 20231-050, Brazil



© 2015 Fuka et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## Background

Cytogenetic and molecular studies have displayed among B-cell precursor-acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) a distinct subtype, characterized by an intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) [1, 2].

Patients with an iAMP21 treated under standard risk regimens had an elevated relapse rate and a dismal prognosis compared to other BCP-ALL, hence risk directed treatment intensification has been recommended [3–7]. Amplification of 21q has also been found in other hematopoietic malignancies such as acute myeloid leukemia and disorders with complex karyotypes involving chromosome 21, supporting the hypothesis that gains within chromosome 21 interplay with the function of a specific set of genes [8]. Array based genomic analyses revealed that alterations on chromosome 21 are highly complex and suggested to arise from breakage-fusion bridge cycles followed by chromothripsis and other complex structural rearrangements on chromosome 21 [9–11]. Multiple regions of gains, amplifications, inversions and deletions with a high level of individuality between different patients have been described. Patients exhibited a common region of amplification (CRA, covering a region of 6 MB) as well as in most cases a common region of deletion (CRD, covering a region of 9 MB) [10]. The CRA, located between 32.8-37.9 MB on chromosome 21, consistently showed the most amplified as well as over-expressed regions, encoding for genes that play important roles in leukemia such as *RUNX1*, *DYRK1A* and *ETS2* [11].

The method nowadays internationally recommended to identify an iAMP21 is fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using probes directed to the *Runt Related Transcription Factor 1 (RUNX1)* gene, present by three or more extra copies on a single abnormal chromosome 21 [10, 12]. However, case interpretation needs to be done cautiously, particularly whenever FISH was performed from interphase nuclei because additional copies of the *RUNX1* genes are also present in high hyperdiploid karyotypes. In light of such considerations, genomic analyses of chromosome 21 might be taken into account for confirming the accuracy of iAMP21 diagnosis [13]. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assays represent a quick and cost effective alternative to array based techniques allowing screening of large cohorts for sub microscopic copy number changes. By quantification of multiple gene sequences on multiple sites on a previously defined chromosomal region such as an abnormal chromosome 21 it permits data comparison with other molecular techniques [14].

In this work, we evaluated MLPA for detecting an iAMP21 in a cohort of Brazilian childhood BCP-ALL and compared data with those obtained from FISH, conventionally detecting *RUNX1* copy numbers. To our knowledge, this is the first published report where the SALSA MLPA

P327\_A1 and P327\_B1 probe sets were tested in order to identify copy number alterations (CNAs) in a subset of genes, demonstrating its value as a tool for screening large cohorts of patients.

## Results

Demographic and clinical characteristics of 368 BCP-ALL alleged according to designated criteria with the MLPA results are shown in Table 1. Most variables were equally distributed in negative and positive cases, but age between 2-10 years, common-ALL and standard prognostic risk was more prone in MLPA positive patients ( $p < 0.05$ ). Blast cell counts were similar in both groups with an average of 82 % (range 67 % to 90 %) in the whole cohort.

