



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

TÁLLITA MECIANY FARIAS VIEIRA

**ANORMALIDADES GENÉTICAS E DE METILAÇÃO DE DNA
EM UMA COORTE DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA
PEDIÁTRICA COM ALTERAÇÕES NO CROMOSSOMO 21**

Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Maria do Socorro Pombo de Oliveira
Dr^a. Sheila Coelho Soares Lima

RIO DE JANEIRO
2017



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

TÁLLITA MECIANY FARIAS VIEIRA

**ANORMALIDADES GENÉTICAS E DE METILAÇÃO DE DNA
EM UMA COORTE DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA
PEDIÁTRICA COM ALTERAÇÕES NO CROMOSSOMO 21**

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

Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Maria do Socorro Pombo de Oliveira
Dr^a. Sheila Coelho Soares Lima

RIO DE JANEIRO
2017

V657a Vieira, Tállita Meciany Farias

Anormalidades genéticas e de metilação de DNA em uma coorte de leucemia linfoblástica aguda pediátrica com alterações no cromossomo 21 / Tállita Meciany Farias Vieira. – Rio de Janeiro, 2017.
201 f.: il. color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2017.

Orientadoras: Maria do Socorro Pombo de Oliveira
Sheila Coelho Soares Lima

1. Leucemia Aguda Bifenotípica. 2. Cromossomos Humanos Par 21.
3. Metilação de DNA. I. Pombo de Oliveira, Maria do Socorro (Orient.).
II. Lima, Sheila Coelho Soares (Orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99419042



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

TÁLLITA MECIANY FARIAS VIEIRA

**ANORMALIDADES GENÉTICAS E DE METILAÇÃO DE DNA
EM UMA COORTE DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA
PEDIÁTRICA COM ALTERAÇÕES NO CROMOSSOMO 21**

ORIENTADOR (AS): Prof^a. Dr^a. Maria do Socorro Pombo de Oliveira
Dr^a. Sheila Coelho Soares Lima

Aprovada em: _____ / _____ / _____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto (INCA)
Prof^a. Dr^a. Tereza de Souza Fernandez (INCA)
Prof^a. Dr^a. Cintia Barros Santos Rebouças (UERJ)
Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli (USP)
Prof^a. Dr^a. Etel Rodrigues Pereira Gimba (INCA)
Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone (USP)

RIO DE JANEIRO
2017

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista aos meus pais porque me ensinaram que com empenho e dedicação eu poderia conquistar os sonhos que quisesse ter.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dr^a Maria do Socorro Pombo de Oliveira, pelo investimento feito neste trabalho e na minha formação, por todos os ensinamentos durante o mestrado e doutorado e por ter cultivado em mim o pensamento crítico científico.

À minha coorientadora Dr^a Sheila, por toda a dedicação e compreensão que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu amigo Dr. Gerhard Fuka, que iniciou esta linha de pesquisa e contribuiu intensamente na elaboração e execução das etapas iniciais do estudo.

À Dr^a Christine Harrison e Claire Schwab por todo o suporte durante o doutorado sanduíche.

À Monique Lopes pelo apoio nas análises de metilação.

À Francianne Gomes pela colaboração nas análises de validação dos perfis de metilação.

Ao Alython Chung pelo suporte na genotipagem dos casos e controles.

Ao Dr. Flávio Braga Paraguaçu pela colaboração na obtenção das amostras controles.

Ao Grupo Colaborativo Brasileiro para Estudo de Leucemias Infantis que contribuiu com o envio dos casos que participaram desta pesquisa.

Ao corpo técnico do laboratório, especialmente Bruno Alves Aguiar e Camila Andrade por todo o trabalho no manuseio das amostras.

À Caroline Barbieri pela ajuda nas análises iniciais do FISH.

À Dr^a Ana Dovalles por ter sido uma mãe e amiga desde o doutorado sanduíche.

Aos amigos do laboratório, especialmente Francianne Gomes, Eugênia Granado, Ingrid Sardou, Priscilla Moniz, Daniela Palheiro, Filipe Bueno, Elda Noronha, Luisa Marques, Alython, Gisele Brisson e Bruno de Almeida Lopes por todos os momentos de descontração que tornaram o trabalho mais leve.

A todos os amigos do alojamento que foram minha família durante esses anos, especialmente Gabriela, Ana Carolina, Lauana Lemos, Tavares, Daniel, e todos que dividiram esta “casa” comigo durante o mestrado e doutorado.

À minha amiga Luisa Aguirre Buexm, pela sensibilidade de enxergar minhas necessidades, por todo o carinho durante esses anos.

Ao instituto Nacional de Câncer que possibilitou a realização deste trabalho e, direta ou indiretamente, trouxe oportunidades e pessoas que mudaram a minha vida.

À Pós-graduação e ao corpo docente do INCA, que se dedicaram em transmitir conhecimentos fazendo parte da construção científica.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq, Ministério da Saúde e FAPERJ.

À minha família, que me educou e me deu valores suficientes para chegar à conclusão deste trabalho, especialmente aos meus pais e irmãos que dividiram todas as alegrias e dificuldades no decorrer deste caminho percorrido.

A(não tem crase)Deus, que me fez sonhar e me permitiu a graça desta conquista, que esteve presente em todos os momentos, me olhando, me guardando e me dando forças para dar cada passo e ultrapassar cada dificuldade.

Anormalidades genéticas e de metilação de DNA em uma coorte de leucemia linfoblástica aguda pediátrica com alterações no cromossomo 21
RESUMO

TESE DE DOUTORADO

TÁLLITA MECIANY FARIAS VIEIRA

A leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLA-CPB) é uma neoplasia heterogênea. Aproximadamente 60% das LLA-CPB apresentam alterações envolvendo o cromossomo 21, incluindo hiperdiploidia, fusão gênica *ETV6-RUNX1* e amplificação intracromossomal do cromossomo 21 (iAMP21). Mecanismos epigenéticos contribuem para a leucemogênese e a metilação do DNA, por sua vez, pode ser modulada por polimorfismos na via do folato. Portanto, este estudo tem como objetivo caracterizar o perfil genético e de metilação de DNA em LLA-CPB com alterações no cromossomo 21. Este estudo partiu de uma série de 1006 casos de LLA-CPB diagnosticados de 2002-2016 e foi desenhado em 3 fases: 1) Identificação dos casos com alterações em número de cópias (CNA) no cromossomo 21 usando *multiplex ligation probe amplification* (MLPA) e FISH (*RUNX1* e sondas para os cromossomos 4, 8, 10, 14, 17, 18, X e Y); 2) Caracterização do perfil de metilação e CNA por meio da técnica de microarranjo. Para tanto, o DNA foi modificado com EZ DNA Methylation™ Kit e o perfil de metilação analisado pelo *Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit*; e 3) Análises comparativas de metilação de DNA gene-específica, metilação em LINE-1 (pirosequenciamento) e genotipagem para o polimorfismo *MTHFR* rs1801133 (PCR-RFLP) entre os diferentes subtipos moleculares de LLA-CPB, controles e amostras em remissão. Encontramos evidências de ganhos em CNA no cromossomo 21 em 83/374 (22%) das amostras (MLPA). Dentre as amostras com ganho do cromossomo 21, 11/83 (13%) apresentaram ≥ 5 sinais de *RUNX1*, avaliado por FISH. Ainda, usando as sondas centroméricas, caracterizamos 53/83 (64%) das amostras como hiperdiplóides. Além das cópias extras do cromossomo 21, identificadas em todas as amostras, também foram identificados ganhos nos cromossomos 4 (58%), 10 (57%), 14 (84%), 17 (53%), 18 (60%), X (86%) e Y (46%). Perda nos cromossomos 17 (2%) e Y (4%) foram identificadas. Dois casos apresentaram a fusão *ETV6-RUNX1* e ganho do cromossomo 21. Foi identificado um caso iAMP21, confirmado por FISH usando sondas centroméricas para os cromossomos 13/21 e 21q. A partir do microarranjo, também foi verificado o perfil de CNA em 24 casos, 87% foram hiperdiplóides, 4% hipertriplóides, 4% dos casos *ETV6-RUNX1* +21 e 4% iAMP21. Na análise de metilação caso vs controle, foram identificados 30.046 sítios CpG diferencialmente metilados (p ajustado $< 0,001$). Nas análises de validação dos achados do microarranjo em amostras dos diferentes subtipos moleculares de LLA-CPB, os genes *ARID3A*, *ERG*, *PDE9A*, *PRDM9* e *PRDM15* foram encontrados hipermetilados no grupo hiperdiplóide e os genes *ARID3A*, *PDE9A*, *PRDM9* e *PRDM15*, hipermetilados nos casos com rearranjo de *KMT2A* (*KMT2A-r*). Os casos *ETV6-RUNX1* tiveram níveis intermediários de metilação em *ARID3A* e, por último, o subtipo *TCF3-PBX1* apresentou hipermetilação em *PRDM15*, porém, esses níveis foram inferiores aos casos *KMT2A-r*. De acordo com o nível de metilação em LINE-1, os casos hiperdiplóides apresentaram-se hipermetilados em relação aos demais subgrupos de LLA-CPB, controles e remissões. Não houve associação entre metilação global e o polimorfismo *MTHFR*rs1801133. De acordo com nossos dados, recomendamos a análise de FISH com sondas centroméricas/teloméricas para a identificação da iAMP21 em casos sem informação de cariótipo. Além disso, demonstramos que os casos de LLA-CPB apresentam assinaturas de metilação global e gênica subtipo-específicas.

Genetic and DNA methylation abnormalities in a cohort of acute lymphoblastic leukemia with chromosome 21 alterations
ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

TÁLLITA MECIANY FARIAS VIEIRA

B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) is a heterogeneous disease. Approximately 60% of BCP-ALL present alterations involving chromosome 21 (chr 21), including high hyperdiploid, *ETV6-RUNX1* fusion and intrachromosomal amplification of the chromosome 21 (iAMP21). Contributing with this process, epigenetic mechanisms could regulate the transcription and induce leukemogenesis. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism could influence this aberrant methylation. This study aimed to characterize the genetic and DNA methylation profile of BCP-ALL with chr 21 aberrations, as well as to identify the DNA methylation signatures of different BCP-ALL molecular subgroups. This study enrolled 1006 BCP-ALL diagnosed between 2002-2016 and was performed in three steps: 1) Identification of copy number alterations (CNA) regarding the Chr 21 by multiplex ligation probe amplification (MLPA) and FISH ("LPH012 TEL/AML1 translocation, dual fusion probe and centromere probes to chr 4, 8, 10, 14, 17, 18, X and Y); 2) DNA methylation and CNA characterization by DNA methylation array. DNA from BCP-ALL cases, controls and remission samples was modified with EZ DNA Methylation™ Kit and analyzed by the Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit; 3) Comparative gene methylation, LINE-1 methylation (pyrosequencing) and *MTHFR* rs1801133 genotype (PCR-RFLP) analysis between the different BCP-ALL subgroups. We found evidence of gains in chr 21 in 83/374 (22%) of the samples analyzed by MLPA. Among the BCP-ALL with chr 21 gains, 11/83 (13%) had ≥ 5 *RUNX1* signals and 53/83 (64%) were classified as hyperdiploid. Besides the gain of an extra copy of chr 21, confirmed in all cases, other gains were identified in hyperdiploid samples: chr 4 (58%), 10 (57%), 14 (84%), 17 (53%), 18 (60%), X (86%) and Y (46%). Losses of the chr 17 (2%) and Y (4%) were identified. Two BCP-ALL with *ETV6-RUNX1* had an extra copy of the chr 21. One patient had iAMP21 identified by MLPA and confirmed by FISH with telomere probe targeted to chr 13 and 21. The comparison of the DNA methylation profile between cases and controls showed 30.046 differentially methylated CpG sites (adjusted $p < 0.001$). In the validation analysis, the *ARID3A* gene was confirmed to be hypermethylated in controls when compared with BCP-ALL and remission samples. The hyperdiploid group presented lower methylation levels in *ARID3A*, *ERG*, *PDE9A*, *PRDM9* and *PRDM15* genes while BCP-ALL with *KMT2A* rearrangements (*KMT2A-r*) showed a higher methylation level for *ARID3A*, *PDE9A*, *PRDM9* and *PRDM15* genes. The *ETV6-RUNX1* cases had an intermediate *ARID3A* methylation level and, lastly, the *TCF3-PBX1* cases presented higher *PRDM15* methylation when compared with the other BCP-ALL subtypes, but lower than the *KMT2A-r* group. The gene-specific methylation can predict ALL subtypes with good accuracy. For LINE-1, the hyperdiploid group presented a distinct profile of increased methylation level in comparison with the other BCP-ALL subtypes and healthy controls. *MTHFR* rs1801133 was not associated with methylation changes. Based on our findings, we recommend the use of centromeric and/or telomeric FISH probes to discriminate the iAMP21 from the hyperdiploid samples. Finally, we showed that BCP-ALL presents a distinct global and gene-specific DNA methylation signature, which are also molecular subtype-specific.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. EPIDEMIOLOGIA DAS LEUCEMIAS.....	1
1.2.O PAPEL DO CROMOSSOMO 21 NA DIFERENCIAÇÃO CELULAR E LEUCEMOGÊNESE.....	5
1.3.ALTERAÇÕES ENVOLVENDO O CROMOSSOMO 21 EM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA PEDIÁTRICA.....	8
1.4.ETIOLOGIA DAS LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS.....	12
1.4.1.Fatores ambientais.....	13
1.5.IMPLICAÇÕES DA CARÊNCIA DE FOLATOS NA LEUCEMOGÊNESE.....	15
1.5.1.Metabolismo do ácido fólico.....	15
1.6.2. Implicações biológicas da carência de folato.....	18
1.6.POLIMORFISMOS EM GENES DA VIA DO FOLATO NA SUSCEPTIBILIDADE PARA LEUCEMIAS.....	18
1.7.MECANISMOS DE REGULAÇÃO EPIGENÉTICA.....	21
1.8.ALTERAÇÕES DE METILAÇÃO EM DESORDENS HEMATOLÓGICAS.....	23
1.9.JUSTIFICATIVA.....	25
2. OBJETIVOS.....	27
2.1.OBJETIVO GERAL.....	27
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1.DESENHO DO ESTUDO.....	28
3.1.1.Seleção do grupo de estudo.....	28
3.2.ALGORITMO DE TESTES PARA DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO DOS SUBTIPOS DE LLA.....	30
3.3.IDENTIFICAÇÃO DOS DIFERENTES NÍVEIS DE GANHO DO CROMOSSOMO 21.....	31
3.3.1.Isolamento de DNA.....	31

3.3.2. <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> (MLPA).....	31
3.3.3. <i>Fluorescence in situ hybridization</i> (FISH).....	33
3.3.4. Análise de alteração em número de cópias cromossômicas por FISH.....	33
3.4. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO.....	35
3.4.1. Tratamento com bissulfito.....	35
3.4.2. Microarranjo de metilação.....	35
3.4.3. Análise de alteração em número de cópias pelo microarranjo de metilação.....	38
3.4.4. Validação do microarranjo de metilação.....	39
3.4.5. Polimorfismos em genes da via de metabolismo do folato.....	40
3.4.6. Análise de metilação global pela avaliação do <i>status</i> de LINE-1.....	41
3.4.7. Análises estatísticas.....	41
3.4.8. Ética.....	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-DEMOGRÁFICA DOS CASOS.....	43
4.2. PANORAMA GERAL DE ALTERAÇÕES EM NÚMEROS DE CÓPIAS.....	50
4.3. ANÁLISE DE ALTERAÇÕES EM NÚMERO DE CÓPIAS POR FISH.....	56
4.4. PERFIL DE METILAÇÃO DAS LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS AGUDAS COM ALTERAÇÕES NO CROMOSSOMO 21.....	61
4.4.1. Análise de metilação gênica.....	61
4.4.2. Validação do microarranjo de metilação.....	73
4.4.3. Análise comparativa da metilação gene-específica em amostras de leucemia linfoblástica aguda, controles e remissões.....	75
4.4.4. Relevância clínica do perfil de metilação dos genes <i>ARID3A</i> , <i>ERG</i> , <i>ETS2</i> , <i>PBX1</i> , <i>PDE9A</i> , <i>PRDM9</i> e <i>PRDM15</i>	80
4.4.5. Análise de metilação gene-específica por subtipo de LLA-CPB.....	83
4.4.6. Análise de metilação global.....	101
4.4.7. Associação entre o polimorfismo <i>MTHFR</i> rs1801133 e a metilação global do DNA.....	104

5.DISSCUSSÃO.....	108
6.CONCLUSÕES.....	122
7.REFERÊNCIAS.....	123
ANEXO I.....	137
ANEXO II.....	139
ANEXO III.....	141
ANEXO IV.....	142
ANEXO V.....	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Classificação de risco das LLAs pediátricas.....	3
Tabela 3.1. Descrição das sondas usadas para a técnica de FISH.....	34
Tabela 3.2: Descrição dos genes cujas regiões foram escolhidas para a análise de validação.....	39
Tabela 3.3: Descrição dos <i>primers</i> usados na validação do perfil de metilação.....	40
Tabela 4.1: Características clínico-demográficas dos casos com resultado positivo e negativo no MLPA.....	45
Tabela 4.2: Frequência de ganhos cromossômicos de acordo com as análises de FISH e CNA por microarranjo para os principais cromossomos adicionados nas LLA-CPB_Toc479108920LLA-CPB hiperdiploides.....	58
Tabela 4.3: Frequência absoluta e relativa dos casos de LLA-CPB incluídos nas diferentes abordagens para identificação das alterações em número de cópias.....	60
Tabela 4.4: Genes com lesões recorrentes em LLA que foram encontrados diferencialmente metilados na série de casos, em comparação aos controles.....	67
Tabela 4.5: Classificação dos casos incluídos nas análises de validação do microarranjo.....	74
Tabela 4.6: Características clínico-demográficas dos casos de leucemia linfoblástica aguda incluídos nas análises de metilação, Brasil, 2002-2015.....	76
Tabela 4.7: Classificação dos casos incluídos nas análises de validação externa do microarranjo.....	77
Tabela 4.8: Perfil de metilação dos genes <i>ARID3A</i> , <i>ERG</i> , <i>ETS2</i> e <i>PBX1</i> de acordo com as características clínico-demográficas dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda. Brasil, 2002-2015.....	81
Tabela 4.9: Perfil de metilação dos genes <i>PDE9A</i> , <i>PRDM9</i> e <i>PRDM15</i> de acordo com as características clínico-demográficas dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda. Brasil, 2002-2015.....	82
Tabela 4.10: Mediana da metilação em LINE-1 de acordo com as características clínico e demográficas dos pacientes com leucemias linfoblásticas_Toc479108928104	115
Tabela 4.11: Associação entre o polimorfismo <i>MTHFR</i> rs1801133 e a metilação de DNA no grupo controle.....	105
Tabela 4.12: Associação entre o polimorfismo <i>MTHFR</i> rs1801133 e a metilação de DNA no grupo de casos LLA-CPB.....	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Anormalidades citogenéticas e moleculares em LLA pediátrica.....	2
Figura 1.2: Distribuição dos subgrupos citogenéticos em LLA de acordo com a idade.....	4
Figura 1.3: Modelo da patogênese das LLA-CPB no diagnóstico e recaída.....	5
Figura 1.4: Metabolismo do folato.....	17
Figura 1.5: Ilustração esquemática dos processos envolvidos nos mecanismos de regulação epigenética.....	22
Figura 3.1: Representação esquemática do desenho do estudo.....	29
Figura 3.2: Fluxograma de análise das amostras direcionadas para os diferentes tipos de testes, congelamento e preparo para pesquisas posteriores.....	30
Figura 3.3. Eletroferogramas do MLPA de DNA de sangue de cordão umbilical e placentário (painel superior) comparado com o paciente P4 (painel inferior).....	32
Figura 3.4: Princípio básico da conversão de bissulfito.....	35
Figura 4.1: Dados representativos do MLPA demonstrando a janela do software de análise Gene-Marker 2.2.0.....	43
Figura 4.2: Análise de coeficiente de correlação de Pearson dos dados obtidos pelo SALSA MLPA P327_A1 e P327_B1 probe sets.....	44
Figura 4.3: Agrupamento hierárquico dos pacientes com e sem CNA no cromossomo 21, controles com SD e Hyp+21 (n=68).....	46
Figura 4.4: Subdivisão dos pacientes com CNA no cromossomo 21 de acordo com os resultados do FISH.....	48
Figura 4.5: Pacientes agrupados pela análise de componente principal.....	49
Figura 4.6: Alterações em número de cópias nos casos com ganho no cromossomo 21.....	50
Figura 4.7: Alterações em número de cópias das amostras de remissão em comparação com os controles.....	51
Figura 4.8: Gráfico da análise de CNA por microarranjo demonstrando diferentes ganhos e perdas cromossômicas em três diferentes casos.....	52
Figura 4.9: Gráfico evidenciando alterações complexas da amostra P66.....	53
Figura 4.10: Gráfico de das CNAs da amostra P79 (iAMP21).....	54
Figura 4.11: Sumário das alterações em número de cópias obtidas pelo microarranjo.....	55
Figura 4.12: Sumário dos casos incluídos nas análises de FISH com sondas centroméricas e teloméricas.....	56

Figura 4.13: Comparação do perfil de alterações em número de cópias usando a técnica de microarranjo e FISH com sondas específicas para cada cromossomo.....	57
Figura 4.14: Ilustração do perfil de alterações em número de cópias na série de casos de LLA-CPB.....	59
Figura 4.15: Pacientes agrupados pela análise de componente principal de acordo com a similaridade do perfil de metilação das 10.000 sondas mais variáveis.....	61
Figura 4.16: Agrupamento hierárquico dos casos, controles e amostras de remissão de acordo com os sítios diferencialmente metilados.....	62
Figura 4.17: Agrupamento hierárquico dos controles e amostras de remissão de acordo com os sítios diferencialmente metilados.....	63
Figura 4.18: Distribuição das frequências observada e esperada de sítios diferencialmente metilados.....	65
Figura 4.19: Frequência de hipometilação e hipermetilação dos sítios diferencialmente metilados em ilhas CpG, análises caso-controle e caso-remissão.....	66
Figura 4.20: Via de sinalização de IL7 em linfócitos B destacando os genes com perfis de metilação alterados na série de casos de LLA-CPB.....	72
Figura 4.21: Rede demonstrando a interação de proteínas associadas a LLA-CPB cujos promotores apresentaram alteração no perfil de metilação na série de casos de LLA-CPB.....	73
Figura 4.22: Fluxograma com a descrição das frequências das alterações citogenéticas e moleculares da série de casos incluídos nas análises de validação e metilação.....	75
Figura 4.23: Avaliação por pirosequenciamento do perfil de metilação dos genes <i>ARID3A</i> , <i>ERG</i> , <i>ETS2</i> , <i>PBX1</i> , <i>PDE9A</i> , <i>PRDM9</i> e <i>PRDM15</i> em casos de LLA-CPB_Toc479109020LLA-CPB, controles e amostras de remissão.....	79
Figura 4.24: Gráfico apresentando o perfil de metilação nos casos ETV6-RUNX1+, ETV6-RUNX1-, controles e amostras de remissão para os genes <i>ARID3A</i> (A), <i>ERG</i> (B), <i>ETS2</i> (C), <i>PBX1</i> (D), <i>PDE9A</i> (E), <i>PRDM9</i> (F) e <i>PRDM15</i> (G).....	85
Figura 4.25: Gráfico apresentando o perfil de metilação nos casos <i>TCF3-PBX1+</i> , <i>TCF3-PBX1-</i> , controles e amostras de remissão para os genes <i>ARID3A</i> (A), <i>ERG</i> (B), <i>ETS2</i> (C), <i>PBX1</i> (D), <i>PDE9A</i> (E), <i>PRDM9</i> (F) e <i>PRDM15</i> (G).....	88
Figura 4.26: Gráfico apresentando o perfil de metilação nos casos <i>KMT2A-r</i> , <i>KMT2A-GL</i> , controles e amostras de remissão para os genes <i>ARID3A</i> (A), <i>ERG</i> (B), <i>ETS2</i> (C), <i>PBX1</i> (D), <i>PDE9A</i> (E), <i>PRDM9</i> (F) e <i>PRDM15</i> (G).....	90
Figura 4.27: Gráfico apresentando o perfil de metilação nos casos cariótipo normal+, cariótipo normal-, controles e amostras de remissão para os genes <i>ARID3A</i> (A), <i>ERG</i> (B), <i>ETS2</i> (C), <i>PBX1</i> (D), <i>PDE9A</i> (E), <i>PRDM9</i> (F) e <i>PRDM15</i> (G).....	93
Figura 4.28: Gráfico apresentando o perfil de metilação nos casos Hiperdiplóides+, Hiperdiplóides-, controles e amostras de remissão para os genes <i>ARID3A</i> (A), <i>ERG</i> (B), <i>ETS2</i> (C), <i>PBX1</i> (D), <i>PDE9A</i> (E), <i>PRDM9</i> (F) e <i>PRDM15</i> (G).....	95

Figura 4.29: Curva ROC dos genes diferencialmente metilados nos subtipos de LLA-CPB.....	98
Figura 4.30: Perfil de metilação em LINE-1 nos casos, controles e remissões.....	102
Figura 4.31: Metilação em LINE-1 em controles, remissões e nos diferentes subtipos de LLA-CPB.....	103
Figura 4.32: Metilação no gene <i>PDE9A</i> de acordo com o genótipo do gene <i>MTHFR</i>	106

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
10-formilTHF	10-formiltetrahidrofolato
5-metil THF	5-metiltetrahidrofolato
AcMo	Anticorpos monoclonais
<i>AHCY</i>	S-adenosilhomocisteína hidrolase
<i>AICART</i>	Aminoimidazol-Carboxamida Ribonucleotideo Formiltransferase
<i>AML1</i>	AML1-CBF
APN	Alto peso ao nascer
APS	Adenosina 5' fosfosulfato
<i>ARID3A</i>	<i>AT-rich interaction domain 3A</i>
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i>
BFB	<i>Breakage-fusion-bridge</i>
<i>BHMT</i>	Betaína-homocisteína metiltransferase
CBS	Cistationina beta-sintase
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CF	Citometria de fluxo
C_f	Concentração final
C_i	Concentração inicial
CNA	Alterações em número de cópias
COG	<i>Children's Oncology Group</i>
COMT	Catecol-O-metiltransferases
<i>CTH</i>	Cistationase
D	Dia
<i>DHF</i>	Dihidrofolato
<i>DHFR</i>	Dihidrofolato redutase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>DNMT</i>	DNA metiltransferases
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DRM	Doença residual mínima
DSCR	<i>Down Syndrome critical region</i>
<i>dTMP</i>	Deoxitimidinamonofosfato
<i>dUMP</i>	Deoxiuracilamonofosfato
<i>dUTP</i>	Deoxiuridina monofosfato

EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
<i>ERG</i>	<i>ERG, ETS transcription factor</i>
<i>ETS2</i>	<i>ETS proto-oncogene 2, transcription factor</i>
<i>ETV6</i>	<i>Ets variant gene 6 (TEL oncogene)</i>
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
FPGS	Folilpoliglutamato sintetase
FR	Folato reduzido
FS	Fator de sinergia
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
<i>GART</i>	Fosforibosil glicinamida formiltransferase
GCPII	Carboxypeptidase glutamato
H3K4	Histona 3, lisina 4
H4 folato	Tetrahidrofolato-poliglutamato
HCY	Homocisteína
HeH	Alta hiperdiploidia
<i>HOX</i>	Subgrupo dos genes <i>Homeobox</i>
iAMP21	Amplificação intracromossomal do cromossomo 21
IC	Intervalo de confiança
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
<i>KMT2A</i>	lisina metiltransferase 2A
<i>KMT2A-r</i>	<i>KMT2A</i> rearranjado
<i>KMT2A-GL</i>	Gene <i>KMT2Agermline</i>
LA	Leucemia aguda
LINE-1	<i>Long interspersed nuclear element-1</i>
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLA-c	Leucemia linfoblástica aguda comum
LLA-CPB	Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B
LMA	Leucemia mieloide aguda
<i>MAT</i>	Metionina adenosil transferase
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MO	Medula óssea
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
<i>MTHFD</i>	Metilenotetrahidrofolato desidrogenase
<i>MTHFR</i>	Metilenotetrahidrofolato redutase
<i>MTR</i>	Metionina sintase

<i>MTRR</i>	Metionina sintase redutase
n	Número
<i>NAT2</i>	N-acetiltransferase 2
Ng	Nanograma
<i>NQO1</i>	NAD(P)H:Quinona Oxidoreductase 1
NPB	Pontes nucleoplásmicas
<i>OCM</i>	Metabolismo de um carbono
OR Aj	Razão de chance ajustada
OR	Razão de chance
pb	Pares de base
PCA	Análise de componente principal
<i>PCFT</i>	Transportador de folato próton-acoplado
PCG	Proteínas da família policombe
PcG	Grupo de proteínas policombe
<i>PCMT</i>	L-aspartato O-metiltransferase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	<i>Restricted fragment length polymorphism</i>
<i>PDE9A</i>	Fosfatidilesterase 9A
<i>PON1</i>	Paraoxonase 1
<i>PRDM9</i>	<i>Domínio PR/SET 9</i>
<i>PRDM15</i>	Domínio PR/SET 9
<i>PRMT</i>	Proteína arginina metiltransferase
PTDs	Duplicações parciais em <i>tandem</i>
q.s.p	Quantidade suficiente para
RCA	Região comum de amplificação
RCD	Região comum de deleção
<i>RFC1</i>	Carreador de folato reduzido 1
RNA	Ácido ribonucleico
<i>RNMT</i>	RNA metiltransferases
RT-PCR	Reação de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase
<i>RUX1</i>	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SD	Síndrome de Down

SEC	Super complexo de alongamento
<i>SEPT6</i>	<i>Septin 6 gene</i>
SET	<i>Su(var)3-9 enhancer of zeste trithorax</i>
SG	Sobrevida global
<i>SHMT</i>	Serino-hidroximetiltransferase
SLE	Sobrevida livre de eventos
SMD	Síndrome mielodisplásica
SCUP	Sangue de cordão umbilical e placentário
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SP	Sangue periférico
<i>SULT1A1</i>	<i>Sulfotransferase 1A1</i>
SULTs	Sulfotransferases
t	Tempo
<i>THF</i>	Tetra-hidrofolato
T°C	Temperatura em graus Celsius
<i>Topo-II</i>	<i>Topoisomerase II</i>
TPz	Teste do Pezinho
trxG	Grupo <i>trithorax</i>
TS	Timidilato sintase
<i>txr</i>	Gene <i>trithorax</i>
V	Volume
V _f	Volume final da reação

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DAS LEUCEMIAS

As leucemias constituem o principal tipo de câncer na infância, correspondendo a aproximadamente 30% de todas as malignidades diagnosticadas até os 15 anos de idade e são menos comuns em adultos (PUI *et al.*, 2004; BRANDWEIN, 2011). A incidência no Brasil, de acordo com o registro de câncer de base populacional, varia de 2,2 casos por 100.000 habitantes em Palmas a 8,1 casos por 100.000 habitantes em Cuiabá(DE SOUZA REIS *et al.*, 2011).

Considerando que as neoplasias malignas são mais frequentes na vida adulta, as leucemias pediátricas de modo geral, têm como característica um curto período de latência entre o nascimento e o diagnóstico da doença, o que leva a crer que consiste em uma doença de origem embrionária(GREAVES, M., 2005). Alguns subtipos de leucemia têm alta taxa de sobrevida, o que para casos com bom prognóstico corresponde a uma sobrevida superior a cinco anos em 90% dos indivíduos com leucemia linfoblástica. Mais recentemente, as taxas de sobrevida das leucemias pediátricas em geral vêm aumentando, isto se deve ao desenvolvimento tecnológico aplicado às técnicas diagnósticas com maior conhecimento da heterogeneidade e patogênese da doença, com evidências de drogas alvo-específicas e consequente melhoramento dos protocolos terapêuticos (PUI *et al.*, 2012).

Do ponto de vista clínico, celular e molecular, as Leucemias Agudas (LAs) são heterogêneas, têm como característica o acúmulo de blastos ou células precursoras hematopoiéticas imaturas na medula óssea (MO) e/ou sangue periférico (SP) com proliferação descontrolada, apoptose diminuída, e/ou diferenciação bloqueada. Os mecanismos que induzem as LAs incluem a expressão aberrante de proto-oncogenes e ativação dos fatores de transcrição. As leucemias podem ser de origem linfóide ou mieloide, de acordo com a linhagem que obteve vantagem proliferativa. As leucemias linfoblásticas podem ainda ser divididas em dois grupos, de células B ou T. As leucemias linfoblásticas agudas de células precursoras B (LLA-CPB) são as mais comuns em crianças (PUI; EVANS, 1998) e serão descritas adiante neste capítulo.

As transformações leucêmicas são decorrentes de alterações somáticas em células precursoras hematopoiéticas que resultam no distúrbio do processo de auto renovação celular, bloqueando a diferenciação e promovendo resistência aos sinais de morte (GREAVES, M. F.; WIEMELS, 2003; TAYLOR, G. M. *et al.*, 2003; PUI,

2009). A desregulação no controle do ciclo celular pode ser decorrente de alterações genômicas numéricas ou estruturais (Figura 1.1).

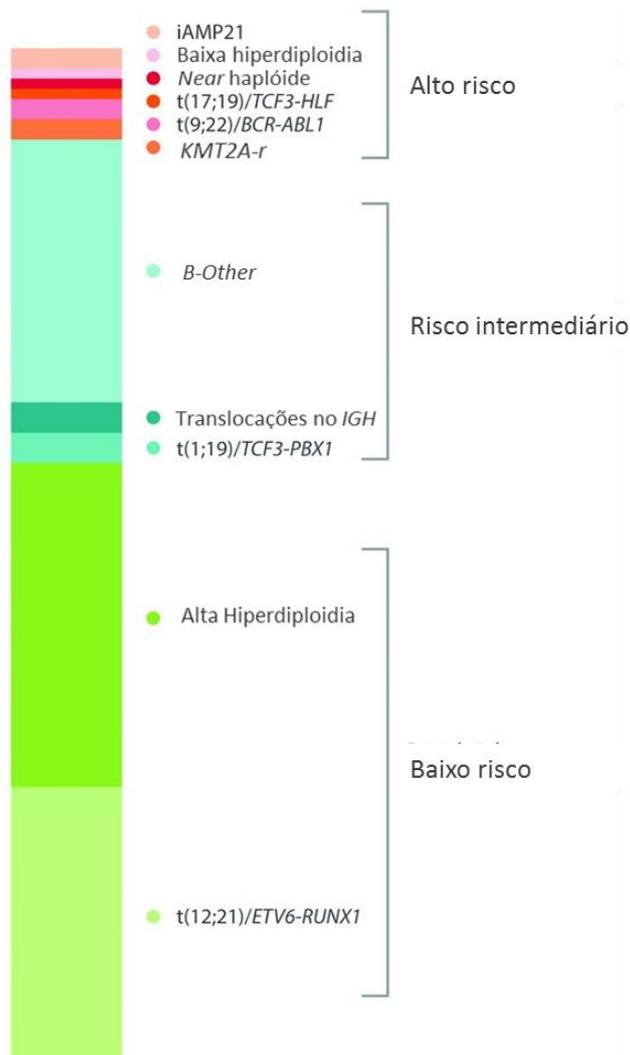


Figura 1.1: Anormalidades citogenéticas e moleculares em LLA pediátrica. As anormalidades citogenéticas e moleculares estão representadas em diferentes cores com suas respectivas frequências e relevância na determinação do risco preditivo. Modificado de Moorman, 2016.

As alterações citogenéticas e genômicas em LLA-CPB incluem: alta hiperdiploidia com ganho de quatro ou mais cromossomos, incluindo o X, 4, 6, 10, 14, 17, 18, e 21, hipodiploidia, com número de cromossomos inferior a 44, t(12;21) (p13;q22), que codificam *ETV6-RUNX1* (*TEL-AML1*); t(1;19)(q23;p13)/*TCF3-PBX1* (*E2A-PBX1*); t(9;22)(q34;q11)/ *BCR-ABL1*; rearranjos do gene *KMT2A*(*KMT2A-r*) localizado na região 11q23 com uma ampla gama de parceiros. Essas alterações são fundamentais na determinação do prognóstico e resposta terapêutica (Tabela 1.1) e

apresentam diferentes frequências de acordo com a idade (Figura 1.2) (MOORMAN, 2016).

Tabela 1.1: Classificação de risco das LLAs pediátricas

Grupo de risco	Critério
Baixo	Idade ≥ 1 e < 10 anos Leucometria $< 50.000/mm^1$ Trissomia do 4, 10 e 17 ou <i>ETV6-RUNX1</i> (+)
Intermediário	Todas as características acima (do baixo risco) exceto trissomia do 4, 10 e 17 ou <i>ETV6-RUNX1</i> (+)
Alto	Qualquer uma das características abaixo: Idade ≥ 10 e < 15 anos Leucometria $\geq 50.000/mm^3$ e $< 100.000/mm^1$ Envolvimento do SNC ² ou testicular LLA-CPB com resposta pobre ao tratamento inicial com corticoides ³ <i>TCF3-PBX1</i> (+) Rearranjo do gene <i>KMT2A</i> DRM (+) ao final da indução ¹ LLA-T com resposta ao tratamento inicial com corticoides
Muito alto	Qualquer uma das características abaixo: Idade ≤ 1 ou ≥ 15 anos Leucometria $\geq 100.000/mm^1$ <i>BCR-ABL1</i> (+) Hipodiplóide com > 45 cromossomos LLA-T com resposta pobre ao tratamento inicial com corticoides Ausência de remissão completa após a primeira indução

¹ A DRM não é mensurada em todos os pacientes, esta é feita pela técnica de RQ-PCR para pacientes com anormalidades genéticas recorrentes.

² Contagem elevada de blastos no líquido cérebro-espinhal (≥ 5 células/?l) e citologia apresentando blastos linfóides são os critérios usados para determinar o envolvimento do SNC.

³ Resposta pobre ao tratamento inicial com corticoides indica contagem de blastos no sangue periférico $\geq 1,000/mm^3$ após 7 dias de tratamento com corticoide.

Abreviações: LLA-CPB, leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B; LLA-T, leucemia linfoblástica aguda de células T; SNC, sistema nervoso central; DRM, doença residual mínima.

Modificado de (LEE *et al.*, 2016).

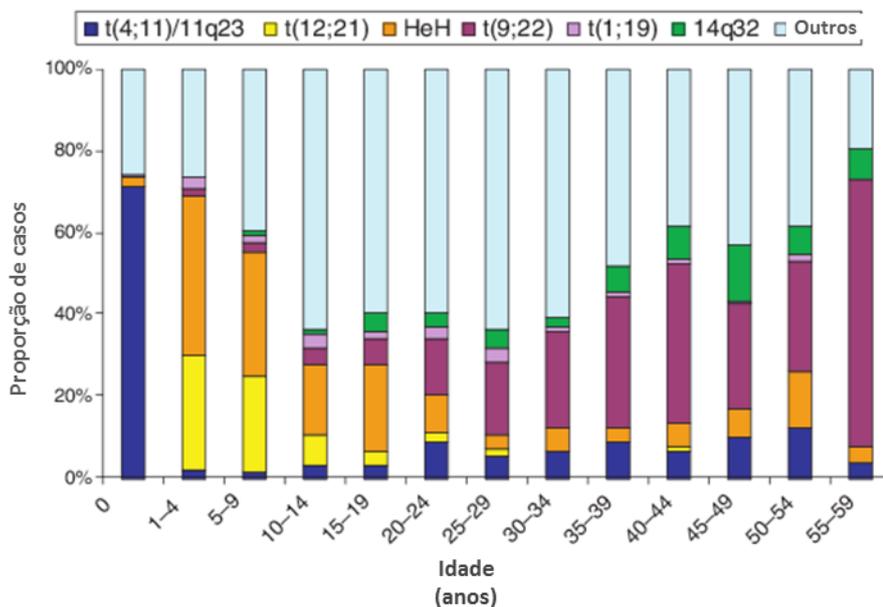


Figura 1.2: Distribuição dos subgrupos citogenéticos em LLA de acordo com a idade. Abreviações: HeH, Alta hiperdiploidia. Figura fornecida por Anthony Moorman. Modificado de HARRISON (2009).

Além das alterações primárias, existem alterações adicionais ou secundárias que cooperam para a expansão do clone leucêmico. Por outro lado, nem sempre essas alterações secundárias são necessárias. Os *KMT2A-r*, por exemplo, são de alta penetrância, de modo que não são necessárias alterações adicionais, e são capazes de conferir o fenótipo leucêmico em um curto período de latência. Por este motivo, esses rearranjos são encontrados em leucemia de lactentes em alta frequência. Em contrapartida, a fusão gênica *ETV6-RUNX1* é de baixa penetrância e necessita de alterações adicionais, sendo comuns em crianças mais velhas (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013).

Atualmente, diversos estudos dão ênfase à presença de subclones, como por exemplo, aqueles com mutações no gene *Ikaros (IKZF1)*, que conferem resistência ao tratamento e aumentam o risco de recaída (Figura 1.3). De modo geral, o clone associado à recaída apresenta as mesmas alterações do clone predominante no momento do diagnóstico, porém, em diversos casos, o clone de recaída é menos frequente ao diagnóstico, ou seja, representa um subclone. Isto sugere que as alterações que tal subclone carrega conferem resistência ao tratamento e, por isso, ele passa a ser o clone dominante no momento da recaída. Além disso, várias alterações encontradas em recaídas são de mau prognóstico, como deleções no *IKZF1* e *CDKN2A/CDKN2B*. Raramente o clone de recaída é completamente diferente do que é observado ao diagnóstico (INABA *et al.*, 2013).

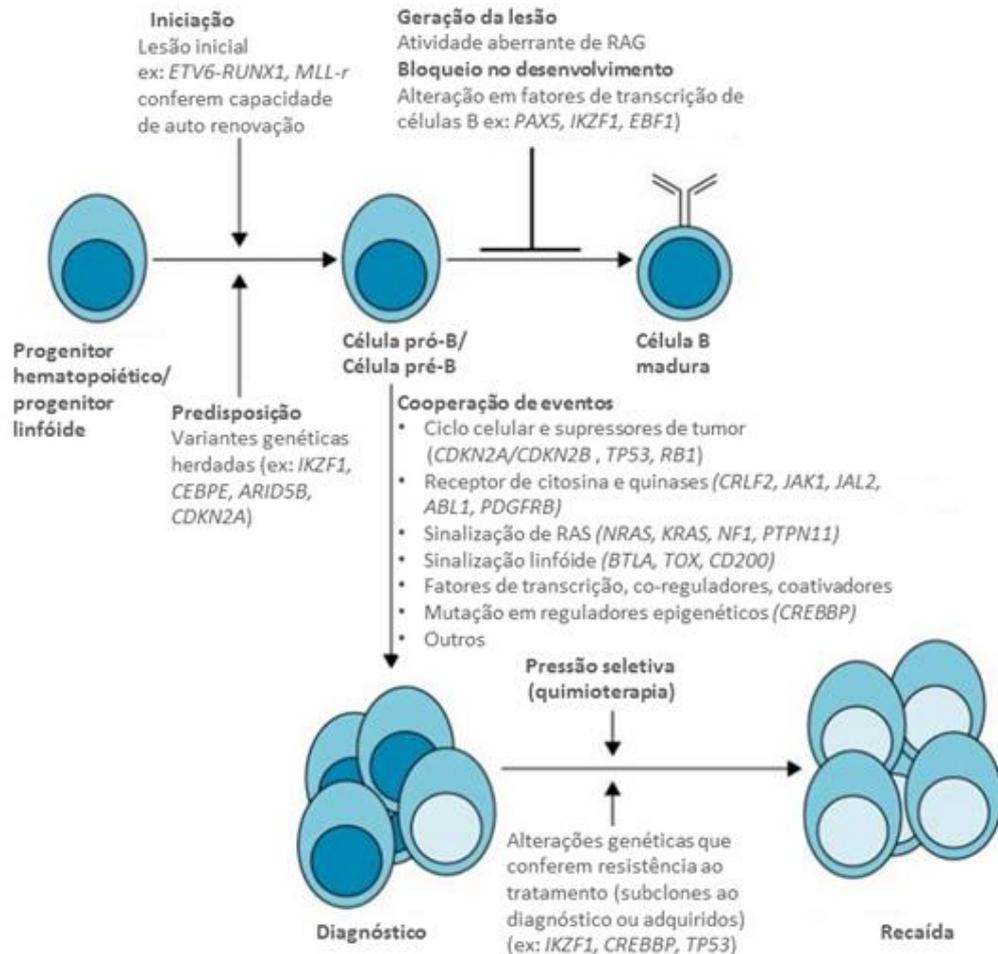


Figura 1.3: Modelo da patogênese das LLA-CPB no diagnóstico e recaída. A figura destaca os eventos iniciadores, eventos que cooperam na ocorrência do fenótipo leucêmico (eventos secundários) e as alterações em subclones que conferem resistência e são encontradas no momento da recaída. Abreviações: RAG, recombinação ativadora de genes. Modificado de INABA et al., (2013).

As alterações somáticas e translocações são bem descritas como elementos fundadores na leucemogênese. Entretanto, só mais recentemente, as alterações epigenéticas vêm ganhando destaque nos estudos de LLA-CPB, uma vez que também contribuem significativamente na regulação do ciclo celular e expansão do clone leucêmico (SCHOLZ; MARSCHALEK, 2012).

Além destes subtipos de LLA-CPB já citados, há também os casos com amplificação intracromossômica do cromossomo 21 (iAMP21), um subgrupo pouco frequente (1,5-2,0% dos casos de LLA-CPB), que, apesar de raro, merece destaque pois está associado a um alto risco de recaída para os pacientes (INABA et al., 2013).

1.2. O PAPEL DO CROMOSSOMO 21 NA DIFERENCIAÇÃO CELULAR E LEUCEMOGÊNESE

Os estudos envolvendo o cromossomo 21 ganharam destaque nos últimos 150 anos, desde quando foi descrita uma cópia adicional de um pequeno cromossomo na síndrome então denominada como “Mongolismo” (NIZETIC; GROET, 2012). A síndrome de Down (SD) consiste na presença de uma cópia extra do cromossomo 21 ou de parte dele a nível constitutivo e representa uma das principais alterações genéticas ao nascimento, com prevalência entre 1 em 1000 e 1100 nascidos vivos no mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (www.who.int). Em estudo de sequenciamento genômico foi observado que o segmento da região 21q22 é relevante no fenótipo da SD, já que contém genes que codificam proteínas importantes para o metabolismo do folato, regiões de ligação de DNA e interação proteína-proteína (HATTORI; FUJIYAMA; SAKAKI, 2001). O sequenciamento do cromossomo 21 identificou 224 genes codificantes neste cromossomo, porém, apenas parte destes genes estão envolvidos nos mecanismos que desencadeiam a SD. Neste aspecto, Arron JR, et al. (2006) defendem a hipótese de que os genes *DSCR1* e *DYRK1A* são responsáveis pela maior parte das manifestações clínicas da SD. Por outro lado, Korbelt et al. (2009) demonstraram que alguns pacientes com SD severa apresentam trissomia em segmentos que não incluem o gene *DSCR1*, indicando que não existe uma única região responsável por todas ou a maioria das características da SD.

A SD está associada com alto risco de desenvolver leucemias na infância, contrastando com a diminuição na chance de desenvolver alguns tumores sólidos. A incidência de leucemia mieloide aguda (LMA) da primeira infância (até 4 anos de idade) é 150 vezes maior em crianças com SD quando comparadas com crianças da mesma faixa etária sem SD, enquanto a incidência de LLA-CPB é 33 vezes maior (ZIPURSKY, 2000).

Pacientes com SD também apresentam uma condição particular, a desordem mieloproliferativa transitória (DMT), comum em pacientes de até três meses de vida, mas que sofre remissão espontânea na maioria dos casos. A alta prevalência de leucemias e DMT em pacientes com SD evidenciam a relevância de genes presentes no cromossomo 21 na leucemogênese, no entanto, a trissomia do 21 por si só não é capaz de explicar a alta frequência de LMA nas crianças com SD. Como destaque, mutações adquiridas no domínio de ativação N-terminal do fator de transcrição de megacariócitos, *GATA1*, localizado no cromossomo X, levam à expressão da isoforma *GATA1s*, resultando na tradução de uma proteína truncada, que afeta progenitores

hematopoiéticos e bloqueiam a maturação dos eritro-megacariócitos. Estas mutações são encontradas em quase um terço dos casos de SD. Já foram reportados casos de DMT em pacientes não-SD. Nesses casos, foram identificadas trissomia do 21 e *GATA1* mutado no clone leucêmico (WECHSLER *et al.*, 2002; XU, G. *et al.*, 2003; VYAS; CRISPINO, 2007; CHOU *et al.*, 2008).

Um estudo recente com camundongos duplo transgênicos expressando *ERG* e *GATA1s* demonstrou que, de modo semelhante ao que ocorre na SD, a superexpressão de *ERG* por si só é suficiente para induzir megacariopoiese e expansão de progenitores megacariocíticos e de células eritróides (PME), de modo semelhante ao que ocorre na SD. A expressão de *GATA1s* em sinergismo com *ERG* favorece a expansão de PMEs, resultando em fibrose hepática, trombocitose pós-natal e anemia. Este é um perfil de expressão gênica semelhante ao descrito nas DMT humanas do neonato (≤ 3 meses) e progressão para progenitores mielóides aos 3 meses de idade. Esse modelo transgênico *ERG/GATA1s* também demonstrou o papel fundamental da região N-terminal de *GATA1* na eritropoiese e o papel antagonista de *ERG* na diferenciação eritróide fetal e sobrevivência (BIRGER *et al.*, 2013).

Outro gene de grande importância para a hematopoese também localizado no cromossomo 21 (21q22) é o *RUNX1* (*runt related transcription factor 1*). Este gene é necessário para o desenvolvimento normal de todas as linhagens hematopoiéticas e alterações em sua função levam a profundas desordens deste processo (MICHAUD; SCOTT; ESCHER, 2003; ESCHER *et al.*, 2004).

A fusão gênica t(8;21)(q22;q22) foi a primeira translocação descrita envolvendo o cromossomo 21 em 1973 por Rowley. Esta ocorre em LMA e tem como consequência o rearranjo entre os genes anteriormente chamados *AML1* e *ETO*, atualmente *RUNX1* e *RUNX1T1* (ROWLEY, 1973). A proteína *RUNX1-RUNX1T1* resultante desta translocação bloqueia a diferenciação de progenitores mielóides e promove a ocorrência da leucemia. *RUNX1* regula negativamente a transcrição do DNA ribossomal, enquanto *RUNX1-RUNX1T1* exerce o efeito oposto, ou seja, é um regulador positivo. Esta fusão gênica é encontrada em 30-40% das LMAs subtipo M2, de acordo com a classificação do grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) e está associada com prognóstico favorável (BAKSHI *et al.*, 2008).

Além da fusão *RUNX1-RUNX1T1* em LMA, a fusão t(12;21)(p13;q22)/ *ETV6-RUNX1* e hiperdiploidia são as anormalidades citogenéticas mais comuns nas LLA-CPBs, enquanto são raras em leucemias com SD (FORESTIER *et al.*, 2008; BUITENKAMP *et al.*, 2014). Até 60% das LLAs-SD apresentam expressão aberrante

do receptor de citocina CRLF2, que está associado com as mutações adicionais de ativação na via de JAK-STAT (BERCOVICH *et al.*, 2008; MULLIGHAN *et al.*, 2009). A expressão aberrante do receptor CRLF2 é causada por rearranjos gênicos, tanto na região de controle de IgH quanto em micro deleções *upstream* no gene *CRFL2*. Essa deleção provoca a fusão de *CRLF2* com o promotor *upstream* do gene *P2RY8*, expresso constitutivamente. Análises de ponto de quebra sugerem que esse rearranjo é mediado por RAG1 ou RAG2 em LLA-CPB (BERCOVICH *et al.*, 2008; MULLIGHAN *et al.*, 2009).

1.2. ALTERAÇÕES ENVOLVENDO O CROMOSSOMO 21 EM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA PEDIÁTRICA

Conforme mencionado no tópico anterior, o cromossomo 21 é o alvo mais importante de alterações nas LLAs pediátricas, sofrendo tanto alterações numéricas quanto estruturais ao longo de toda a sua extensão no cromossomo. Alta hiperdiploidia e a fusão gênica *ETV6-RUNX1* correspondem a aproximadamente 50% dos casos de LLA-CPB em crianças. Ambas as alterações recorrentes são de bom prognóstico e apresentam evidências de origem intrauterina (MOORMAN, 2016).

A fusão *ETV6-RUNX1* resulta da translocação entre os cromossomos 12 e 21, consiste em uma translocação críptica e recíproca e não pode ser identificada através do bandeamento G (ROMANA *et al.*, 1995). Já a alta hiperdiploidia é caracterizada por ganho modal dos cromossomos X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 e 21, sendo que o perfil de alterações numéricas é heterogêneo entre os pacientes (HEEREMA *et al.*, 2000; HARRISON *et al.*, 2003). Apesar da heterogeneidade dos ganhos cromossômicos, a distribuição entre eles não é aleatória, ou seja, existem cromossomos que são adicionados em maior frequência que outros. Por exemplo, de acordo com Heerema *et al.*, (2007), aproximadamente 96% das LLAs hiperdiplóides (51-60 cromossomos) apresentam ganho do cromossomo 21 (+21). A razão biológica para a diferente frequência de ganhos cromossômicos nas LLA-CPB altamente hiperdiplóides ainda não é clara (HEEREMA *et al.*, 2007). No entanto, é questionado o porquê da alta frequência do ganho do cromossomo 21 em 30% das LLA-CPB, que corresponde aos casos altamente hiperdiplóides, bem como, o acometimento de genes localizados no cromossomo 21 em outros subtipos de LLA, apontando para a relevância dos mesmos nos mecanismos de patogênese das leucemias agudas (CHOU *et al.*, 2008; VYAS; CRISPINO, 2007; WECHSLER *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2003).

Além das alterações recorrentes no cromossomo 21 já citadas que conferem bom prognóstico, existe um outro subgrupo menos frequente com relevância clínica que compreende as LLA-CPB com iAMP21. Este subgrupo de LLA foi descrito e sua importância deve-se às fortes associações com prognóstico adverso (HAREWOOD *et al.*, 2003; HARRISON, 2015b). Por definição convencional a partir da aplicação da técnica de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*), a iAMP21 é identificada a partir da presença de três ou mais cópias adicionais do gene *RUNX1* em núcleos interfásicos. Até recentemente, esta técnica vem sendo considerada como o método padrão-ouro para identificação da iAMP21. No entanto, as novas técnicas genômicas como, *single nucleotide polymorphism (SNP) array-based Comparative Genomic Hybridization (SNP array)* ou outros microarranjos usados para alterações em número de cópias (CNA) de DNA também são utilizados (RAND *et al.*, 2011), porém, este conceito baseado apenas no FISH necessita ser revisitado.

Em se tratando de epidemiologia clínica, LLA-CPB com iAMP21 é mais frequente em crianças com média de idade de 9 anos, está associada com contagem leucocitária inferior a 50.000 células/mL ao diagnóstico. Os resultados de vários estudos indicaram uma sobrevida significativamente inferior nestes pacientes quando tratados no grupo de risco padrão em comparação com os demais subtipos de LLA-CPB e o alto risco de recaída está associado à doença residual mínima (DRM) positiva no D30 (ROBINSON *et al.*, 2003a; MOORMAN *et al.*, 2007; ATTARBASCHI *et al.*, 2008; HEEREMA *et al.*, 2013; HAAS; *et al.*, 2014). Dentre diversos protocolos, os resultados dos protocolos ingleses (*The United Kingdom ALL 97/99 trial*) demonstraram que 28 pacientes com LLA-CPB com iAMP21 apresentaram sobrevida livre de eventos (SLE) de 26%, e sobrevida global (SG) de 69% em cinco anos, ou seja, apresentaram altos índices de recaída (MOORMAN *et al.*, 2007; ATTARBASCHI *et al.*, 2008). O grupo do protocolo *The Austrian and German ALL Berlin-Frankfurt-Munster (ALL-BFM) 86, 90, 95, and 2000 trials* demonstrou praticamente os mesmos índices de SLE e SG (MOORMAN *et al.*, 2007; ATTARBASCHI *et al.*, 2008; HARRISON, 2009). Os pacientes de LLA-CPB com iAMP21 apresentam menores taxas de recaída no protocolo do grupo *International studies of Berlin-Frankfurt-Munster (I-BFM)* quando comparado ao protocolo Inglês, fato que pode ser resultado da terapia de indução e reintensificação precoce mais intensivas neste protocolo (ATTARBASCHI *et al.*, 2008). Do ponto de vista dos mecanismos de patogênese, a iAMP21 ainda é alvo de várias pesquisas no contexto celular e genômico. Alterações adicionais nos genes *IKZF1* (22%), *CDKN2A/B* (17%), *PAX5* (8%), *ETV6* (19%) e *RB1*

(37%) foram encontradas em LLA com iAMP21, porém, a investigação da arquitetura clonal forneceu a evidência de que essas anormalidades, assim como *P2RY8-CRLF2*, foram secundárias à iAMP21 (RAND *et al.*, 2011).

Através da análise genômica *Array-based Comparative Genomic Hybridization* (aCGH) foi demonstrada a presença de uma região comum de amplificação (RCA) ao longo do cromossomo 21 e uma região comum de deleção (RCD) na região telomérica, as quais compreendem 6 MB e 9 MB, respectivamente (principalmente no braço longo do cromossomo 21). A RCA se encontra amplificada em todos os pacientes com iAMP21, enquanto que a RCD foi detectada em 88% dos casos (RAND *et al.*, 2011). Na RCA foram encontrados 47 genes que codificam proteínas, incluindo o gene *RUNX1* e genes localizados na *Down Syndrome critical region* (DSCR), além de 20 pseudogenes, 18 RNAs não-codificantes e um único microRNA (miRNA), o miR-802. Adicionalmente, 66% dos genes localizados na RCA foram identificados como superexpressos (STREFFORD *et al.*, 2006). Entre eles encontram-se *IFNGR2*, *GART*, *SON*, *DSCR1*, *RUNX1*, *DYRK1A*, *ERG* e *ETS2*, cujas funções são importantes na patogênese e na resposta terapêutica de outros subtipos de LAs. No entanto, as funções interativas desses genes na LLA-CPB com iAMP21 ainda são alvo de pesquisas (ZAZA *et al.*, 2004; GE *et al.*, 2008; KIM, D. H. *et al.*, 2010; BIRGER; IZRAELI, 2012; AHN *et al.*, 2013; CHEN, D. W. *et al.*, 2013).

Recentemente, Li *et al.* (2014) descreveram um modelo evolutivo nas LLA-CPB com iAMP21 que pode ser sumarizado da seguinte forma: o processo chamado *breakage-fusion-bridge* (BFB) é iniciado a partir de uma quebra na dupla fita de DNA na região telomérica, que conseqüentemente fica desprotegida. No final da fase S, as regiões teloméricas duplicadas são fundidas por um processo de reparo de DNA chamado *non-homologous end joining*. Isto cria um cromossomo dicêntrico em que os dois centrômeros são puxados para polos opostos durante a mitose, formando uma ponte de anáfase. Com a citocinese, as pontes quebram, e o processo pode se repetir no próximo ciclo celular (LI *et al.*, 2014). Devido a esse processo de BFB, um outro processo chamado *chromotripsis* pode ocorrer. Durante um evento catastrófico, regiões cromossômicas são fragmentadas e, independente das localizações iniciais, os mecanismos de reparo de DNA ligam alguns fragmentos, enquanto outros podem ser perdidos. Conseqüentemente, o *chromotripsis* leva a um grande número de rearranjos genômicos. Esse conjunto de alterações combinadas possibilita a ocorrência de muitas perdas e ganhos de material genético, como é visto nos casos com iAMP21 (LI *et al.*, 2014).

Os ciclos de BFB contribuem para deleções, ampliações gênicas e translocações não recíprocas. Neste contexto, a deficiência de folato, um dos principais intermediários para a síntese do doador de grupamentos metil S-adenosil metionina (SAM), induz formação de pontes nucleoplásmicas (NPB), enquanto a perda de metilação do DNA resulta em aumento da recombinação telomérica. Portanto, se faz necessário investigar se as NPBs são induzidas por reparo errôneo de quebras na dupla fita de DNA ou pela disfunção de telômeros, que podem causar amplificação de sequência e fusões teloméricas (MOORES; FENECH; O'CALLAGHAN, 2011).

1.3. ETIOLOGIA DAS LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS

Os estudos epidemiológicos que buscam compreender os fatores etiológicos das leucemias pediátricas são consensuais no que se refere à complexidade das vias de patogênese. As LLAs de modo geral apresentam origem multifatorial resultante da combinação entre susceptibilidade genética e exposição ambiental (GREAVES, M. F., 1999). Os fatores genéticos correspondem a apenas 5% dos casos, sendo as demais relações causais atribuídas aos fatores ambientais que interagem com as características genéticas de cada indivíduo (suscetibilidade), podendo modular o risco para o surgimento de neoplasias (PERERA, 1997).

Antes de falar dos fatores de risco para as leucemias pediátricas, se faz necessário pensar no momento no qual elas têm origem. Existem fortes evidências de que a maior parte das leucemias pediátricas têm origem intrauterina. Inicialmente, diversos estudos demonstraram alta concordância entre leucemias de gêmeos (FORD *et al.*, 1997; FORD *et al.*, 1998; WIEMELS *et al.*, 1999; KEMPSKI *et al.*, 2003; MAIA *et al.*, 2003; TEUFFEL *et al.*, 2004), apontando para uma origem clonal comum durante a vida intraútero. Além disso, dentre outros estudos citados anteriormente, Greaves *et al.* demonstraram que o período de latência varia entre os gêmeos, sendo que nos casos com *KMT2A-r* o período de latência é mais curto e as leucemias ocorrem quase que simultaneamente.

Mais recentemente, Gruhn *et al.* (2008) demonstraram a origem intrauterina de LLA-CPB a partir de material coletado no teste do pezinho. Este estudo buscou rearranjos na cadeia pesada de imunoglobulina que são específicos para LLA-CPB, encontrando uma frequência de 59% de casos com alterações presentes já no momento do nascimento.

Para reforçar mais ainda esta hipótese, foi realizado um grande estudo na Inglaterra, em que foi observada em amostras de sangue de cordão umbilical a presença da fusão gênica *ETV6-RUNX1* em 1% dos nascidos vivos. O achado aponta para a origem da fusão ainda durante a vida intrauterina, mas um fato permaneceu intrigante, a frequência de recém-nascidos com a fusão gênica *ETV6-RUNX1* era muito maior que a incidência cumulativa da fusão *ETV6-RUNX1* em LLA (1/10.000), ou seja, apenas 1 em 100 recém-nascidos com *ETV6-RUNX1* desenvolveria leucemia. Desse modo, foi possível concluir que eram necessários eventos adicionais para a ocorrência do fenótipo leucêmico (MORI *et al.*, 2002).

Até aqui é possível entender que a maior parte das leucemias pediátricas 1) apresentam origem intrauterina, 2) necessitam de eventos adicionais para a ocorrência da doença. As leucemias obedecem a um modelo de carcinogênese semelhante ao descrito por Knudson em 1971, no qual ocorrem dois *hits*, sendo um primeiro evento durante a vida intrauterina e um segundo evento pós-natal (KNUDSON, 1971). Os fatores que desencadeiam estes *hits* ainda não são completamente esclarecidos, porém, estudos epidemiológicos sugerem alguns mecanismos que apresentam associação causal com as leucemias pediátricas, sendo que a exposição aos fatores de risco pode ocorrer indiretamente, a partir da exposição materna no período gestacional, e/ou diretamente durante a infância.

1.3.1. Fatores ambientais

Dentre os estudos epidemiológicos observacionais de associação causal com leucemias pediátricas, o fator de risco mais consistente, além da exposição à radiação na vida intrauterina, é o alto peso ao nascer (APN). A razão pela qual o APN está associado ao risco para alguns tipos de câncer permanece desconhecida (KOIFMAN; POMBO-DE-OLIVEIRA, 2008). A plausibilidade biológica e a hipótese mais provável é de que a alta expressão de *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) pode estimular a proliferação celular e a leucemia. Por outro lado, células pré-leucêmicas podem produzir IGF-1 e provocar o APN (ROSS, 2012). Além disso, a idade materna avançada aumenta moderadamente o risco dos cânceres infantis mais frequentes, enquanto etilismo e tabagismo podem ser levados em consideração como fatores de risco para leucemia pediátrica, apesar de estudos apresentam resultados contraditórios (JOHNSON *et al.*, 2009) Outro fator de risco é a exposição a pesticidas (PYATT; HAYS, 2010; METAYER *et al.*, 2011); (ROSS *et al.*, 1994; GREAVES, M. F., 1997; MEINERT *et al.*, 2000; INFANTE-RIVARD; WEICHENTHAL, 2007; METAYER; BUFFLER, 2008; TURNER; WIGLE; KREWSKI, 2010; VAN MAELE-FABRY *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2012; SEILER, 2012) e a exposição a hormônios (POMBO-DE-OLIVEIRA; KOIFMAN, 2006);(GLASS *et al.*, 2012). além da exposição a infecções. Neste último, os coadjuvantes são a hiperhigienização e a formação da resposta imune (WIEMELS, 2012). Entretanto, a maior parte desses estudos tem as limitações próprias de estudos retrospectivos.

Em se tratando de exposição a agentes químicos, alguns tipos de exposição estão diretamente associados com marcadores moleculares específicos para

determinados tipos de leucemias. Por exemplo, a exposição ao benzeno e seus derivados está associada com LMA, enquanto agentes inibidores de topoisomerase II (*Topoll*) estão associados com LAs e *KMT2A-r* (COGLIANO; BAAN; STRAIF, 2011). As evidências epidemiológicas vêm sendo confirmadas em estudos consecutivos tanto com leucemias secundárias a tratamentos quimioterápicos com etoposídeos, como em leucemias *de novo*. Recentemente, foi encontrada associação entre a ingestão de alimentos ricos em flavonóides e a ocorrência de leucemias com *KMT2A-r* (VANHEES *et al.*, 2011). Os flavonóides e etoposídeos são potenciais inibidores de *Topoll*, enzima cuja principal função é se ligar a sítios específicos na dupla-fita de DNA para a quebra transitória e religação dos fragmentos de DNA gerados durante a replicação. Desta forma, a inibição na ação da *Topoll* desempenha um papel crucial na replicação do DNA e parece ser importante também na leucemogênese (SKIBOLA; SMITH, 2000). Neste mesmo sentido, foi encontrada associação entre a exposição a tintas no período gestacional e aumento no risco para a fusão gênica *ETV6-RUNX1* (SCÉLO *et al.*, 2009).

Os estudos epidemiológicos por vezes apresentam resultados discordantes que, embora sejam avaliados do ponto de vista metodológico, podem ser indicativos de que a relação entre a exposição a elementos químicos e biológicos seja modulada por susceptibilidade genética. Por exemplo, polimorfismos em genes que participam do metabolismo de xenobióticos em interação com a exposição modulam o risco conferido pelos agentes químicos (URAYAMA *et al.*, 2013). Genes envolvidos no metabolismo do folato constituem um outro exemplo, tendo sido descritos como uma peça importante na patogênese (WIEMELS *et al.*, 2001) e na reposta terapêutica das leucemias agudas (DE JONGE *et al.*, 2009; ONGARO *et al.*, 2009).

1.4. IMPLICAÇÕES DA CARÊNCIA DE FOLATOS NA LEUCEMOGÊNESE

1.4.1. Metabolismo do ácido fólico

Em geral, o termo folato se refere ao ácido fólico e demais derivados que compõem o complexo vitamínico B. O ácido pteroilmonoglutâmico é a forma sintética do folato, utilizada como suplemento nutricional. O folato ingerido na alimentação (natural, exógeno), principalmente sob a forma de poliglutamato, quando em concentrações fisiológicas, é absorvido principalmente no primeiro terço do intestino delgado por processo ativo saturável dependente de pH (inferior a 6,3) e de sódio. Além disso, a absorção também ocorre ao longo de todo o intestino delgado, sendo que apenas os monoglutamatos são absorvidos no intestino delgado (tá repetido intestino delgado). O folato é absorvido como monoglutamil folato, após a remoção da cadeia de poliglutamil pela γ -glutamil hidrolase (HALSTED, 1989).

O folato sob a forma de poliglutamato é metabolizado a monoglutamato pela enzima folil conjugase do pâncreas e conjugase na mucosa da parede intestinal. Os monoglutamatos são absorvidos nas células da mucosa por difusão passiva e transporte ativo por transportadores de folato próton-acoplados (*PCFT*). Além disso, o ácido fólico é absorvido como tal via *PCFT*. Nas células da mucosa, o folato monoglutamato absorvido é, eventualmente, convertido para 5-metiltetrahydrofolato pelas enzimas *OCM* (metabolismo de um carbono), e o ácido fólico é também convertido à 5-metilTHF após duas etapas de redução para dihydrofolato (*DHF*) e subsequentemente tetrahydrofolato (*THF*) pela dihydrofolato redutase (*DHFR*). A difusão passiva através da membrana celular é limitada e ocorre apenas nas altas doses.

O folato circulante, principalmente como metil-THF, em sua maioria é transportado ligado a proteínas de baixa afinidade, como albumina, globulina e hemoglobina, e apenas uma pequena parte do folato plasmático está ligado à proteína ligante específica de alta afinidade (*folate binding proteins*, *FBPs*). O folato está presente no plasma em três frações: o folato livre e os ligados aos transportadores de baixa e de alta afinidade, que são responsáveis pelo transporte do folato para as células da MO, reticulócitos, fígado, fluido cérebro-espinhal e células tubulares renais. O 5-metilTHF transportado na circulação entra na célula via carreador de folato reduzido (*RFC*) ou receptor de folato (*FR*) e se incorpora nas *OCMs*. A enzima metileno tetra-hydrofolato redutase (*MTHFR*) é uma peça fundamental no metabolismo de folato, pois catalisa a produção de 5,10-MTHF em 5-metiltetra-hydrofolato (5-

MTHF), o principal doador de grupamentos metil para o metabolismo de homocisteína em metionina (SELHUB; MILLER, 1992). A *MTHFR* é inibida alostericamente pela AdoMet (S-adenosilmetionina); dessa forma, altos níveis de metionina previnem a formação de 5-MTHF e, indiretamente, a síntese de metionina a partir da homocisteína (BYDLOWSKI; MAGNANELLI; CHAMONE DDE, 1998). A serino hidroximetittransferase 1 (*SHMT1*), enzima citosólica dependente de vitamina B6, é codificada pelos genes *SHMT1* e *SHMT2*. Essa enzima contribui para a compartimentalização do metabolismo de carbono entre o citoplasma, mitocôndria e núcleo (CHRISTENSEN; MACKENZIE, 2006). Ela catalisa a transferência reversível de um carbono da serina para THF, para em seguida formar a 5,10-metilenoTHF e glicina usando o piridoxal 5'-fosfato (*PLP*; derivado da vitamina B6) como um cofator (GARROW *et al.*, 1993); a forma 5,10 metilenoTHF é reduzida para 5-metilTHF pela metilenotetra-hidrofolato redutase (*MTHFR*). Após metabolizado, o folato segue para ser armazenado e reutilizado.

O local de armazenamento de folato é o fígado, o sítio regulatório do folato, onde 90% deste é reabsorvido nas células epiteliais do túbulo proximal e os 10% restantes são excretados pela urina. A circulação enterohepática é encarregada de reabsorver e reutilizar esses folatos, sendo este processo fisiológico responsável pela manutenção dos níveis de folato mesmo quando ele não está sendo ingerido. A manutenção do nível sérico de folato é essencial, pois a redução de tais níveis pode interferir no fornecimento do mesmo para a MO e outros tecidos que necessitam de grande aporte de folato. Vale ressaltar que o folato não é estocado em grandes quantidades, sendo assim, caso o consumo seja interrompido, haverá carência em poucas semanas (MEDICI; HALSTED, 2013). O folato apresenta importância crítica no metabolismo da metionina, aminoácido essencial. Além disso, AdoMet é o maior doador de grupamentos metil para as reações de metilação, incluindo a metilação do DNA (ROBERTSON, 2005; DOLINOY; JIRTLE, 2008) (Figura 1.4).

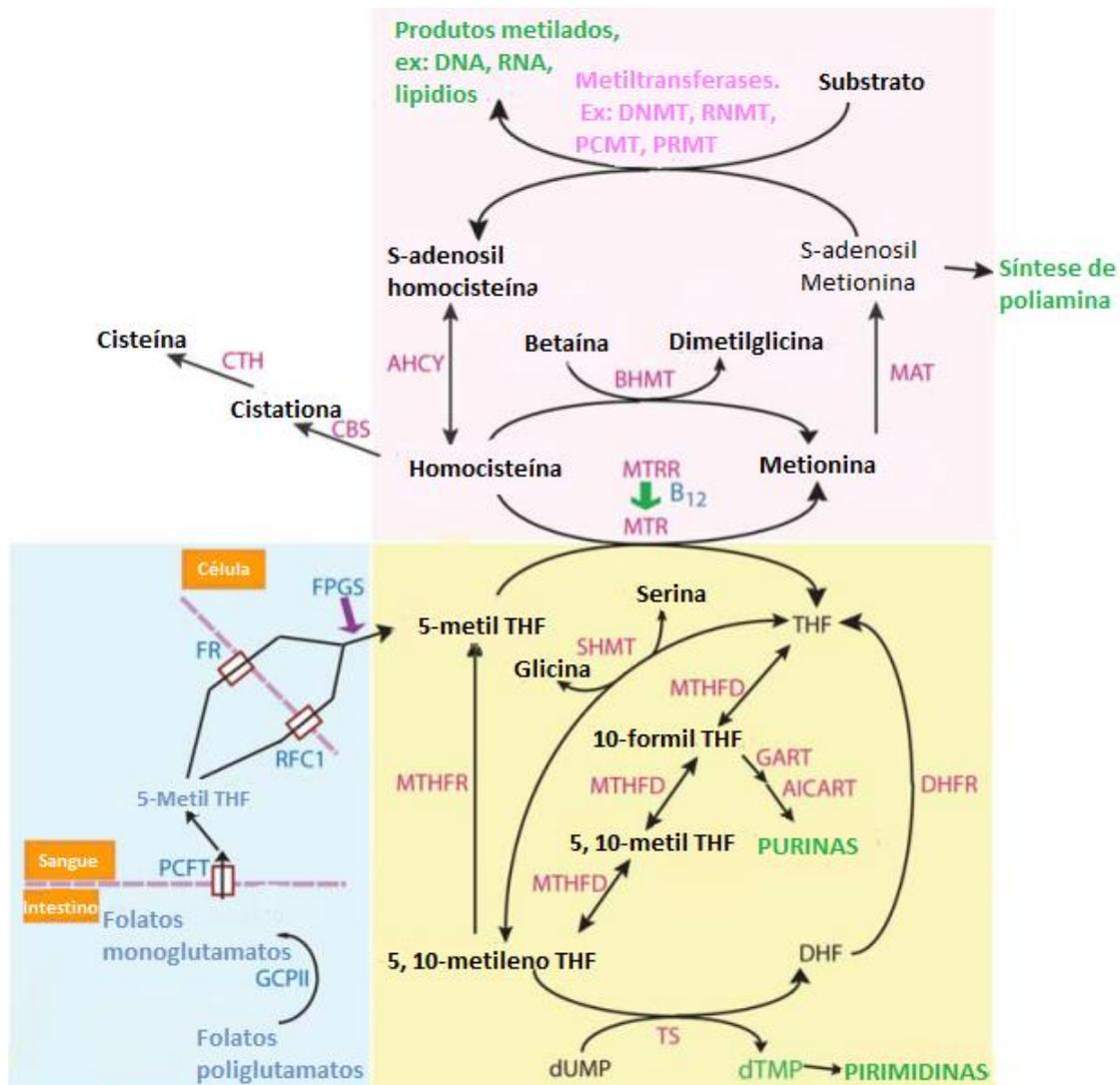


Figura 1.4: Metabolismo do folato.

Em azul, estão destacadas as enzimas envolvidas no processamento do folato no trato digestivo, transporte e retenção celular (pela adição de glutamatos). Em amarelo, está destacada a maior parte do ciclo envolvendo a transferência de um grupo carbono necessário para a síntese de purinas e pirimidinas. Em rosa, estão destacadas as reações de metilação. Abreviações: *GCP II*, Carboxipeptidase glutamato; *PCFT*, transportador de folato próton-acoplado; THF, tetrahydrofolato; *RFC1*, carreador de folato reduzido 1; FR, folato reduzido; *FPGS*, folilpoliglutamato sintetase; *MTHFR*, metileno tetrahydrofolato redutase; *SHMT*, serinohidroxi metiltransferase; *MTHFD*, metileno tetrahydrofolato desidrogenase; *GART*, fosforibosil glicinamida formiltransferase, *AICART*, aminoimidazol-carboxamida ribonucleotídeo formyltransferase; *DHFR*, dihydrofolato redutase; *DHF*, dihydrofolato; *dUMP*, deoxiuracilamono fosfato; *dTMP*, deoxitimidinamono fosfato; *TS*, timidilato sintase; *MTR*, metionina sintase, *MTRR*, metionina sintase redutase; *BHMT*, betaina-homocisteína metiltransferase; *MAT*, metionina adenosil transferase; *DNMT*, DNA metiltransferases; RNA metiltransferases; *PCMT*, L-aspartato O-metiltransferase; *PRMT*, proteína arginina metiltransferase; *AHCY*, S-adenosilhomocisteína hidrolase; *CBS*, cistationina beta-sintase; *CTH*, cistationase. Na biossíntese do DNA, 5,10 metileno THF é usado como doador de grupo metil para a metilação e conversão da deoxiuridina mono fosfato (dUMP) em deoxitimidina mono fosfato (dTMP). Metileno tetrahydrofolato desidrogenase (*MTHFD*) converte 5,10 metileno THF em 10-formil tetrahydrofolato (10-formil THF), que é necessária para a síntese de purinas (IKEDA, KOYAMA *et al.* 2012). Adicionalmente, 5-metil tetrahydrofolato (5-metil THF) fornece um grupamento metil para a vitamina B12, que transfere este para a homocisteína, evitando o acúmulo de homocisteína celular e mantendo a síntese de aminoácidos (OHRVIK, BUTTNER *et al.* 2010). A demetilação do 5-metil THF a THF é catalisada pela – metionina sintase (*MTR*), tendo como cofator a vitamina B12. Nesta reação, o grupo metil do 5-metil THF, é usado para metilar a homocisteína, que liga o ciclo do folato com o ciclo da metionina (PIETRZIK, BAILEY *et al.* 2010). Modificado de GREENE, STANIER, COPP (2009).

1.6.2. Implicações biológicas da carência de folato

A fortificação com ácido fólico previne má formação congênita, defeitos no fechamento do tubo neural e diversos tipos de câncer (DUNLAP *et al.*, 2011). No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, Resolução RDC nº 344, Dec 13-2002; <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/>), regulamentou a adição de 100 microgramas de ácido fólico para cada 100 gramas de farinha de trigo e milho partir de maio de 2002. Os Estados Unidos tomaram a mesma medida bem antes, em 1996. No ano de 2008, 67 países tinham como mandatória a fortificação de ácido fólico na farinha de trigo (BELL; OAKLEY, 2009).

A deficiência na ingestão de doadores de grupamento metil como colina, folato, metionina e vitamina B12, está associada com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Dietas deficientes em diferentes combinações de intermediários do metabolismo do folato induzem hipometilação genômica e em proto-oncogenes (*MYC*, *FOS*, *HRAS*), elevados níveis de expressão de alguns mRNAs, e hipometilação sítio-específica no gene *TP53* no fígado de ratos. Deficiências em doadores de grupamento metil também têm como consequência a superexpressão de *DNMTs* (DNA metiltransferases) (KIM, 1999). Outra consequência não menos importante da deficiência de folato, de modo geral, é dano ao DNA. Segundo Giovannucci, a deficiência promove aumento de 30% em quebras na dupla-fita de DNA (GIOVANNUCCI *et al.*, 1998).

Além de variações da dieta, os níveis de folato também podem variar de acordo com as características genéticas de cada indivíduo (MOYERS; BAILEY, 2001). Fatores genéticos que conhecidamente modificam os níveis de ácido fólico são os polimorfismos em genes que participam do metabolismo do folato.

1.5. POLIMORFISMOS EM GENES DA VIA DO FOLATO NA SUSCEPTIBILIDADE PARA LEUCEMIAS

Fatores de susceptibilidade genética são importantes como moduladores de risco na leucemogênese. Neste contexto, podem ser destacados os polimorfismos genéticos. Os polimorfismos podem modificar a susceptibilidade de desenvolvimento de tumores, mas são considerados de baixa penetrância. As principais abordagens de associação causal em câncer dizem respeito a polimorfismos de genes envolvidos

no metabolismo de xenobióticos (ex., *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *NQO1*), genes envolvidos no reparo de DNA (ex., *XRCC1*, *ERCC2*, *ATM*), genes envolvidos na regulação do ciclo celular (ex., *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *TGFB1*) e genes envolvidos no metabolismo do ácido fólico (ex., *MTHFR*, *MTRR*, *SHMT1*, *RFC1*) (SHERBORNE *et al.*, 2010; URAYAMA *et al.*, 2013).

Os polimorfismos *MTHFR* rs1801133(677C>T), *SHMT1* rs1979277(1420C>T) e *RFC1*rs1051266(80G>A) têm como consequência substituições de aminoácidos nas respectivas proteínas codificadas. Entretanto, as implicações na atividade da proteína são bem descritas apenas para o polimorfismo *MTHFR* rs1801133, que gera uma proteína termolábil com redução de até 60% da atividade. Alguns estudos sugerem que os polimorfismos em genes do metabolismo do folato podem ter impacto na tumorigênese de maneira tecido-específica e a predisposição genética está ligada a fatores ambientais, como a suplementação de folato (WIEMELS *et al.*, 2001; FRISO; CHOI, 2002).

Os polimorfismos nos genes *MTHFR*, *SHMT1* e *RFC1* podem ter associação causal como fatores de proteção ou risco para neoplasias. O efeito protetor hipoteticamente se dá pelo acúmulo de substrato para a síntese de timidina, evitando a incorporação errônea de uracila, quebra de DNA para a excisão de base e reparo, o que aumenta a probabilidade de mutações e rearranjos gênicos. O efeito de risco pode se dar por duas vias: 1) metilação aberrante de DNA favorecendo a ativação de proto-oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor (CHIANG; WANG; TANG, 2007); e 2) pela incorporação errônea de uracila, promovendo quebras na dupla fita de DNA pelo sistema de reparo, colaborando na formação de fusões gênicas, mutações e alterações numéricas nos cromossomos (WIEMELS *et al.*, 2001; FRISO; CHOI, 2002). Estes dois processos estão ligados entre si.

Em 2011, Crider *et al.* realizaram um ensaio clínico randomizado duplo-cego a fim de mensurar a metilação global de DNA em um grupo com suplementação de ácido fólico. Eles observaram que ao final de 6 meses, 27% dos indivíduos com o alelo polimórfico *MTHFR*C677T apresentaram aumento nos níveis de metilação em ≤5%, não foi observada alteração nos níveis de metilação nos indivíduos com genótipo selvagem (*MTHFR*CC). Segundo esse estudo, a suplementação com ácido fólico leva a mudança nos níveis de metilação de DNA tempo, dose e genótipo *MTHFR*-dependentes. Apesar disso, Narayanan *et al.*(2004) não identificaram qualquer associação entre *MTHFR* C677T, marcadores de estabilidade de DNA e *status* de metilação.

Mais recentemente, Burghardt *et al.*(2012) demonstraram associação entre o polimorfismo *MTHFR* rs1801133 e metilação em *Long interspersed nuclear element-1* (LINE-1). Estes são retrotransposons de classe I, correspondem a aproximadamente 17% do genoma humano, e são essenciais na estrutura e função da cromatina, servindo como um elemento epigenético crítico no remodelamento da cromatina (CHUEH *et al.*, 2009). Neste sentido, o genótipo *MTHFR*TT foi associado com diminuição nos níveis de metilação em LINE-1 (56%), quando comparado aos demais genótipos (75%) em pacientes com esquizofrenia (BURGHARDT *et al.*, 2012).

Em leucemia pediátrica, foi sugerido que polimorfismos que alteram o metabolismo do folato são importantes candidatos na etiologia das LLAs com fusões *ETV6-RUNX1* e *KMT2A-r*, alterações que ocorrem, na maioria das vezes, durante a vida intrauterina (GREAVES, M. F.; WIEMELS, 2003). De modo mais específico, tem sido proposto que o polimorfismo *MTHFR* rs1801133 tem efeito protetor para o desenvolvimento de leucemias (WIEMELS *et al.*, 2001). Uma meta-análise brasileira demonstrou que o polimorfismo *MTHFR* rs1801133 contribui para uma diminuição no risco de desenvolver LLA em adultos, mas não altera a susceptibilidade para LLA pediátrica (PEREIRA *et al.*, 2006). Além da variante *MTHFR* rs1801133, diferentes estudos investigaram outras variantes genéticas envolvidas no ciclo do folato, demonstrando um aumento de risco para LLA conferido pelo polimorfismo *RFC1* rs1051266. Já os polimorfismos *SHMT1* rs1979277 e *MTHFR* rs1801133, apresentam resultados controversos, enquanto o polimorfismo *MTHFR* rs1801131 demonstra efeito nulo na maioria dos estudos (PEREIRA *et al.*, 2006; VIJAYAKRISHNAN; HOULSTON, 2010; YAN *et al.*, 2012).

Durante o desenvolvimento da minha dissertação de mestrado, identificamos um aumento de risco para LLA em crianças com variantes polimórficas de modo isolado e combinado. Encontramos aumento no risco com significância estatística para os polimorfismos *RFC1* rs1051266 [razão de chances (OR), 1,82; intervalo de confiança de 95% (IC 95%), 1,07–3,09], *SHMT1* rs1979277 (OR 1,95; IC 95%, 1,12-3,38) e *MTHFR* rs1801133 (OR, 1,78; IC 95%, 1,17-2,71). Quando fizemos o cálculo do fator de sinergia, o efeito combinado destas variantes polimórficas aos pares apresentou um risco adicional, ou seja, maior que o risco de cada variante isoladamente (*RFC1* GA+AA e *SHMT1* CT+TT, OR de 2,72, IC 95% 1.25-5.91 e, a combinação entre *SHMT1* CT+TT e *MTHFR* 677 CT+TT, OR 2,97, CI 95% 1.50-5.85). Portanto, nós encontramos associação entre os polimorfismos *MTHFR* rs1801133,

RFC1 rs105126 e *SHMT1* rs1979277e o desenvolvimento de LLA-CPB da primeira infância (VIEIRA, 2013).