**Table 1** Baseline characteristics of BCP-ALL with and without chromosome 21 CNAs

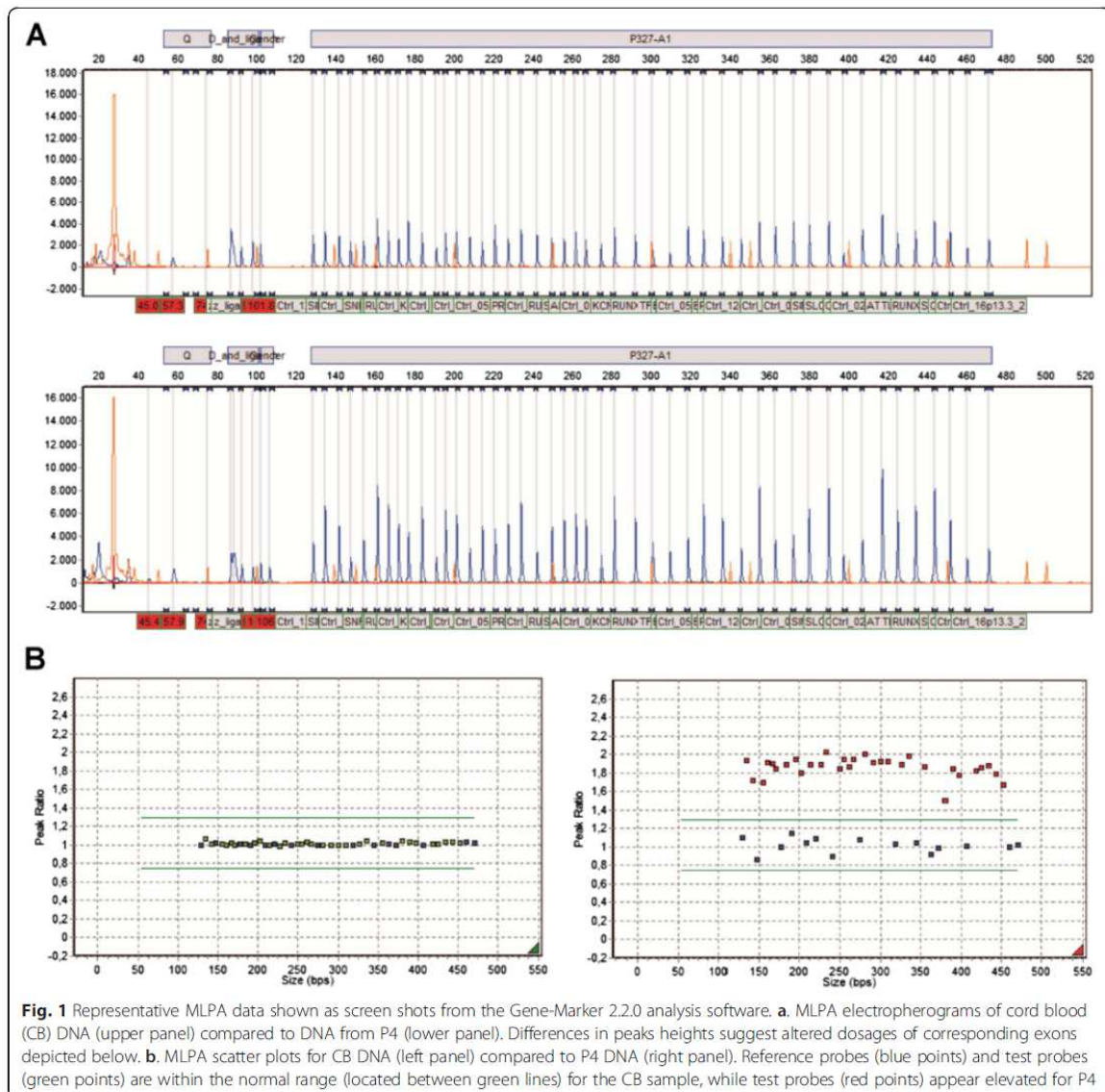
Characteristics	MLPA negative n (%)	MLPA positive n (%)	P-value
Total	294 (80.0)	74 (20.0)	
Gender			
Male	169 (57.0)	42 (56.8)	
Female	125 (43.0)	32 (43.2)	0.999
Age range, (years)			
≤1	15 (5.1)	0 (0.0)	
2-10	185 (62.6)	62 (83.8)	
>10	94 (32.3)	12 (16.2)	0.001**
Skin color			
White	117 (42.5)	36 (50.0)	
Non-white	159 (57.5)	36 (50.0)	0.300
WBC, $\times 10^9/l$			
Median	61.1	44.8	
Range	0.6-978.0	2.2-95.0	
≤20	153 (52.8)	40 (54.8)	
20-50	56 (19.3)	15 (20.5)	
>50	81 (27.9)	18 (24.7)	0.816
Immunophenotype			
Pro-B ALL	31 (10.5)	1 (1.4)	
Common-ALL	205 (69.8)	58 (78.3)	
Pre-B ALL	58 (19.7)	15 (20.3)	0.038*
NCI risk group			
Standard risk	141 (48.3)	46 (63.0)	
High risk	151 (51.7)	27 (37.0)	0.018*
Status			
Alive	28 (65.1)	21 (75.0)	
Dead	15 (34.9)	7 (25.0)	0.379

n number, WBC white blood cell count  $\times 10^9/l$

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$

Patient material was first subjected to MLPA using the SALSA MLPA P327\_A1 probe set. Relative peak heights between 0.75 and 1.3 were considered normal, while those below 0.75 and above 1.3 indicated losses or gains of genomic material, respectively (Fig. 1). Two hundred and ninety-four patients had no copy number changes of chromosome 21 regions since test fragments binding on chromosome 21 and control fragments binding on other chromosomes appeared normal, whereas in 74 patients gain of genetic material on chromosome 21 was found. None of our patients harbored gene deletions on chromosome 21.

For data validation and sub-division of MLPA positive patients we next applied the SALSA MLPA P327\_B1 probe set. Down syndrome (DS) patients and cytogenetically confirmed hyperdiploid ALL with extra copies of chromosomes 21 (Hyp + 21) were included as additional controls. We could not re-evaluate all 74 cases with chromosome 21 CNAs due to restrictions in the availability of DNA. However, for those patients subjected to analysis, no qualitative differences have been observed (n = 64); the presence or absence of CNAs on chromosome 21 has been confirmed. Pearson's correlation coefficients ( $r = 0.09101$ ,  $r^2 = 0.8287$ ,  $p < 0.0001$ ), calculated to measure



the linear dependence of variables and Kappa tests ( $\kappa = 0.661$ ,  $SE = 0.083$ , 95 %  $CI = 0.498-0.825$ ) to evaluate the number of observed agreements revealed only minor differences between average peak heights obtained from P327\_A1 and P327\_B1 probe sets (Fig. 2).

In order to understand gene CNAs distributions, MLPA results were illustrated in a heat map and arranged from centromeric to telomeric positions. MLPA peak heights allocated patients with chromosome 21 abnormalities into 3 main groups by a hierarchical clustering analysis (Fig. 3). Group 1 (bottom,  $n = 8$ ) consisted of patients with slightly elevated MLPA peak ratios clustering in proximity to BCP-ALL without chromosome 21 CNAs; group 2 (middle,  $n = 15$ ) of patients with intermediate peak ratios - similar to those observed in DS and Hyp + 21 - and, group 3 (top,  $n = 26$ ) of patients with high or very high MLPA peak ratio profiles. Patient (P) 5 did not allocate into any of the three groups since its MLPA peak pattern demonstrated a higher variability than others.