As implicações dos polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo do folato na metilação de DNA é um tema pouco abordado quando associados aos padrões de metilação aberrante em LLA-CPB.

1.6. MECANISMOS DE REGULAÇÃO EPIGENÉTICA

O termo epigenética é usado para descrever os processos moleculares herdáveis que afetam a expressão gênica sem causar mudanças na sequência de bases na molécula de DNA (BIRD, 2002). Os mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica incluem modificações de histonas, metilação de DNA e RNAs não codificantes (Figura 1.5) (SAWAN *et al.*, 2008).

A metilação de sítios CpG é um processo importante no silenciamento gênico e manutenção da estabilidade genômica, estando envolvida em uma ampla gama de processos fisiológicos e patológicos em mamíferos, incluindo a embriogênese, *imprinting* genômico e tumorigênese (JONES; BAYLIN, 2002). Este mecanismo epigenético está associado também a fenômenos tais como reparo de DNA (WALSH; XU, 2006), iniciação do dimorfismo sexual, programação da divisão celular e supressão de elementos transponíveis e elementos retrovirais no genoma (YODER; WALSH; BESTOR, 1997; HOWARD *et al.*, 2008). Metilação *de novo* em genes específicos e demetilação ocorrem durante a diferenciação de linhagens celulares, por exemplo, durante a diferenciação de progenitores hematopoiéticos (JI *et al.*, 2010).

A metilação do DNA, uma modificação epigenética necessária para a regulação normal da expressão gênica e manutenção da integridade cromossômica, depende do fluxo metabólico no ciclo do folato (ROBERTSON, 2005; DOLINOY; JIRTLE, 2008). A adição do grupamento metil ao DNA ocorre na posição C5 da citosina, tanto por um processo *de novo*, mediado principalmente pelas enzimas DNA metil-transferases 3A e 3B (DNMT3A e DNMT3B), quanto por manutenção replicativa, catalisada primordialmente pela DNMT1 (VERTINO *et al.*, 1996; JAIR *et al.*, 2006). A metilação/demetilação de DNA, acompanhada de modificações na cromatina, controlam a acessibilidade ao DNA, sendo determinantes na expressão gênica.

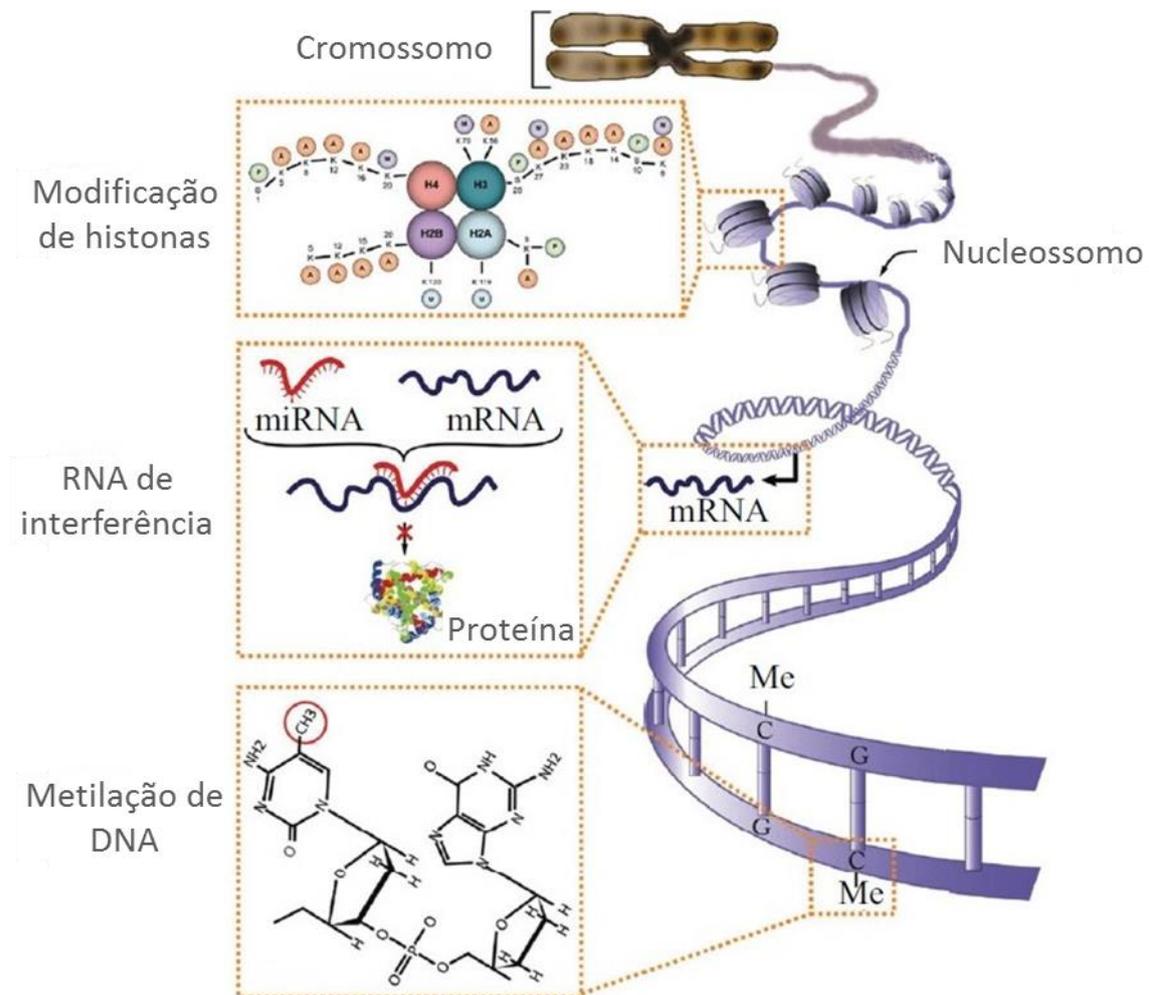


Figura 1.5: Ilustração esquemática dos processos envolvidos nos mecanismos de regulação epigenética. De cima para baixo, a figura ilustra os mecanismos básicos de regulação epigenética que consistem na modificação de histonas que atuam na compactação da cromatina, RNAs de interferência que regulam negativamente a expressão gênica pela ligação ao RNA mensageiro e, por último, a metilação de DNA, cujo papel na expressão gênica é um pouco mais complexo. A metilação em regiões promotoras regula negativamente a expressão gênica.

Modificado de (SAWAN *et al.*, 2008).

1.7. ALTERAÇÕES DE METILAÇÃO EM DESORDENS HEMATOLÓGICAS

As transformações leucêmicas são decorrentes de alterações somáticas em células precursoras hematopoiéticas que resultam no distúrbio do processo de autorrenovação celular, bloqueando a diferenciação e promovendo resistência aos sinais de morte. Além das alterações primárias, existem alterações adicionais ou secundárias que cooperam para a expansão do clone leucêmico. Em LLA-CPB, as alterações mais comuns incluem: hiperdiploidia, *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *KMT2A-re BCR-ABL1*. Porém, mais recentemente, tem sido demonstrado que alterações epigenéticas podem contribuir não só para o desenvolvimento, mas também para a progressão da doença (FIGUEROA, 2014). Diante deste panorama, um dos objetivos do presente trabalho foi caracterizar o perfil de metilação do DNA nos diferentes subtipos citogenético a fim de melhor compreender o papel de tais alterações em LLA-CPB.

Ainda, diferentes estudos epidemiológicos têm indicado que a exposição a elementos químicos e biológicos pode contribuir para o desenvolvimento de LLA-CPB. Entre eles, o folato se destaca e já foi descrito que polimorfismos em genes envolvidos no seu metabolismo são uma peça importante na patogênese e na resposta terapêutica das leucemias agudas. Segundo Moores *et al.*, (2011), é possível que a deficiência de folato (1) cause aumento de uracila no telômero, favorecendo quebras na dupla fita de DNA, a excisão de bases e tentativa de reparo, favorecendo também o encurtamento dos telômeros; (2) induza hipometilação subtelomérica podendo, conforme o grau de modificação epigenética, afetar o tamanho e função do telômero; e (3) favoreça pontes nucleoplásmicas ou fusões cromossômicas que envolvem especificamente a região telomérica e/ou sequências subteloméricas. Além disso, polimorfismos genéticos que alteram a atividade das enzimas necessárias na absorção de ácido fólico podem estar associados com hipometilação global do DNA e favorecer a leucemogênese. Os polimorfismos *MTHFR*rs1801133, *MTHFR* 1298A>C, *SHMT1* rs1979277 e *RFC1* rs1051266 levam à substituição de aminoácidos e diminuição na atividade dessas enzimas com implicações em metilação e síntese de DNA.

O risco associado à combinação entre os polimorfismos na via do folato pode ser explicado pela diminuição na atividade das enzimas com consequente diminuição na disponibilidade de substrato para a etapa seguinte do ciclo, levando à deficiência de metabólitos do folato. Em estudo anterior realizado durante o meu mestrado,

identificamos uma associação de risco elevado entre LLA-CPB em lactentes com as variantes *MTHFR* 677C>T, *RFC1* 80G>A e *SHMT1* 1420C>T. Nós especulamos, então, que o efeito combinado entre essas variantes poderia favorecer mudanças em células progenitoras, promovendo mutações e metilação aberrante ainda durante a vida intraútero.

Os marcadores de regulação epigenética encontram-se amplamente alterados em células tumorais quando comparadas a controles normais. Metilação aberrante, por exemplo, é comumente vista em LMA e têm implicações clínicas. Recentemente, Figueroa *et al.* demonstraram que diferentes subtipos de leucemias pediátricas se distinguem quanto ao padrão de metilação e perfil de expressão gênica. Pela integração entre os perfis genéticos e epigenéticos, foi demonstrado que esses dois mecanismos desempenham um papel-chave na regulação da programação transcricional em LLA, contribuindo para a caracterização do fenótipo da doença. Tais alterações na metilação do DNA não parecem ser apenas uma consequência das alterações genéticas, e sim alterações necessárias para a ocorrência e vantagem proliferativa nas leucemias (FIGUEROA, 2013).

Um estudo recente realizado na Suécia demonstrou que é possível prever o subtipo de LLA de acordo com o perfil de metilação com maior eficiência em comparação aos métodos tradicionais (citogenética molecular), com um consenso superior a 90%. Por isso, os autores sugerem o uso de microarranjo de metilação na prática diagnóstica devido à eficácia do teste, por não haver necessidade de amostra com viabilidade celular e pelo teste ser realizado com pequena quantidade de DNA (~250 ng). Entretanto, em momento algum o alto custo da técnica é citada como desvantagem (NORDLUND *et al.*, 2015b).

Recentemente, estudos buscaram correlacionar alterações na metilação do DNA e instabilidade cromossômica nas regiões subteloméricas (ricas em CpG). Neste sentido, Zhang *et al.* demonstraram que demetilação das regiões subteloméricas induzidas pelo tratamento com 5-azacitidina foi correlacionado com encurtamento dos telômeros, bem como diminuição na expressão de hTERT em células cancerígenas (ZHANG *et al.*, 2012). Dessa forma, a metilação do DNA parece desempenhar importante papel na regulação do tamanho dos telômeros. Modelos experimentais também demonstraram que demetilação nas regiões subteloméricas está relacionada com encurtamento dos telômeros. Esses telômeros desprotegidos, por sua vez, podem se ligar, favorecendo a ocorrência de *breakage-fusion-bridge cycles*, mecanismo envolvido na iAMP21 (LUO *et al.* 2014).

1.8. JUSTIFICATIVA

Em estudo anterior realizado durante o meu mestrado, identificamos uma associação de risco, ou seja, aumento de risco para LLA-CPB em lactentes com as variantes *MTHFR* 677C> T, *RFC1* 80G> A e *SHMT1* 1420C> T em diferentes combinações de sinergismos(VIEIRA, 2013). Este subgrupo particular de LLA-CPB em idade precoce está associado à origem durante o desenvolvimento embrionário, conforme evidências de alterações genômicas recorrentes encontradas em clones pré-leucêmicos de sangue de cordão umbilical, tais como alta hiperdiploidia, *ETV6-RUNX1* e *KMT2A-r* (MAIA *et al.*, 2004).

Segundo Moores *et al.*, 2011, a deficiência de folato pode (1) causar aumento de uracila no telômero, favorecendo quebras na dupla fita de DNA, a excisão de bases e tentativa de reparo, favorecendo também o encurtamento dos telômeros; (2) induzir a hipometilação subtelomérica e conforme o grau de modificação epigenética, afetar o tamanho e função do telômero; e (3) favorecer a ocorrência de pontes nucleoplásmica ou fusões cromossômicas especificamente na região telomérica e/ou sequências subteloméricas (MOORES *et al.*, 2011). Desta forma, os polimorfismos genéticos que alteram a atividade das enzimas necessárias no metabolismo de ácido fólico poderiam estar associados com hipometilação global do DNA devido à menor disponibilidade de doadores de metil, conseqüentemente favorecendo a ocorrência de clones com alterações somáticas(CHIANG *et al.*, 2007). Os polimorfismos *MTHFR*rs1801133, *MTHFR* 1298A>C, *SHMT1* rs1979277 e *RFC1*rs1051266 levam à substituição de aminoácido e diminuição na atividade dessas enzimas com implicações em metilação e síntese de DNA. Nós especulamos que o efeito combinado entre essas variantes pode estar relacionado com mudanças em células progenitoras, promovendo metilação aberrante ou mutações durante a vida intraútero e origem das células com alta hiperdiploidia.

Alterações na metilação de DNA são associadas com instabilidade genômica devido à mobilização de elementos transponíveis, como LINE-1 ou elementos Alu em diferentes regiões do genoma (RODIC; BURNS, 2013; LUO; LU; XIE, 2014). Outra via que correlaciona metilação de DNA e instabilidade genômica é o processo de demetilação por si só e suas implicações nos mecanismos de reparo. Alterações na metilação do DNA também podem resultar em desregulação transcricional em LLA-CPB com alterações no cromossomo 21(TAYLOR, K. H. *et al.*, 2007; DAVIDSSON *et al.*, 2009; STUMPEL *et al.*, 2009; SCHAFFER *et al.*, 2010; FIGUEROA *et al.*, 2013).

Baseado nessas evidências, nós hipotetizamos que a metilação aberrante do DNA pode não apenas dirigir mutações pontuais, mas também variações em números de cromossomos ou iAMP21 e, conseqüentemente, em clones leucêmicos.

Não se sabe ao certo o motivo pelo qual o cromossomo 21 está envolvido na maior parte das LLA-CPB, seja com alterações numéricas ou estruturais. A expressão aberrante de genes localizados nesse cromossomo pode ser consequência de dois fatores: i) devido ao ganho de material genético na região amplificada; ii) resultante de modificações epigenéticas, como a metilação aberrante do DNA. Semelhante aos achados dos estudos anteriores que caracterizaram subtipos leucêmicos de acordo com o perfil de metilação (TAYLOR, K. H. *et al.*, 2007; DAVIDSSON *et al.*, 2009; STUMPEL *et al.*, 2009; SCHAFFER *et al.*, 2010; FIGUEROA *et al.*, 2013), nós hipotetizamos também que perfis de metilação podem levar à instabilidade genômica, como uma etapa necessária para a iAMP21 e iniciação da LLA-CPB. É possível que as LLA-CPB com alterações no cromossomo 21 apresentem um perfil próprio de metilação distinto de células B normais. A identificação desses genes com metilação aberrante poderá indicar novos alvos terapêuticos, possibilitando sua utilização em futuros estudos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil genômico e de metilação de DNA em uma coorte de LLA-CPB com alterações no cromossomo 21.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer uma sequência de testes capaz de identificar iAMP21 dentre as demais LLA-CPBs com ganhos no cromossomo 21.
- Identificar alterações em número de cópias em casos LLA-CPB.
- Caracterizar o perfil de metilação global e gene-específico dos diferentes subtipos de LLA-CPB.
- Verificar se os subtipos acima apresentam uma assinatura de metilação específica.
- Investigar a inter-relação entre o polimorfismo *MTHFR* rs1801133 e a metilação global em LINE-1 nos casos de LLA-CPB.

3. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental a partir de uma série de casos de LLA-CPB. A representação esquemática do desenho do estudo encontra-se na Figura 3.1. O estudo foi dividido em três etapas: 1) identificação dos diferentes níveis de ganho em número de cópias no cromossomo 21; 2) análise de metilação e alterações em número de cópias acessando todo o genoma; e 3) análises comparativas entre os diferentes subtipos de LLA-CPB.

2.1.1. Seleção do grupo de estudo

Casos: Foram avaliadas amostras de MO colhidas para diagnóstico e enviadas para o Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrico (PHOP) diagnosticadas com LLA-CPB conforme recomendações da OMS(JAFFE *et al.*, 2008). Foram incluídos pacientes com idade ≤ 18 anos diagnosticados no período de 2002-2016. Foram avaliadas amostras disponíveis dos casos com suspeita de iAMP21 que entraram em remissão completa. Além disso, foram incluídos casos de LLA-CPB com SD apenas para análises de validação de resultados do MLPA. Para a estratificação entre o risco prognóstico padrão ou alto foram usados os critérios do *National Cancer Institute* (NCI)(SMITH *et al.*, 1996).

Apenas os sujeitos de pesquisa cujos responsáveis legais autorizaram o estudo, através da concordância expressa pela assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) obtidos nos centros de tratamento foram incluídos no grupo de estudo.

Critérios de exclusão: a) pacientes com LLA-CPB associada às fusões gênicas *ETV6-RUNX1*, *BCR-ABL1*, *TCF3-PBX1* e *KMT2A-r*, pois estas alterações, em regras gerais, são mutuamente exclusivas, ou seja, não ocorrem concomitantemente nos casos com iAMP21 ou hiperdiploidia. Este critério de exclusão foi aplicado apenas na primeira fase do estudo (Figura 3.1); b) Leucemias bi-fenotípicas e pacientes com baixa porcentagem de blastos (<30%).

Controles: Amostras de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) de doadores saudáveis foram utilizados como controles das reações e padrões comparativos para as análises de metilação e expressão gênica. Estas amostras são provenientes do banco de SCUP do INCA com permissão para utilização em pesquisa.

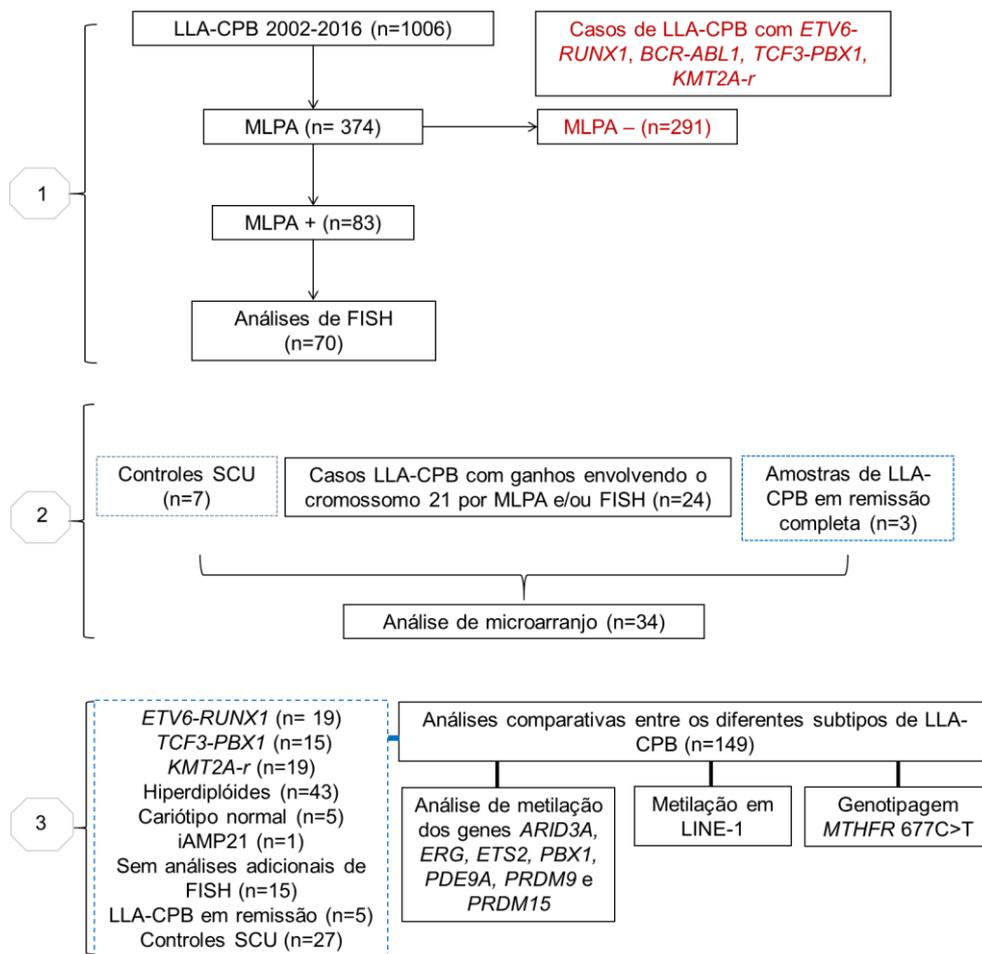


Figura 3.6: Representação esquemática do desenho do estudo.

1) Identificação dos casos com alterações em número de cópias (CNA) no cromossomo 21 identificados por MLPA. Nesta etapa, os casos positivos no MLPA seguiram para a análise por FISH. 2) os casos selecionados para o microarranjo de metilação incluíram o grupo controle, casos com ganho em número de cópias envolvendo o cromossomo 21 detectados por MLPA e/ou por FISH e amostras de LLA-CPB em remissão completa e/ou fora de tratamento; 3). As análises comparativas foram realizadas entre os diferentes subgrupos de LLA-CPB incluindo casos com ganho no cromossomo 21, *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *KMT2A-r*, com cariótipo normal, *iAMP21*, amostras em remissão e controles. SCU, sangue de cordão umbilical e placentário.

O presente estudo foi desenhado em três etapas (Figura 3.1): na primeira fase, foi feita a identificação dos casos com ganhos em CNA envolvendo o cromossomo 21; na segunda etapa, foram selecionados casos com ganhos em CNA envolvendo o cromossomo 21, controles e amostras de LLA-CPB em remissão completa para a caracterização do perfil de metilação e CNA usando a técnica de microarranjo; por último, foram feitas análises comparativas de metilação gene-específica, metilação em LINE-1 e genotipagem para o polimorfismo *MTHFR 677C>T* nos diferentes subtipos de LLA-CPB, controles e amostras em remissão.

2.1. ALGORITMO DE TESTES PARA DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO DOS SUBTIPOS DE LLA

As amostras de medula óssea e/ou sangue periférico foram enviadas ao laboratório dos diversos centros de tratamento de leucemia pediátrica no Brasil para diagnóstico imunomolecular e utilização em pesquisa, após a devida anuência (Anexo I). As amostras seguiram o fluxograma descrito na Figura 3.2. As análises morfológicas foram realizadas após coloração convencional utilizando “May-Grünwald-Giemsa”, aspecto morfológico e diagnóstico imunofenotípico foram realizados preferencialmente em amostra de MO em EDTA. As amostras foram então incubadas com anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados direcionados para antígenos celulares de superfície e intracelulares. Inicialmente foi feito um painel de triagem para direcionar a linhagem dos blastos com os AcMo, MPO intracitoplasmático, CD79a intracitoplasmático, CD45, CD19, CD34, CD3 intracitoplasmático. Em seguida, foram usados AcMO direcionados para antígenos de membrana específicos de linhagem e maturação celular, sendo eles, cyTdT, CD20, CD45, CD19, CD10, CD9, cyIgM, CD19, CD58, CD66c, CD123, CD38 e CD13+CD33. Após a marcação, a leitura foi realizada no citômetro de fluxo FacCanto-6 cores 3.0.

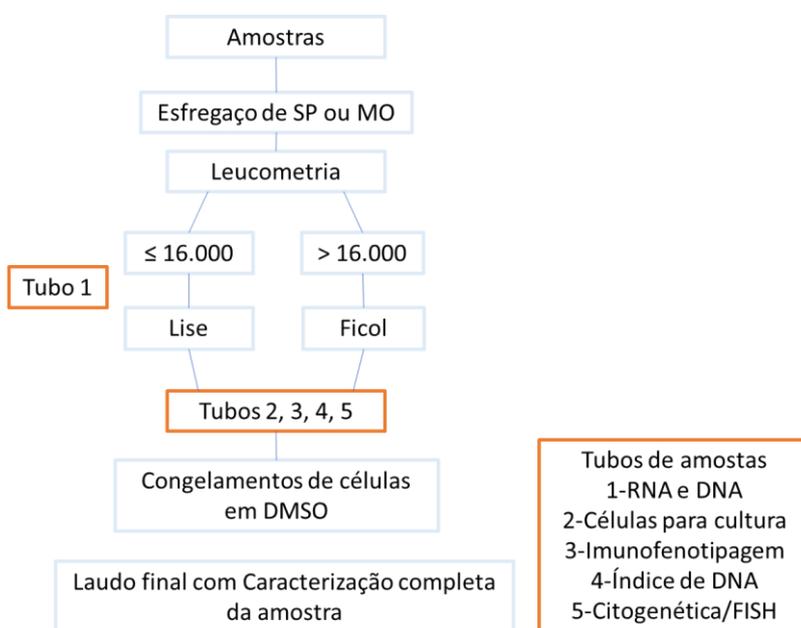


Figura 3.7: Fluxograma de análise das amostras direcionadas para os diferentes tipos de testes, congelamento e preparo para pesquisas posteriores.

Após o diagnóstico imunofenotípico, as amostras seguiram para a caracterização molecular dos subtipos. Para tal, foi realizada a técnica de RT-PCR com iniciadores específicos para cada translocação/fusão gênica associada a bom prognóstico (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*) ou prognóstico adverso (*KMT2A-AF4* e *BCR-ABL1*). O RNA extraído foi tratado com a enzima DNase para eliminação de possível DNA genômico usando o kit Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen, EUA; nº cat. 18068-015). Em seguida, foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA) com o kit ImProm-ITM Reverse Transcriptase (PROMEGA, EUA; nº cat. A3802), de acordo com instruções do fabricante. Para avaliar se o cDNA foi devidamente sintetizado, foi feita a amplificação do gene constitutivo, *GAPDH* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). A identificação das fusões gênicas *ETV6-RUNX1* e *KMT2A-AF4* também foram realizadas pela técnica de FISH com as sondas LPH012 TEL/AML1 Translocation, Dual Fusion Probe (Cytocell, Cambridge, UK) e *KMT2A* Breakapart Probe (Cytocell, Cambridge, UK), respectivamente.

IDENTIFICAÇÃO DOS DIFERENTES NÍVEIS DE GANHO DO CROMOSSOMO 21

3.1.1. Isolamento de DNA

As amostras de DNA foram isoladas com o auxílio do *Blood DNA isolation kit*, de acordo com o manual de instruções (Qiagen, Hilden, Holanda) ou com *TRizol reagent* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), também de acordo com as instruções do fabricante. Foi feita a quantificação pelo método de espectrofotometria usando NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware), e as amostras com concentração abaixo de 20 ng/μL foram excluídas.

3.1.2. *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA)

Inicialmente, a identificação das CNAs no cromossomo 21 foi avaliada usando o kit MLPA SALSA P327_A1 (lote A1-0101) que, em seguida, foi retestada com o conjunto de sondas P327_B1 (lote B1-0613) (MRC Holland, Amsterdam, Holanda) em algumas amostras, conforme descrito por Fuka, Farias Vieira *et al.* (2015). O conjunto de sondas foi desenhado a fim de avaliar o *status* do número de cópias entre a região centromérica e telomérica do braço longo do cromossomo 21 (q11.2-q22.3, 14.668-46.356). A comparação entre os dois kits (P327_A1 e kit P327_B1) foi realizada para avaliação dos resultados obtidos no MLPA. Foram selecionadas amostras com os

maiores picos obtidos na primeira etapa, além de amostras negativas e SD. O kit P327_B1 representa uma versão modificada do kit P327_A1, com a adição de 12 novas sondas para o gene *ERG* e 3 sondas adicionais para o cromossomo 21. Quatro sondas específicas para o gene *RUNX1* (éxon 10; 7; 6 e 4b) foram substituídas, enquanto duas sondas para o mesmo gene (éxon 9 e 2), permaneceram no segundo kit. Após a identificação inicial em uma série de casos de 2002-2012 (FUKA *et al.*, 2015), o teste continua sendo aplicado nos casos novos. A separação dos fragmentos é feita por eletroforese capilar de acordo com as instruções do fabricante (ABI 3130xl, Life Technologies, Carlsbad, CA). O número relativo de cópias foi obtido após a normalização dos picos tendo como controles amostra de SCU. As sequências foram analisadas usando Gene Marker 2.2.0 softwares (Soft Genetics LLC, State College, PA). A Figura 3.3 mostra a imagem gerada pelo GeneMarker após normalização com os fragmentos considerados normais (entre 0,75 e 1,3) (Figura 3.3A) e com perda ou ganho de material (<0,75 e >1,3), (Figura 3.3B).

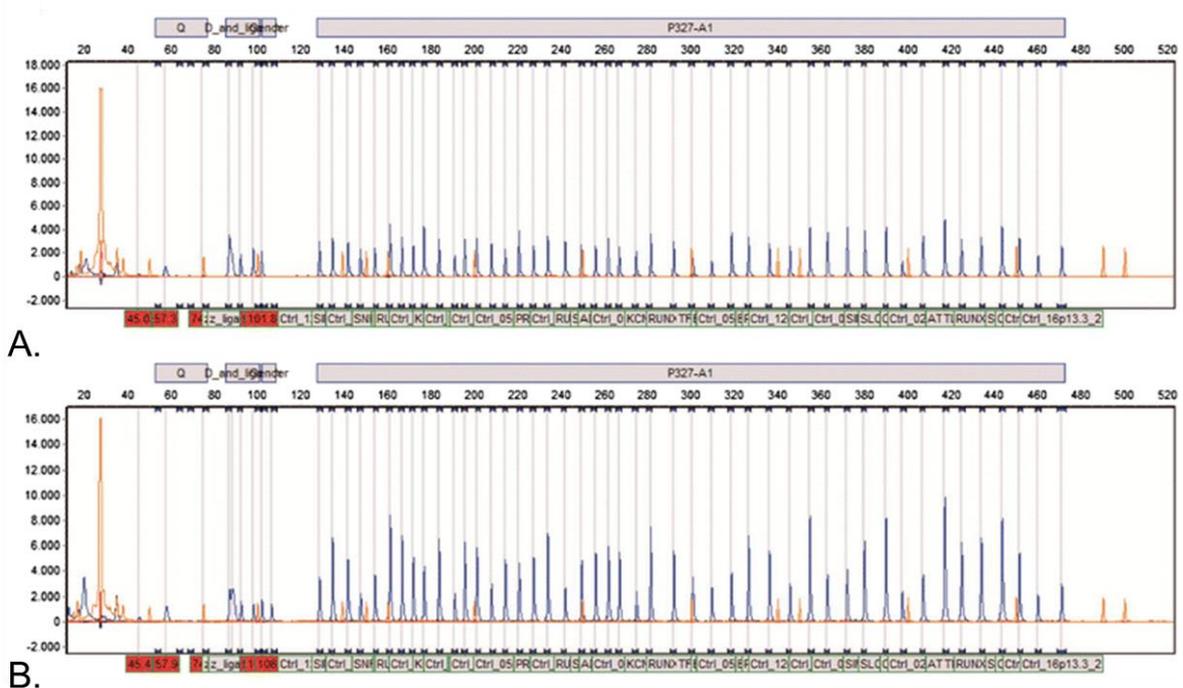


Figura 3.8. Eletroferogramas do MLPA de DNA de sangue de cordão umbilical e placentário (painel superior) comparado com o paciente P4 (painel inferior). O perfil dos picos de MLPA demonstra o que foi considerado como perfil de normalidade (painel superior) e um exemplo cujas diferenças nas alturas dos picos sugerem ganhos no cromossomo 21 (painel inferior).

3.1.3. *Fluorescence in situ hybridization* (FISH)

Foram selecionados 83 casos com padrão preconizado como positivo pela técnica de MLPA para a análise por FISH. Esta foi realizada preferencialmente em amostra de MO e, quando não foi possível, as amostras de SP com contagem de blastos superior a 30% foram testadas. O FISH foi realizado usando a sonda LPH012 TEL/AML1 Translocation, Dual Fusion Probe (Cytocell, Cambridge, UK), desenhada para detectar a fusão gênica *ETV6-RUNX1* e apresenta duas cores, verde e vermelha. A técnica foi realizada de acordo com as instruções fornecidas no protocolo pelo fabricante. As amostras em EDTA ou congeladas em DMSO foram lavadas em PBS e fixadas em solução de Carnoy e, em seguida, aplicadas em forma de gotas sobre as lâminas até a completa obtenção da quantidade de núcleos suficientes, possibilitando uma contagem superior a 200 núcleos em interfase. Após o preparo, as lâminas foram submetidas a uma série de lavagens. Primeiro, em uma solução com 2X *Saline-sodium citrate buffer* (SSC pH 7.0), durante 2 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 90%, 100%), por um minuto em cada concentração. Em seguida, a lâmina com a amostra, a lamínula e 2,5µL de sonda foram então pré-desnaturados à 37°C por 2 min no escuro. A sonda foi aplicada na lâmina, na área previamente demarcada, e coberta pela lamínula de vidro. Em seguida, foi feita a desnaturação à 75°C. As lâminas foram incubadas em câmara úmida à 37°C por 16 horas, no escuro.

No dia seguinte, a lamínula foi removida cuidadosamente e foi feita a lavagem em solução 1X SSC a 75°C (+/- 1°C) por 2 min, eem solução 2X SSC com 1% de Tween 20 por 1 min. A lâmina foi colocada para secar e foi feita a aplicação da contra-coloração DAPI, tendo sido aplicados 3,5 µL de DAPI, de modo a permitir a visualização das células em azul brilhante.

A visualização do FISH foi feita em microscópio Olympus BX41 TR/URA/DP2 equipado com lâmpada de HBO 100 W. Para visualização da passagem de luz das sondas e contra coloração foram utilizados os filtros Olympus nos espectros DAPI, FITC e TEXAS RED. Foram analisados, no mínimo, 200 núcleos sem interfase e os casos foram considerados positivos para *iAMP21* quando apresentaram ≥ 3 sinais adicionais (≥ 5 sinais ao todo) de *RUNX1* em 7% dos núcleos (desvio padrão de +/- 2%).

3.1.4. Análise de alteração em número de cópias cromossômicas por FISH

Após o FISH com sonda para os genes *ETV6-RUNX1*, as alterações em número de cópias foram confirmadas nos casos analisados no MLPA, nas amostras com ganho do cromossomo 21 com material biológico ainda disponível. Para caracterizar os diferentes subtipos com ganho no cromossomo 21, foram também usadas sondas para os cromossomos mais frequentemente adicionados nas LLA-CPB hiperdiplóides. O FISH foi, então, realizado em uma outra etapa usando sondas para os seguintes cromossomos: 4, 10, 14, 17, 18, 21, X e Y. A especificação das sondas encontram-se apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.2. Descrição das sondas usadas para a técnica de FISH

Cromossomo	Sonda	Fabricante	Cat n.
4	4q subtelomere	Appligene	
10	CEP 10	Cytocell	LPE010G
14	IGH Breakapart	Cytocell	LPH 014-A
17	CEP 17	Cytocell	LPE017R
18	CEP 18	Cytocell	LPE018R
21	TEL/AML1 Translocation	Cytocell	LPH012
13/21	CEP 13/21	Cytocell	LPE013G
21	Subtelomere 21q	Cytocell	LPT21QR
X	CEP X	Cytocell	LPE0XG
Y	CEP y	Cytocell	LPE0YcR

Abreviações: CEP, sonda centromérica.

Para a classificação da distribuição modal do número de cromossomos neste estudo, foram seguidas as normas do Sistema Internacional para Nomenclatura Citogenética, do inglês, *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (2013) (ISCN, 2013). A faixa entre 47 e 57 cromossomos foi classificada como hiperdiplóide e 70-80 cromossomos, hipertriplóide.

2.2. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO

2.2.1. Tratamento com bissulfito

Após a extração do DNA, a quantidade final de 600ng de DNA foram tratados com bissulfito usando o EZ DNA Methylation™ Kit (Zymo Research, Califórnia, Estados Unidos). Após o tratamento, as citosinas não metiladas foram convertidas em uracila e as citosinas metiladas permaneceram inalteradas (Figura 3.3).

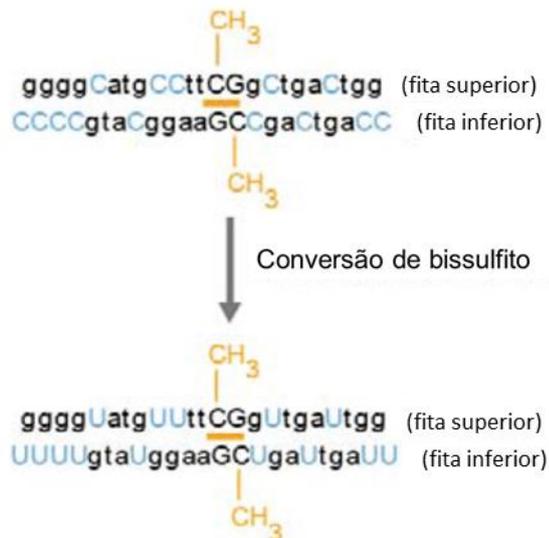


Figura 3.9: Princípio básico da conversão de bissulfito. Por meio deste processo, as citosinas não metiladas (em azul) são convertidas a uracilas (azul, pós-conversão). Modificado de ILLUMINA (2010).

2.2.2. Microarranjo de metilação

O *chip* usado para o microarranjo de metilação foi o Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit (Illumina, Califórnia, Estados Unidos). Após a reação de conversão com bissulfito de sódio, 250 ng das amostras tratadas foram preparadas para a aplicação no chip. A preparação das amostras foi feita criteriosamente de acordo com as instruções do fabricante em três dias, e consiste no processo descrito na Figura 3.4 nas etapas seguintes:

- Desnaturação: As amostras foram preparadas para a amplificação, para isso foram desnaturadas e neutralizadas.

- Incubação para amplificação: O DNA desnaturado foi amplificado em uma mesma temperatura durante a noite. O genoma completo foi amplificado, aumentando

de modo uniforme a quantidade de DNA em alguns milhares de vezes sem introduzir grande viés de amplificação.

- Fragmentação: O produto amplificado foi fragmentado com um processo enzimático controlado que não requer gel de eletroforese.

- Precipitação: Após uma precipitação com isopropanol, os fragmentos de DNA foram centrifugados por 20 minutos a 4° C.

- Ressuspensão: O DNA precipitado foi ressuscitado em tampão fornecido pelo fabricante.

- Preparo do chip: Os fragmentos ressuscitados no tampão foram dispensados no chip.

- Hibridização: Os chips com as amostras foram incubados durante a noite no forno de hibridização (16-20 horas). Os fragmentos de DNA anelam de forma específica por ligações covalentes durante a hibridização. Este kit apresenta dois tipos de sondas direcionadas a cada *locus* CpG: I) uma sonda anela de forma específica à região no estado metilado (C) e outra à mesma região, se estiver não metilada (T); II) A sonda hibridiza tanto com o alelo metilado quanto não metilado e é feita a extensão de uma única base complementar ao sítio CpG. Os dideoxinucleotídeos são marcados com fluoróforos específicos, sendo ddCTP e ddGTP marcados com biotina, enquanto ddATP e ddUTP são marcados com 2,4-dinitrofenol (DNP).

- Lavagem do chip: A fim de remover o DNA que não foi hibridizado ou que foi hibridizado de forma inespecífica, foi feita uma série de lavagens no chip, e o mesmo foi preparado para a marcação e extensão.

- Extensão e marcação: A extensão e marcação ocorreram em câmaras de escoamento capilar. A extensão de base única dos oligos no chip usou o DNA capturado como molde, incorporou marcação detectável no chip e determinou os níveis de metilação dos sítios CpG em questão.

- Escaneamento do chip: O escaneamento foi feito no iScan Systems (Illumina) usando um laser para excitar o fluoróforo referente ao produto da extensão de uma base única nas oligos. O scanner recupera as imagens da luz emitida pelos fluoróforos em alta resolução.

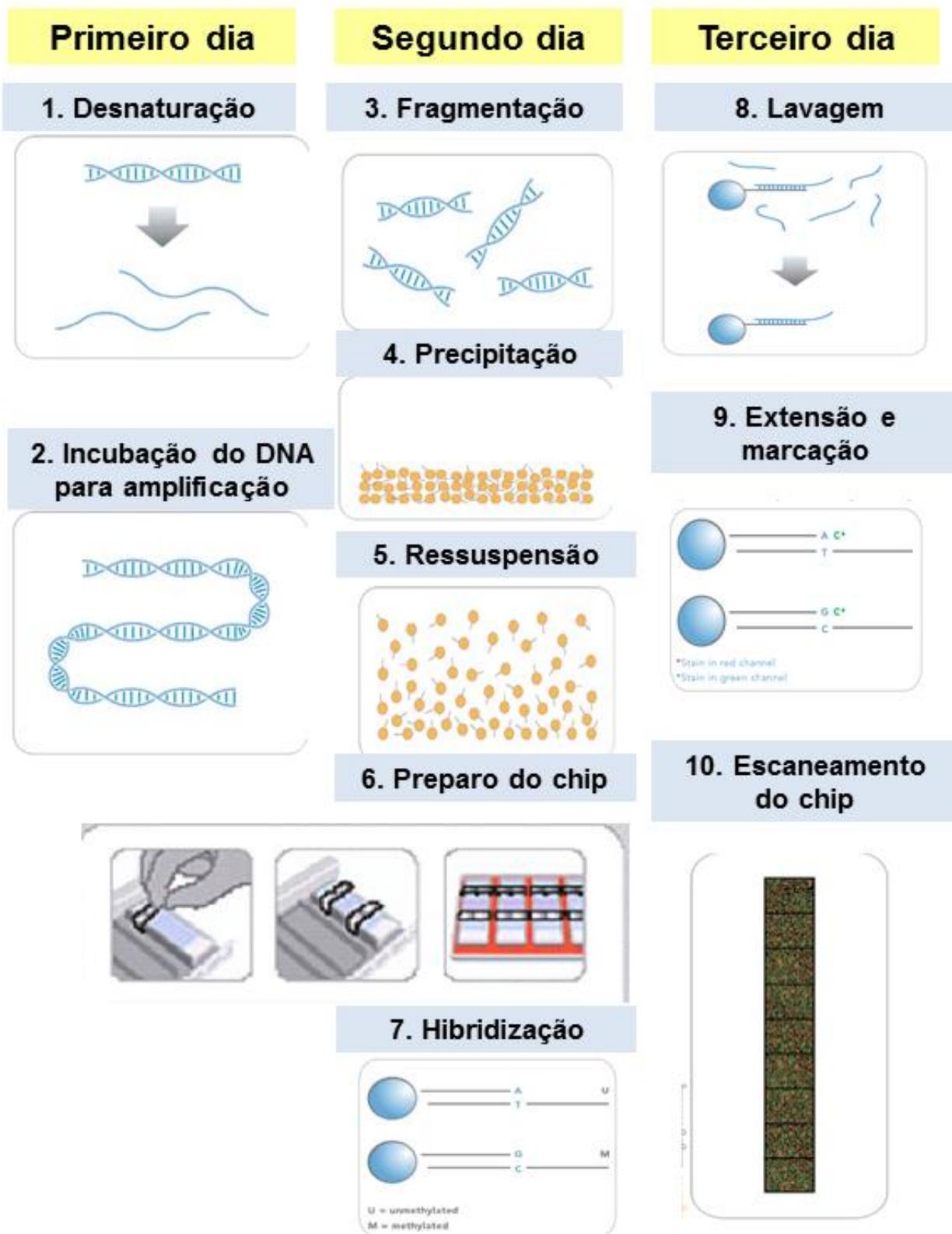


Figura 3.4: Etapas da preparação do chip para o microarranjo de metilação. Adaptado de ILLUMINA (2010).

Todas as análises do microarranjo foram feitas com auxílio do software RStudio com diferentes pacotes do Bioconductor. Para importação dos dados brutos, foi utilizado o pacote "methyumi". Em seguida, foram removidas as sondas de reação cruzada, sondas presentes nos cromossomos sexuais e aquelas que contêm SNPs conhecidos com uma frequência alélica de pelo menos 5% na população em geral (CHEN, Y. A. *et al.*, 2013). Além disso, foram removidas as sondas de baixa qualidade com um valor de p de detecção $< 0,05$ e amostras que contivessem mais de 1% das sondas com valor de p de detecção $< 0,05$ (pacote "wateRmelon"). Entretanto, nenhuma amostra foi excluída. Após a correção de background e ajuste de viés de fluoróforo (pacote "lumi"), foi feita a correção para o viés de tipo de sonda (tipo I e tipo II) utilizando o pacote "wateRmelon".

O valor de beta (beta-value) representa a razão entre a intensidade do alelo metilado e a soma das intensidades dos alelos metilado e não metilado. A partir do beta-value, foi calculado o valor M (M-value), que nada mais é do que sua transformação logarítmica, ou seja, o \log_2 da razão das intensidades da sonda para o alelo metilado *versus* a sonda do alelo não metilado. A partir destes valores, foi feita uma regressão linear utilizando o pacote "limma", sendo os diferentes grupos avaliados (controle, caso e remissão) variáveis categóricas. Para a determinação dos sítios diferencialmente metilados (SDM) nas comparações controle vs caso e remissão vs caso, foi utilizado como ponto de corte um valor de p ajustado $< 0,001$. Já para a comparação Controle vs Remissão, o ponto de corte foi de $< 0,05$.

Para as análises de enriquecimento, foi usado o programa MetaCore™ (versão 5.0). Para a análise, foi carregada a lista contendo os 34.046 SDM na análise caso-controle. A partir daí, dentro de "Enrichment Ontologies", foi selecionada a opção "Pathway Maps" e "IL7 Synaliation in B lymphocytes", "Neoplasms by Hystologic Type", "precursor B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia-Lymphoma" e em seguida selecionadas a via de FLT3, Ikaros e JAK2.

2.2.3. Análise de alteração em número de cópias pelo microarranjo de metilação

A análise de CNA foi feita a partir do chip Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit (Illumina, Califórnia, Estados Unidos), conforme os procedimentos metodológicos já descritos acima e ilustrados na Figura 3.4. Foram feitas comparações entre casos vs controles e remissões vs controles. Os ganhos e perdas em número de cópias foram determinados a partir da variação de intensidade de

fluorescência entre o grupo analisado e o grupo controle, utilizando o pacote ChAMP (Bioconductor) (MORRIS *et al.*, 2014). Após a normalização e remoção de sondas de baixa qualidade, as diferentes regiões foram consideradas amplificadas quando a média do segmento (seg. mean) > 0,3 e deletadas quando esta média < -0,3, ou seja, quando o ganho ou perda foi de pelo menos 2,5 vezes.

3.4.4. Validação do microarranjo de metilação

Para a escolha dos genes para a validação, foram levados em consideração genes previamente descritos como sendo cruciais na leucemogênese, dando preferência aos genes localizados no cromossomo 21. Na análise controle vs remissão, o gene *ARID3A* foi selecionado. Já na análise caso vs controle, SDM dos genes *ERG*, *ETS2*, *PBX1*, *PDE9A*, *PRDM9*, *PRDM15* e *RUNX1* foram selecionados para validação. O genoma de referência foi o *GRCh37*. A descrição das regiões analisadas encontra-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.3: Descrição dos genes cujas regiões foram escolhidas para a análise de validação

Gene	Sonda	Cromossomo: Localização no genoma	Região gênica
<i>ARID3A</i>	cg12713583	19:94072	Corpo
<i>ERG</i>	cg27471246	21:39776434	Corpo
<i>ETS2</i>	cg06958537	21:40176950	TSS1500
<i>PBX1</i>	cg00222472	1: 164545783	Corpo
<i>PDE9A</i>	cg13879523	21: 44088948	Corpo
<i>PRDM9</i>	cg02444433	5: 23507469	TSS1500
<i>PRDM15</i>	cg18113101	21: 43221756	Corpo

Abreviações: TSS, *transcription start site*.

Foi feito o desenho de *primers* (Tabela 3.3), os produtos foram amplificados usando 1,5 mM de MgCl₂, 1x de tampão, 200 µM de DNTP, 10 pmol de *primer*, uma unidade de Taq DNA Polimerase *Platinum* e 25 ng de DNA tratado com bissulfito em um volume final de 50 µL. A ciclagem compreendeu uma desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, desnaturação a 95°C, anelamento (Tabela 3.3) e extensão a 72°C, ambos os três pelo tempo de 40 segundos, repetidos em 50 ciclos, seguida por

extensão final a 72°C por 10 minutos e armazenadas a -20 °C. Os produtos de PCR foram analisados por pirosequenciamento no PyroMark Q96 ID Software 2.5 (Qiagen, Hilden, Holanda)

Tabela 3.4: Descrição dos primers usados na validação do perfil de metilação

Gene	Primers	T anel. °C	Amplicon (pb)
<i>ARID3A</i>	S: 5'GGTTTAGGTAGGAGTAGAAGAGGTTAATA3' AS: 5' biotina-ACCAAATACCCAAAAAACTTCCC 3' SEQ: 5' TGTGTTTGTTAAGAGAGT 3'	58	321
<i>ERG</i>	S: GGGGAGAAGGAGTAGGTGAT AS: 5' biotina-CTCCCTACCCATATATCTCT 3' SEQ: 5' GGAGTAGGTGATTTTTAATAGAA	58	147
<i>ETS2</i>	S: TAGGGGGTGGTTTTGATTAGG AS: 5' biotina-ACCCATTCTTAAACCTCT 3' SEQ: 5' TTATTTTGAATTTTTTATTAATTTG 3'	56	402
<i>PBX1</i>	S: 5' biotina-ATTAGAGGAGAGGGTTAGGG 3' AS: 5'CCCCTCTACCTCAAAAACCTCTAAATAT3' SEQ: 5' CTAAAAAACACTTAACTT 3'	58	549
<i>PDE9A</i>	S: 5' GGGGAAATGGGTTTTGAAA 3' AS: 5' ACCCTACCCACACCTAAATT 3' SEQ: 5' GATTTGGAGGGTTGTTTA 3'	58	486
<i>PRDM9</i>	S: 5' AGTGTAAGAATTTTGGTAATTTAAAAAGAT 3' AS: 5' biotina- AACTCAAAAAATAAAAAAAAACCTAACTC 3' SEQ: 5' TGGGGAAAATTAAGTAATAAAAT 3'	58	245
<i>PRDM15</i>	S: 5' AGGTTGATGAAATGGGTTATAGA 3' AS: 5' biotina-ACCCAAATATAACCACACCA 3' SEQ: 5' GTTTAGGGGTGGTAAG 3'	58	280

Abreviações: S, senso; AS, anti-senso; SEQ, sequenciamento; T anel.°C, temperatura de anelamento em graus Celsius.

3.4.5. Polimorfismos em genes da via de metabolismo do folato

O grupo total de casos foi genotipado para o polimorfismo *MTHFR* rs1801133 (677C>T). A genotipagem foi realizada através de PCR-RFLP, com a enzima de restrição *HinfI* conforme descrito previamente (WIEMELS *et al.*, 2001).

3.4.6. Análise de metilação global pela avaliação do *status* de LINE-1

A amplificação de LINE-1 foi feita utilizando tampão de reação 1X, MgCl₂ 5 mM, dNTPs 200 µM, 10 pmol de cada *primer*, uma unidade de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 25 ng de DNA tratado com bissulfito de sódio em um volume final de 50 µL. A ciclagem foi a mesma usada no PCR de validação, sendo que a temperatura de anelamento foi de 56°C. As análises de metilação em LINE-1 foram realizadas por pirosequenciamento usando oligonucleotídeos específicos previamente descritos (LIMA et al., 2011). As análises foram realizadas utilizando o equipamento PyroMark Q96 e o PyroMark Q96 ID Software 2.5 (Qiagen, Hilden, Holanda).

3.4.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando os pacotes Statistical Package for Social Sciences (SPSS), 18 (Chicago, IL), Graph Pad Prism 4.02 (La Jolla, Ca) e R (Foundation for Statistical Computing, Auckland, Nova Zelândia). Testes de Chi-square exato de Fisher foram usados nas análises comparativas entre as variáveis clínicas e demográficas. Nas análises de correlação dos dados dos dois conjuntos de sondas de MLPA foram usados testes de correlação de Pearson e testes de Kappa, perfil de metilação (LINE-1 e gene específico) mediante as variantes polimórficas de *MTHFR*. Análises de cluster hierárquico e componente principal foram realizadas usando o R.

Os pacientes agrupados no *heatmap* (análise supervisionada) gerado nas análises de microarranjo de SDM caso-controle, caso-remissão e controle-remissão foram comparados por análise de T-teste não pareado bicaudal. A análise de componente principal (PCA) dos diferentes perfis de metilação no grupo de casos foi realizado a partir de valores ordenados usando a função *prcomp*. Todos os testes tiveram como base IC 95%, admitindo uma significância de $p < 0,05$. Para avaliar a validade dos perfis de metilação na distinção dos subtipos de LLA-CPB, foi realizada a curva ROC. Para determinar a acurácia, foi tomada como base a área sobre a curva (HAJIAN-TILAKI, 2013). Como ponto de corte foi considerado o ponto que mais se afasta da chance de se obter o resultado ao acaso, além disso, foram observados os valores de maior sensibilidade e especificidade.

3.4.8. Ética

Todas as instituições que colaboram com os estudos epidemiológicos de leucemias infantis por meio do estudo multicêntrico (Anexo I) que assinaram o termo de anuência de participação no estudo e aplicaram o TCLE assinado pelas mães ou representantes legais da criança. Este trabalho faz parte de um estudo epidemiológico denominado “ESTUDOS DE POLIMORFISMOS DE GENES DO METABOLISMO DE FOLATO E METILAÇÃO GLOBAL EM LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS” aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP#626.268 em 28/04/2014) (Anexo II).

4. RESULTADOS

4.1. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-DEMOGRÁFICA DOS CASOS

Inicialmente, 606 casos diagnosticados com LLA-CPB foram selecionados. Destes, foram excluídos 238 casos por se tratarem de LLA-CPB com fusões gênicas, como *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1eKMT2A-r*, portanto, 374 casos seguiram no estudo para as análises de MLPA. Os resultados da identificação de ganhos no cromossomo 21 utilizando o MLPA já se encontram publicados. A Figura 4.1 exemplifica o perfil de MLPA encontrado em amostras sem ganho em número de cópias (4.1A) e três amostras com evidência de ganho no cromossomo 21, P4 (4.1B), P79 (4.1C) e P82 (4.1D).

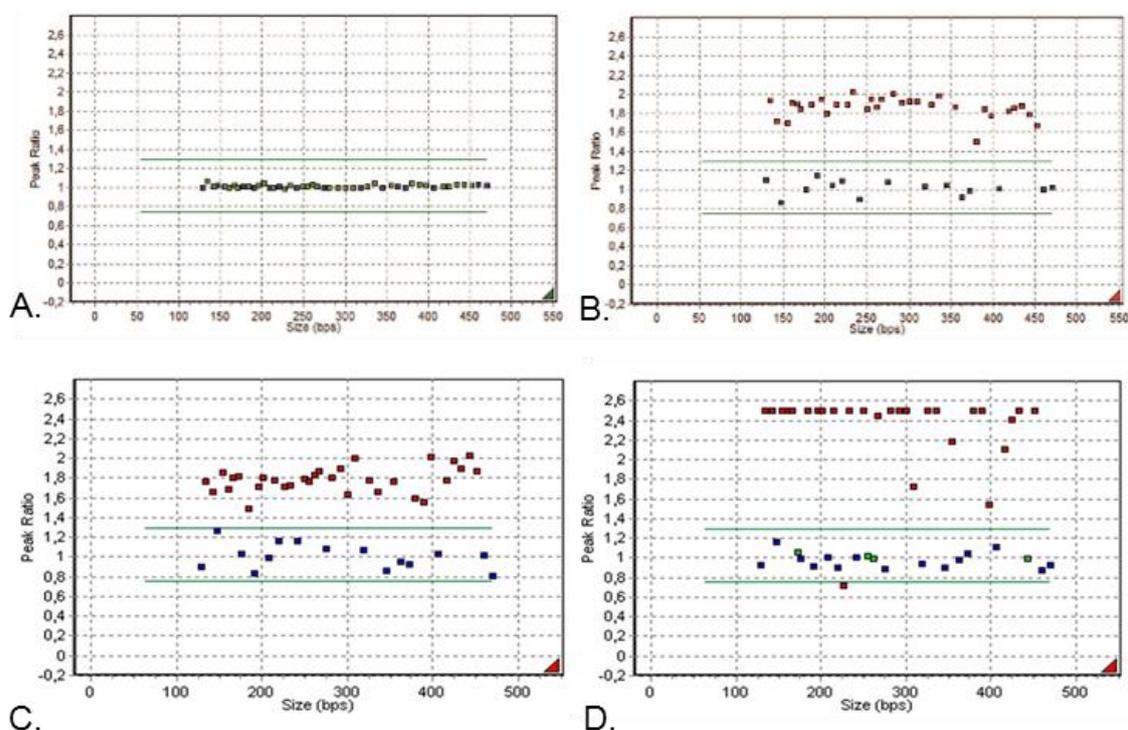


Figura 4.10: Dados representativos do MLPA demonstrando a janela do software de análise Gene-Marker 2.2.0.

A. Pontos de dispersão do MLPA em DNA de sangue de SCUP. B. Amostra P4 com evidência de ganhos em número de cópias no cromossomo 21, assim como P79 (C) e P82 (D). As sondas de referência então representadas em pontos azuis e as sondas-teste em pontos verdes ou vermelhos. As sondas teste e controles encontram-se distribuídas entre as linhas verdes para a amostra controle. Quando há ganho ou perda em número de cópias, as sondas testes são representadas em vermelho e ficam localizadas fora das linhas verdes.

Dentre os pacientes submetidos à nova análise (n=64), não foram observadas diferenças qualitativas quanto à presença ou ausência de CNA no cromossomo 21. Através do teste de coeficiente de correlação de Pearson, foi verificada a correlação positiva entre os dois conjuntos de sondas dos kits A1 e B1 ($r=0,9101$, $r^2=0,8287$, $p<0,0001$). O teste de Kappa [$\kappa=0.661$, erro padrão (SE) = 0.083, IC 95% =0.498-0.825] foi aplicado para avaliar o número de concordâncias e demonstrou que houve apenas pequenas diferenças entre as alturas dos picos obtidos usando os kits P327_A1 e P327_B1 (Figura 4.2).

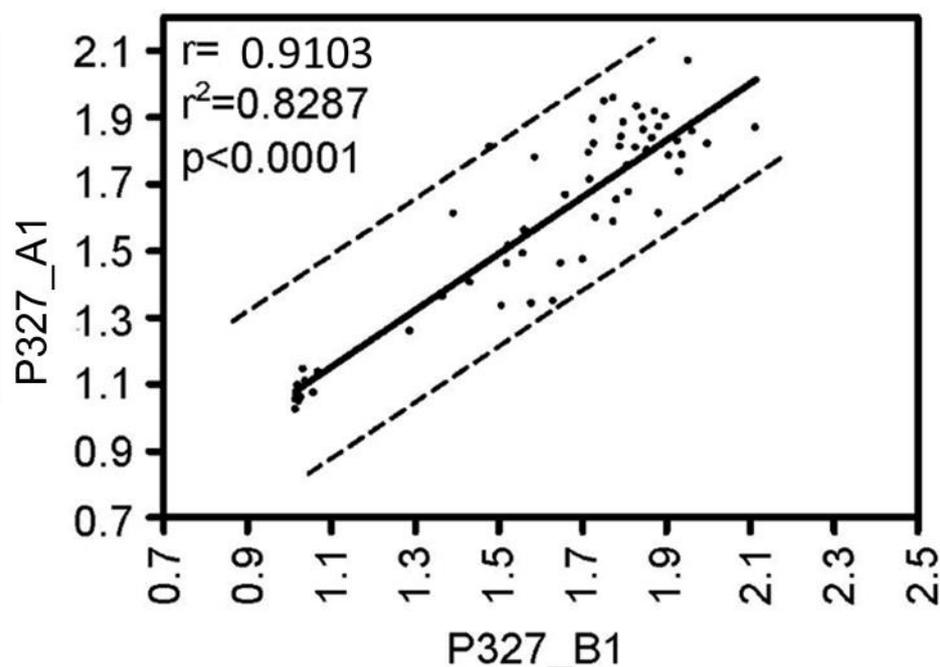


Figura 4.11: Análise de coeficiente de correlação de Pearson dos dados obtidos pelo SALSA MLPA P327_A1 e P327_B1 *probe sets*.

Média das taxas de picos do MLPA para todas as sondas do cromossomo 21 (pontos pretos) foram plotadas para cada paciente; a linha preta demonstra a correlação linear dos dados e a linha tracejada os pontos extremos na dispersão. Correlação de Pearson (r), r -quadrado (r^2). FUKA *et al.*, (2015).

Dos pacientes avaliados, 291 casos não apresentaram CNA nas regiões do cromossomo 21. Por outro lado, em 83 pacientes, foi observado ganho de material genético no cromossomo 21. As características clínicas e demográficas desses pacientes encontram-se apresentadas na Tabela 4.1. Os pacientes positivos no MLPA foram predominantemente da faixa etária entre 2-10 anos e expressam CD10. As demais características são semelhantes entre os grupos com resultado positivo e negativo no MLPA.

Tabela 4.5: Características clínico-demográficas dos casos com resultado positivo e negativo no MLPA

Características	MLPA positivo n (%)	MLPA negativo n (%)	P valor
Total	83 (22)	291 (78)	
Sexo			
Masculino	45 (21)	164 (79)	
Feminino	37 (23)	127 (77)	1,000
Faixa etária, (anos)			
≤1	4 (11)	34 (89)	
2-10	66 (27)	177 (73)	
>10	12 (13)	80 (87)	0,004**
Cor da pele			
Branco	42 (26)	117 (74)	
Não-branco	39 (20)	157 (80)	0,163
Leucometria, x10⁹/L			
<50.000	59 (23)	198 (77)	
>50.000	21 (19)	88 (81)	0,242
Imunofenótipo			
CD10-	0 (0)	29 (100)	
CD10+	83 (24)	262 (76)	<0,001***
Grupo de risco (NCI)			
Risco padrão	47 (25)	139 (75)	
Alto risco	35 (19)	152 (81)	0,127
Status			
Vivo	26 (48)	28 (52)	
Óbito	7 (32)	15 (68)	0,306

Abreviações: n, número; **, p < 0,005. ***, p < 0,001.

A fim de analisar a concordância entre os dois conjuntos de sondas disponíveis para a identificação das alterações de número de cópias no cromossomo 21, parte dos casos (68 amostras) foi avaliada pela versão mais recente do kit de MLPA, SALSA MLPA P327_B1. Na segunda análise, foram incluídas 48 amostras positivas na primeira análise, três amostras hiperdiploides com ganho do cromossomo 21 (Hyp+21) avaliadas pela técnica de citogenética convencional, 5 amostras de LLA SD e 12 casos negativos na primeira análise.

Para facilitar o entendimento, os resultados do MLPA foram ilustrados em um *heatmap* ordenados da região centromérica para a região telomérica. Foi possível agrupar os pacientes com anormalidade no cromossomo 21 em 3 principais grupos pelo agrupamento hierárquico (Figura 4.3). O grupo 1 (inferior, n=8) contemplando os pacientes que apresentaram taxa nos picos de MLPA pouco elevadas, semelhantes aos casos de LLA-CPB sem CNA no cromossomo 21. Já no grupo 2 (intermediário, n=15), podemos observar pacientes com picos intermediários, similares aos casos com SD ou Hyp+21; e no terceiro grupo (topo, n=26), temos pacientes com taxas de picos altos ou muito altos no MLPA. O paciente P5 não foi alocado em nenhum grupo de acordo com a taxa de picos, demonstrando alta variabilidade em relação aos demais pacientes.

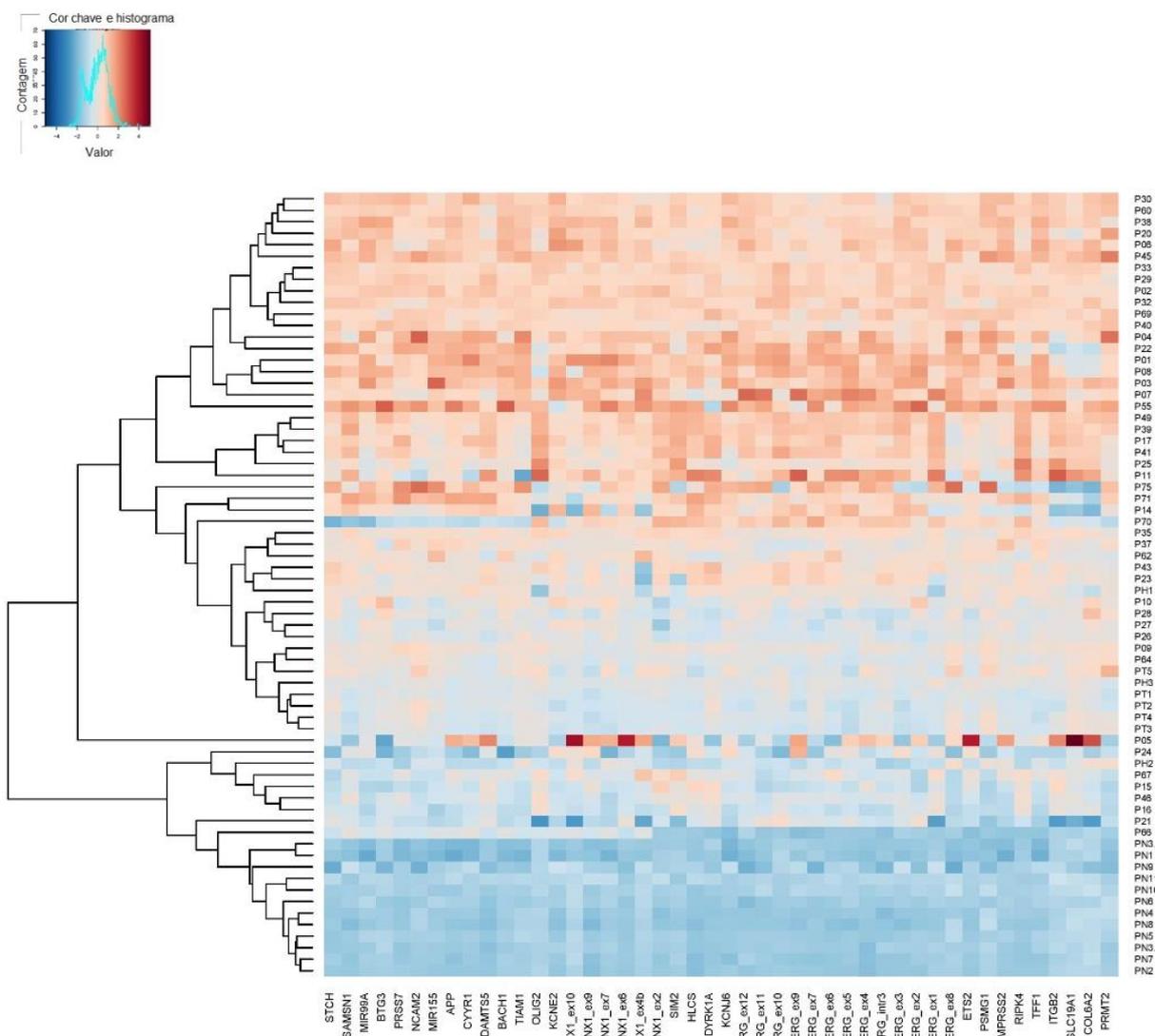


Figura 4.12: Agrupamento hierárquico dos pacientes com e sem CNA no cromossomo 21, controles com SD e Hyp+21 (n=68).

Os resultados foram organizados horizontalmente da região centromérica para a região telomérica no cromossomo 21 e verticalmente de acordo com a similaridade nos picos do MLPA. Esta figura já está publicada em FUKA, FARIAS-VIEIRA, HUMMEL *et al.* (2015).

Os pacientes com alterações no MLPA foram analisados por FISH, de acordo com a disponibilidade de amostra (70 casos, 84,3%) conforme mostra a Tabela 4.2. Três casos apresentaram perfil normal na técnica de FISH com dois sinais para o gene *RUNX1*; em 44 pacientes, foram observados 3-4 sinais de *RUNX1*, enquanto 11 pacientes apresentaram ≥ 5 sinais para *RUNX1* (Figura 4.4 A). Os pacientes com ≥ 5 sinais de *RUNX1* têm média de idade de 55 meses (22-120 meses) e leucometria de $15,85 \times 10^9/L$ (7,2-92,0 $\times 10^9/L$).

Levando em consideração os critérios do NCI, três pacientes, P5, P6 e P9, foram alocados no grupo de alto risco (33,3%). Os pacientes P1, P3, P4 e P5 estavam vivos e em remissão completa até o último *follow-up* em novembro de 2016. Os pacientes P8 e P9 evoluíram para óbito, enquanto as informações dos pacientes P2, P6 e P9 não foram disponibilizadas.

Ambas as metodologias de identificação de CNA no cromossomo 21, MLPA e FISH, foram comparadas em uma análise supervisionada de acordo com o número de sinais para *RUNX1* (Figura 4.4 B). Os casos com ≥ 5 sinais de *RUNX1* apresentaram picos mais altos no MLPA tendo como referência as sondas direcionadas para o cromossomo 21. Os picos de MLPA dos genes que compreendem a RCA foram analisados separadamente. Quando comparados os pacientes com ≥ 5 sinais de *RUNX1* com o grupo de 2-4 sinais, foi possível observar que os últimos apresentaram picos mais baixos, semelhante ao que foi visto nos controles com SD (PT1-5) e em Hyp+21(PH1-3) (Figura 4.4 C).

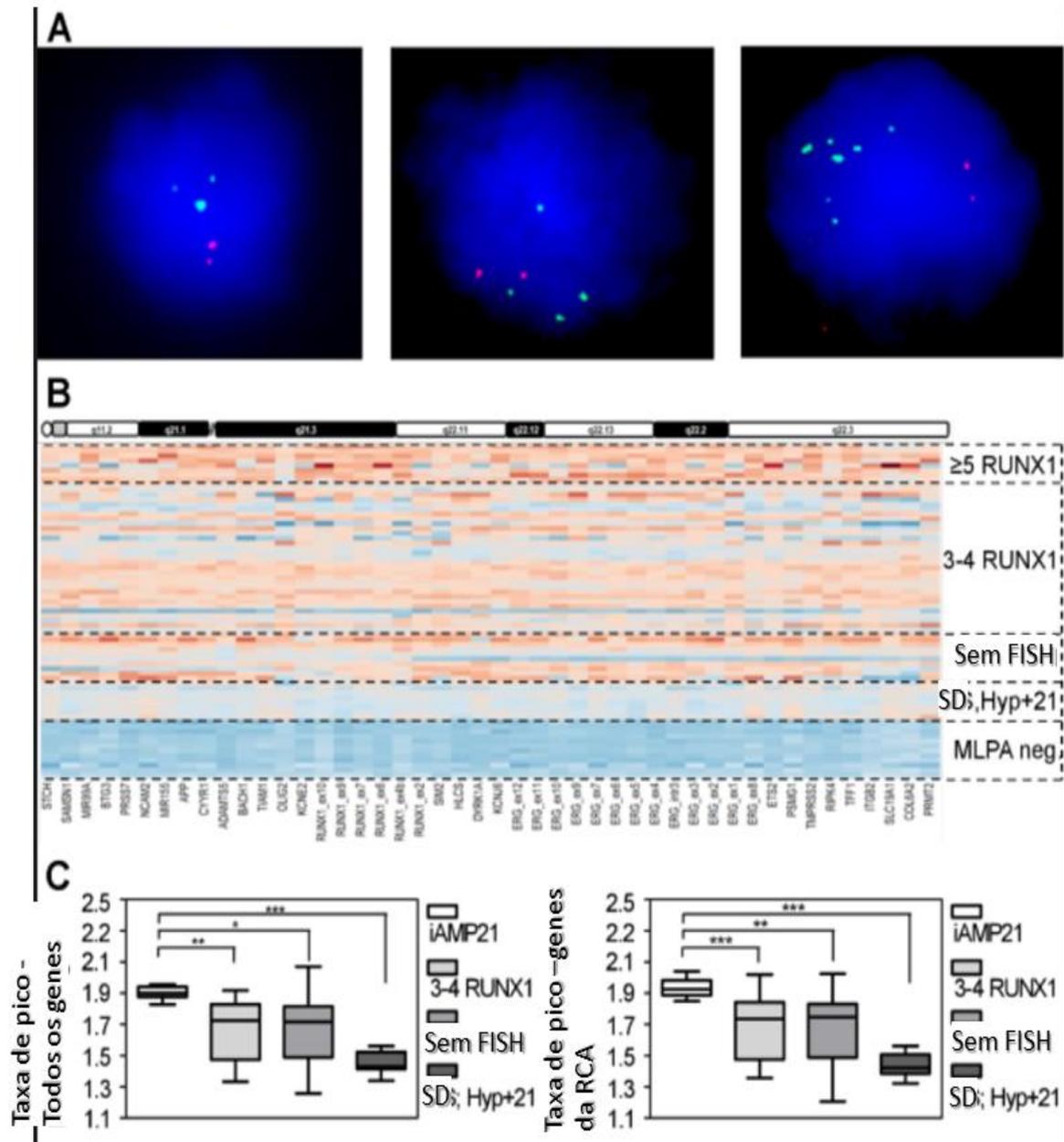


Figura 4.13: Subdivisão dos pacientes com CNA no cromossomo 21 de acordo com os resultados do FISH.

A. FISH em interfase detectando *ETV6* (vermelho) e *RUNX1* (verde) em pacientes com elevados picos no MLPA. O número de sinais de *RUNX1* foi como evidência da diferença entre LLA-CPB com cópias adicionais do cromossomo 21 e ≥ 5 sinais de *RUNX1*. B. Heat map das taxas de picos do MLPA obtidos pelo kit P327_B1. No heat map estão destacados os pacientes com 2-4 sinais de *RUNX1* (n=31), ≥ 5 sinais de *RUNX1* (n=8), sem informações do FISH (n=10), controles com SD e Hyp+21 (n=8), assim como 12 casos com picos normais no MLPA (n=12). C. Diagramas Scatter plot apresentando a taxa média dos picos no grupo contendo todas as sondas do cromossomo 21 (esquerda) e apenas com as sondas da RCA (direita). As linhas tracejadas indicam a média dos valores para cada grupo de pacientes. *, $P < 0,05$; ***, **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ (Teste não pareado bicaudal). Modificado FUKA, FARIAS-VIEIRA, HUMMEL *et al.* (2015).

Também foram feitas PCA para ilustrar a distribuição dos casos de acordo com os picos de MLPA. Os pacientes foram classificados da seguinte forma: 1) Casos com >5 sinais de *RUNX1* por FISH, 2) <5 sinais de *RUNX1*, 3) sem informações do FISH, 4) SD e Hyp+21 e 5) sem alterações no cromossomo 21 (Figura 4.5).

Do total de 66 pacientes, sessenta e três foram segregados em três grupos, de acordo com a análise de PCA: o primeiro grupo consiste de todos os pacientes classificados com ≥ 5 sinais de *RUNX1* no FISH, ou seja, os casos com ≥ 5 sinais de *RUNX1* por FISH; alguns pacientes classificados com 3 ou 4 sinais de *RUNX1* no FISH e quatro pacientes sem resultado no FISH. O segundo grupo consiste em todos os pacientes classificados com SD, a maior parte dos casos com 3-4 sinais de *RUNX1* e 4 pacientes sem dados de FISH. O terceiro grupo contempla os casos negativos no MLPA e um caso sem dados de FISH. Os pacientes que apresentaram perfil no MLPA semelhante ao grupo dos pacientes com ≥ 5 sinais de *RUNX1*, foram denominados de “iAMP21-like”.

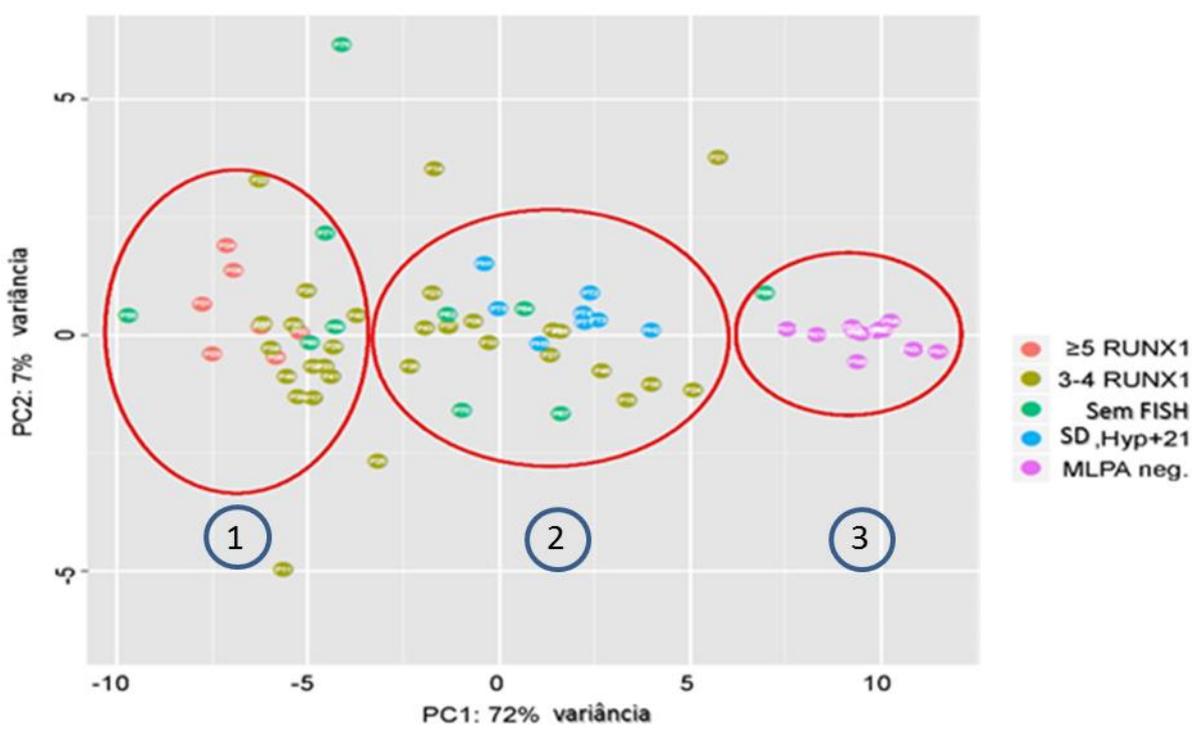


Figura 4.14: Pacientes agrupados pela análise de componente principal.

Os indivíduos foram distribuídos de acordo com a similaridade entre os perfis de picos do MLPA. Os círculos em vermelho demonstram a presença de três principais grupos: 1) corresponde aos casos com picos mais altos no MLPA e é onde estão localizados os casos com ganho de cromossomos 21; 2) casos positivos no MLPA, mas com perfil de picos mais baixo, evidenciando um ganho menor em número de cópias, esse grupo contempla os casos hiperdiploides, casos com Síndrome de Down e casos com 3-4 sinais de *RUNX1* no FISH que são possíveis hiperdiploides; 3) casos negativos no MLPA. Modificado de FUKA, FARIAS-VIEIRA, HUMMEL et al. (2015)

4.2. PANORAMA GERAL DE ALTERAÇÕES EM NÚMEROS DE CÓPIAS

A análise de CNA realizada a partir do microarranjo e metilação incluiu inicialmente 24 casos com ganho no cromossomo 21, três amostras em remissão completa e fora de tratamento e sete controles de SCUP. Todos os casos apresentaram ganho envolvendo o cromossomo 21. Também foram observados ganhos comuns em mais de 80% dos casos para os cromossomos sexuais e para o cromossomo 14 (Figura 4.6).

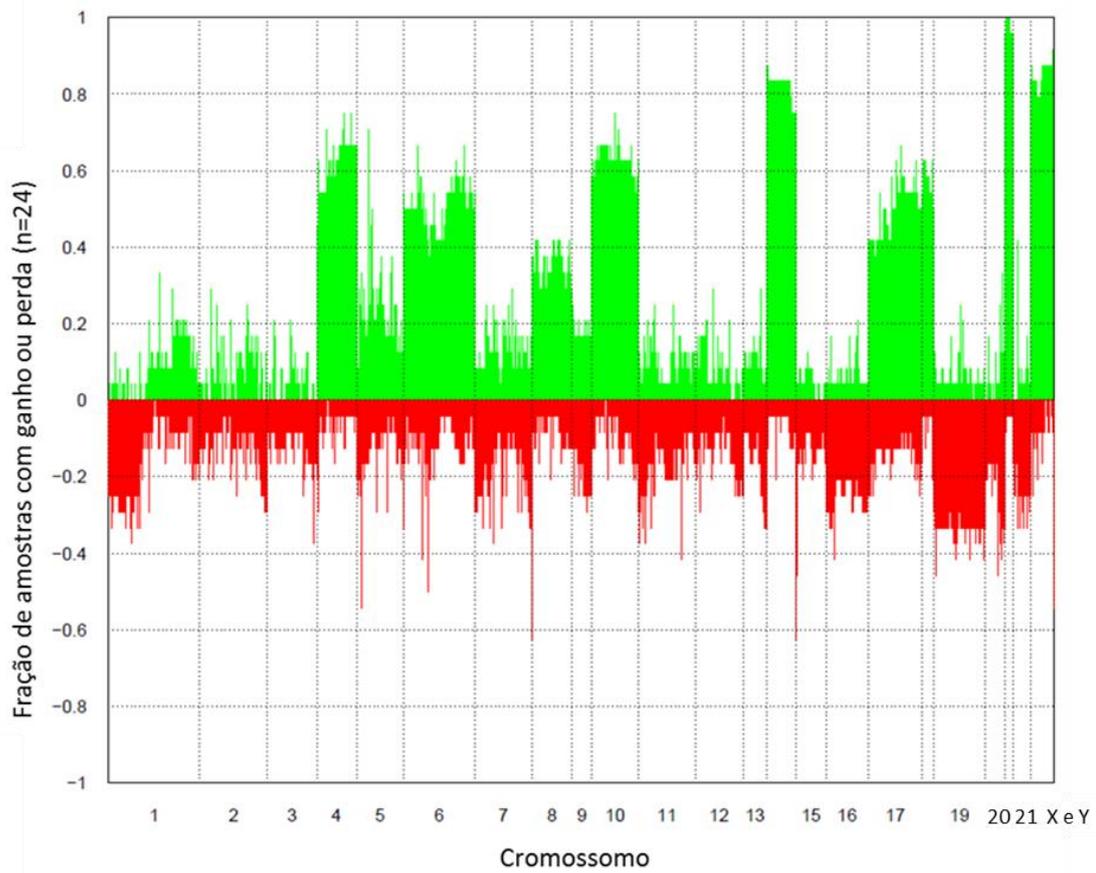


Figura 4.15: Alterações em número de cópias nos casos com ganho no cromossomo 21. Foram considerados como ganhos amostras com a média de seguimento $>0,03$ e como perda, média de seguimento $< -0,03$.

Dentre as amostras de remissão, é possível observar um volume nitidamente menor de CNA (Figura 4.7). Não foram observados ganhos comuns entre as amostras, porém, todas as remissões apresentaram deleção no cromossomo 11. Para a realização desta análise foram removidas as sondas contendo SNPs, porém as sondas dos cromossomos sexuais foram mantidas.

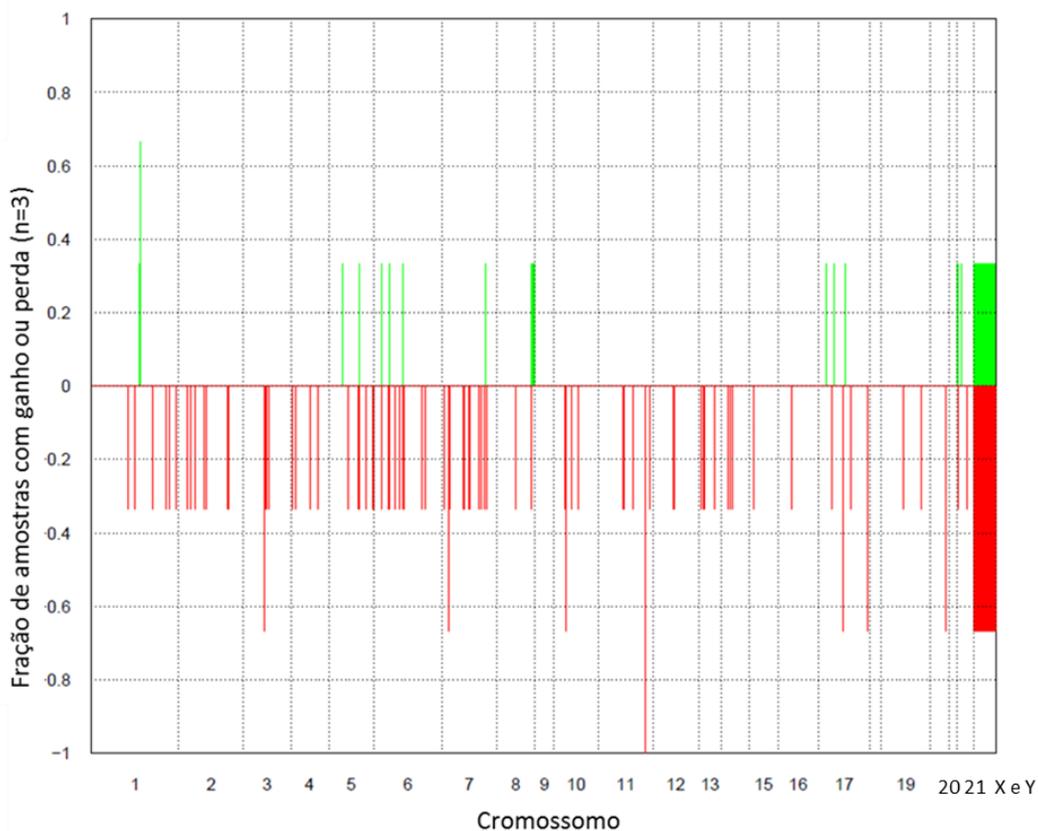


Figura 4.16: Alterações em número de cópias das amostras de remissão em comparação com os controles. Foram considerados como ganhos amostras com a média de seguimento $>0,03$ e como perda, média de seguimento $< -0,03$.