According to availability of material FISH directed to the *RUNX1* gene was performed in 50 patients. Six patients had a normal FISH pattern with 2 signals of *RUNX1*; in 35 patients 3–4 signals for *RUNX1* - while in 9 patients  $\geq 5$  signals for *RUNX1* were observed (Fig. 4a). Cells with 2–4 *RUNX1* signals most likely acquired one or two additional copies of chromosome 21 (even though not detectable in all cases by interphase FISH), while those with  $\geq 5$  *RUNX1* signals fulfilled the internationally adopted criteria for an iAMP21.

Patients with an iAMP21 had a mean age of 55 months (range 22–120) and a median WBC (white blood cell count) of  $15.9 \times 10^9/l$  (range 7.2–92.0). According to National Cancer Institute (NCI) risk classification criteria, P5, P6 and P9 (33,3 %) allocated to the high risk group. P1, P3, P4 and

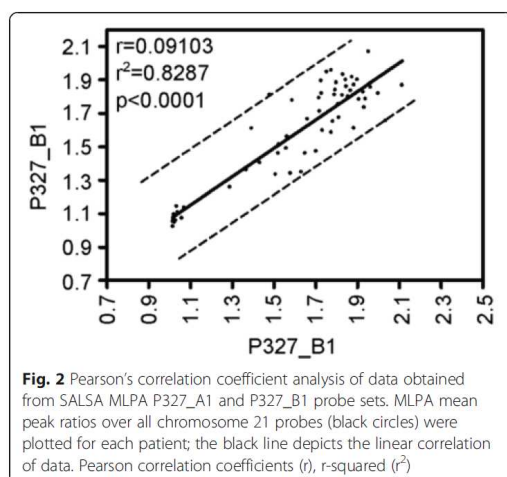
P5 remained in complete remission until the last follow up in November 2014, while P8 and P9 succumbed to disease. For P2, P6, and P7 no follow up data was available.

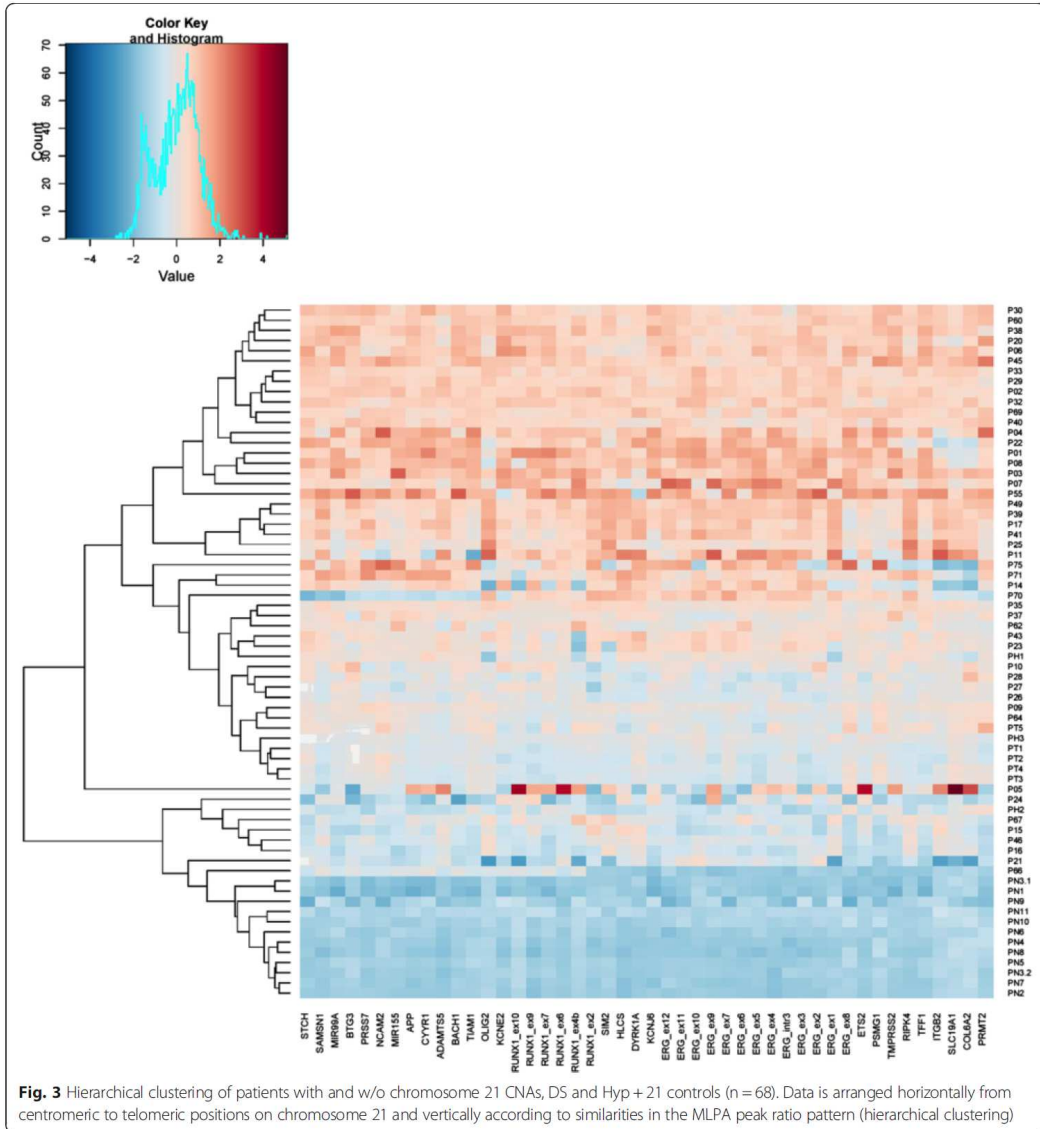
For data comparison of the methodologies MLPA and FISH patients were clustered according to the number of *RUNX1* signals (Fig. 4b). Mean MLPA peak ratios and standard deviations for chromosome 21 probes are provided in Additional file 1. MLPA peak ratios and in particular those of CRA genes separated cases with  $\geq 5$  *RUNX1* signals from cases with 2–4 *RUNX1* signals. In the latter group these were lower and in the same magnitude as controls such as patients with DS (PT1-5) and Hyp + 21 (PH1-3) (Fig. 4c). We next performed a principal component analysis in order to illustrate the distribution of cases according to their MLPA peak profile. Patients were grouped into (1) FISH confirmed iAMP21, (2)  $< 5$  *RUNX1* signals, (3) no FISH data, (4) DS and Hyp + 21, and (5) no chromosome 21 aberrations (Fig. 5). Sixty-three out of sixty-eight patients segregated into three clusters: The first one consisted of all patients from group 1 and two patients from group 3 and 4; the second of all patients from group 4 and most of the patients of group 2; and the third one of all patients from group 1 except P5. Interestingly, the latter cluster also contained some patients of group 2 and group 3 that located in close proximity to patients with an iAMP21; in other words exhibited an “iAMP21 like” MLPA peak profile.

Since we observed variations in MLPA peak heights between different patients, the correlation between *RUNX1*, *DYRK1A*, *ETS2* and *ERG* gene load and expression was tested. Delta threshold cycle (dCT) values for each patient are shown in Table 2. For illustration we stepwise arranged cases from the lowest to the highest MLPA mean peak ratios and depicted corresponding dCT values (Fig. 6). Positive correlation between the MLPA mean peak ratios and dCT values were observed, since those patients with high MLPA mean peak ratios were the ones with low gene expression. This observation particularly held true for the genes *RUNX1*, *DYRK1A*, and *ERG*.

## Discussion

In this study, we evaluated MLPA as a tool to detect an iAMP21 in a cohort of BCP-ALL, providing first data of this leukemia entity in a Brazilian BCP-ALL cohort. The information about gene CNA distributions on chromosome 21 was re-tested. Nine out of 368 BCP-ALL patients (2.4 %) were identified with an iAMP21 according to criteria specified recently [13]. Taking submicroscopic aberrations into account examined by MLPA, additional cases presenting high MLPA peak ratios of genes within the CRA region or exhibiting an “iAMP21 like” peak ratio profile of chromosome 21 genes might be considered as positive for this chromosomal abnormality and subjected to further genomic tests.

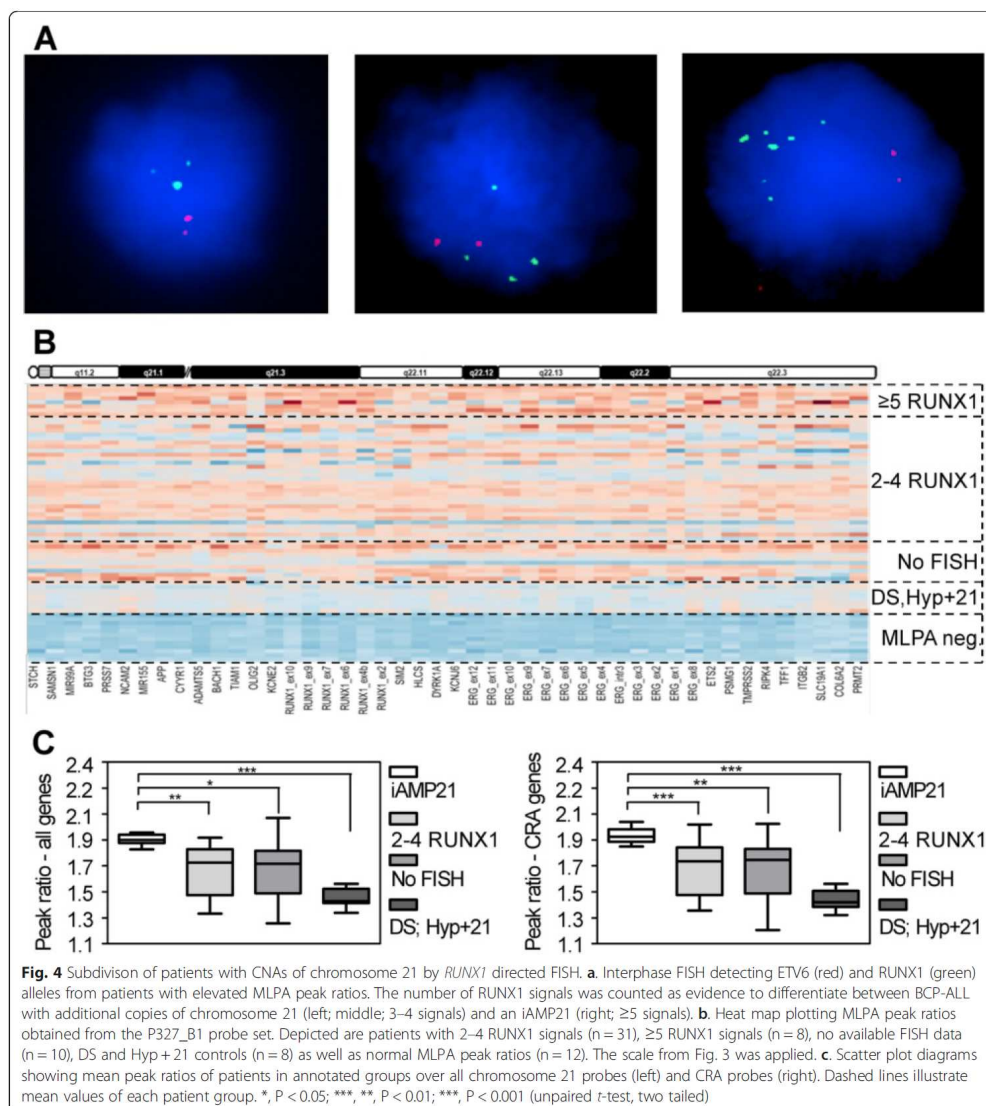




**Fig. 3** Hierarchical clustering of patients with and w/o chromosome 21 CNAs, DS and Hyp + 21 controls (n = 68). Data is arranged horizontally from centromeric to telomeric positions on chromosome 21 and vertically according to similarities in the MLPA peak ratio pattern (hierarchical clustering)

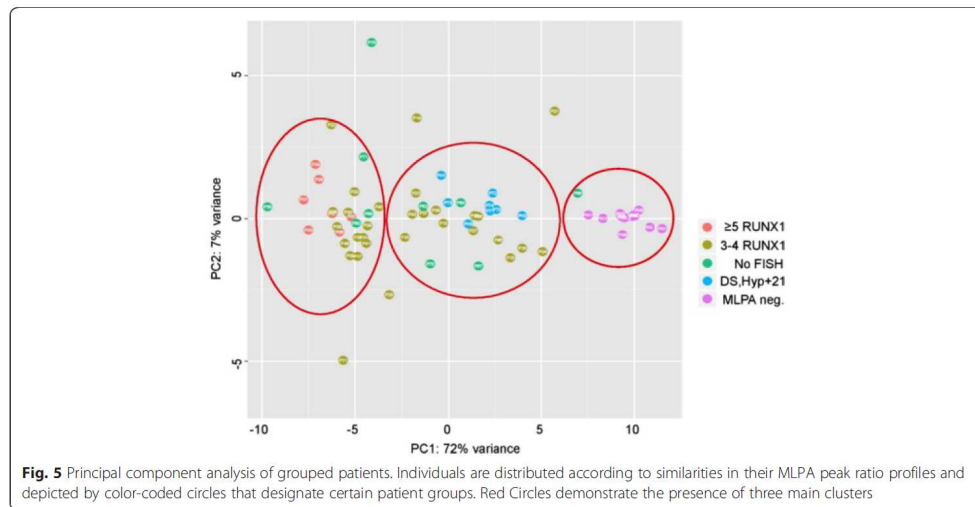
In the past 10 years MLPA was successfully applied as a tool in cancer research, providing precise information on increased or decreased copy numbers at specific loci [14]. More recently it has been proven as accurate and sensitive for detection of CNAs in hematological malignancies, particularly appearing advantageous for analyzing large sample sets in a time efficient fashion [15, 16]. MLPA demonstrated comparable detection rates to routine interphase FISH for aberrations being