A fim de melhorar o entendimento das CNA, nós analisamos caso a caso individualmente. Nas figuras 4.8 e 4.9 podemos observar diferentes perdas e ganhos cromossômicos. A Figura 4.8A ilustra um caso com ganho dos cromossomos 4, 8, 10, 14, 17, 21, e X, ou seja, trata-se de um caso hiperdiploide. Dando seguimento às análises de número de cópias, além de casos hiperdiploides, também foram identificados casos com deleções (Figura 4.8B). É importante ressaltar que este caso apresenta deleção completa do cromossomo 7, no qual está localizado o gene *IKZF1*. Esta amostra também apresenta deleções dos cromossomos 9, 15, 19 e 20 e ganho dos cromossomos 10, 14, 17, 18 e 21. O caso apresentado na Figura 4.8C, apesar de ser hiperdiploide, apresenta deleção telomérica de 13q, deleção da região 15q, deleção de 17p e amplificação de quase todo o cromossomo 17. Outro caso interessante com alterações pouco frequentes está ilustrado na Figura 4.9. Trata-se de uma amostra com a fusão *ETV6-RUNX1*, +21 e de deleção no 6q.

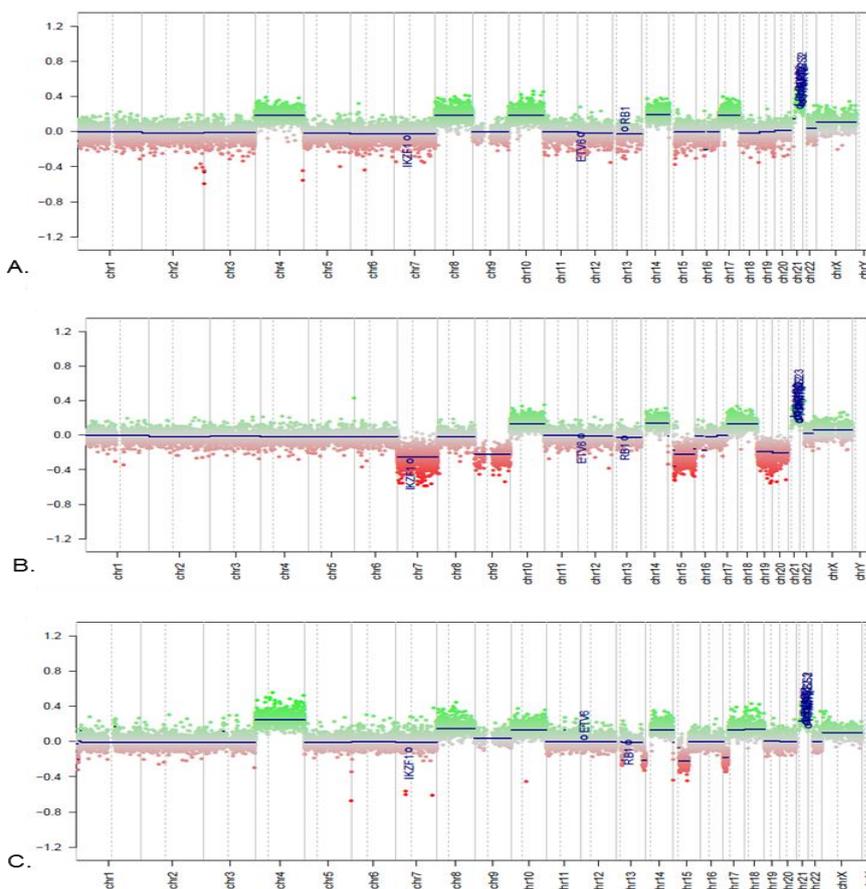


Figura 4.17: Gráfico da análise de CNA por microarranjo demonstrando diferentes ganhos e perdas cromossômicas em três diferentes casos.

A. Amostra P01 com hiperdiploidia clássica envolvendo ganhos dos cromossomos 4, 8, 10, 14, 17 e 21. B. Amostra P05 com deleções nos cromossomos 7, 9, 19 e 20. C. Amostra P64, hiperdiploide apresentando deleções nos cromossomos 15 e 17.

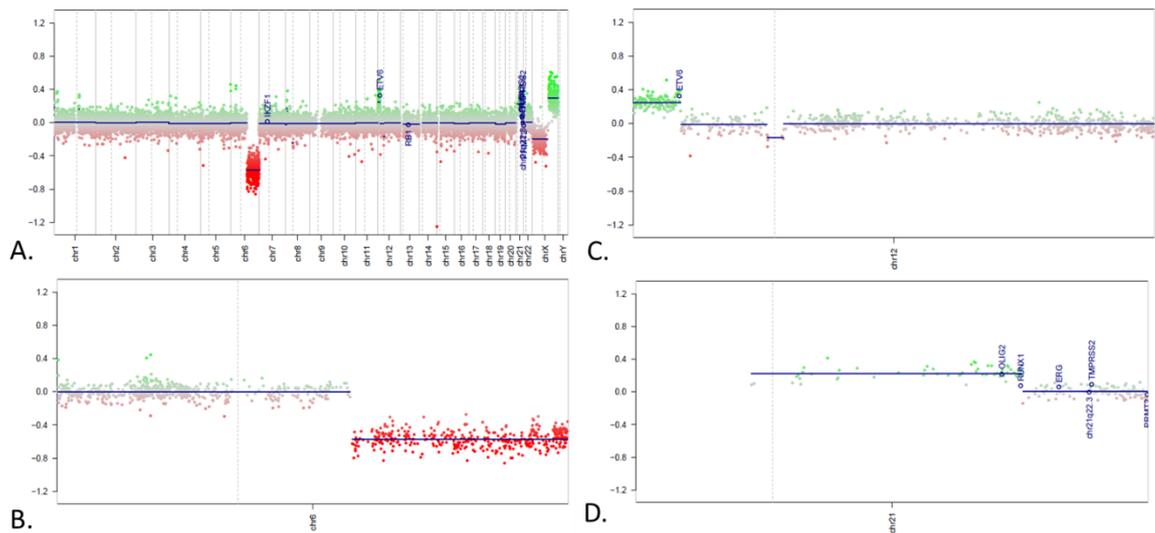


Figura 4.18: Gráfico evidenciando alterações complexas da amostra P66. A. CNA de todos os cromossomos. B. Gráfico demonstrando deleção no cromossomo 6q. C. Ganho no cromossomo 12 envolvendo o gene *ETV6*. D. Gráfico demonstrando o ganho do cromossomo 21, com ponto de quebra envolvendo o gene *RUNX1*.

Dentre as 34 amostras analisadas, foi identificado um caso com iAMP21 (P79). A amostra apresenta 47 cromossomos e o perfil de ganho no cromossomo 21 é compatível com a amplificação. A Figura 4.10A demonstra que, numericamente, esta amostra apresenta número cromossômico normal para quase todos os cromossomos, sendo que no cromossomo 21 (Figura 4.10B), há uma região com padrão normal de CNA, seguida por uma região com alto nível de ganho (mais de 2x) envolvendo os genes *RUNX1* e *ERG*, seguida por uma região de deleção na região telomérica. Ou seja, o caso iAMP21 não apresenta um padrão linear de ganho e número de cópias, mas sim um alto nível de ganho na RCA e deleção na RCD.

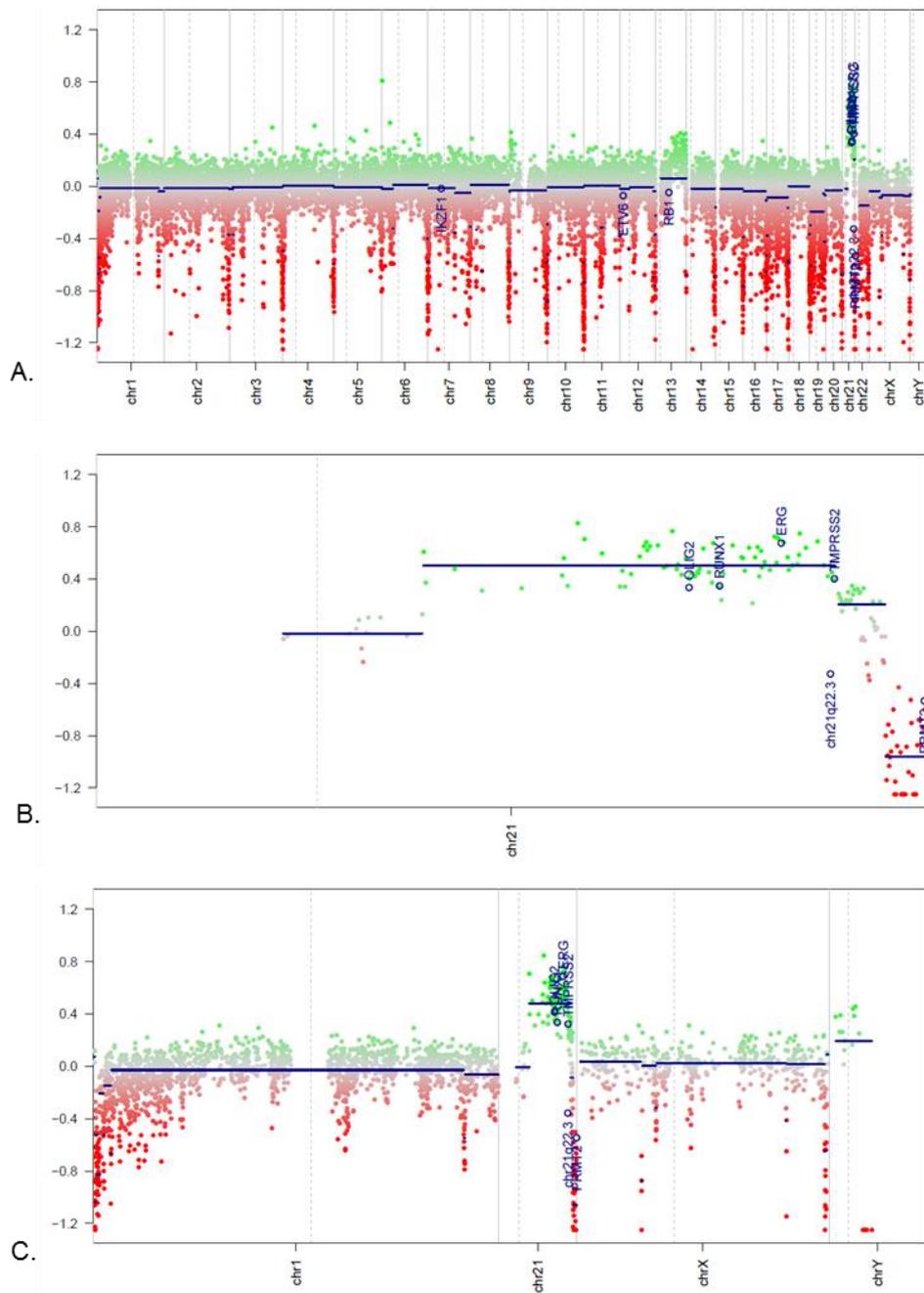


Figura 4.19: Gráfico de das CNAs da amostra P79 (iAMP21).

A. Perfil geral demonstrando que existe ganho apenas envolvendo o cromossomo 21. B. Cromossomos 21 apresentando uma porção normal, uma região com alto nível de amplificação envolvendo o *RUNX1* e deleção na região subtelo mérica. C. Análise do cromossomo sexual em separado evidenciando ganho do cromossomo Y. Neste gráfico foram plotados também as CNA dos cromossomos 1 e 21 apenas para servirem de referência.

Na Figura 4.11, encontra-se o sumário dos resultados do microarranjo. Houve ganho do cromossomo 21 em todos os casos, a segunda alteração mais frequente foi o ganho dos cromossomos X, 14, 18, 17 e 4, respectivamente. Portanto, os casos foram classificados como hiperdiplóides (47-57cromossomos) em sua maioria, exceto pelos casos P66 com a fusão *ETV6-RUNX1* +21 e o caso P47 com *iAMP21*.

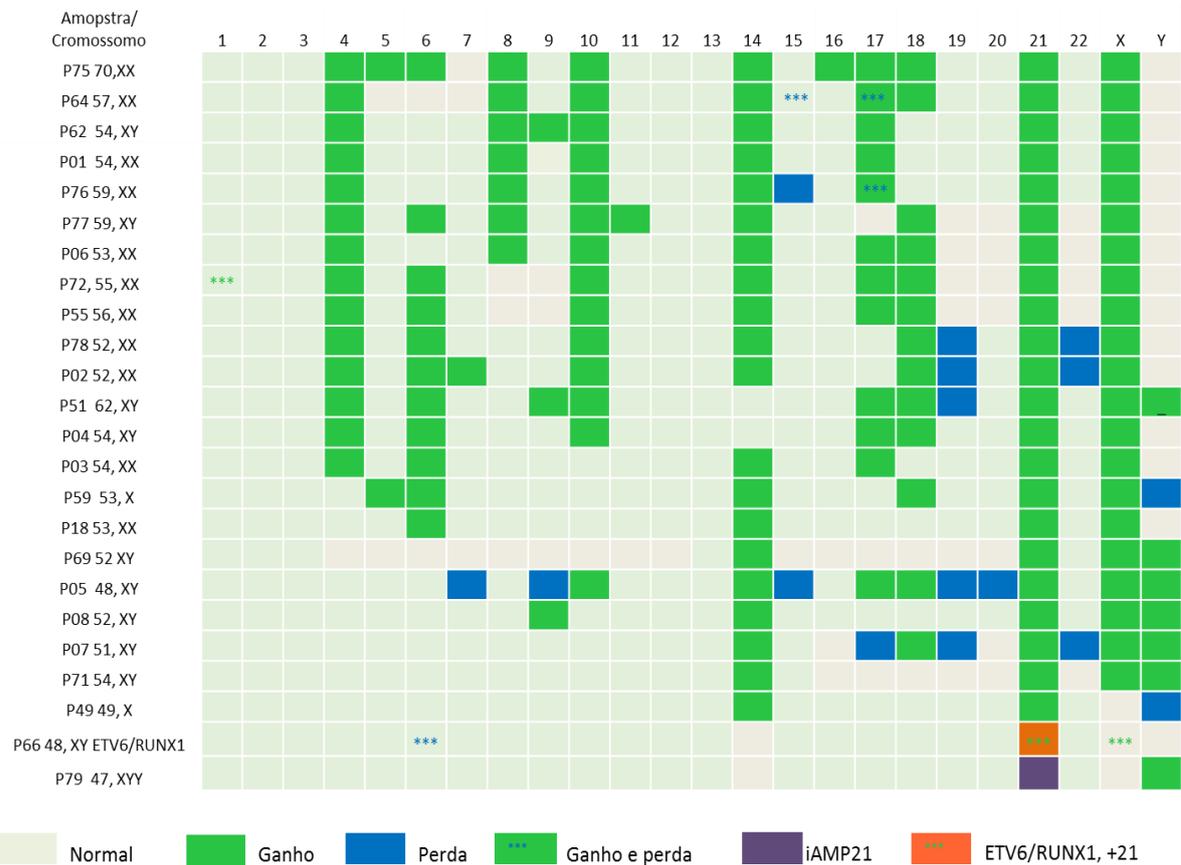


Figura 4.20: Sumário das alterações em número de cópias obtidas pelo microarranjo.

4.3. ANÁLISE DE ALTERAÇÕES EM NÚMERO DE CÓPIAS POR FISH

Mediante os achados de número de cópias cromossômicas por meio do microarranjo de metilação, nos quais verificamos que a maior parte das amostras com ≥ 5 sinais de *RUNX1* identificados no FISH foram classificadas como hiperdiplóides, aliados à carência de resultados de citogenética convencional na nossa série de casos, nós confirmamos os resultados do microarranjo e retestamos os casos positivos na análise de MLPA usando a técnica de FISH com sondas direcionadas para os cromossomos 4, 10, 14, 17, 18, 21, X e Y, os principais cromossomos adicionados nas LLAs hiperdiplóides, para assim determinar a ploidia dessas amostras. Esta escolha foi feita devido ao fato da carência de resultados pela citogenética convencional. O fluxograma (Figura 4.12) ilustra o número de casos iniciais e os que foram incluídos em cada etapa de avaliação do FISH.

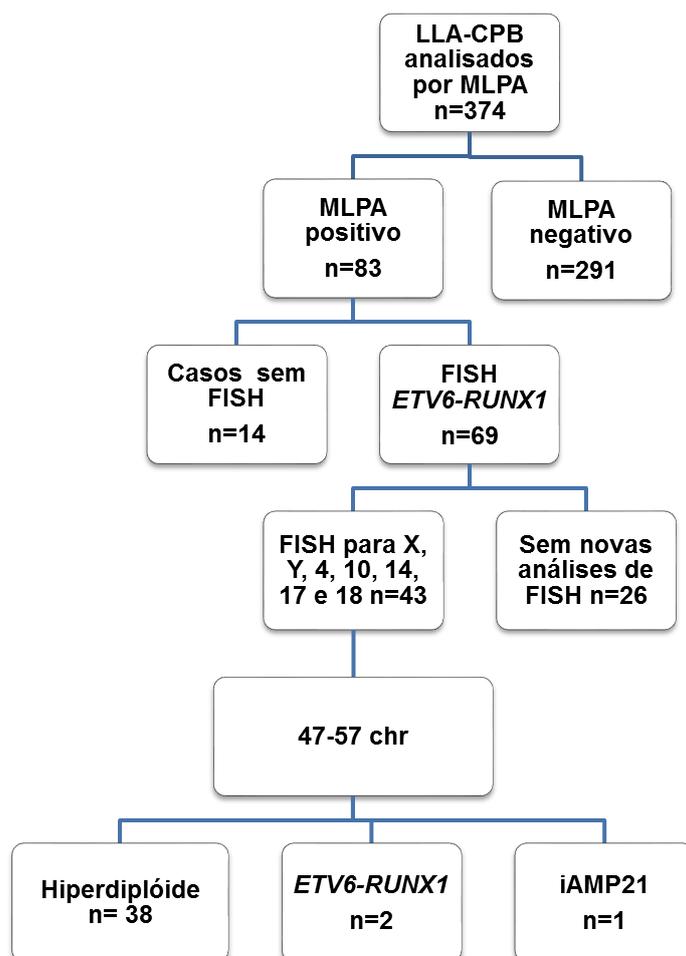


Figura 4.21: Sumário dos casos incluídos nas análises de FISH com sondas cetroméricas e teloméricas. O número pode variar devido às falhas na realização do teste.

Dez casos foram caracterizados por todas as abordagens, ou seja, foram

analisadas por MLPA, pelas diferentes sondas de FISH, *ETV6-RUNX1* e direcionadas aos cromossomos 4, 10, 14, 17, 18, 21, X e Y, e pelo microarranjo de metilação. Visto que a análise de número de cópias usando o Infinium HumanMethylation450 BeadChip ainda é recente, realizamos a comparação entre os dois métodos. Conforme apresentado na Figura 4.13, houve apenas um resultado discrepante, pois, a amostra P49 apresentou ganho do cromossomo 14 apenas na análise de microarranjo. Os demais resultados foram todos concordantes.

Devido à similaridade dos resultados, nós consideramos as frequências de ganhos ou perdas cromossômicas em 54 casos, conforme a Tabela 4.2, independente se o CNA foi analisado pela técnica de microarranjo e/ou por FISH. O número total de casos varia devido à falha na análise de FISH em algumas amostras.

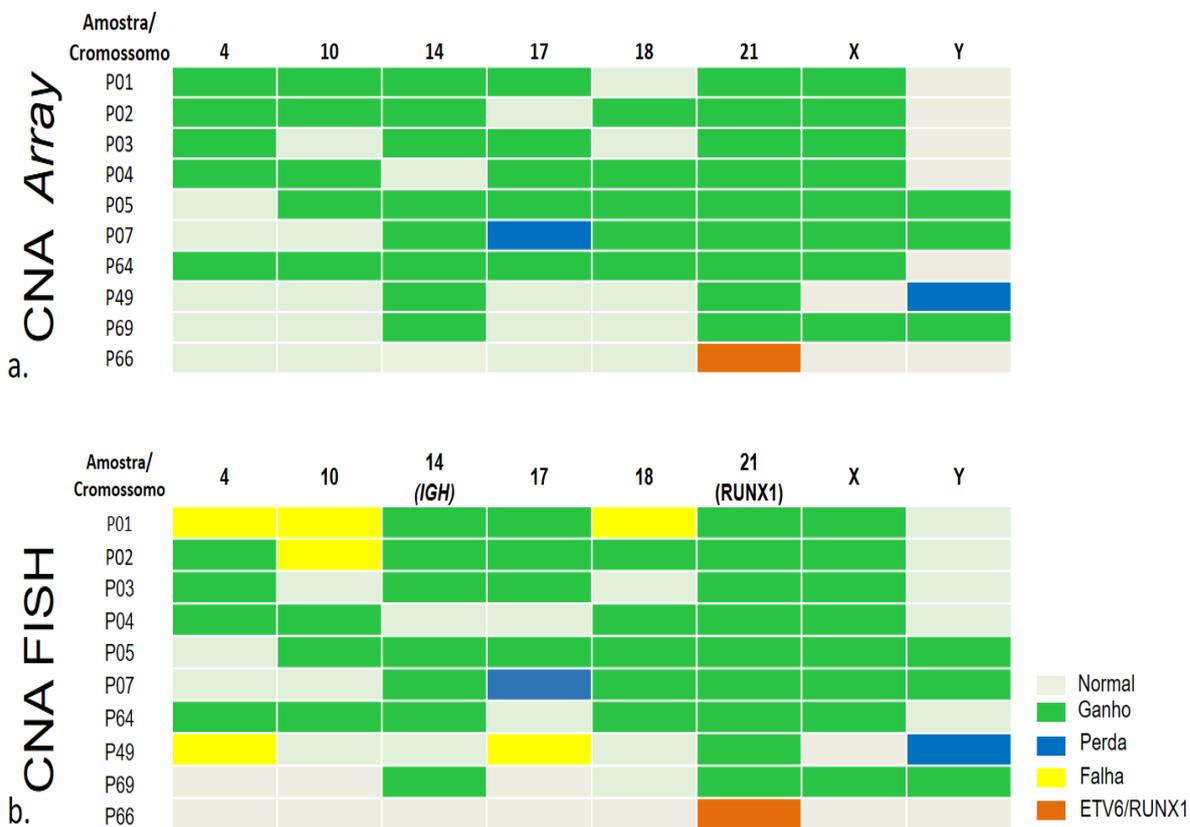


Figura 4.22: Comparação do perfil de alterações em número de cópias usando a técnica de microarranjo e FISH com sondas específicas para cada cromossomo. A. Heat map das alterações em número de cópias obtidas na técnica de microarranjo. B. Heat map das alterações em número de cópias obtidas na técnica de FISH.

Tabela 4.6: Frequência de ganhos cromossômicos de acordo com as análises de FISH e CNA por microarranjo para os principais cromossomos adicionados nas LLA-CPB hiperdiplóides

Cromossomo	Hiperdiplóide n (%)	<i>ETV6-RUNX1</i> n (%)	iAMP21 n (%)
Cromossomo 4	28/48 (58)	--	--
Cromossomo 10	27/47 (57)	--	--
Cromossomo 14	42/50 (84)	--	--
Cromossomo 17	23/43 (53)	1/2 (50)	--
Cromossomo 18	28/47 (60)	1/2 (50)	--
Cromossomo 21	50/50 (100)	2/2 (100)	--
Cromossomo X	43/50 (86)	1/2 (50)	--
Cromossomo Y	11/27 (41)	--	1/1 (100)

Abreviações: n, número.

A frequência de ganhos cromossômicos foi variável dentro do grupo de casos (Tabela 4.2). O ganho do cromossomo 21 foi observado em todos os casos, seguido pelo ganho do X (86%), cromossomo 14 (84%), cromossomo 18 (60%), cromossomo 4 (58%), cromossomo 10 (57%) e cromossomo 17 (53%). Dois pacientes (P48 e P52) apresentaram a fusão *ETV6-RUNX1*. Em ambos os casos, também houve ganho do cromossomo 21. Por outro lado, o caso P52, além do ganho do 21, apresentou ganho dos cromossomos 17, 18, X e 21 (Figura 4.14A). As perdas dos cromossomos Y (P49) e 17 (P07) também foram observadas.

Além da realização de FISH usando sonda direcionada ao gene *RUNX1*, também foram usadas as sondas centroméricas e teloméricas para o cromossomo 21, permitindo a determinação da quantidade de números de cópias cromossômicas nos casos que são hiperdiplóides com ganho do 21. O único paciente iAMP21 também apresentou ganho do cromossomo Y e deleção de21q (Figura 4.14B e C), ao passo que o ganho do cromossomo 21 foi confirmado nos casos hiperdiplóides (Figura 4.14D e E).

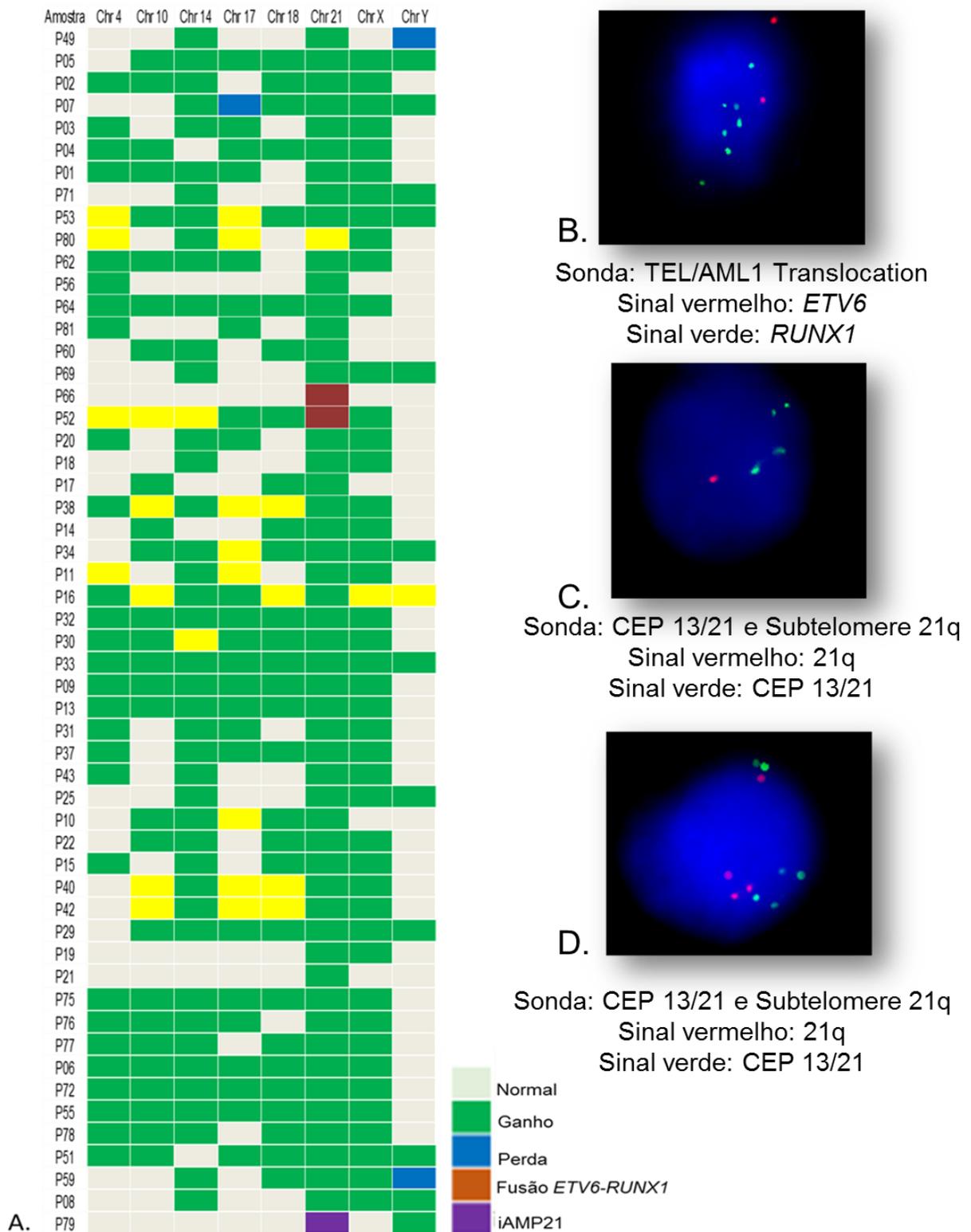


Figura 4.23: Ilustração do perfil de alterações em número de cópias na série de casos de LLA-CPB.

A. *Heatmap* ilustrando o número de cópias para os principais cromossomos adquiridos nas LLAs hiperdiplóides. B. FISH interfásico demonstrando duas cópias do gene *ETV6* (vermelho) e sete cópias do gene *RUNX1* (verde) na amostra P79 (iAMP21). C. FISH interfásico apresentando 6 sinais para os centrômeros (cromossomos 13/21-verde) e um sinal de telômero (21q-vermelho) da amostra P79. D. FISH interfásico de uma amostra hiperdiplóide com 6 sinais de centrômero (cromossomos 13/21) e quatro sinais de telômero (21q).

Os resumos das características clínicas dos pacientes incluídos nas diferentes análises de CNA encontram-se apresentados na Tabela 4.3. A técnica de MLPA serviu como ferramenta inicial para identificar os ganhos e perdas no cromossomo 21, portanto, apenas casos positivos na análise de MLPA seguiram para as análises adicionais. Estes casos foram caracterizados quanto as alterações cromossômicas e considerados como padrão para as análises de perfil de metilação.

Tabela 4.7: Frequência absoluta e relativa dos casos de LLA-CPB incluídos nas diferentes abordagens para identificação das alterações em número de cópias

Características	MLPA + n (%)	FISH <i>ETV6- RUNX1</i>	FISH centr/telom	CNA microarranjo
Total	83 (100,0)	70 (100,0)	44 (100,0)	24 (100,0)
Sexo				
Masculino	47 (56,6)	41 (58,6)	26 (59,1)	13 (54,2)
Feminino	36 (43,4)	29 (41,4)	18 (40,9)	11 (45,8)
Faixa etária, (anos)				
≤1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
2-10	71 (85,5)	61 (87,1)	39 (88,6)	23 (95,8)
>10	12 (14,5)	9 (12,9)	5 (11,4)	1 (4,2)
Leucometria, x10⁹/L				
<50.000	59 (72,8)	50 (73,5)	33 (76,7)	17 (70,8)
>50.000	22 (27,2)	18 (26,5)	10 (23,3)	7 (29,2)
Imunofenótipo				
CD10-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
CD10+	83 (100,0)	70 (100,0)	44 (100,0)	24 (100,0)
Grupo de risco (NCI)				
Risco padrão	49 (60,5)	42 (61,8)	28 (65,1)	16 (66,7)
Alto risco	32 (39,5)	26 (38,2)	15 (34,9)	8 (33,3)
Status				
Vivo	30 (71,4)	22 (66,7)	16 (72,7)	7 (58,3)
Óbito	12 (28,6)	11 (33,3)	6 (27,3)	5 (41,7)

Abreviações: MLPA+, MLPA positivo; n, número; centr, centromérico; telom, telomérico. As frequências relativas foram distribuídas em colunas visto que uma categoria (coluna) é parte da outra.

4.4. PERFIL DE METILAÇÃO DAS LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS AGUDAS COM ALTERAÇÕES NO CROMOSSOMO 21

4.4.1. Análise de metilação gênica

O perfil de metilação das LLA-CPB nos casos já caracterizados com ganhos no cromossomo 21 foi realizado usando a técnica de microarranjo de metilação de DNA, conforme o desenho do estudo. Na análise de componente principal com os 10.000 sítios CpG mais variáveis entre as amostras, foi possível observar a formação de dois grupos distintos, sendo que o primeiro compreende os controles e as remissões e o segundo grupo é composto pelos casos com ganhos no cromossomo 21 (Figura 4.15). Podemos observar que as amostras de controle e de remissão apresentaram alta similaridade entre si e são claramente distintas dos casos de LLA-CPB com ganho no cromossomo 21, que formam um grupo mais heterogêneo.

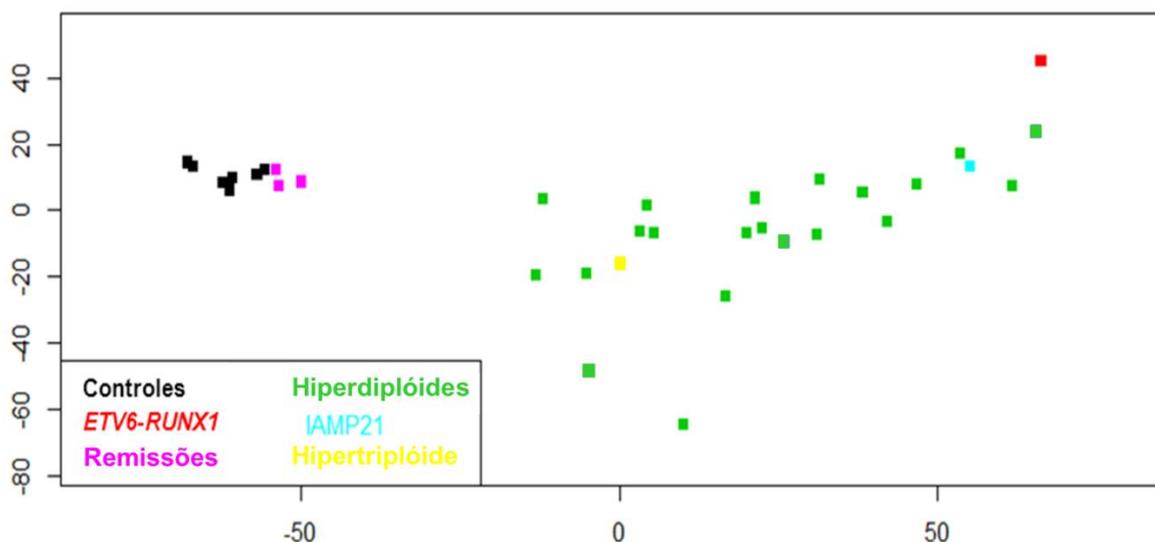


Figura 4.24: Pacientes agrupados pela análise de componente principal de acordo com a similaridade do perfil de metilação das 10.000 sondas mais variáveis.

Na análise supervisionada entre casos e controles foram encontrados 34.046 sítios CpG diferencialmente metilados (p ajustado $<0,001$). A fim de facilitar a visualização, a partir dos 5.000 sítios com menores valores de p , foi gerado um *heatmap*, porém não foi possível visualizar todas as sondas diferencialmente metiladas devido a limitações do *software*. Nele, é possível observar que os perfis de metilação dos casos e controles são muito distintos, enquanto os controles e remissões apresentam perfil semelhante para estes 5.000 sítios (Figura 4.16A). Apesar da semelhança entre esses dois últimos grupos, também foram feitas análises comparativas entre os casos ao diagnóstico e na remissão e entre controles e

remissão. Quando os casos foram comparados com as remissões, foram observados 9.101 sítios diferencialmente metilados (p ajustado $<0,001$) e, mais uma vez, controles e remissões apresentaram perfil bastante semelhante entre si (Figura 4.16B).

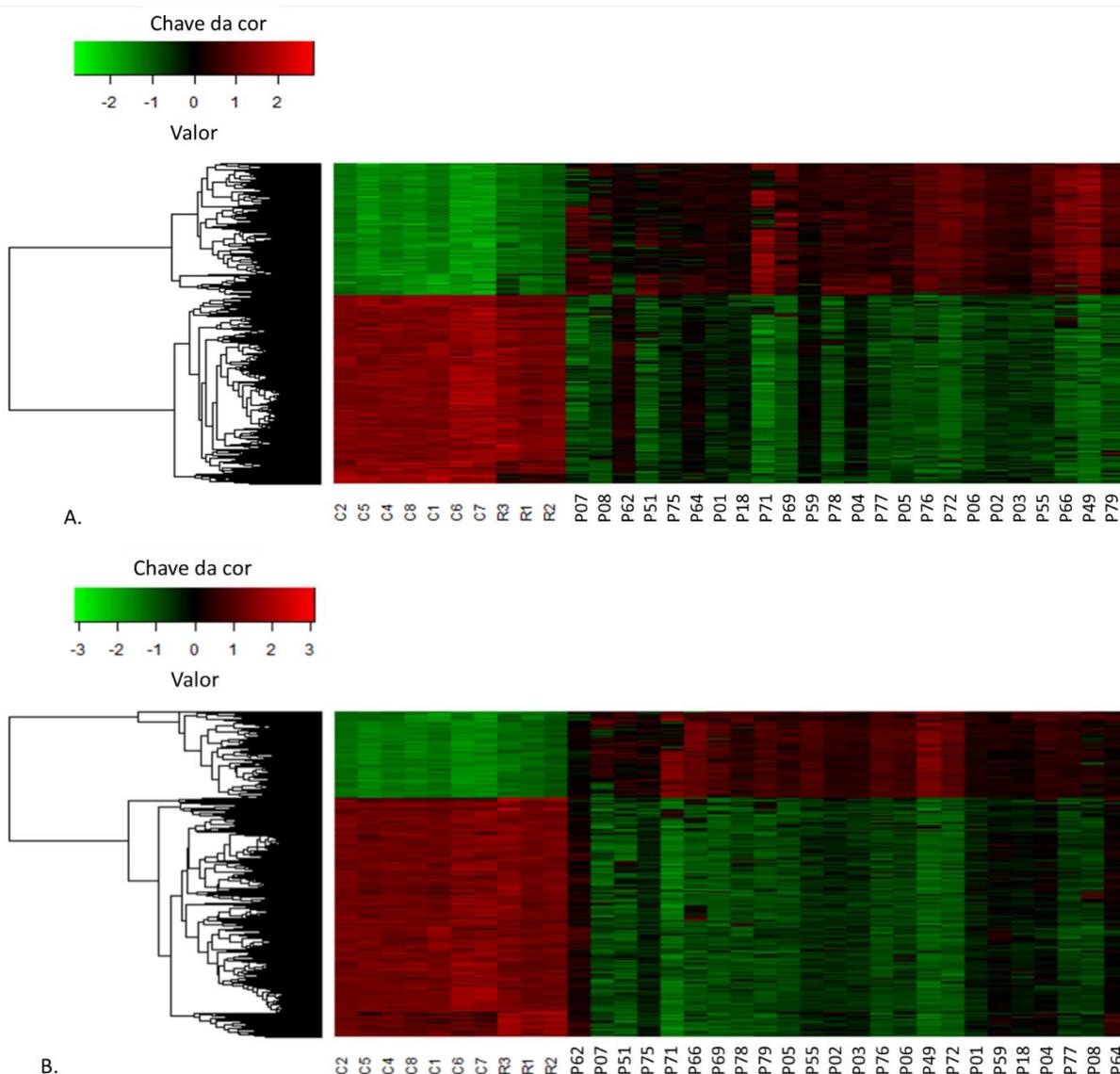


Figura 4.25: Agrupamento hierárquico dos casos, controles e amostras de remissão de acordo com os sítios diferencialmente metilados.

A. Análise caso vs controles com os 5.000 sítios diferencialmente metilados (p ajustado $<0,001$). B. Análise caso vs remissão com 5.000 sondas diferencialmente metiladas (p ajustado $<0,001$). As regiões hipermetiladas encontram-se destacadas em vermelho e as regiões hipometiladas em verde. Abreviação: C, controle; R, remissão; P, caso.

Quando as remissões foram comparadas aos controles, foram encontrados apenas 19 sítios diferencialmente metilados com um ponto de corte de valor de p ajustado $< 0,05$ (Figura 4.17). Apesar de essa diferença ser sutil, gera especulações interessantes no sentido de que o perfil de metilação em regiões do gene *ARID3A* são semelhantes entre caso e remissão.

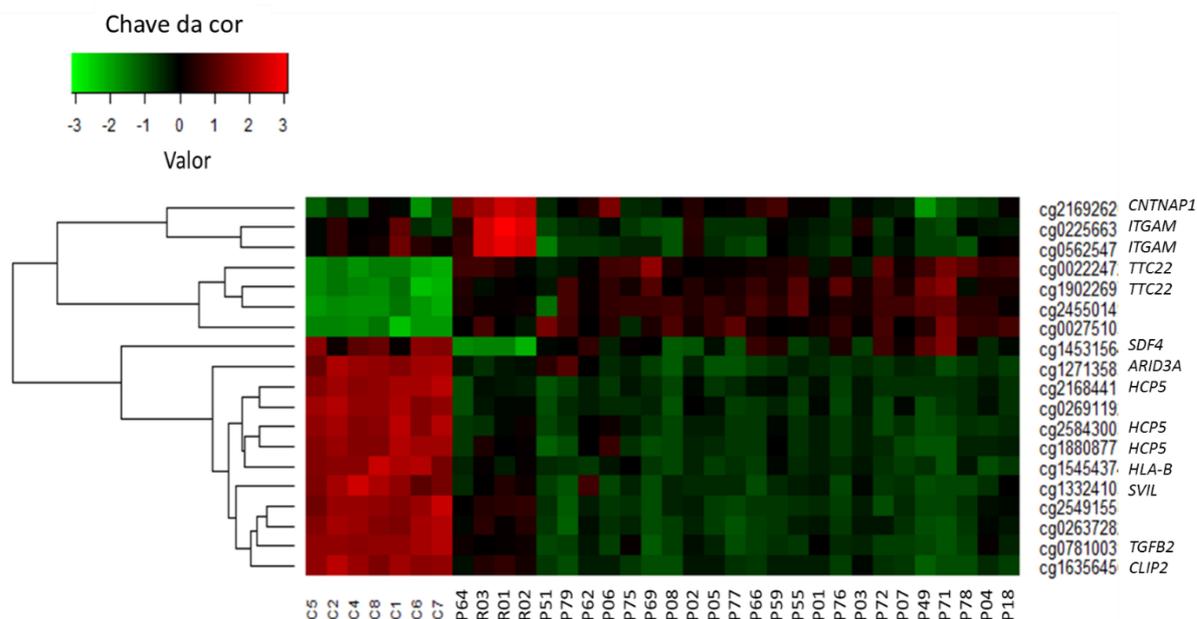


Figura 4.26: Agrupamento hierárquico dos controles e amostras de remissão de acordo com os sítios diferencialmente metilados.

Na análise controle vs remissão, foram identificados 19 sítios diferencialmente metilados (p ajustado $< 0,05$). As regiões hipermetiladas encontram-se destacadas em vermelho e as regiões hipometiladas, em verde.

Tomando como base a análise caso vs controle e caso vs remissão, com o intuito de identificar se houve predomínio de sítios diferencialmente metilados (SDM) em alguma região gênica, comparamos a frequência da distribuição de sondas no *chip* com a frequência da distribuição dos SDM em nossa análise. De acordo com a região gênica (Figura 4.18A e B), verificamos que não houve predomínio de região com alterações no perfil de metilação. Também analisamos a distância entre os sítios CpG alterados e as ilhas, comparando com a distribuição dessas regiões no *chip*. Observamos que no grupo de casos, a maior parte dessas alterações encontra-se em ilhas CpG (Figura 4.18C). O contrário foi visto na análise caso vs remissão, nas quais houve uma discreta diminuição de SDM nas ilhas CpG (Figura 4.18D).