typically present in leukemia. Since it can detect also rare chromosomal aberrations it was suggested being applied as an initial test if routine cytogenetics is not possible or informative [17]. The SALSA P327\_A1 and P327\_B1 probe sets were designed to provide information on the copy number status of 24 and 29 genes located on chromosome 21, respectively. Six of the 31 probes targeting chromosome 21 are specific for *RUNX1* gene being located within the CRA. Other probes anneal to



regions flanking the *RUNX1* gene described being duplicated or amplified in most cases with an *iAMP21*. In our hands low MLPA mean peak ratios within the CRA ( $< 1.8$ ) ruled the presence of an *iAMP21* out, in all of these cases less than three additional *RUNX1* signals have been detected. By contrast, high MLPA mean peak ( $\geq 1.8$ ) ratios should be taken as evidence for the presence of an *iAMP21*, even though encountering difficulties to detect

this chromosomal abnormality by FISH performed from interphase preparations. Nevertheless, we cannot rule out that MLPA in some cases fails to accurately distinguish between BCP-ALL with 4 copies of a chromosome 21 and an *iAMP21* due to certain variability between blast counts of different patient samples. On the other hand interphase FISH could not detect additional *RUNX1* signals in a total of six cases, shown to have gain of genetic material by



MLPA. Even though we are aware of such methodological pitfalls, these cases unlikely harbored an iAMP21 since peak ratios obtained from both data sets were low to intermediate. Further investigation of such cases by whole genome techniques such as array based comparative genomic hybridization or, alternatively exome sequencing capable of assessing gene copy numbers would be desirable.

Depending on the chromosomal location of genes, MLPA peak ratios appeared heterogeneous in BCP-ALL with an iAMP21. The highest MLPA peak ratios and lowest variations between different patients were encountered within and close to the CRA while peak ratios often dropped towards telomeric regions. These observations are in line with the view that chromosome 21 aberrations in BCP-ALL with an iAMP21 are highly complex, exhibiting a stepwise increase in copy numbers towards the CRA and decrease of copy number towards the CRD,

mapping centromeric and telomeric parts of chromosome 21, respectively [10].

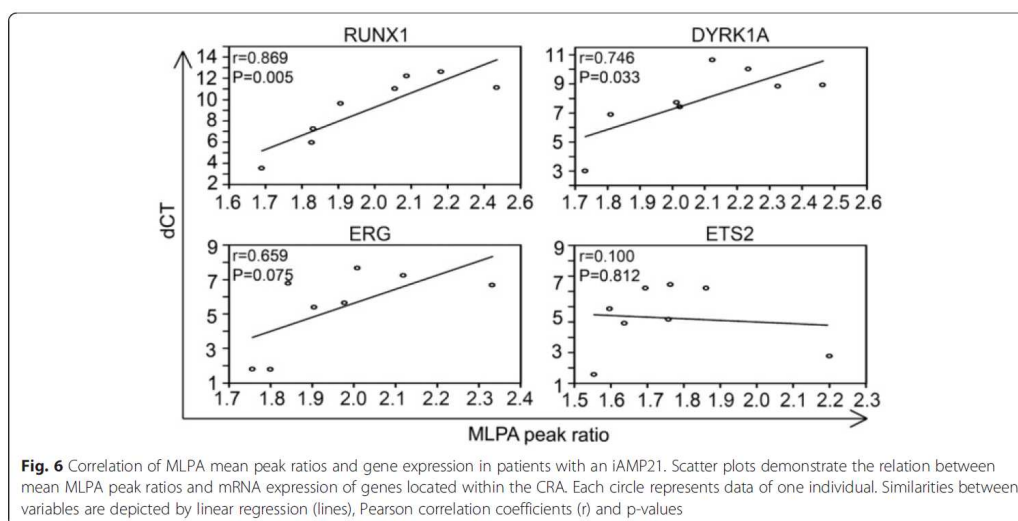
Due to the lack of studies identifying individual genes, playing an important role in leukemogenesis or providing evidence that de-regulation of certain candidates would explain the poor outcome of patients with an iAMP21, the effect of gene load on mRNA expression within the CRA was also evaluated. In contrast to our expectations, this analysis revealed that patients with lowest gene dosages of *RUNX1*, *DYRK1A*, *ETS2* and *ERG* genes displayed the highest expression of the respective mRNA. These results need to be consolidated analyzing more patients. As part of a study to describe genomic alterations and gene expression in BCP-ALL with an iAMP21, Strefford *et al.* 2006 evaluated the expression of genes located in the CRA of eight cases and compared data with that of other BCP-ALL subtypes. Even though expression levels of the genes contained within the CRA were higher in BCP-ALL with an iAMP21 for almost half of the probe sets from the CRA no over-expression was observed, including the *RUNX1* gene. The authors concluded that these results could be explained by regulatory mechanisms such as epigenetics and biofeedback in BCP-ALL [9]. Strikingly, hyperdiploid leukemias, by definition harboring less gene copies on chromosome 21 than cases with an iAMP21, showed higher mRNA expression for the genes analyzed.

**Table 2** RT-qPCR data of patients with an iAMP21 for selected genes located in the CRA

#	dCT DYRK1A	dCT ERG	dCT ETS2	dCT RUNX1
P1	8.715	1.790	0.555	5.950
P2	11.625	7.655	6.430	12.195
P3	3.995	1.775	1.760	3.515
P4	7.885	5.380	4.155	7.250
P5	9.905	7.230	6.200	12.595
P6	9.815	6.665	6.200	11.095
P7	8.420	6.765	3.895	9.630
P8	11.010	5.635	4.845	11.000

## Conclusions

Altogether, we confirmed that aberrations on chromosome 21 in BCP-ALL with an iAMP21 represent a high level of complexity but as a group exhibited similar MLPA peak ratio profiles and, furthermore provided evidence for



the existence of gene regulatory mechanisms that might modulate the expression of amplified genes. MLPA profiles of CRA genes might be taken into account to facilitate diagnosis whenever metaphase nuclei for FISH are not available. However, for identification of an iAMP21 solely by MLPA next generation probe sets would need to include control fragments binding genes on chromosomes usually over-represented in hyperdiploid ALL.