Neste mesmo sentido, uma vez que o nosso estudo tem como foco LLA-CPB com CNA no cromossomo 21, também verificamos se houve predominância de SDM por cromossomo, comparando a frequência esperada ao acaso, de acordo com o número sondas por cromossomo, com a frequência observada na análise caso vs controle. A distribuição de SDM por cromossomo não foi uniforme, sendo que o número de SDM foi menor que o esperado para os cromossomos 1, 16, 17, 19, 22, X e Y, e maior que o esperado para os cromossomos 2, 3, 4, 5, 8, 10, 14 e 21. Não houve diferença entre as frequências observadas e esperadas de SDM para os cromossomos 7, 9, 11, 12, 13, 15 e 20 (Figura 4.18E). Também foram vistas diferenças entre as frequências observadas e esperadas na análise caso vs remissão, também com aumento na frequência observada de SDM no cromossomo 21 (Figura 4.18F).

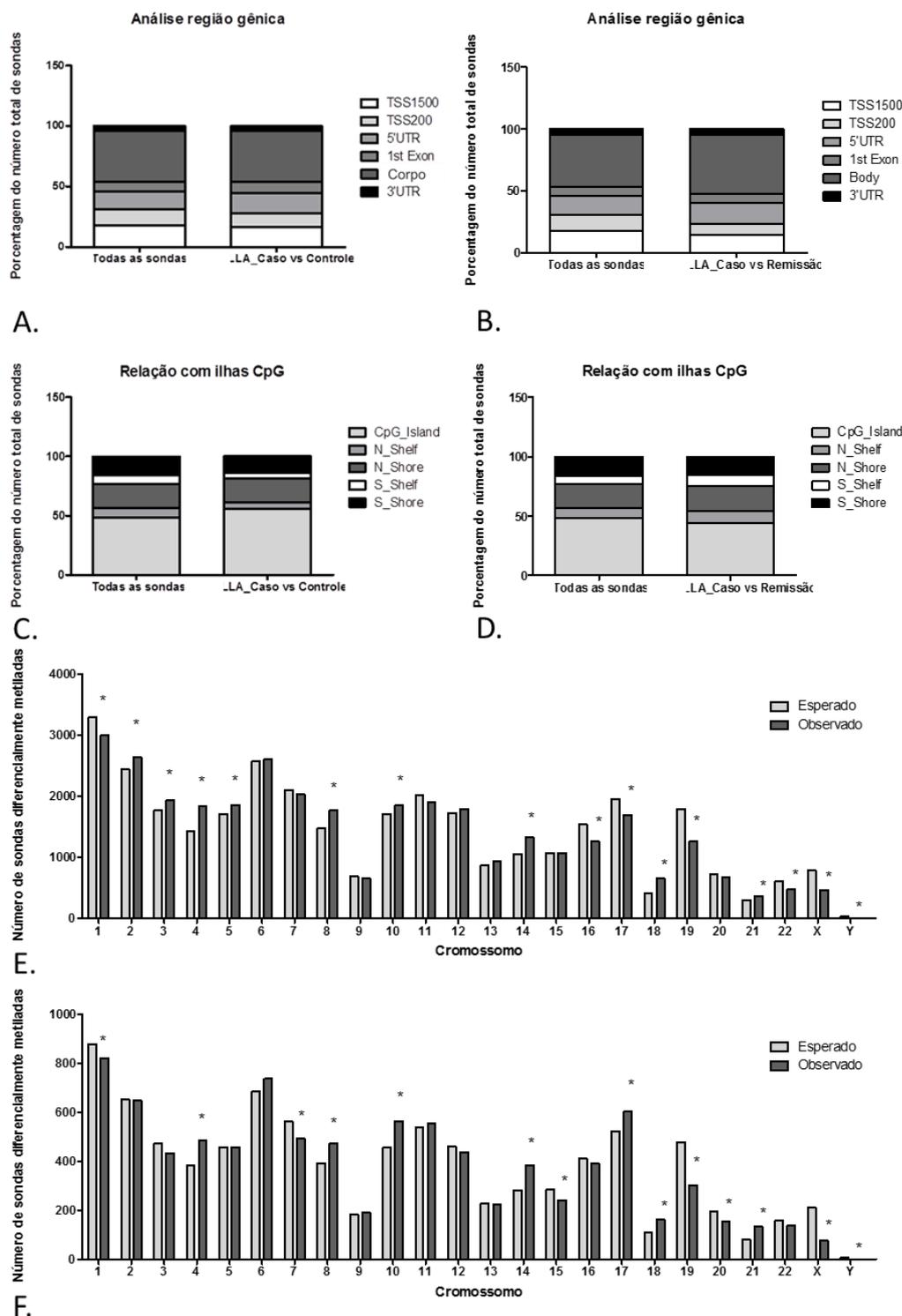


Figura 4.27: Distribuição das frequências observada e esperada de sítios diferencialmente metilados.

A. Frequência dos sítios diferencialmente metilados na análise caso-controle. B. Frequência dos sítios diferencialmente metilados na análise caso-remissão. C. Frequência da distribuição de regiões CpG de acordo com a distância das ilhas CpG em todas as sondas contidas no microarranjo e na análise caso-controle e D. Caso-remissão. E. Frequência observada e esperada dos sítios diferencialmente metilados por cromossomo na análise caso-controle e F. Caso-remissão.

Abreviações: 3' UTR, 3' *untranslated region*; 5' UTR, 5' *untranslated region*; TSS, *Transcription start site*. Ilhas CpG, região com >50 CG; Shore, até 2Kb de distância da ilha CpG; Shelf, 2-4 Kb de distância da ilha CpG.

Uma vez que as sondas encontradas diferencialmente metiladas na comparação entre casos e controles encontravam-se preferencialmente em ilhas CpG, também comparamos a frequência de regiões hipometiladas e hipermetiladas nessas regiões. Curiosamente, a série de casos foi caracterizada por hipermetilação de ilhas CpG tanto na análise caso-controle, com 94,1% dos SDM em ilha CpG hipermetiladas, quanto na análise caso-remissão, com 87,9% de regiões hipermetiladas. Este achado aponta para uma regulação negativa da expressão gênica (Figura 4.19).

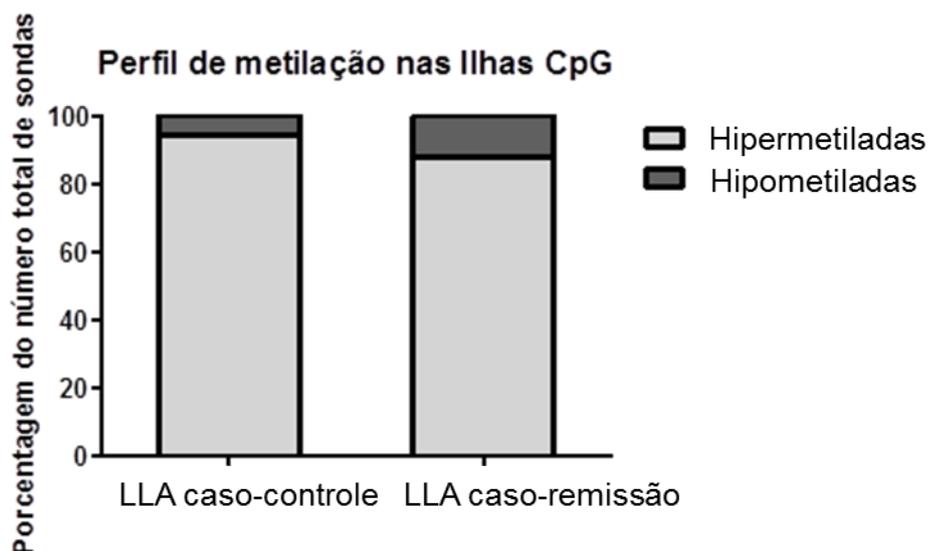


Figura 4.28: Frequência de hipometilação e hipermetilação dos sítios diferencialmente metilados em ilhas CpG, análise caso-controle e caso-remissão.

Em seguida, identificamos os genes que são alvos comuns de alterações estruturais e numéricas em leucemias agudas e que tiveram alteração no perfil de metilação nas nossas análises. Foram identificadas 51 regiões envolvendo genes importantes no desenvolvimento e progressão das leucemias, como *IKZF1*, *ETV6*, *TCF3*, *PAX5*, entre outros (Tabela 4.4).

Tabela 4.8: Genes com lesões recorrentes em LLA que foram encontrados diferencialmente metilados na série de casos, em comparação aos controles

Código da Sonda	Gene	Alteração	Localização	Enhancer
cg14362370	<i>ABL1</i>	Hipermetilado	5'UTR, 1º Exon	Não
cg06315974	<i>ADAR</i>	Hipermetilado	TSS 1500	Não
cg07660114	<i>ADARB2</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg17000076	<i>ADARB2</i>	Hipometilado	TSS 1500	Não
cg2740482	<i>ADARB2</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg06083652	<i>ADARB2</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg04930661	<i>ADARB2</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg06028247	<i>ADARB2</i>	Hipermetilado	Corpo	Não
cg11189134	<i>ADARB2</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg00972313	<i>ADARB2</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg00525508	<i>ADARB2</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg11704601	<i>ADARB2</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg14698025	<i>ADARB2</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg20151301	<i>ADARB2</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg27566842	<i>ADARB2</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg07162000	<i>ADARB2</i>	Hipermetilado	Corpo	Não
cg04374015	<i>ADARB2</i>	Hipometilado		Não
cg01433914	<i>ADD3</i>	Hipometilado	5'UTR	Não
cg02619834	<i>ADD3</i>	Hipermetilado	5'UTR	Sim
cg20603106	<i>ARHGAP24</i>	Hipometilado	TSS 200, corpo	Não
cg22866565	<i>ARHGAP24</i>	Hipometilado	Corpo, 5'UTR	Sim
cg05688618	<i>ARHGAP24</i>	Hipometilado	Corpo, 5'UTR, 1º Exon	Não
cg12417466	<i>ARPP21</i>	Hipometilado	TSS 200	Não
cg18183671	<i>ARPP21</i>	Hipometilado	5'UTR, TSS 200	Não
cg18749990	<i>ARPP21</i>	Hipometilado		Não
cg12886494	<i>ARPP21</i>	Hipometilado	5'UTR, TSS 1500	Não
cg05615150	<i>ARPP21</i>	Hipometilado	TSS 200	Não
cg20582941	<i>ARPP21</i>	Hipometilado	5'UTR, 1º Exon	Não
cg10730398	<i>ARPP21</i>	Hipometilado		Sim
cg01307174	<i>ARPP21</i>	Hipometilado		Não
cg11442052	<i>ARPP21</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg16370778	<i>ARPP21</i>	Hipometilado		Não
cg24785473	<i>ARPP21</i>	Hipometilado		Não
cg02208504	<i>ATP10A</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg15338782	<i>ATP10A</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg07986058	<i>ATP10A</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg13356455	<i>ATP10A</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg13356455	<i>ATP10A</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg13361023	<i>ATP10A</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg16605633	<i>ATP10A</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg26062856	<i>ATP10A</i>	Hipometilado	TSS 1500	Não
cg16779976	<i>BLNK</i>	Hipometilado	1º Exon	Não
cg03281335	<i>BLNK</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg18448570	<i>BLNK</i>	Hipometilado	TSS200	Não
cg25263238	<i>BLNK</i>	Hipometilado	TSS 1500	Não
cg16779976	<i>BLNK</i>	Hipometilado	1º Exon	Não
cg03281335	<i>BLNK</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg08901339	<i>BLNK</i>	Hipometilado	5'UTR; 1º Exon	Não
cg02980499	<i>BLNK</i>	Hipometilado	TSS 1500	Não
cg07397033	<i>BLNK</i>	Hipometilado	TSS 1500	Não
cg20540372	<i>BLNK</i>	Hipometilado	TSS 1500	Não
cg03995631	<i>BTLA</i>	Hipometilado	TSS200	Não

cg18263166	<i>CDK6</i>	Hipometilado		Sim
cg25156198	<i>CDK6</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg05278074	<i>CDK6</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg08300570	<i>CDK6</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg27035480	<i>CREBBP</i>	Hipermetilado	Corpo	Sim
cg05557932	<i>CREBBP</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg04545079	<i>CTCF</i>	Hipometilado	5' UTR	Não
cg04949225	<i>DLEU1</i>	Hipermetilado		Não
cg05191839	<i>DLEU1</i>	Hipometilado		Sim
cg00373763	<i>DLEU1</i>	Hipermetilado		Sim
cg13212435	<i>DLEU1</i>	Hipermetilado		Sim
cg20733077	<i>DLEU1</i>	Hipometilado	TSS 1500	Não
cg15491102	<i>DLEU1</i>	Hipometilado		Sim
cg25304198	<i>DLEU1</i>	Hipometilado		Sim
cg06228828	<i>DLEU2</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg14177924	<i>DMD</i>	Hipermetilado		Não
cg04647039	<i>DMD</i>	Hipermetilado	Corpo, TSS 200	Não
cg24903893	<i>EBF1</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg18043514	<i>EBF1</i>	Hipometilado		Não
cg11690724	<i>EBF1</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg23465650	<i>EBF1</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg18816534	<i>EBF1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg11898646	<i>EBF1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg01192077	<i>EBF1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg00210856	<i>EBF1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg17811857	<i>EBF1</i>	Hipometilado		Não
cg06908379	<i>EBF1</i>	Hipometilado		Não
cg11922066	<i>EBF1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg01551441	<i>EBF1</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg21188858	<i>EBF1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg09172244	<i>EBF1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg00594129	<i>EBF1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg26117521	<i>EBF1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg02485328	<i>EBF1</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg12125772	<i>EBF1</i>	Hipometilado		Sim
cg22586996	<i>EBF1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg22790839	<i>EBF1</i>	Hipometilado		Sim
cg04248271	<i>EBF1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg27471246	<i>ERG</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg17228105	<i>ERG</i>	Hipometilado	Corpo, TSS 1500	Não
cg00990740	<i>ERG</i>	Hipometilado	Corpo, TSS 1500	Não
cg03609488	<i>ETV6</i>	Hipometilado	3'UTR	Não
cg06516865	<i>ETV6</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg24438354	<i>ETV6</i>	Hipometilado		Sim
cg00001793	<i>ETV6</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg06225767	<i>ETV6</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg14830166	<i>ETV6</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg21535657	<i>ETV6</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg18907610	<i>ETV6</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg08064997	<i>ETV6</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg23738760	<i>ETV6</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg21223094	<i>ETV6</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg14569771	<i>FBXW7</i>	Hipometilado		Sim
cg21987515	<i>FBXW7</i>	Hipometilado	Corpo, TSS 200	Não
cg05052463	<i>FBXW7</i>	Hipometilado	Corpo; 1° Exon; 5'UTR	Não
cg05647891	<i>FBXW7</i>	Hipermetilado	5'UTR	Sim

cg01094351	<i>FBXW7</i>	Hipometilado		Sim
cg13745692	<i>FHIT</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg17894779	<i>FHIT</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg05709770	<i>FHIT</i>	Hipermetilado		Sim
cg19282443	<i>FHIT</i>	Hipometilado	5'UTR	Sim
cg02854288	<i>FHIT</i>	Hipermetilado	5'UTR	Não
cg01556706	<i>FHIT</i>	Hipermetilado	Corpo	Sim
cg15931943	<i>FHIT</i>	Hipermetilado	5'UTR	Não
cg03479209	<i>FLNB</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg05093811	<i>FLNB</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg10227830	<i>GAB1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg06855485	<i>GAB1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg25404454	<i>GAB1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg19159011	<i>IKZF1</i>	Hipometilado	5' UTR	Sim
cg07103517	<i>IKZF1</i>	Hipometilado	5' UTR	Não
cg18743793	<i>IKZF1</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg08052546	<i>IKZF1</i>	Hipometilado		Não
cg26925669	<i>IKZF3</i>	Hipometilado		Não
cg00716716	<i>IKZF3</i>	Hipometilado	TSS 1500	Não
cg13878456	<i>IKZF3</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg14688652	<i>IL1RAP2</i>	Hipermetilado	5' UTR	Não
cg02283535	<i>IL1RAP2</i>	Hipermetilado	5' UTR, 1º Exon	Não
cg06927864	<i>IL1RAP1</i>	Hipermetilado	TSS 1500	Não
cg20350671	<i>IL1RAP1</i>	Hipermetilado	TSS 200	Não
cg22522299	<i>IL1RAP2</i>	Hipometilado	TSS 200	Não
cg18230558	<i>IL1RAP1</i>	Hipermetilado	TSS 200	Não
cg01757402	<i>IL1RAP1</i>	Hipermetilado	TSS 200	Não
cg26791231	<i>IL1RAP1</i>	Hipermetilado	TSS 200	Não
cg23384620	<i>IL1RAP2</i>	Hipermetilado	TSS1 500	Não
cg08848171	<i>IL1RAP2</i>	Hipermetilado	5' UTR	Não
cg00691671	<i>JAK1</i>	Hipometilado		Não
cg15208832	<i>JAK1</i>	Hipometilado		Sim
cg12075498	<i>JAK1</i>	Hipometilado	5' UTR	Não
cg03980424	<i>KLF6</i>	Hipometilado		Sim
cg25580581	<i>KLF6</i>	Hipometilado		Sim
cg24420366	<i>KLF6</i>	Hipermetilado		Sim
cg03917666	<i>KLF6</i>	Hipometilado		Sim
cg09676171	<i>KLF6</i>	Hipometilado		Não
cg12048965	<i>KLF6</i>	Hipometilado		Sim
cg24287110	<i>KLF6</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg25749254	<i>KLF6</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg03216580	<i>KLF6</i>	Hipermetilado	Corpo, 3'UTR	Sim
cg23680451	<i>KLF6</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg22984894	<i>KLF6</i>	Hipometilado		Sim
cg06048750	<i>KLF6</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg24023289	<i>LEF1</i>	Hipometilado	TSS 1500, Corpo	Sim
cg08460812	<i>LEF1</i>	Hipometilado	TSS1500, Corpo	Sim
cg12271317	<i>LEF1</i>	Hipometilado	3'UTR, Corpo	Não
cg12623364	<i>LEF1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg25437531	<i>LMO2</i>	Hipometilado	3'UTR	Não
cg25006077	<i>MBNL1</i>	Hipermetilado	Corpo	Sim
cg17878501	<i>MBNL1</i>	Hipometilado		Sim
cg15488194	<i>MBNL1</i>	Hipermetilado	TSS 1500, 5'UTR	Sim
cg02061820	<i>MBNL1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg13702222	<i>MBNL1</i>	Hipermetilado	1º Exon, 5'UTR	Sim
cg10639811	<i>MBNL1</i>	Hipermetilado	Corpo	Sim

cg06835212	<i>MEF2C</i>	Hipometilado	5'UTR	Não
cg16173529	<i>MSRA</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg01043583	<i>MSRA</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg23400122	<i>MSRA</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg06620390	<i>MSRA</i>	Hipermetilado	Corpo	Não
cg00629382	<i>MSRA</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg02750234	<i>NF1</i>	Hipermetilado	Corpo	Não
cg21850879	<i>NF1</i>	Hipermetilado	Corpo, 3'URT	Não
cg09395195	<i>NF1</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg22473770	<i>NF1</i>	Hipometilado	5'UTR, Corpo	Sim
cg08845721	<i>NR3C1</i>	Hipometilado	5'UTR	Não
cg07733851	<i>NR3C1</i>	Hipometilado	5'UTR	Não
cg18998365	<i>NR3C1</i>	Hipometilado	5'UTR	Não
cg06613263	<i>NR3C1</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg17342132	<i>NR3C1</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg27107893	<i>NR3C1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg21185255	<i>NR3C2</i>	Hipometilado		Sim
cg02786966	<i>NR3C2</i>	Hipermetilado		Sim
cg15757019	<i>NR3C2</i>	Hipometilado		Sim
cg13753527	<i>PAX5</i>	Hipometilado		Sim
cg14383078	<i>PAX5</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg13751548	<i>PAX5</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg14317609	<i>PAX5</i>	Hipermetilado	Corpo	Não
cg06671450	<i>PAX5</i>	Hipermetilado	Corpo	Não
cg19754554	<i>PDE4B</i>	Hipermetilado	5' UTR, TSS 200	Sim
cg22488256	<i>PDE4B</i>	Hipermetilado	TSS 200, TSS 1500	Não
cg00046625	<i>PDE4B</i>	Hipermetilado	5' UTR, TSS 200	Sim
cg24637364	<i>PDE4B</i>	Hipermetilado	5' UTR	Sim
cg26963271	<i>PDE4B</i>	Hipermetilado	5' UTR	Sim
cg22336004	<i>PDE4B</i>	Hipermetilado	TSS 200	Não
cg26832142	<i>PDE4B</i>	Hipermetilado	5' UTR, TSS 200	Sim
cg04704294	<i>PDE4B</i>	Hipermetilado	TSS 1500	Não
cg16294013	<i>PDE4B</i>	Hipermetilado		Não
cg02867102	<i>PECAM1</i>	Hipometilado		Não
cg16155207	<i>PIK3AP1</i>	Hipometilado		Não
cg02307823	<i>PTEN</i>	Hipermetilado	Corpo	Não
cg21149466	<i>PTPN2</i>	Hipermetilado	Corpo	Não
cg07665575	<i>RAG1</i>	Hipometilado	5' UTR	Não
cg06288355	<i>RAG1</i>	Hipometilado	TSS 200	Não
cg25154959	<i>RAG1</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg18422371	<i>RAG1</i>	Hipometilado	5' UTR	Não
cg08285589	<i>RAG1</i>	Hipometilado	3' UTR	Não
cg23324787	<i>RAG1</i>	Hipometilado	5' UTR, 1º Exon	Não
cg11494699	<i>RAG1</i>	Hipometilado	TSS 1500	Não
cg07297964	<i>RB1</i>	Hipermetilado	Corpo	Não
cg16071713	<i>RUNX1</i>	Hipometilado	TSS 1500, Corpo	Não
cg21172011	<i>RUNX1</i>	Hipometilado		Não
cg00291213	<i>RUNX1</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg18546236	<i>RUNX1</i>	Hipermetilado		Não
cg02824983	<i>SPRED1</i>	Hipometilado		Sim
cg10121601	<i>STIL</i>	Hipermetilado		Sim
cg04911180	<i>TBL1XR1</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg17578639	<i>TBL1XR1</i>	Hipometilado	5' UTR	Não
cg03290752	<i>TBL1XR1</i>	Hipermetilado	TSS 200	Não
cg12183032	<i>TCF3</i>	Hipometilado	TSS 200, 5' UTR	Não
cg24940706	<i>TCF3</i>	Hipometilado	Corpo	Não

cg08430680	<i>TCF3</i>	Hipometilado	TSS 200, 5' UTR	Não
cg09432758	<i>TCF3</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg11170796	<i>TCF3</i>	Hipometilado	Corpo, 1º Exon	Não
cg21458030	<i>TCF3</i>	Hipometilado	Corpo, 1º Exon	Não
cg13457790	<i>TCF3</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg14304014	<i>TCF3</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg08643005	<i>TCF3</i>	Hipermetilado	TSS 1500	Não
cg26928195	<i>TCF3</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg26615224	<i>TCF3</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg12165782	<i>TCF3</i>	Hipermetilado	1º Exon, 5'UTR	Não
cg14807446	<i>THADA</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg25938803	<i>THADA</i>	Hipermetilado	Corpo	Sim
cg24998197	<i>TOX</i>	Hipometilado		Sim
cg13601957	<i>TOX</i>	Hipometilado		Sim
cg06419601	<i>TOX</i>	Hipometilado		Sim
cg26140802	<i>TOX</i>	Hipometilado		Sim
cg06779553	<i>TOX</i>	Hipometilado	Corpo	Sim
cg01891260	<i>VPREB1</i>	Hipometilado	TSS 1500	Não
cg04776489	<i>VPREB1</i>	Hipometilado	TSS 1500	Não
cg18441959	<i>VPREB1</i>	Hipometilado	Corpo	Não
cg25330366	<i>VPREB1</i>	Hipometilado	TSS 200	Não
cg18899220	<i>ZMYM5</i>	Hipermetilado		Não

5' UTR, 5' untranslated region; TSS, Transcription start site

A fim de melhor compreender as implicações biológicas relacionadas aos perfis de metilação encontrados, foram realizadas análises de enriquecimento usando o programa MetaCore. Foram selecionados os SDM em regiões de sítios de início de transcrição (TSS) na análise caso-controle, visto que alterações nessas regiões (promotores) geralmente estão associadas com alterações na expressão gênica.

Na análise dos mapas de via, a via do sistema imune apareceu entre as dez principais vias com maior probabilidade de associação com os genes cujo perfil de metilação na região promotora foi alterado na nossa série de casos ($p < 0,05$). Dentro desta via, exploramos a via de sinalização de IL7 em linfócitos B (Figura 4.20). O ligante de IL7 está hipermetilado. A partir do enriquecimento realizado, nós podemos especular que as alterações nos perfis de metilação estão levando a bloqueio na diferenciação celular e estímulo proliferativo. Isto pode ser explicado pela hipermetilação de promotores que regulam *E2A*, *PAX5* e *N-Myc*, bloqueando a função regulatória dessas proteínas, cuja expressão é estimulatória das recombinações VDJ no locus IgH, conduzindo a célula para diferenciação. A possível supressão desses genes por hipermetilação do promotor poderia, portanto, levar ao bloqueio da diferenciação celular de linfócitos B. Por outro lado, os promotores que regulam *GRB2*, *SOS*, *MEK1/2* envolvidos na ativação da proliferação, foram encontrados hipometilados na nossa série de casos, o que pode resultar em uma regulação positiva

destes genes e consequente estímulo proliferativo de linfócitos B. O guia completo com as referências das figuras geradas no MetaCore encontra-se no Anexo III.

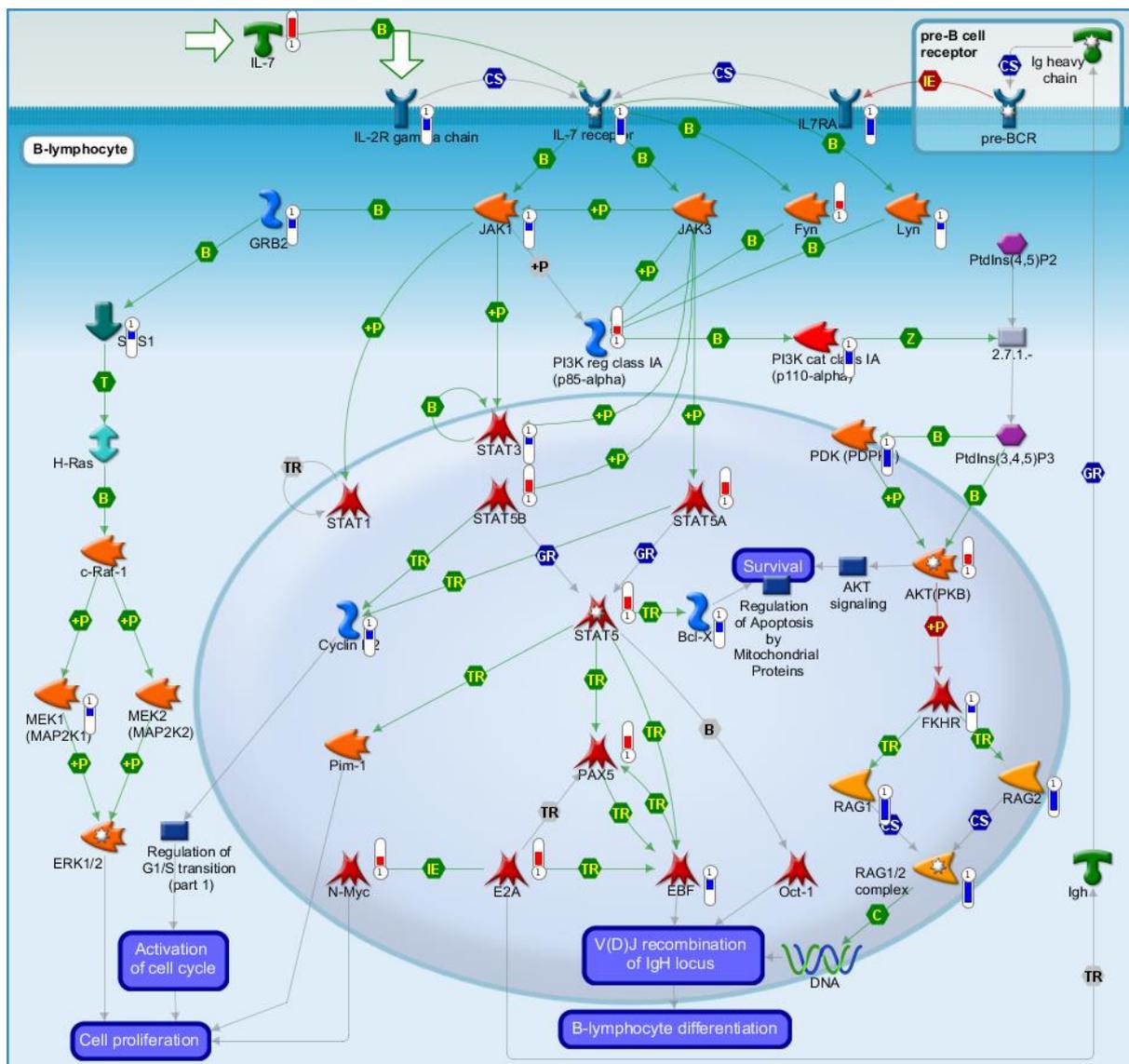


Figura 4.29: Via de sinalização de IL7 em linfócitos B destacando os genes com perfis de metilação alterados na série de casos de LLA-CPB.

A figura foi gerada pela análise de enriquecimento de mapas de vias (MetaCore) baseada nos sítios diferencialmente metilados em regiões de início de transcrição (TSS) na comparação casos vs controles. As proteínas destacadas em cores mais vivas são as que tiveram genes diferencialmente metilados na série de casos de LLA-CPB. O termômetro em azul indica a hipometilação em regiões de TSS e, em vermelho, a hipermetilação.

Nas análises de enriquecimento por biomarcadores de doenças, os genes com perfil de metilação do promotor alterado em nossas análises estavam fortemente associados a câncer de um modo geral. Dentre as diferentes opções de explorar as redes de câncer, selecionamos neoplasias por subtipo histológico que nos direcionou para a rede de LLA-CPB como uma das doenças com maior número de

biomarcadores alterados (N=32), dentro do total de biomarcadores considerados para LLA-CPB (N=32), tendo como destaque as proteínas Ikaros, PBX1 e JAK1, que são reguladores da hematopoese. Os genes que codificam tais proteínas apresentaram hipometilação nos sítios de início de transcrição na nossa série de casos (Figura 4.21), mostrando que não só lesões genéticas, mas também que a ativação desses genes através da hipometilação também são observados nas LLA-CPB. Outro fato interessante é que proteínas hiperexpressas em células precursoras B, como CD19 e CD79a, estão com os promotores hipometilados.

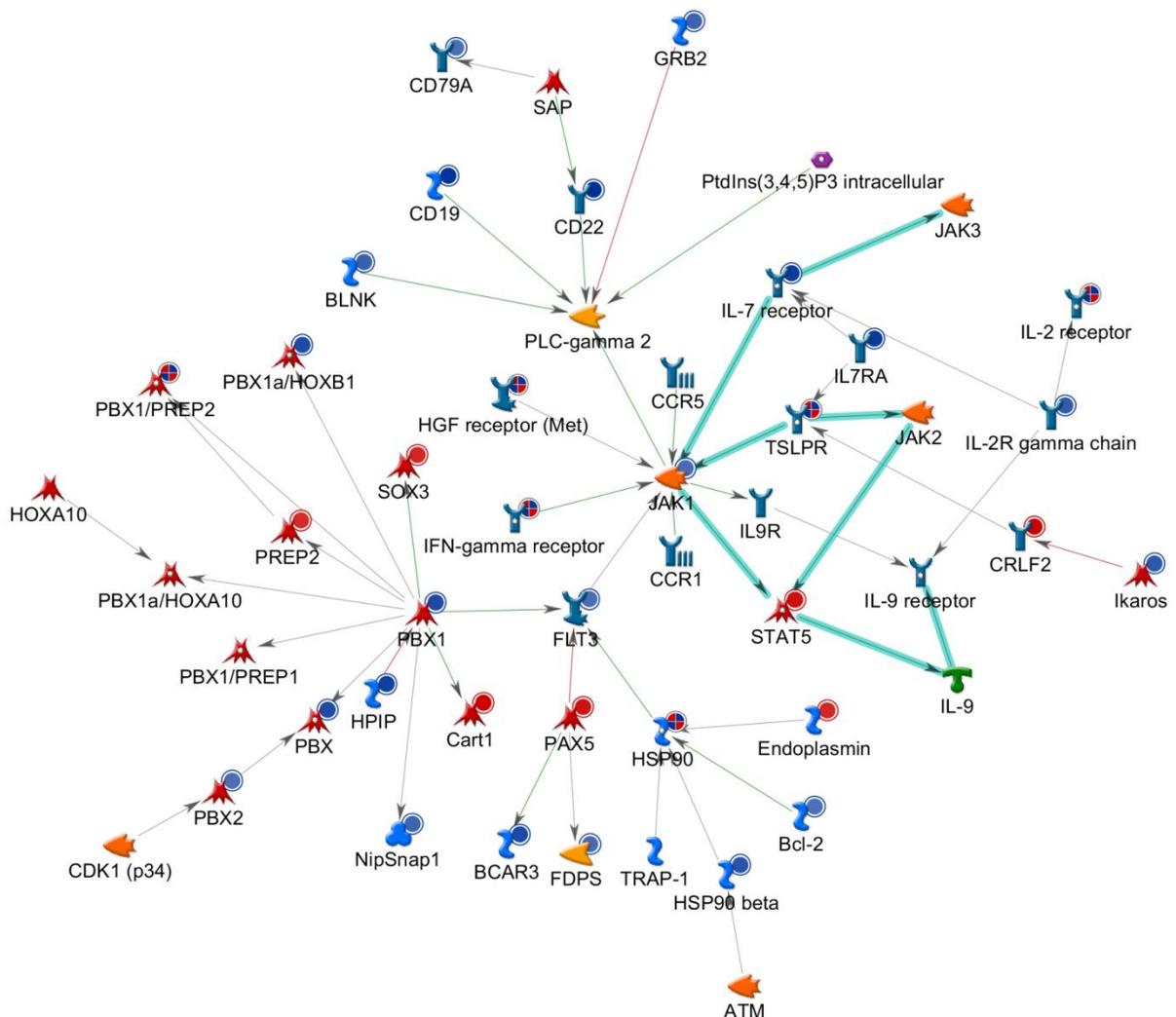


Figura 4.30: Rede demonstrando a interação de proteínas associadas a LLA-CPB cujos promotores apresentaram alteração no perfil de metilação na série de casos de LLA-CPB. A rede foi gerada pelo enriquecimento de doenças por biomarcadores, neoplasias por subtipo histológico, LLA-CPB apresentando 50 nós de interação. Os círculos em vermelho representam hipermetilação e em azul, hipometilação. Os círculos com as duas cores indicam que existem membros da mesma família com diferentes perfis de metilação.

4.4.2. Validação do microarranjo de metilação

Para as análises por pirosequenciamento, foram selecionados 7 genes encontrados diferencialmente metilados na análise caso vs controle (*ERG*, *ETS2*, *PBX1*, *PDE9A*, *PRDM9*, *PRDM15*) e também na análise controle vs remissão (*ARID3A*). Foi realizado o pirosequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados referentes aos genes acima citados. Em seguida, foi calculada a média das porcentagens de metilação dos sítios analisados para cada gene e então realizadas as análises estatísticas comparando casos com controles, casos com remissões e remissões com controles.

Inicialmente, as análises de validação foram feitas apenas nas amostras que foram incluídas no microarranjo de metilação. Foram incluídas 34 amostras no microarranjo e esses casos foram classificados como hiperdiplóides (n=21; 47-57 cromossomos) e hipertriplóide (n=1, 70 cromossomos), hiperdiplóide com a fusão *ETV6-RUNX1* (n=1) e iAMP21 (n=1). Destes, três controles e um caso (cariótipo: 48, XY, P05, Figura 4.11) não dispuseram de material suficiente para as análises de validação. Além disso, o número de amostras analisadas variou de acordo com o sucesso obtido nas reações de PCR. A Tabela 4.5 apresenta o número de amostras incluídas na validação de cada gene.

Tabela 4.9: Classificação dos casos incluídos nas análises de validação do microarranjo.

Gene	N Cas.	N Cont.	N rem.	<i>p</i> Cas. vs Cont.	<i>p</i> Cont. vs Rem.	Região gênica	Status do gene
<i>ARID3A</i>	22	4	3	0,002	0,057	Corpo	Hipometilado
<i>ERG</i>	23	5	3	0,002	0,071	Corpo	Hipometilado
<i>ETS2</i>	21	5	2	0,035	---	TSS1500	Hipometilado
<i>PBX1</i>	19	5	3	0,001	0,025	Corpo	Hipermetilado
<i>PDE9A</i>	16	6	2	0,002	---	Corpo	Hipometilado
<i>PRDM9</i>	17	2	0	---	---	TSS1500	Hipermetilado
<i>PRDM15</i>	23	5	3	0,001	0,571	Corpo	Hipometilado

Abreviações: N, número; Cas., casos; Cont., controles; Rem., remissões; *p* Cas. vs Control., valor de *p* obtido na análise caso vs controle; *P* Cont vs Rem., valor de *p* obtido na análise controle vs remissão; ---, não foi possível fazer o cálculo devido ao pequeno número de amostras; negrito, valor de *p*<0,05.

Na análise caso vs controle, todas as diferenças encontradas no microarranjo foram confirmadas pela análise de pirosequenciamento (Tabela 4.5), exceto no caso do gene *PRDM9*, para o qual não foi possível realizar o teste estatístico devido ao baixo número de controles. Já na análise controle vs remissão, houve uma tendência de diferença entre os grupos para o gene *ARID3A* ($p=0,057$) e diferença significativa para o perfil de metilação do gene *PBX1* ($p=0,025^*$) (Tabela 4.5). Apesar disso, o número de amostras foi reduzido, portanto, incluímos um maior número de amostras a fim de realizar a validade externa do microarranjo.

4.4.3. Análise comparativa da metilação gene-específica em amostras de leucemia linfoblástica aguda, controles e remissões

Visando realizar a validação dos achados do microarranjo em um grupo independente de amostras, avaliar a associação dessas alterações com as características clínico-demográficas dos pacientes e realizar análises entre os diferentes subtipos citogenético-moleculares de LLA-CPB, foi incluída nas análises de pirosequenciamento uma série de casos com perfis que representam as LLA-CPB: hiperdiplóides, *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *KMT2A-r* e cariótipo normal, além de amostras comparativas de SCUP e casos que também foram incluídos na remissão, totalizando 149 amostras especificadas na Figura 4.22.

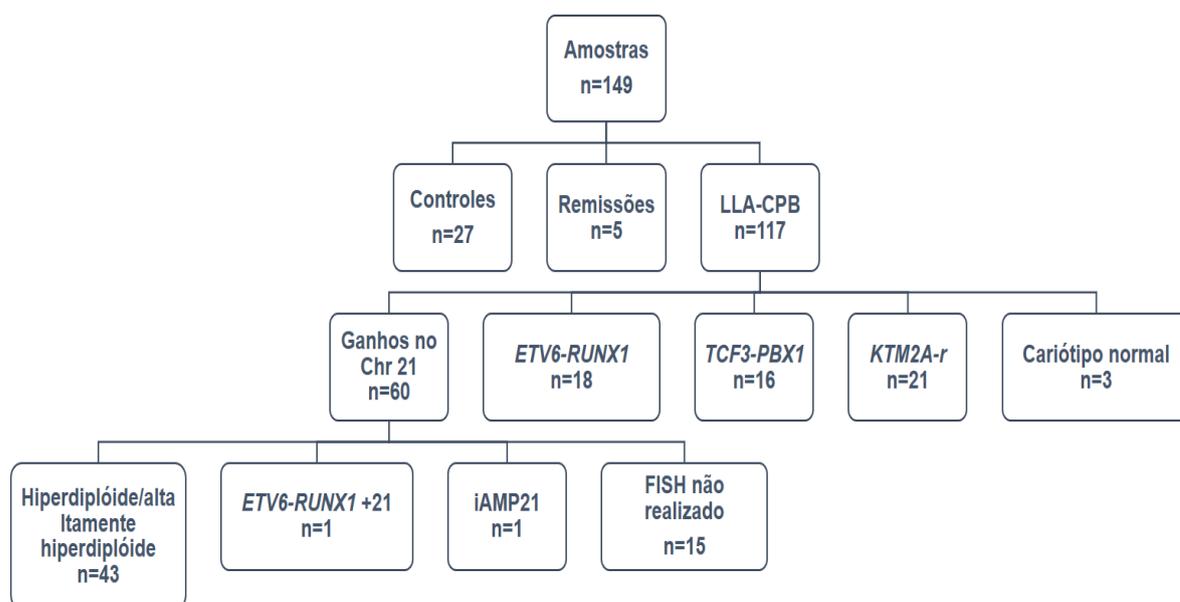


Figura 4.31: Fluxograma com a descrição das frequências das alterações citogenéticas e moleculares da série de casos incluídos nas análises de validação e metilação. Em 15 amostras, não foi possível realizar análises adicionais de FISH para os cromossomos 4, 10, 17, 18, 21, X e Y.

As características clínico-demográficas dos casos encontram-se especificadas na Tabela 4.6. A maioria dos pacientes são LLA-CPB CD10⁺(85%) e com leucometria >50.000x10⁶células/L (64%). As demais características apresentaram distribuição homogênea entre os pacientes.

Tabela 4.10: Características clínico-demográficas dos casos de leucemia linfoblástica aguda incluídos nas análises de metilação, Brasil, 2002-2015

Características	N (%)
Total	117 (100)
Gênero	
Masculino	61 (52)
Feminino	56 (48)
Idade (anos)	
≤1	25 (21)
2-10	78 (67)
>10	14 (12)
Etnia	
Branços	56 (50)
Não-brancos	57 (50)
Leucometria, x10⁹/L	
<50	72 (64)
>50	41 (36)
Imunofenótipo	
CD10 -	17 (15)
CD10 +	100 (85)
Grupo de risco	
Risco padrão	52 (46)
Alto risco	60 (54)
Status de sobrevida	
Vivo	31 (57)
Óbito	23 (43)
Genótipo <i>MTHFR</i>	
CC	75 (53)
CT	56 (40)
TT	10 (7)

Abreviações: n, número.

*Os números podem variar devido à falta de informação referente aos dados.