## Methods

### Patients

A series of consecutive diagnostic samples from Brazilian childhood BCP-ALL patients collected between the years 2002 to 2012 were selected according to availability of material of good quality providing that bone marrow aspirates harbored at least 30 % of blast cells. The initial dataset contained samples from 606 patients. Out of those, 368 samples were retained for this study, excluding 238 cases based on the available results of mutually exclusive gene fusions (*ETV6/RUNX1*, *TCF3/PBX1*, *MLL-r* and *BCR-ABL1*). In addition five patients with ALL and Down syndrome were included.

As criteria for assigning as standard-risk or high-risk patients, age at diagnosis and WBC according to the Cancer Therapy Evaluation Program of the NCI were considered. Data collection and laboratory procedures have been evaluated and approved by the Research Ethics Committee from the National Cancer Institute (INCA) in Rio de Janeiro (CEP #005/06 and CAAE 626.268 at April 28, 2014). Informed consent was obtained from all subjects or their parents in accordance with the Declaration of Helsinki.

### Multiplex ligation-dependent probe amplification

The presence of an iAMP21 has been evaluated applying the MLPA SALSA P327\_A1 (lot A1-0101) and P327\_B1 (lot B1-0613) probe sets (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands). Tests fragments have been designed to evaluate the copy number status of genes distributed from centromeric to telomeric regions (q11.2-q22.3, 14.668-46.356) of chromosome 21. The P327\_B1 probe set represents a modified version of the P327\_A1 probe set in which 12 new probes for the *ERG* gene and 3 additional probes for chromosome 21 genes have been added. Four *RUNX1* specific probes (exon 10; 7; 6 and 4b) have been replaced while two probes (exon 9 and 2) remained unchanged. The size and location of most other test probes as well as reference probes has been redefined. Detailed information about P327\_A1 and P327\_B1 MLPA probe sets was downloaded from the MRC Holland website (<http://www.mlpa.com>); see Additional files 2 and 3, respectively. MLPA and capillary electrophoresis based amplification product separation (ABI 3130xl, Life Technologies, Carlsbad, CA) was performed according to the manufacturer's instructions. Relative copy numbers were obtained after normalization of peaks against cord blood derived controls. Sequences were analyzed by the Gene Marker 2.2.0 software (Soft Genetics LLC, State College, PA).

### Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

FISH was performed using the "LPH012 *TEL/AML1* Translocation, Dual Fusion Probe", designed to detect the *TEL/AML1* fusion gene. Cells were processed



according to the protocols instructions (Cytocell, Cambridge, UK). Cases were considered positive for an iAMP21 when  $\geq 5$  *RUNX1* signals were observed in at least 7 % of metaphase nuclei (standard deviation  $\pm 2$  %). If metaphase FISH was not possible, an iAMP21 was identified as multiple copies of *RUNX1* in most interphase nuclei [1, 13].

#### Reverse transcriptase quantitative (RT-q)PCR

Total RNA was isolated by Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA) and used for cDNA synthesis by Super Script II Reverse Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA). *RUNX1*, *ETS2*, *DYRK1A*, *ERG* and *GAPDH* transcripts used as an endogenous control were quantified by SYBR-green RT-qPCR (Bioline, London, UK) using the *Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA). For data depiction dCT values (CT target – CT reference) of biological replicates were calculated. The following primer combinations were used: *RUNX1*, forward 5'-GAGCTGAGAAATGCTACCGC-3', reverse 5'-GGTCAGAGTGAAGCTTTTCCC-3'; *ETS2*, forward 5'-TTCCAAAGAACCCTGGCTG-3', reverse 5'-CGAACCTCTGCAGATTCACG-3'; *DYRK1A*, forward 5'-TGTAACCCCAAACGCAGTG-3', reverse 5'-ACCGATAAAAGCGACTCTGAA-3'; *ERG*, forward 5'-AAGTAGCCGCTTGCAAAT-3', reverse 5'-GTGCCTTCCCAGGTGATG-3'; and *GAPDH*, forward 5'-TGACCCCTTCACTGACCTCA-3', reverse 5'-AGTCCCTTCCACGATACCAA-3'.

#### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS), 18 (Chicago, IL), Graph Pad Prism 4.02 (La Jolla, Ca) and R (Foundation for Statistical Computing, Auckland, New Zealand) software packages. Confidence intervals of 95 % were used; *P*-values  $< 0.05$  were considered statistically significant. Chi-square and Fisher's exact tests were used for comparative variable analyzes of demographic and clinical variables. Correlation and the strength of agreement between MLPA data were assessed by Pearson correlation coefficients and Kappa tests, respectively. Hierarchical clustering and principal component analyses (PCA) were created in R. For creation of heat maps MLPA values were scaled and centered using the scale function followed by clustering and plotting of normalized values using heat map .2 with default values. Patient groups from heatmaps were compared by unpaired, two sided Student's T-tests. PCA was performed on scaled values using the `prcomp()` function with default parameters.

#### Additional files

**Additional file 1:** Mean MLPA peak ratios in BCP-ALL obtained from test fragments of the MLPA SALSA P327-B1 probe set.  
**Additional file 2:** The size and location of each test and reference fragment of the MLPA SALSA P327\_A1 probe set.  
**Additional file 3:** The size and location of each test and reference fragment of the MLPA SALSA P327\_B1 probe set.