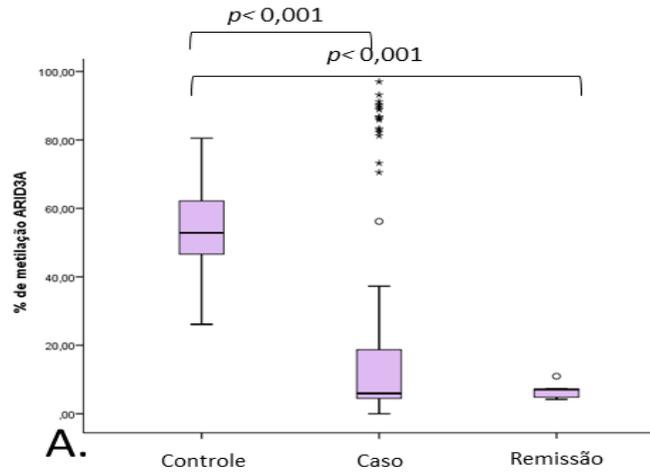
A fim de demonstrar a validade externa dos achados do microarranjo, realizamos análises de pirosequenciamento no grupo total de casos. Inicialmente, essas análises foram feitas de acordo com o diagnóstico, sendo que as amostras foram divididas em casos, controles e remissões (Tabela 4.7). A porcentagem de metilação não apresentou distribuição normal para nenhum dos genes analisados, portando, foram feitos testes não paramétricos. Usando o teste de Mann-Whitney, foi confirmada a diferença no perfil de metilação na análise caso vs controle para todos os genes selecionados (Tabela 4.7). Na análise controle vs remissão, além da confirmação da diferença no perfil de metilação do gene *ARID3A*, também foram observadas diferenças estatisticamente significativas no perfil de metilação dos genes *ERG* e *ETS2* (Figura 4.23A, B e C). Na análise caso vs remissão, foram observadas diferenças significativas para os genes *ERG*, *PBX1* e *PDE9A* (Figura 4.23B, D e E).

Tabela 4.11: Classificação dos casos incluídos nas análises de validação externa do microarranjo

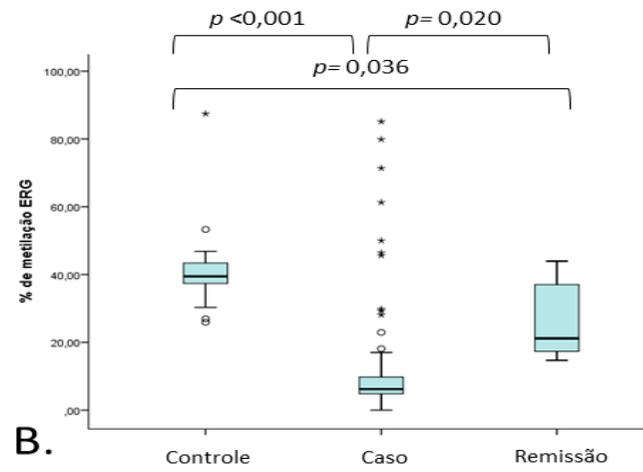
Gene	N Cas.	N Cont.	N rem.	<i>p</i> Cas. vs Cont.	<i>p</i> Cont. vs Rem.	Região gênica	Status do gene
<i>ARID3A</i>	109	24	5	<0,001	<0,001	Corpo	Hipometilado
<i>ERG</i>	115	26	5	<0,001	0,020	Corpo	Hipometilado
<i>ETS2</i>	111	25	4	0,002	0,284	TSS1500	Hipometilado
<i>PBX1</i>	100	19	5	<0,001	0,010	Corpo	Hipermetilado
<i>PDE9A</i>	74	24	3	<0,001	0,006	Corpo	Hipometilado
<i>PRDM9</i>	96	16	1	<0,001	NR	TSS1500	Hipermetilado
<i>PRDM15</i>	114	25	4	<0,001	0,397	Corpo	Hipometilado

Abreviações: N, número; Cas., casos; Cont., controles; Rem., remissões; *p* Cas. vs Control., valor de *p* obtido na análise caso vs controle; *P* Cont vs Rem., valor de *p* obtido na análise controle vs remissão; NR, não realizado o cálculo devido ao pequeno número de amostras; negrito, valor de *p*<0,05.

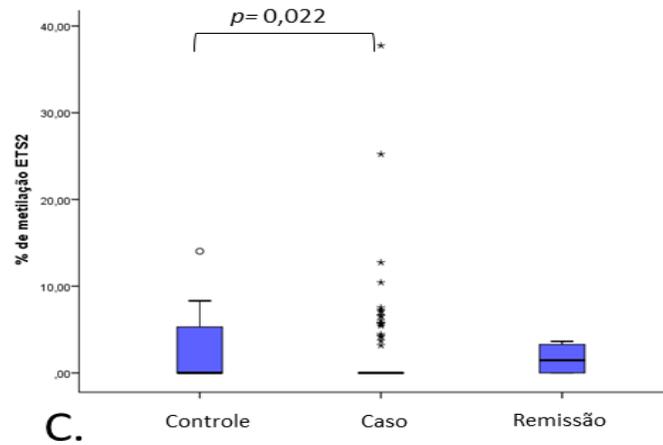
% de metilação *ARID3A*



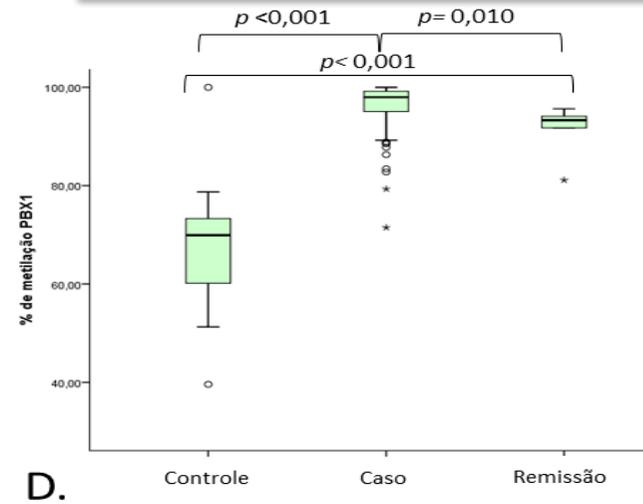
% de metilação *ERG*



% de metilação *ETS2*



% de metilação *PBX1*



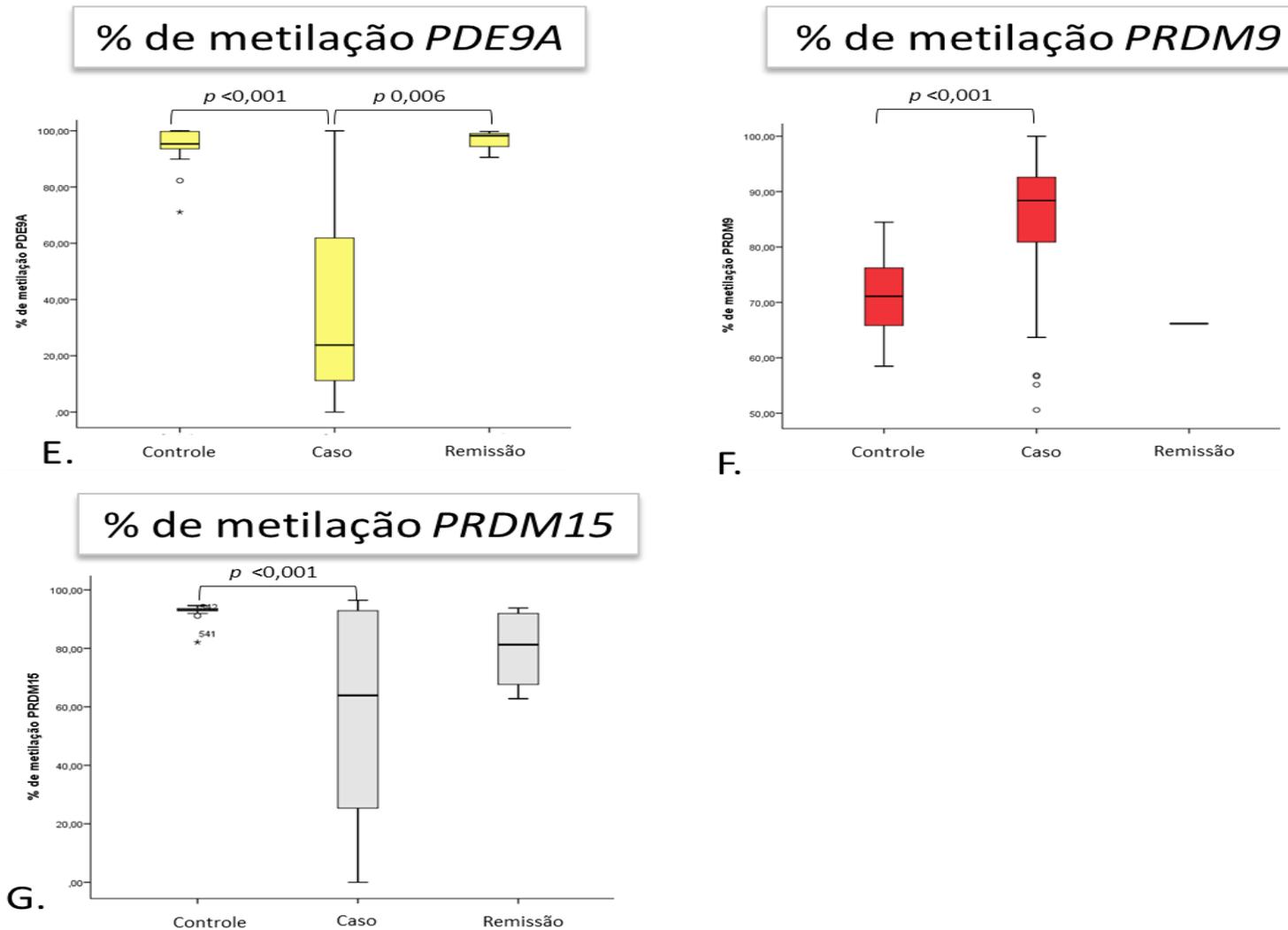


Figura 4.32: Avaliação por pirosequenciamento do perfil de metilação dos genes *ARID3A*, *ERG*, *ETS2*, *PBX1*, *PDE9A*, *PRDM9* e *PRDM15* em casos de LLA-CPB, controles e amostras de remissão. As categorias foram comparadas aos pares pelo teste de Mann-Whitney.

4.4.4. Relevância clínica do perfil de metilação dos genes *ARID3A*, *ERG*, *ETS2*, *PBX1*, *PDE9A*, *PRDM9* e *PRDM15*

Visando o melhor entendimento do papel dos genes acima descritos na leucemogênese, verificamos se havia diferença no perfil de metilação de acordo com as características clínico-demográficas dos pacientes. Nesse sentido, o gene *ARID3A* apresentou-se hipermetilado na faixa etária ≤ 1 ano ($p < 0,001$), como mesmo perfil sendo associado ao imunofenótipo com expressão negativa de CD10 ($p < 0,001$) e ao alto risco prognóstico ($p = 0,012$) (Tabela 4.8). Por outro lado, a metilação nos genes *ERG*, *ETS2* e *PBX1* não foi associada com qualquer característica clínica e demográfica dos pacientes (Tabela 4.8).

O gene *PDE9A* apresentou-se hipermetilado nos casos com idade ≤ 1 ano ($p = 0,037$) e que não expressavam CD10 ($p = 0,049$), seguindo o mesmo padrão do gene *ARID3A* (Tabela 4.9). Este mesmo perfil de hipermetilação foi ainda observado para o gene *PRDM9*, idade ≤ 1 ano ($p = 0,002$) e CD10- ($p = 0,049$) (Tabela 4.9). O gene *PRDM15*, além de hipermetilado na faixa etária ≤ 1 ano ($p < 0,001$) e CD10- ($p < 0,001$), também foi encontrado hipermetilado no grupo de alto risco prognóstico ($p < 0,001$) (Tabela 4.9). Ou seja, blastos leucêmicos com estágios maturativos mais precoces apresentaram hipermetilação nos genes acima citados dentro da coorte estudada.

Tabela 4.12: Perfil de metilação dos genes *ARID3A*, *ERG*, *ETS2* e *PBX1* de acordo com as características clínico-demográficas dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda, Brasil, 2002-2015

Características	% metilação <i>ARID3A</i> (min-máx)	<i>P</i> valor	% metilação <i>ERG</i> (min-máx)	<i>P</i> valor	% metilação <i>ETS2</i> (Min-Máx)	<i>P</i> valor	% metilação <i>PBX1</i> (min-máx)	<i>P</i> valor
Sexo								
Masculino	6,6 (0,6-93,1)		6,6 (0,0-71,4)		2,0 (0,0-96,5)		96,9 (59,0-100,0)	
Feminino	5,9 (0,0-97,0)	0,59	6,3 (0,0-85,1)	0,48	0,0 (0,0-25,2)	0,40	94,0 (39,6-100,0)	0,54
Idade (anos)								
≤1	86,4 (7,5-97,0)		6,0 (4,0-81,1)		0,0 (0,0-37,8)		95,2 (82,8-100,0)	
2-10	5,6 (0,0-90,3)		6,1 (0,0-79,9)		0,0 (0,0-25,2)		98,5 (71,5-100,0)	
>10	5,6 (0,6-90,2)	<0,01	7,1 (71,4-71,4)	0,55	0,0 (0,0-7,1)	0,35	98,5 (71,5-100,0)	0,07
Leucometria, x10 ⁶ /L								
<50.000	5,8 (5,8-93,1)		6,7 (0,0-71,4)		0,0 (0,0-12,7)		97,6 (71,5-100,0)	
>50.000	6,7 (0,3-97,0)	0,09	5,9 (1,2-85,1)	0,11	0,0 (0,0-37,8)	0,72	97,8 (82,8-100,0)	0,89
Imunofenótipo								
CD10 -	83,3 (5,3-97,0)		6,0 (3,0-85,1)		0,0 (0,0-5,7)		95,9 (82,8-100,0)	
CD10 +	5,6 (0,0-90,3)	<0,01	6,3 (0,0-79,9)	0,85	0,0 (0,0-37,8)	0,10	98,0 (71,5-100,0)	0,08
Grupo de risco								
Risco padrão	5,8 (0,0-90,3)		6,6 (0,0-61,3)		0,0 (0,0-12,7)		96,4 (79,3-100,0)	
Alto risco	7,4 (0,4-97,0)	0,01	6,4 (1,2-85,1)	0,63	0,0 (0,0-37,8)	0,51	98,2 (39,6-100,0)	0,95
Status								
Vivo	4,5 (0,0-24,6)		6,5 (0,0-37,1)		0,0 (0,0-12,7)		97,3 (79,2-100,0)	
Óbito	5,1 (1,5-5,8)	0,81	60,4 (2,8-45,6)	0,47	0,0 (0,0-25,2)	0,37	98,2 (88,9-100,0)	0,93

Abreviações: n, número; min, mínimo; máx, máximo; O valor da porcentagem de metilação é referente às medianas de cada distribuição por categoria; as associações estatisticamente significantes encontram-se destacadas em negrito. Foi usado o teste de Mann-Whitney (2 categorias) ou Kruskal-Wallis One-way anova (mais que duas categorias diferentes).

Tabela 4.13: Perfil de metilação dos genes *PDE9A*, *PRDM9* e *PRDM15* de acordo com as características clínico-demográficas dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda. Brasil, 2002-2015.

Características	% metilação <i>PDE9A</i> (min-máx)	<i>P</i> valor	% metilação <i>PRDM9</i> (min-máx)	<i>P</i> valor	Mediana da % metilação <i>PRDM15</i>	<i>P</i> valor
Sexo						
Masculino	27,7 (0,0-98,9)		90,0 (50,6-100,0)		74,2 (0,0-94,5)	
Feminino	25,6 (0,0-100,0)	0,65	88,4 (55,13-99,2)	0,51	62,8 (0,0-94,9)	0,60
Idade (anos)						
≤1	68,2 (0,0-100,0)		88,7 (63,7-95,60)		93,9 (92,8-94,9)	
2-10	21,9 (0,0-97,75)		85,8 (50,58-99,2)		49,6 (0,0-95,9)	
>10	24,3 (71,5-100,0)	0,04	92,7 (75,1-100,0)	<0,01	84,9 (12,8-96,5)	<0,01
Leucometria, x 10 ⁶ /L						
<50.000	41,4 (0,0-99,87)		87,4 (55,1-100,0)		53,0 (0,0-96,5)	
>50.000	24,5 (0,0-100,0)	0,68	91,3 (50,6-96,5)	0,08	90,0 (0,0-94,9)	0,05
Imunofenótipo						
CD10 -	54,7 (0,0-100,0)		91,5 (63,7-95,6)		93,9 (29,6-94,9)	
CD10 +	22,9 (0,0-99,9)	0,05	87,6 (50,6-100,0)	0,12	52,9 (0,0-96,5)	<0,01
Grupo de risco						
Risco padrão	25,4 (0,0-99,8)		84,4 (55,1-99,2)		42,7 (0,0-95,9)	
Alto risco	30,4 (0,0-100,0)	0,56	91,5 (50,6-100,0)	<0,01	91,8 (0,0-96,5)	<0,01
Status						
Vivo	20,9 (0,0-54,4)		83,4 (56,7-88,6)		21,5 (6,5-78,1)	
Óbito	23,0 (0,0-53,4)	0,88	90,1 (50,6-100,0)	0,08	28,3 (5,8-93,5)	0,42

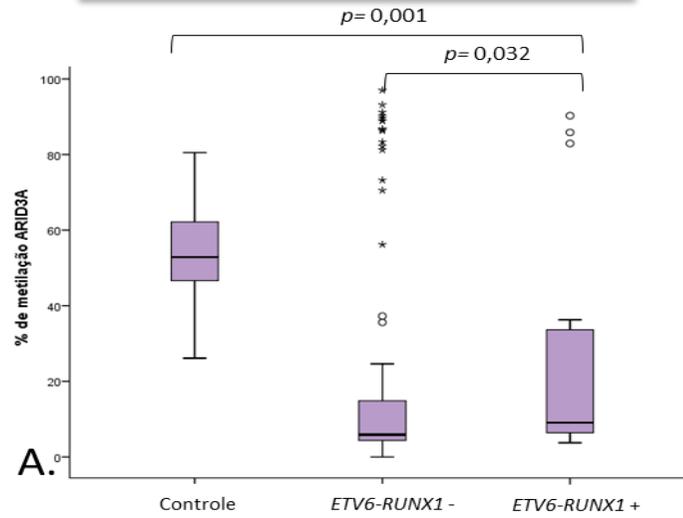
Abreviações: n, número; min, mínimo; máx, máximo; O valor da porcentagem de metilação é referente à mediana de cada distribuição por categoria; as associações estatisticamente significantes encontram-se destacadas em negrito. Foi usado o teste de Mann-Whitney (2 categorias) ou Kruskal-Wallis One-way anova (mais que duas categorias diferentes).

4.4.5. Análise de metilação gene-específica por subtipo de LLA-CPB

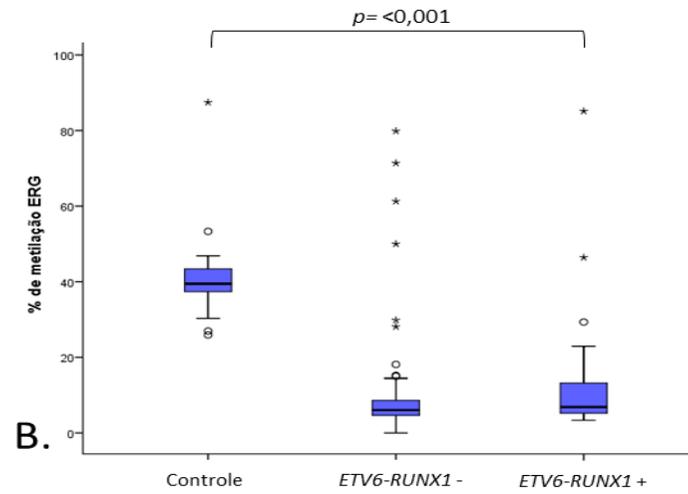
Dando seguimento às análises de metilação gene-específicas, verificamos se havia distinção no perfil de metilação dos genes *ARID3A*, *ERG*, *ETS2*, *PBX1*, *PDE9A*, *PRDM9*, e *PRDM15* nos diferentes subtipos citogenético-moleculares de LLA-CPB incluindo *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *KMT2A-r*, cariótipo normal e hiperdiploidia. Esta análise foi realizada tendo cada subtipo de LLA-CPB como grupo de referência e comparando com os demais casos, ou seja, casos positivos para os outros subtipos de LLA-CPB. Por exemplo, o grupo com a translocação *ETV6-RUNX1* (*ETV6-RUNX1+*) foi comparado contra os demais subtipos de LLA-CPB (*ETV6-RUNX1-*) que compreendem os casos *TCF3-PBX1*, *KMT2A-r*, com cariótipo normal e hiperdiploides, assim como, foi também comparado ao grupo controle. A Figura 4.24 apresenta os gráficos com a distribuição da porcentagem de metilação entre controles, casos *ETV6-RUNX1-* e casos *ETV6-RUNX1+*. Análises comparativas entre estes grupos demonstraram que os casos *ETV6-RUNX1+* apresentam hipometilação dos genes *ARID3A* ($p=0,001$), *ERG* ($p<0,001$), *PDE9A* ($p<0,001$) e *PRDM15* ($p<0,001$) em comparação com os controles (Figura 4.24A, B, E e G), enquanto os genes *PBX1* e *PRDM9* apresentaram-se hipermetilados ($p<0,001$) (Figura 4.24D e F).

Na análise comparativa entre os casos *ETV6-RUNX1+vs ETV6-RUNX1-*, foi observado um perfil de metilação distinto apenas para o gene *ARID3A*, no qual os níveis de metilação foram mais altos nos casos *ETV6-RUNX1+* que nos casos *ETV6-RUNX1-* (Figura 4.24A).

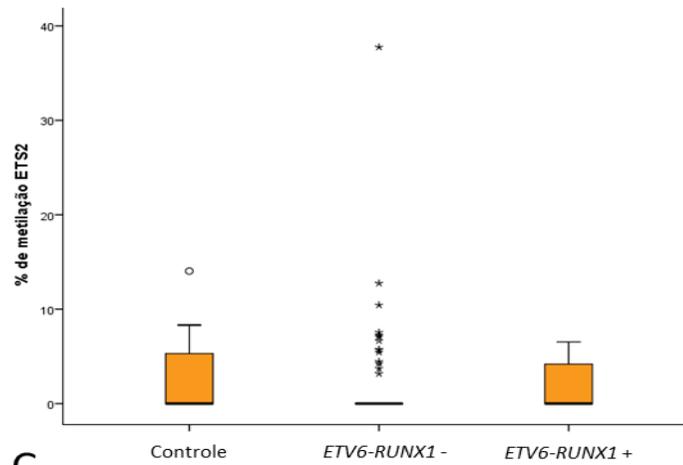
% de metilação *ARID3A*



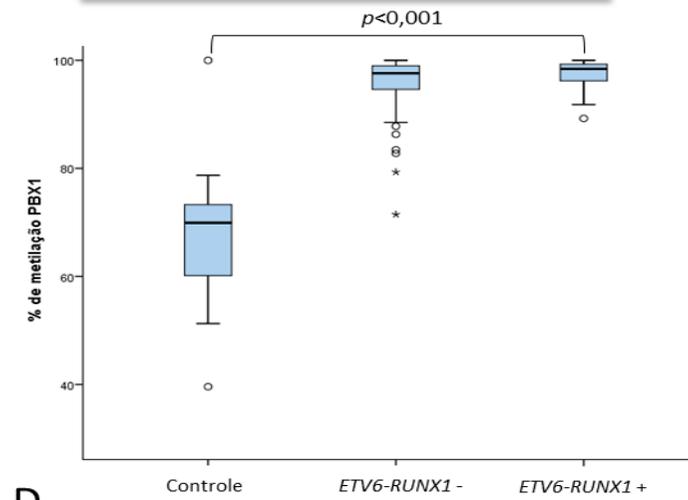
% de metilação *ERG*

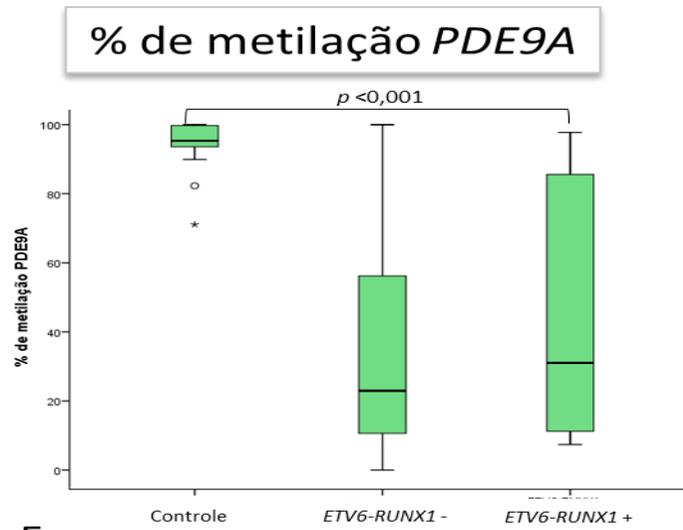


% de metilação *ETS2*

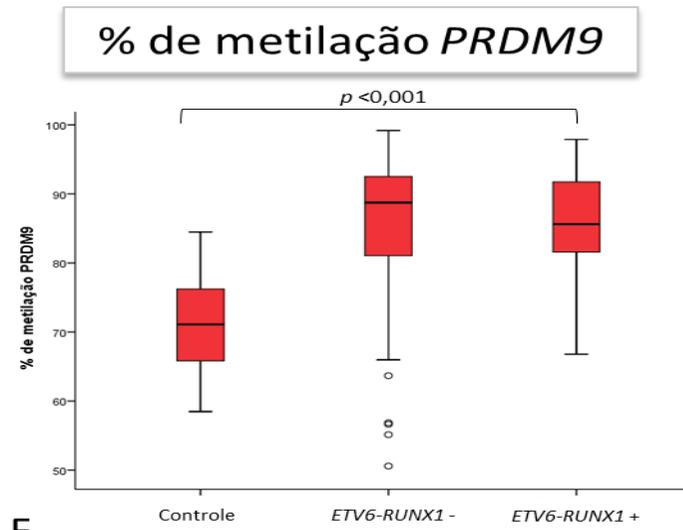


% de metilação *PBX1*

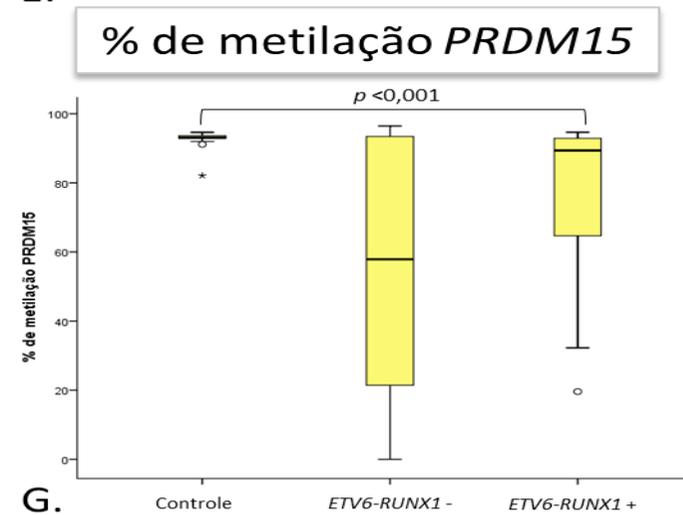




E.



F.



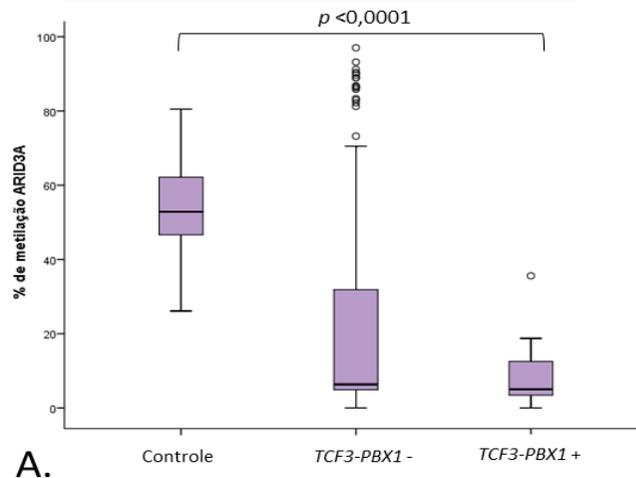
G.

Figura 4.33: Gráfico apresentando o perfil de metilação nos casos *ETV6-RUNX1+*, *ETV6-RUNX1-*, controles e amostras de remissão para os genes *ARID3A* (A), *ERG* (B), *ETS2* (C), *PBX1* (D), *PDE9A* (E), *PRDM9* (F) e *PRDM15* (G). As categorias foram comparadas aos pares (Mann-Whitney).

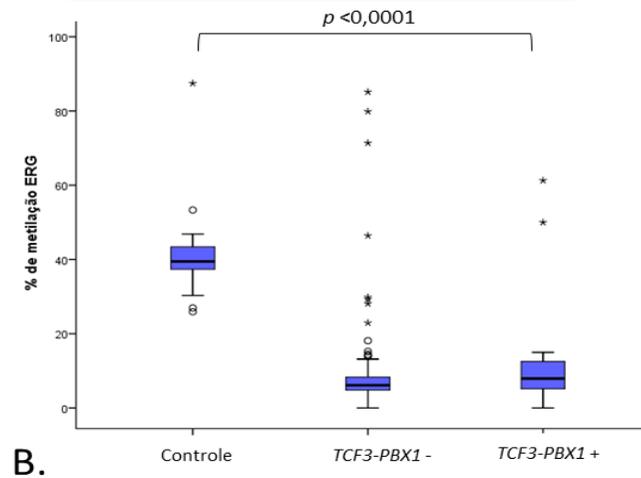
Da mesma forma que os casos *ETV6-RUNX1*, foram realizadas análises comparativas entre os casos *TCF3-PBX1+*, *TCF3-PBX1-* e controles. Nestas, a fusão gênica foi associada a perfis de hipometilação nos genes *ARID3A* ($p < 0,0001$), *ERG* ($p < 0,0001$), *PDE9A* ($p < 0,0001$) e *PRDM15* ($p = 0,025$) quando comparados ao grupo controle (Figura 4.25A, B, E e G), ao passo que o perfil de metilação do gene *PBX1* foi de hipermetilação nos casos *TCF3-PBX1+* ($p < 0,0001$) (Figura 4.25D). Já nas análises caso vs caso, a fusão *TCF3-PBX1* foi associada com hipermetilação no gene *PRDM15* ($p = 0,025$) (Figura 4.25G).

Já os casos *KMT2A-r*, quando comparados ao grupo controle, apresentaram hipermetilação dos genes *ARID3A* ($p < 0,0001$), *PBX1* ($p < 0,0001$), *PDE9A* ($p < 0,0001$), *PRDM9* ($p < 0,0001$) e *PRDM15* ($p < 0,0004$) (Figura 4.26A, D, E, F e G). Por outro lado, para os genes *ERG* ($p < 0,0001$) e *ETS2* ($p = 0,030$), foi observado um perfil de hipometilação (Figura 4.26B e C). Nas análises caso vs caso, o *KMT2A-r* foi associado com a hipermetilação dos genes *ARID3A* ($p < 0,0001$), *PDE9A* ($p = 0,034$), *PRDM9* ($p = 0,007$) e *PRDM15* ($p < 0,0001$) (Figura 4.26A, E, F e G).

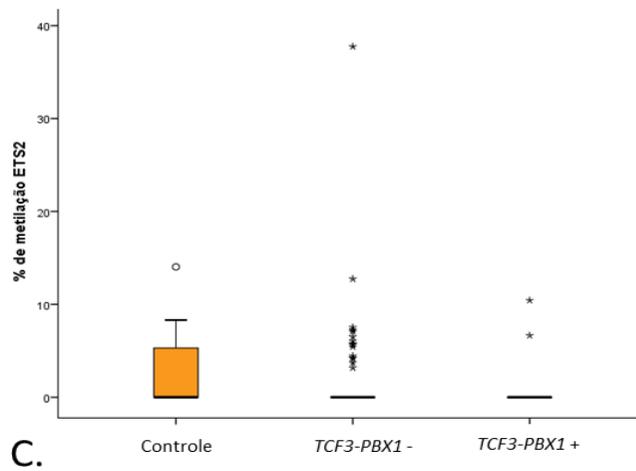
% de metilação *ARID3A*



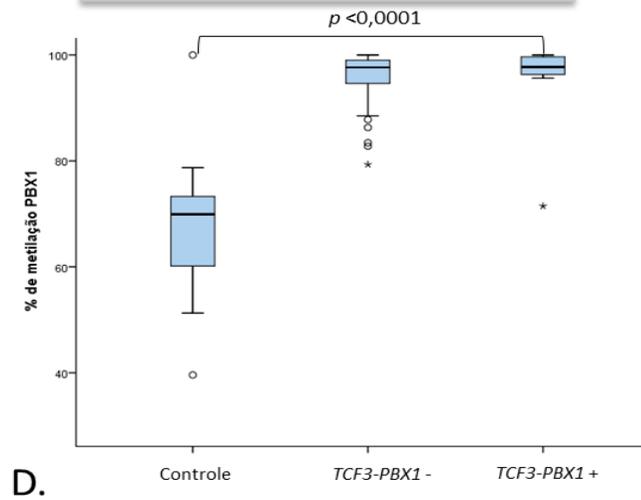
% de metilação *ERG*



% de metilação *ETS2*



% de metilação *PBX1*



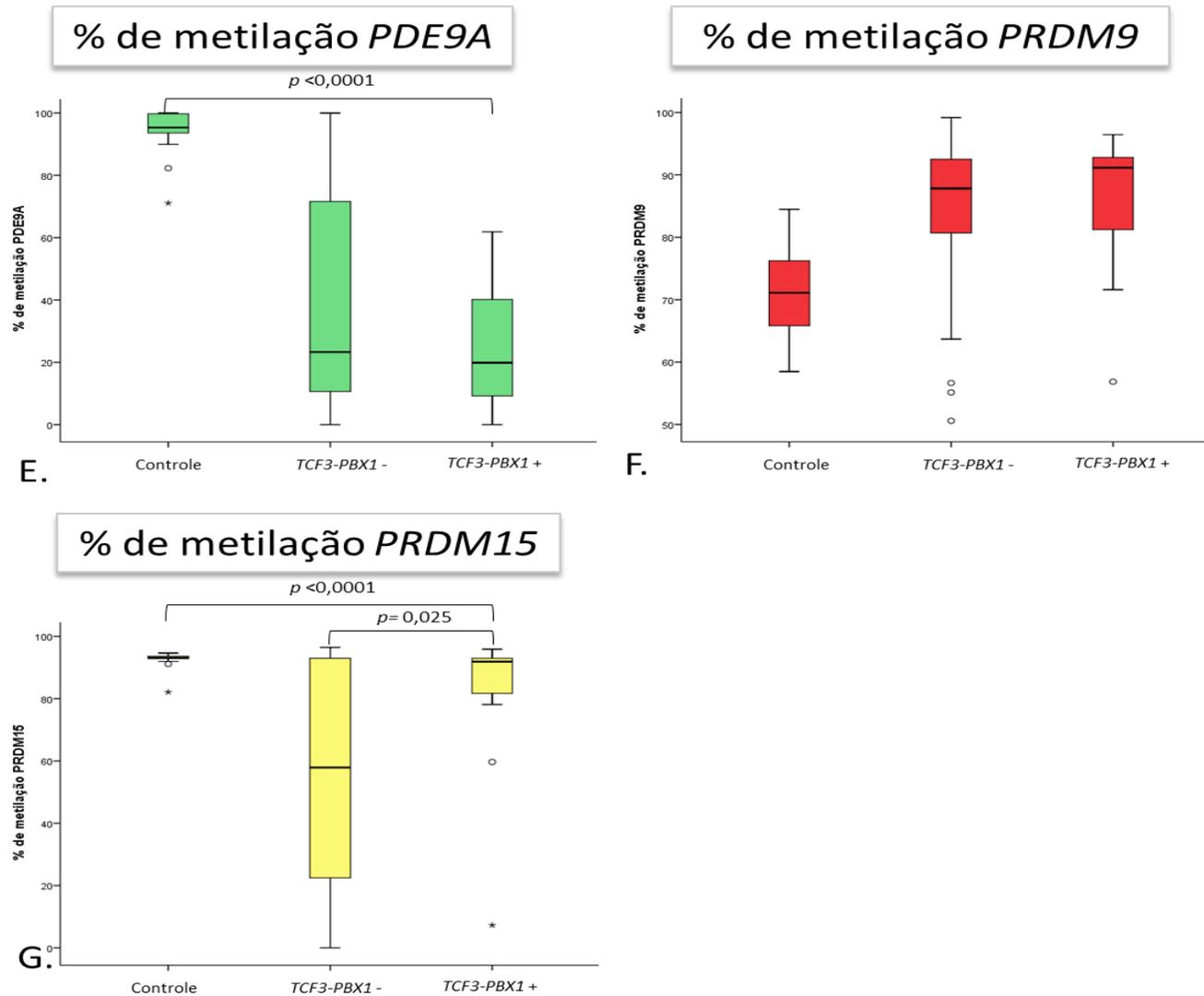
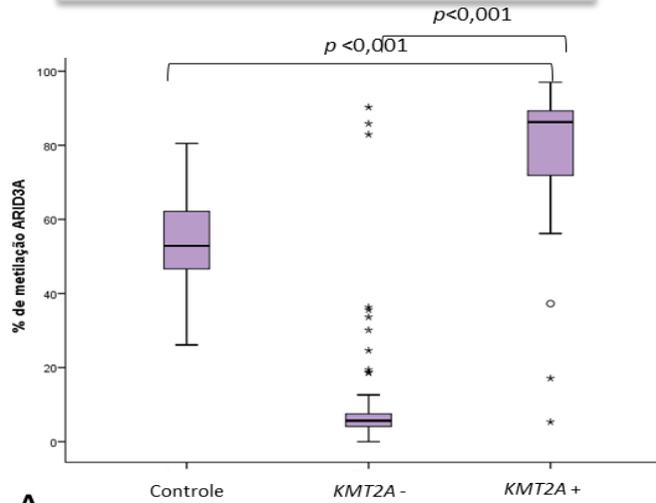


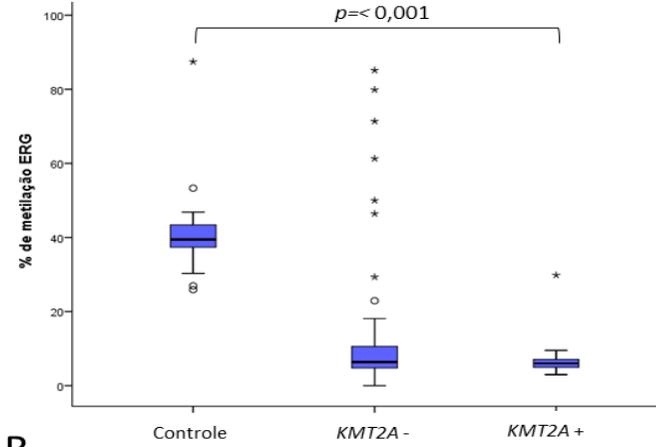
Figura 4.34: Gráfico apresentando o perfil de metilação nos casos *TCF3-PBX1+*, *TCF3-PBX1-*, controles e amostras de remissão para os genes *ARID3A* (A), *ERG* (B), *ETS2* (C), *PBX1* (D), *PDE9A* (E), *PRDM9* (F) e *PRDM15* (G). As categorias foram comparadas aos pares (Mann-Whitney).

% de metilação *ARID3A*



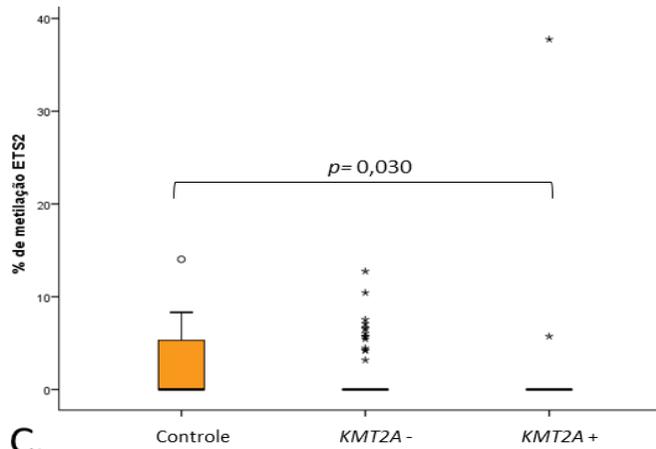
A.

% de metilação *ERG*



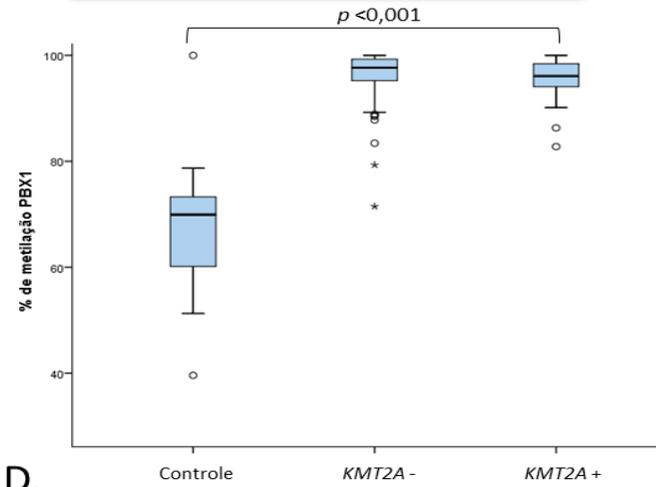
B.

% de metilação *ETS2*



C.

% de metilação *PBX1*



D.