#### Abbreviations

BCP-ALL: B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia; CNAs: Copy number alterations; CRA: Common region of amplification; CRD: Common region of deletion; dCT: Delta threshold cycle; DS: Down syndrome; FISH: Fluorescence *in situ* hybridization; Hyp + 21: Hyperdiploid ALL with extra copies of chromosomes 21; iAMP21: Intrachromosomal amplification of chromosome 21; P: Patient; PCA: Principal component analysis; PH: Patients with Hyp + 21; PT: Patients with DS; WBC: White blood cell count.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

ETGP performed diagnostic immunophenotyping of BCP-ALL cases. GF and TCB carried out and analyzed MLPA data. LH, CB and TMFV performed FISH. ME assisted in interpretation of gene expression data acquired by JCS. GF designed the study, interpreted data and wrote the manuscript. MSPO was the principal investigator, coordinated the research, assisted in data interpretation and edited the manuscript together with ME. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank for Alessandra Faro, Bruno Alves Aguiar Gonçalves, Camilla Andrade and Dr. Gisele Vasconcelos for technical support. We particularly appreciate all bioinformatical assistance of Dr. Christian Frech from the Children's Cancer Research Institute in Vienna, Austria. MSPO has been supported by CNPq Research Scholarships #302423/2010-9 and FAPERJ #E026/101.562/2010. The Brazilian Ministry of Health supported GF through the Institutional Development Scholarship Program.

Received: 22 April 2015 Accepted: 20 May 2015

Published online: 10 June 2015

#### References

1. Robinson HM, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harewood L, Harris RL, Jalali GR, et al. Amplification of AML1 in acute lymphoblastic leukemia is associated with a poor outcome. *Leukemia*. 2003;17(11):2249–50.
2. Harewood L, Robinson H, Harris R, Al-Obaidi MJ, Jalali GR, Martineau M, et al. Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases. *Leukemia*. 2003;17(3):547–53.
3. Moorman AV, Richards SM, Robinson HM, Strefford JC, Gibson BE, Kinsey SE, et al. Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). *Blood*. 2007;109(6):2327–30.
4. Heerema NA, Carroll AJ, Devidas M, Loh ML, Borowitz MJ, Gastier-Foster JM, et al. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 is associated with inferior outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia treated in contemporary standard-risk children's oncology group studies: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*. 2013;31(27):3397–402.
5. Moorman AV, Robinson H, Schwab C, Richards SM, Hancock J, Mitchell CD, et al. Risk-directed treatment intensification significantly reduces the risk of relapse among children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia and intrachromosomal amplification of chromosome 21: a comparison of the MRC ALL97/99 and UKALL2003 trials. *J Clin Oncol*. 2013;31(27):3389–96.
6. Attarbaschi A, Panzer-Grumayer R, Mann G, Moricke A, König M, Mecklenbrauer A, et al. Minimal residual disease-based treatment is adequate for relapse-prone childhood acute lymphoblastic leukemia with an intrachromosomal amplification of chromosome 21: the experience of the ALL-BFM 2000 trial. *Klin Padiatr*. 2014;226(6–7):338–43.

7. Harrison CJ, Moorman AV, Schwab C, Carroll AJ, Raetz EA, Devidas M, et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia*. 2014;28(5):1015–21.
8. Baldus CD, Liyanarachchi S, Mrozek K, Auer H, Tanner SM, Guimond M, et al. Acute myeloid leukemia with complex karyotypes and abnormal chromosome 21: Amplification discloses overexpression of APP, ETS2, and ERG genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(11):3915–20.
9. Strefford JC, van Delft FW, Robinson HM, Worley H, Yiannikouris O, Selzer R, et al. Complex genomic alterations and gene expression in acute lymphoblastic leukemia with intrachromosomal amplification of chromosome 21. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(21):8167–72.
10. Rand V, Parker H, Russell LJ, Schwab C, Ensor H, Irving J, et al. Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;117(25):6848–55.
11. Li Y, Schwab C, Ryan SL, Papaemmanuil E, Robinson HM, Jacobs P, et al. Constitutional and somatic rearrangement of chromosome 21 in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2014;508(7494):98–102.
12. Robinson HM, Harrison CJ, Moorman AV, Chudoba I, Strefford JC. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) may arise from a breakage-fusion-bridge cycle. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46(4):318–26.
13. Harrison CJ. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. *Blood*. 2015;125(9):1383–6.
14. Schouten JP, McElgunn CJ, Waajer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(12):e57.
15. Schwab CJ, Jones LR, Morrison H, Ryan SL, Yigittop H, Schouten JP, et al. Evaluation of multiplex ligation-dependent probe amplification as a method for the detection of copy number abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49(12):1104–13.
16. Konialis C, Savola S, Karapanou S, Markaki A, Karabela M, Polychronopoulou S, et al. Routine application of a novel MLPA-based first-line screening test uncovers clinically relevant copy number aberrations in haematological malignancies undetectable by conventional cytogenetics. *Hematology*. 2014;19(4):217–24.
17. Alhourani E, Rincic M, Othman MA, Pohle B, Schlie C, Glaser A, et al. Comprehensive chronic lymphocytic leukemia diagnostics by combined multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) and interphase fluorescence in situ hybridization (iFISH). *Mol Cytogenet*. 2014;7(1):79.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