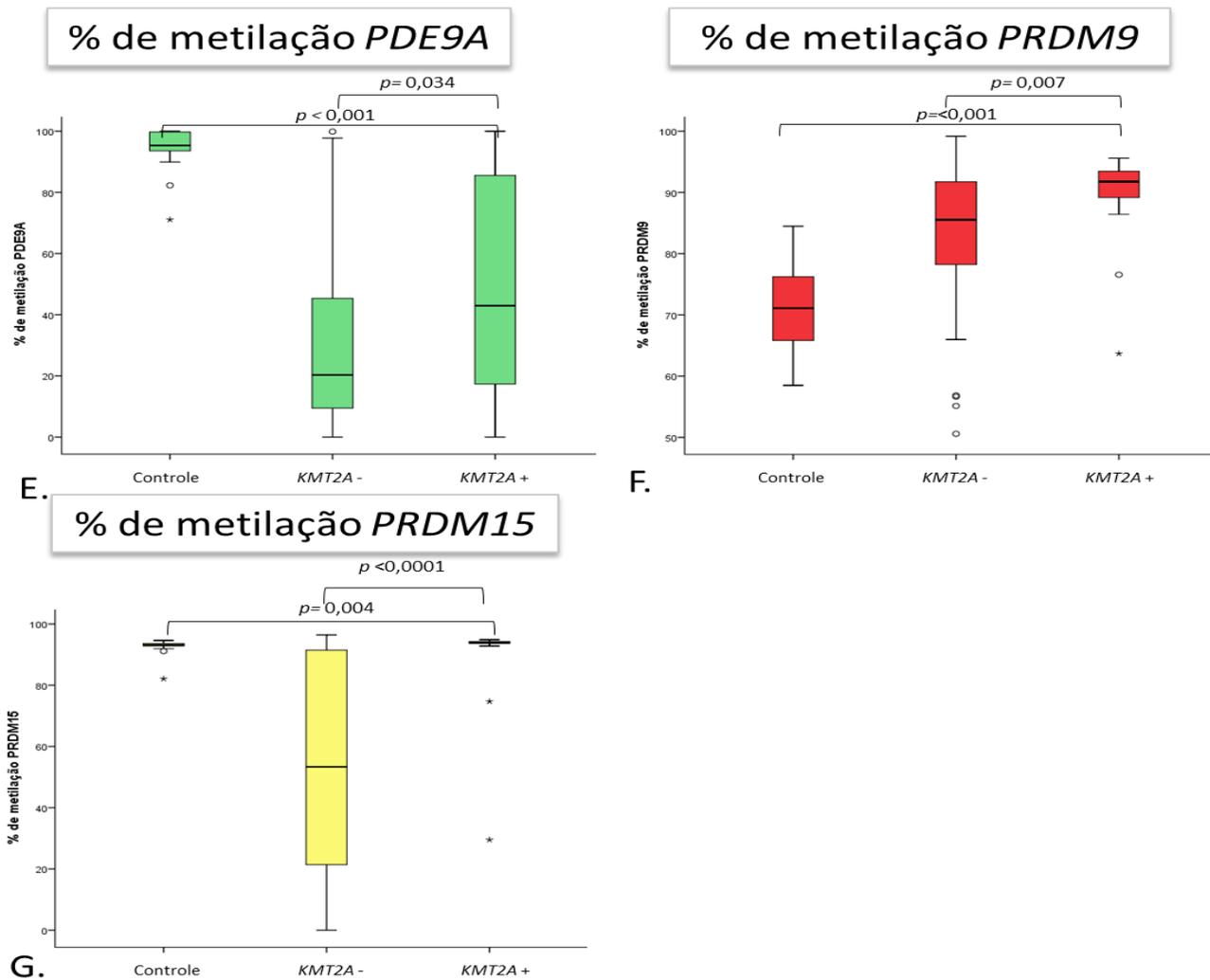


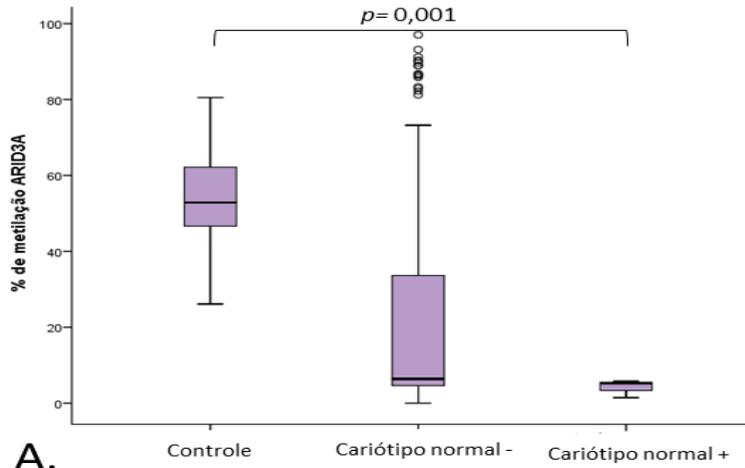
Figura 4.35: Gráfico apresentando o perfil de metilação nos casos *KMT2A-r*, *KMT2A* não rearranjado, controles e amostras de remissão para os genes *ARID3A* (A), *ERG* (B), *ETS2* (C), *PBX1* (D), *PDE9A* (E), *PRDM9* (F) e *PRDM15* (G). As categorias foram comparadas aos pares (Mann-Whitney).

Os casos com cariótipo normal e sem qualquer alteração críptica entre as testadas ao diagnóstico apresentaram menores níveis de metilação para os genes *ARID3A* ($p=0,001$), *PDE9A* ($p=0,012$) e *PRDM15* ($p=0,025$), quando comparados ao grupo controle (Figura 4.27A, E e G). Este mesmo grupo apresentou maiores níveis de metilação para o gene *PBX1* ($p=0,003$; Figura 4.27D). Na análise entre os casos com cariótipo normal e os demais subtipos de LLA-CPB, os casos com cariótipo normal apresentaram maiores níveis de metilação no gene *PBX1* ($p=0,009$) (Figura 4.27D).

Por último, foram feitas as análises dos perfis de metilação nos casos hiperdiplóides. Nas análises hiperdiplóide vs controles, foram observados menores níveis de metilação nos genes *ARID3A* ($p<0,001$), *ERG* ($p<0,0001$), *ETS2* ($p=0,015$), *PDE9A* ($p<0,001$) e *PRDM15* ($p<0,001$) (Figura 4.28A, B, C, E e G). O perfil oposto, ou seja, de hipermetilação, foi observado nos genes *PBX1* ($p<0,001$) e *PRDM9* ($p=0,002$) (Figura 4.28D e F).

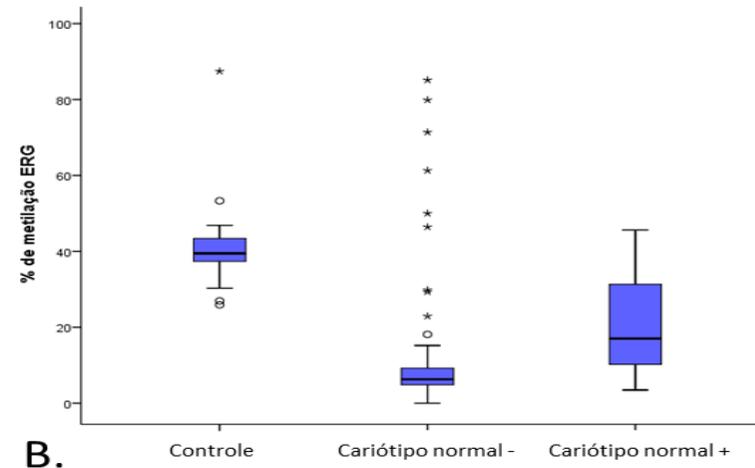
Quando comparados aos demais subtipos de LLA-CPB, os casos hiperdiplóides apresentaram menores níveis de metilação nos genes *ARID3A* ($p<0,001$), *ERG* ($p=0,021$), *PDE9A* ($p=0,036$), *PRDM9* ($p=0,026$) e *PRDM15* ($p<0,001$) (Figura 4.28A, B, E e G). Vale ressaltar que os perfis de hipometilação nos genes *ARID3A*, *PDE9A*, *PRDM9* e *PRDM15* se contrapõem aos perfis de hipermetilação encontrados nos casos *KMT2A-r* para os mesmos genes (Figura 4.26), e ainda se relacionam com as características clínicas apresentadas nas Tabelas 4.7 e 4.8, de modo que as leucemias na faixa etária ≤ 1 ano e a expressão negativa de CD10 são caracterizadas por blastos em estágio maturativo precoce, com a maior parte desses casos (16/18=89%) apresentando *KMT2A-r*.

% de metilação *ARID3A*



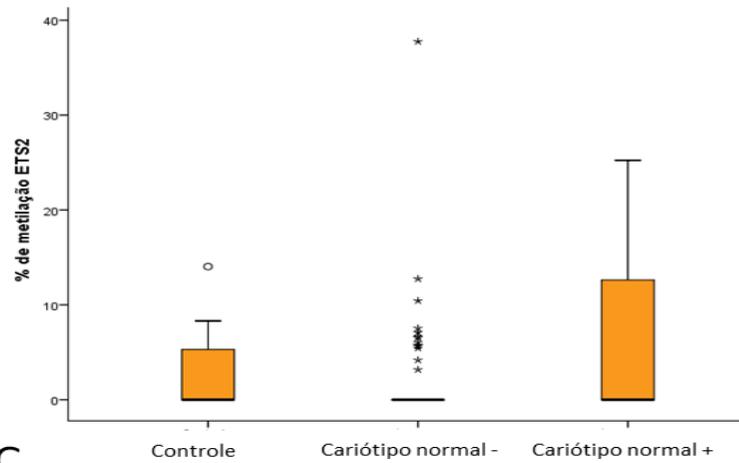
A.

% de metilação *ERG*



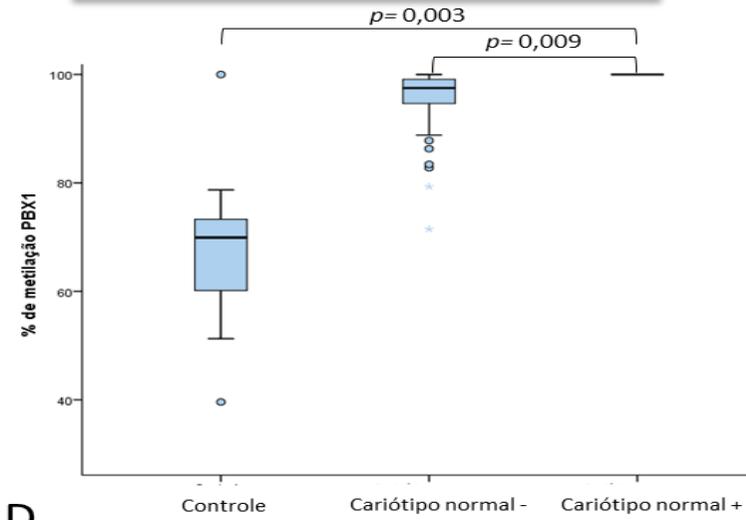
B.

% de metilação *ETS2*



C.

% de metilação *PBX1*



D.

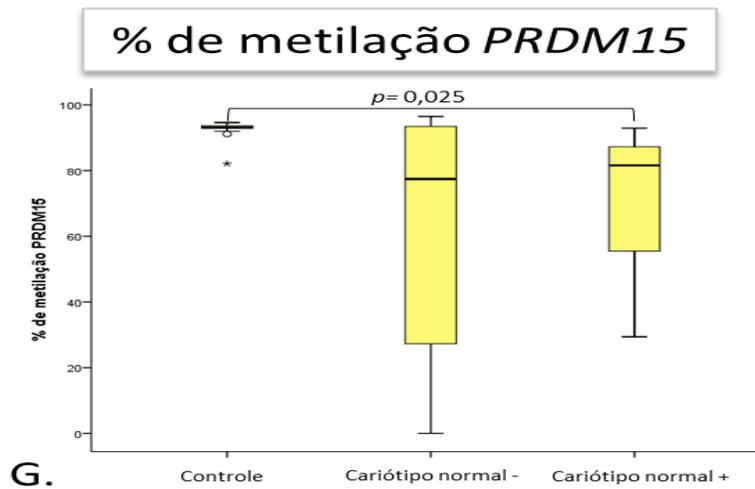
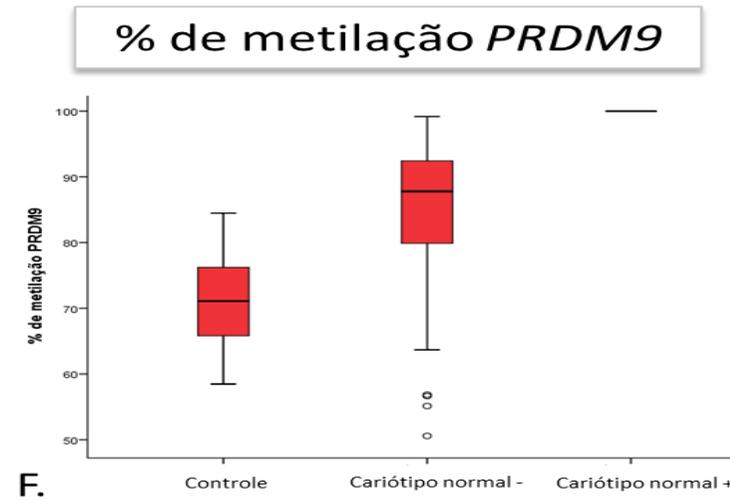
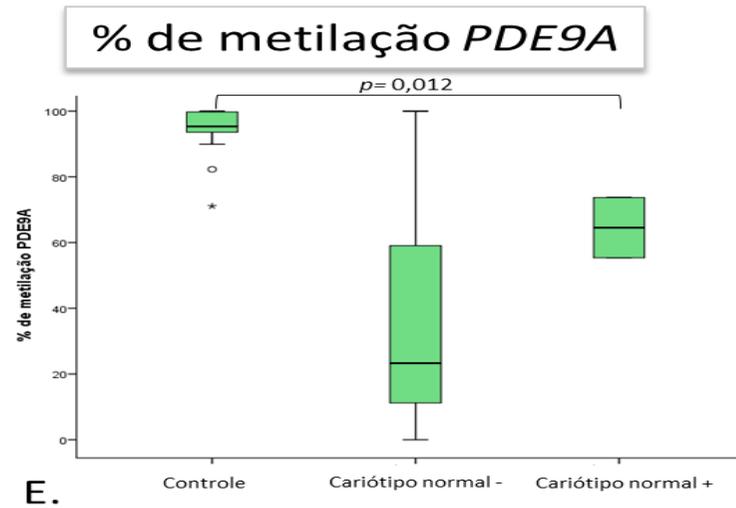
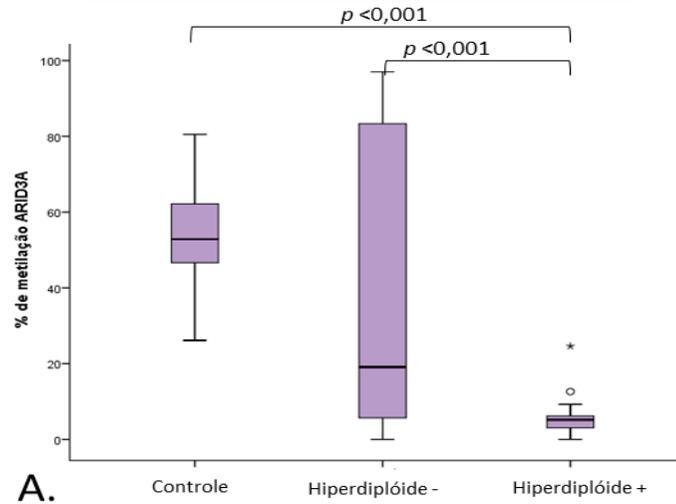
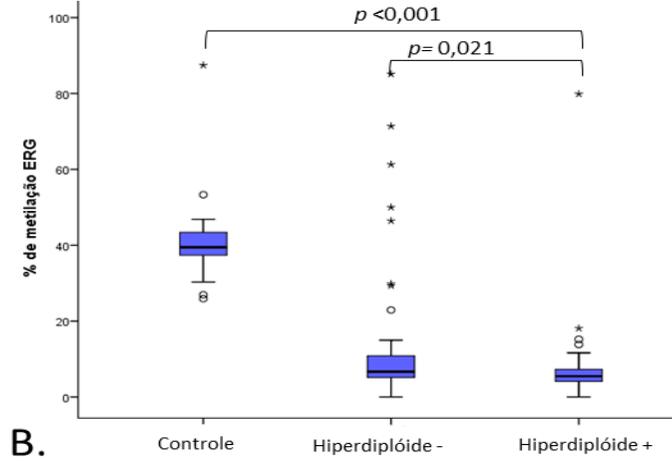


Figura 4.36: Gráfico apresentando o perfil de metilação nos casos cariótipo normal+, cariótipo normal-, controles e amostras de remissão para os genes *ARID3A* (A), *ERG* (B), *ETS2* (C), *PBX1* (D), *PDE9A* (E), *PRDM9* (F) e *PRDM15* (G). As categorias foram comparadas aos pares (Mann-Whitney).

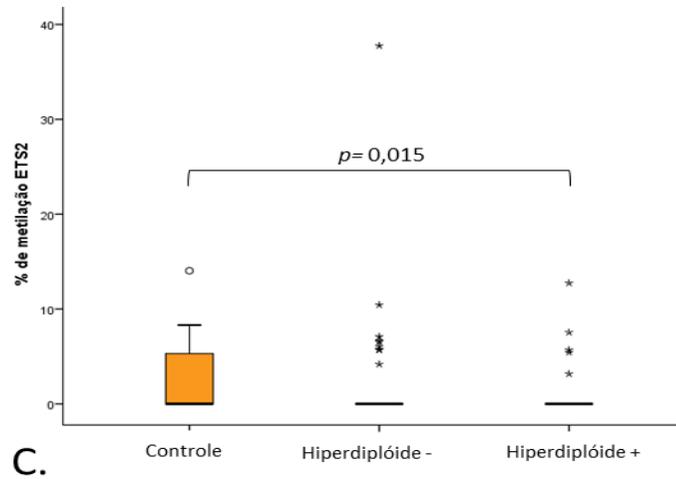
% de metilação *ARID3A*



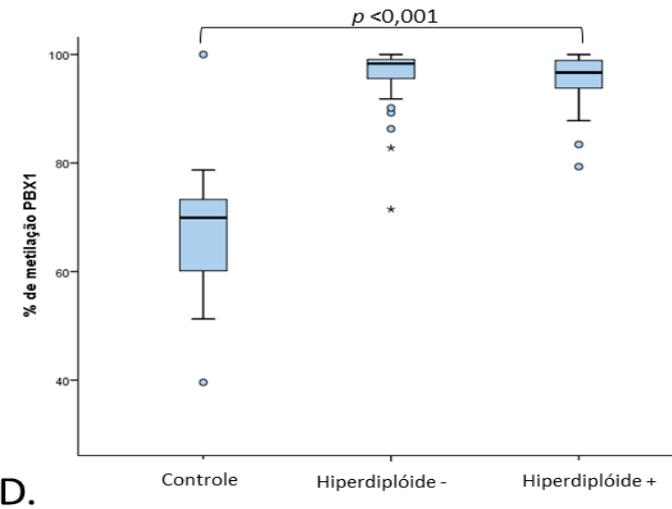
% de metilação *ERG*



% de metilação *ETS2*



% de metilação *PBX1*



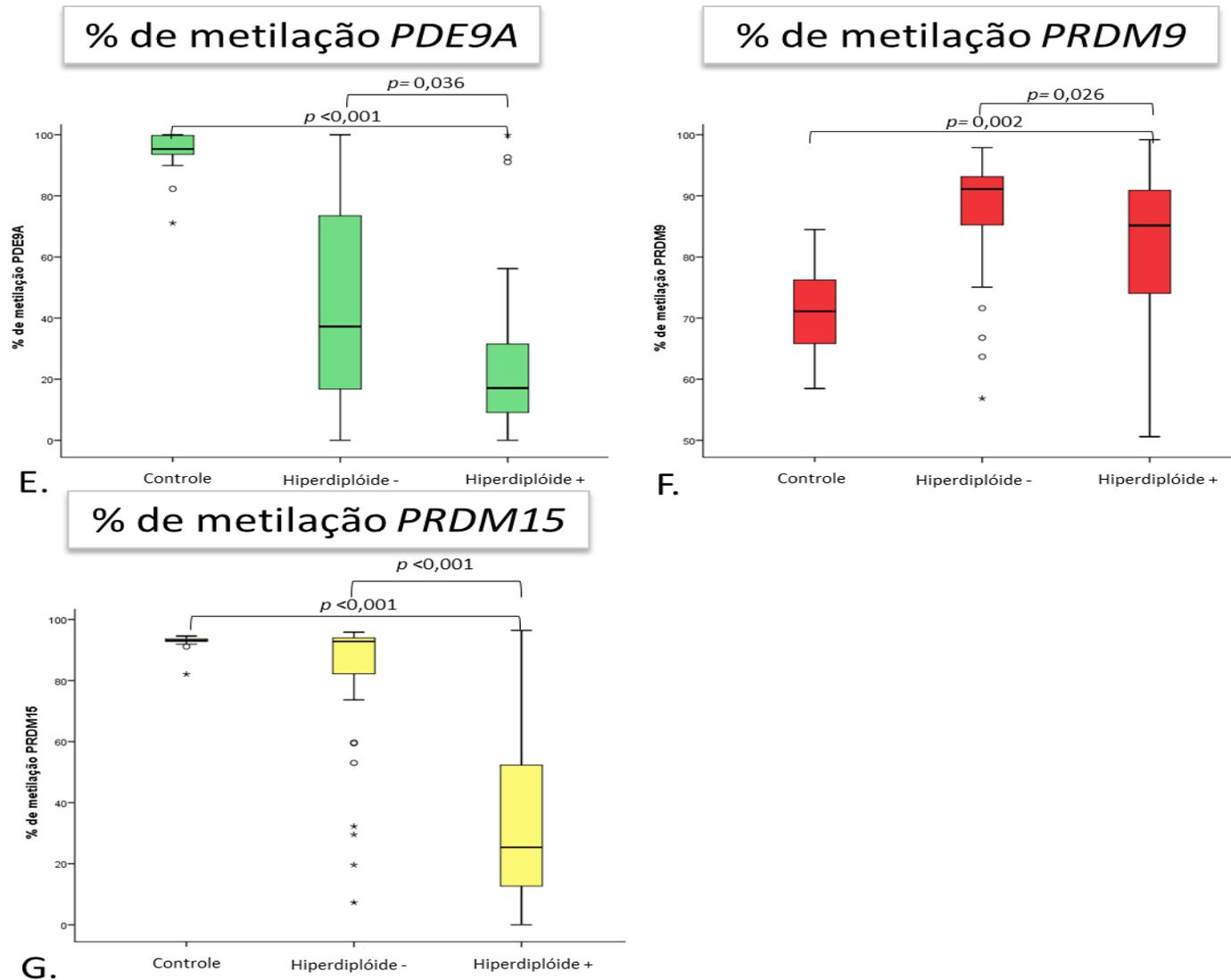


Figura 4.37: Gráfico apresentando o perfil de metilação nos casos Hiperdiplóides+, Hiperdiplóides-, controles e amostras de remissão para os genes *ARID3A* (A), *ERG* (B), *ETS2* (C), *PBX1* (D), *PDE9A* (E), *PRDM9* (F) e *PRDM15* (G). As categorias foram comparadas aos pares (Mann-Whitney).

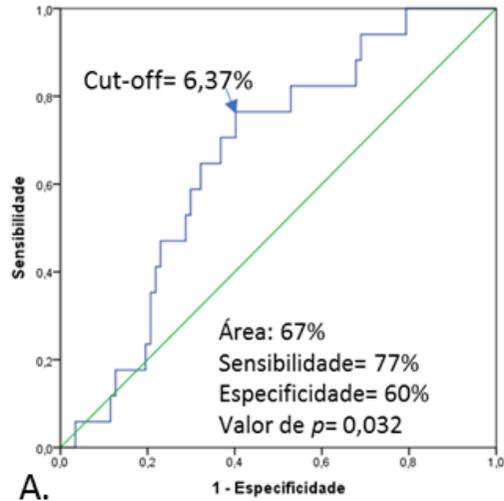
Visto que o perfil de metilação dos genes escolhidos para a validação são distintos entre os diferentes subtipos de LLA-CPB, investigamos a validade da análise de metilação gene-específica em prever as características citogenéticas e moleculares dos casos incluídos no estudo. Para tanto, realizamos a curva ROC, calculamos a acurácia, sensibilidade e especificidade dos genes diferencialmente metilados na análise caso vs caso por subtipo de LLA-CPB.

A curva ROC teve significância estatística para todos os genes analisados (Figura 4.29A-M). Dado o perfil de hipermetilação nos genes em questão nos casos *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1* e *KMT2A-r*, e a porcentagem de metilação gene-específica, o teste foi considerado positivo quando os valores foram maiores que o *cut-off* estabelecido (Figura 4.29A-G). Já nos casos hiperdiplóides, devido ao perfil de hipometilação observado, o teste foi considerado positivo quando a porcentagem de metilação foi inferior ao *cut-off* estabelecido (Figura 4.29H-M).

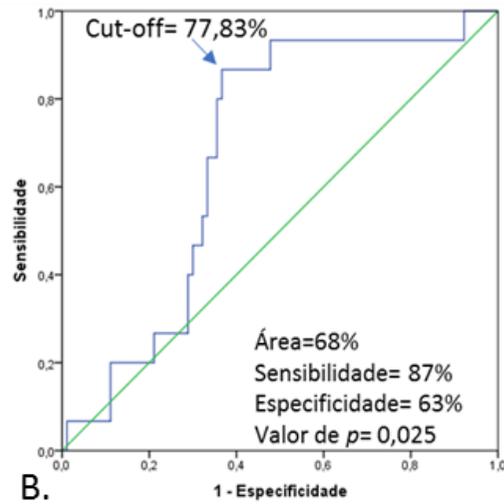
Os perfis de metilação foram capazes de distinguir os subtipos com boa sensibilidade e especificidade, de um modo geral. Os casos *ETV6-RUNX1* puderam ser identificados pela metilação do gene *ARID3A* com acurácia de 67% usando o *cut-off* de 6,37 (Figura 4.29A). Porém, visto que os casos *KMT2A-r* também foram caracterizados por hipermetilação no gene *ARID3A*, sendo que os últimos apresentaram níveis bem mais altos de metilação (mediana= 86,28; mínimo=5;máximo=97) (Figura 4.26A) em comparação com os casos *ETV6-RUNX1* (Mediana= 9,06; mínimo=4,0; máximo=90,0) (Figura 4.24A), observando que a maior parte dos casos apresentam porcentagem de metilação distinta. A fim de definir um nível de positividade intermediário, determinamos uma faixa de positividade para a metilação no gene *ARID3A*, entre 6,37% e 36,28%, deste modo, o perfil de metilação é capaz de prever este subtipo com acurácia de 82%, sensibilidade de 59% e especificidade de 87%.

Os casos com a fusão *TCF3-PBX1* foram associados à hipometilação no gene *PRDM15*. Estes puderam ser identificados usando o ponto de corte de 77,83% com acurácia de 68% (Figura 4.29B).

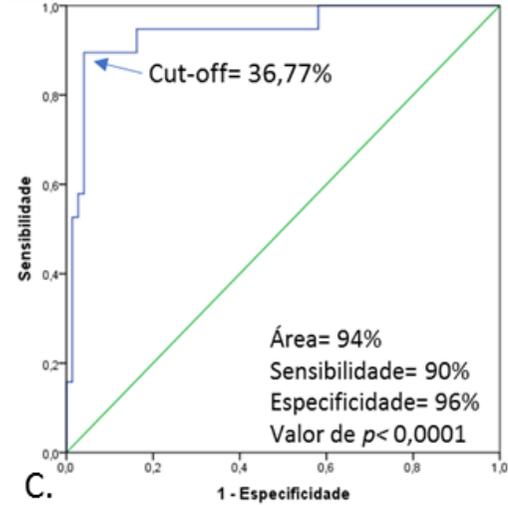
Metilação *ARID3A* nos casos *ETV6-RUNX1*



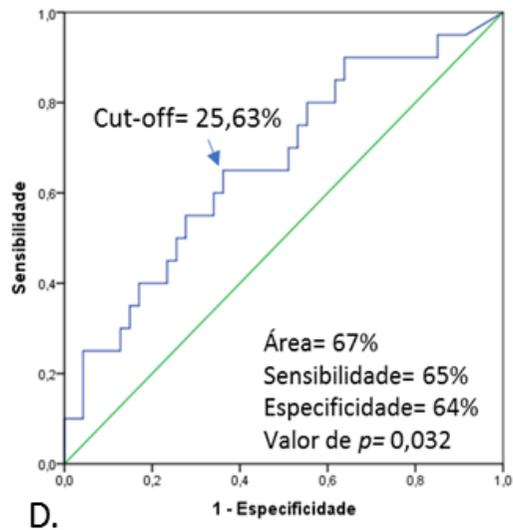
Metilação *PRDM15* nos casos *TCF3-PBX1*



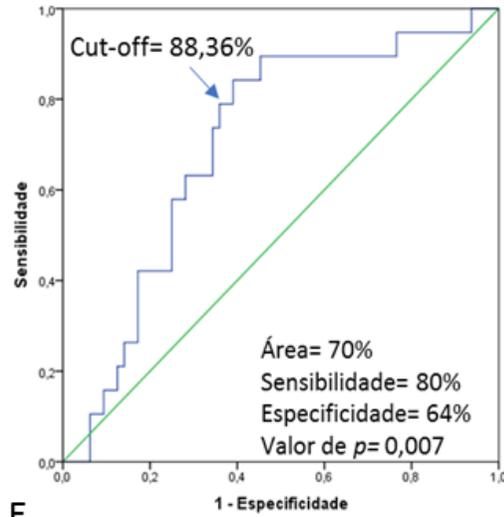
Metilação *ARID3A* nos casos *KTM2A-r*



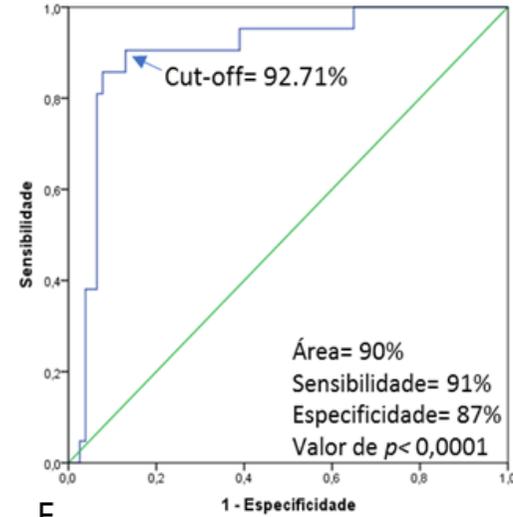
Metilação *PDE9A* nos casos *KTM2A-r*



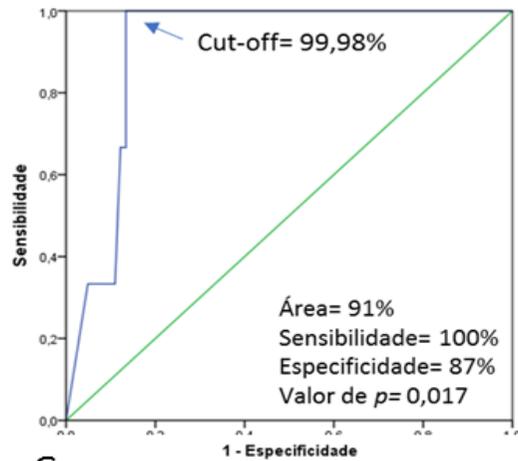
Metilação *PRDM9* nos casos *KTM2A-r*



Metilação *PRDM15* nos casos *KTM2A-r*

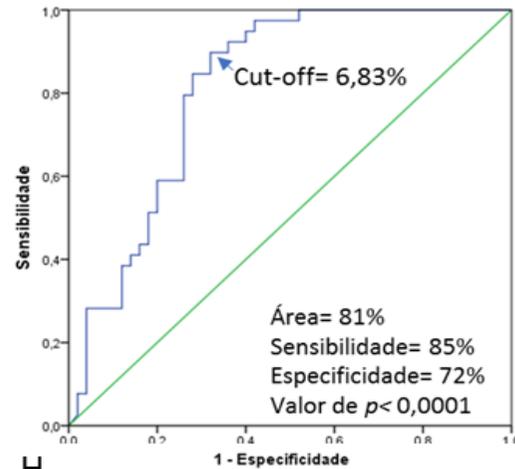


Metilação *PBX1* nos casos com cariótipo normal



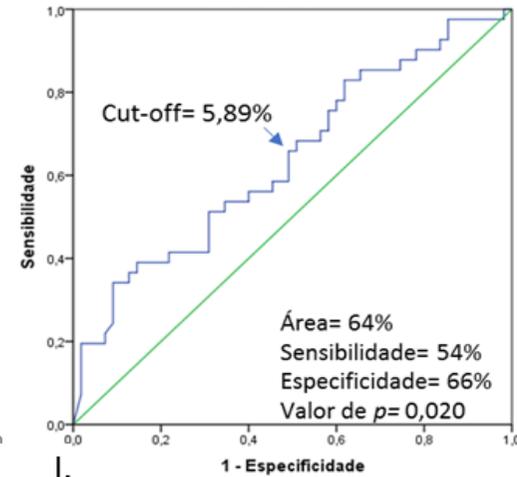
G.

Metilação *ARID3A* nos casos hiperdiplóides



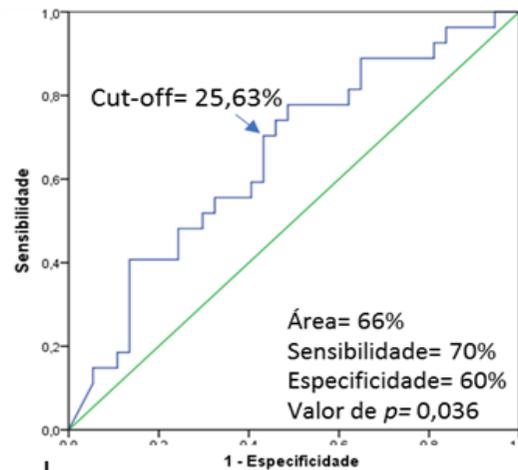
H.

Metilação *ERG* nos casos hiperdiplóides



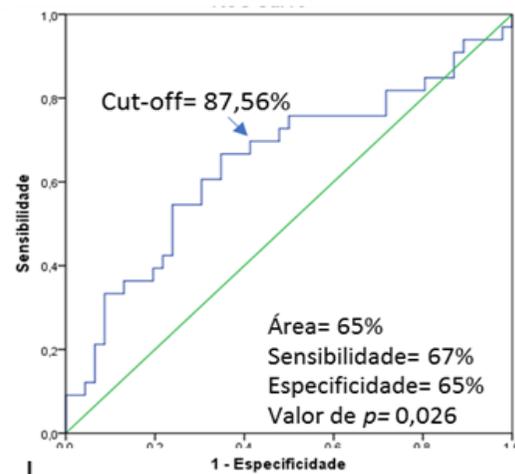
I.

Metilação *PDE9A* nos casos hiperdiplóides



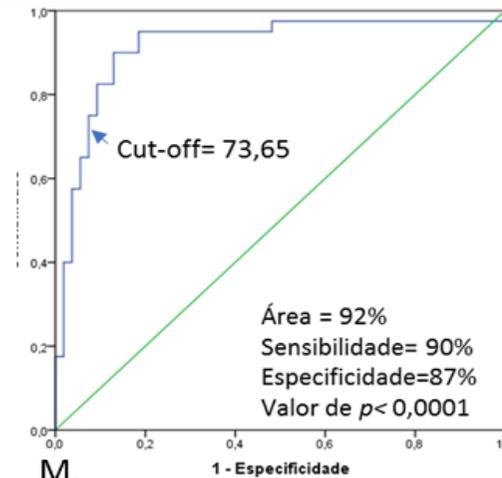
J.

Metilação *PRDM9* nos casos hiperdiplóides



L.

Metilação *PRDM15* nos casos hiperdiplóides



M.

Figura 4.38: Curva ROC dos genes diferencialmente metilados nos subtipos de LLA-CPB.

A. Curva ROC da metilação no gene *ARID3A* nos casos *ETV6-RUNX1*. B. Curva ROC da metilação no gene *PRDM15* nos casos *TCF3-PBX1*. C. Curva ROC da metilação no gene *ARID3A* nos casos *KMT2A-r*. D. Curva ROC da metilação no gene *PDE9A* nos casos *KMT2A-r*. E. Curva ROC da metilação no gene *PRDM9* nos casos *KMT2A-r*. F. Curva ROC da metilação no gene *PRDM15* nos casos *KMT2A-r*. G. Curva ROC da metilação no gene *PBX1* nos casos com cariótipo normal. H. *ARID3A* nos casos hiperdiploides. I. Curva ROC da metilação no gene *ERG* nos casos hiperdiploides. J. Curva ROC da metilação no gene *PDE9A* nos casos hiperdiploides. L. Curva ROC da metilação no gene *PRDM9* nos casos hiperdiploides. M. Curva ROC da metilação no gene *PRDM15* nos casos hiperdiploides. A linha em verde representa a probabilidade ao acaso. A linha azul representa a curva ROC propriamente dita.

Assim como no gene *ARID3A*, o gene *PRDM15* está hipermetilado nos casos com a fusão *TCF3-PBX1* (Figura 4.29A) e nos casos *KMT2A-r* (Figura 4.29F). Apesar de não serem dois grupos tão distintos, é possível definir também uma faixa de positividade entre 77,83 e 92,71. Dependendo do objetivo ao aplicar o teste, restringindo o grupo de casos positivos, é possível aumentar a especificidade e a acurácia do teste. A mediana da metilação no gene *PRDM15* foi de 91,86 (mínimo= 7,00; máximo= 96,00) nos casos *TCF3-PBX1* e 93,90 (mínimo= 30,00; máximo= 95,00) nos casos *KMT2A-r*. Usando como critério de positividade os valores entre 77,83 e 92,71, acurácia do teste sobe para 87%, 61% de sensibilidade e especificidade 91%.

Dando seguimento às análises do teste de validação, os casos *KMT2A-r* foram, dentre todos os subtipos estudados, os que melhor puderam ser caracterizados quanto ao perfil de metilação. Estes apresentaram os níveis de metilação mais altos para os genes *ARID3A*, *PBX1*, *PDE9A*, *PRDM9* e *PRDM15* (Figura 4.26A-D, E, F e G). Tendo como base apenas a porcentagem de metilação no gene *ARID3A*, usando o *cut-off* de 36,67, foi possível predizer o *KMT2A-r* com acurácia de 94%, sensibilidade de 90% e especificidade de 96% (Figura 4.29C). Por outro lado, os perfis de metilação dos genes *PDE9A* e *PRDM9* foram menos sensíveis e específicos para o rearranjo, o primeiro com acurácia de 67%, sensibilidade de 65% e especificidade 64% (Figura 4.29D) e, o segundo, com acurácia de 70%, sensibilidade de 80% e especificidade 64% (Figura 4.29E). Já os níveis de metilação no gene *PRDM15* acima de 92,71% foram capazes de identificar o rearranjo com acurácia de 90%, sensibilidade de 91% e especificidade 87% (Figura 4.29F).

Apesar de termos incluídos poucos casos com cariótipo normal neste estudo, estes puderam ser caracterizados pelos níveis de metilação no gene *PBX1* a partir de 99,98% com acurácia de 91%, sensibilidade de 100% e especificidade 87% (Figura 4.29G).

Por fim, porém não menos importante, o subtipo com os casos hiperdiploides corresponde ao subgrupo com maior número de casos analisados. Este, diferente dos demais subtipos, teve como característica hipometilação dos genes *ARID3A*, *ERG*, *PDE9A*, *PRDM9* e *PRDM15*. A metilação no gene *ARID3A* abaixo de 6,83 foi capaz de identificar os casos hiperdiploides com acurácia de 81%, sensibilidade de 85% e especificidade 72% (Figura 4.29H). Já a metilação no gene *ERG* abaixo de 5,89, teve acurácia de 64%, sensibilidade de 54% e especificidade 66% (Figura 4.29I).A

hipometilação no gene *PDE9A* apresentou acurácia de 66%, sensibilidade de 70% e especificidade 60% (Figura 4.29J). O gene *PRDM9* apresentou acurácia de 65%, sensibilidade de 67% e especificidade 65% (Figura 4.29L). Por último, e com os melhores resultados para a hiperdiploidia, a metilação no gene *PRDM15* abaixo de 73,65% identificou este subtipo de LLA-CPB com acurácia de 92%, sensibilidade de 90% e especificidade 87% (Figura 4.29M).

4.4.6. Análise de metilação global

A metilação global foi inferida a partir da avaliação dos níveis de metilação de regiões de LINE-1. Nesta etapa do estudo, foram incluídos os mesmos casos e controles incluídos nas análises de validação, sendo eles 117 casos de LLA-CPB, 27 controles de SCUP e 5 amostras de remissão. O número de amostras incluídas e as especificações dos diferentes níveis de ganho envolvendo o cromossomo 21 encontram-se especificados na Figura 4.22. A média do tempo de sobrevida para todos os casos foi de 12,19 anos (IC 95%, 9.98-14.60) e a mediana foi de 3,7 anos.

Em seguida, foi avaliado o perfil de metilação em LINE-1 nos casos e controles. Para realizar as análises, foram usados os valores médios obtidos dos sítios CpG.

A mediana do perfil de metilação observado foi semelhante entre casos (72%), controles (71%) e remissões (70%) (Figura 4.30A.), porém, os casos de LLA apresentaram variabilidade maior quanto à porcentagem de metilação, com o mínimo de 61% e máximo 79%. Análises pareadas entre os casos de LLA ao diagnóstico e no momento da remissão demonstraram que a porcentagem de metilação em LINE-1 foi menor na remissão para três dos cinco casos avaliados (Figura 4.30B), nos outros dois pacientes, a porcentagem de metilação pouco difere no diagnóstico e remissão.

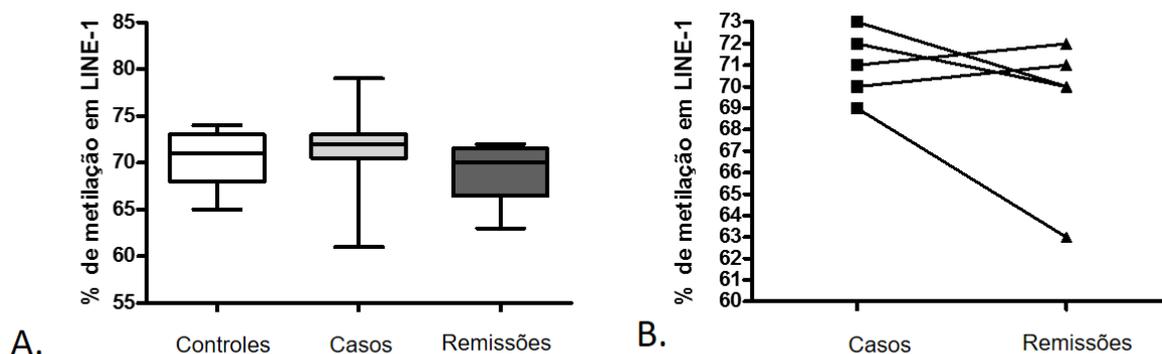


Figura 4.39: Perfil de metilação em LINE-1 nos casos, controles e remissões.

A. Box plot da porcentagem de metilação nos casos, controles e remissões. B. Gráfico de linhas ilustrando a porcentagem de metilação dos casos ao diagnóstico e no momento da remissão.

Mediante a variabilidade encontrada no perfil de metilação dos casos, decidimos realizar análises pelos diferentes subtipos de LLA. Estas análises demonstraram que os subtipos *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *KMT2A-r* e de cariótipo normal não apresentaram diferenças no perfil de metilação quando comparados aos casos negativos para cada alteração citogenética-molecular (Figura 4.31A-D). O mesmo resultado foi obtido quando estes grupos foram comparados às amostras de remissão (Figura 4.31A-D). Por outro lado, as amostras hiperdiplóides apresentaram níveis mais altos de metilação em LINE-1 quando comparadas aos casos não hiperdiplóides ($p=0,0004$), ao grupo controle ($p=0.0013$), assim como com às remissões ($p=0.0198$) (Figura 4.31E).

Uma vez que essas diferenças foram observadas, nós realizamos a análise decurva ROC para avaliar se os níveis de metilação em LINE-1 são capazes de discriminar o grupo hiperdiplóide frente aos demais subtipos de LLA. Usando o ponto de corte de 71,5%, LINE-1 é capaz de distinguir o grupo de hiperdiplóides com uma acurácia de 70,56%, sensibilidade de 69,8% e especificidade de 57,6% (Figura 4.31F).

Nós também verificamos se os níveis de metilação em LINE-1 diferem de acordo com o gênero, idade, leucometria, classificação de risco do NCI e *status* de sobrevida global, porém, não foi observada qualquer diferença estatisticamente significativa (Tabela 4.10). Por outro lado, a metilação em LINE-1 foi diferente quanto

ao imunofenótipo, sendo que o grupo CD10+ apresentou maiores níveis de metilação em comparação ao grupo CD10- ($p= 0,004$) (Tabela 4.10).

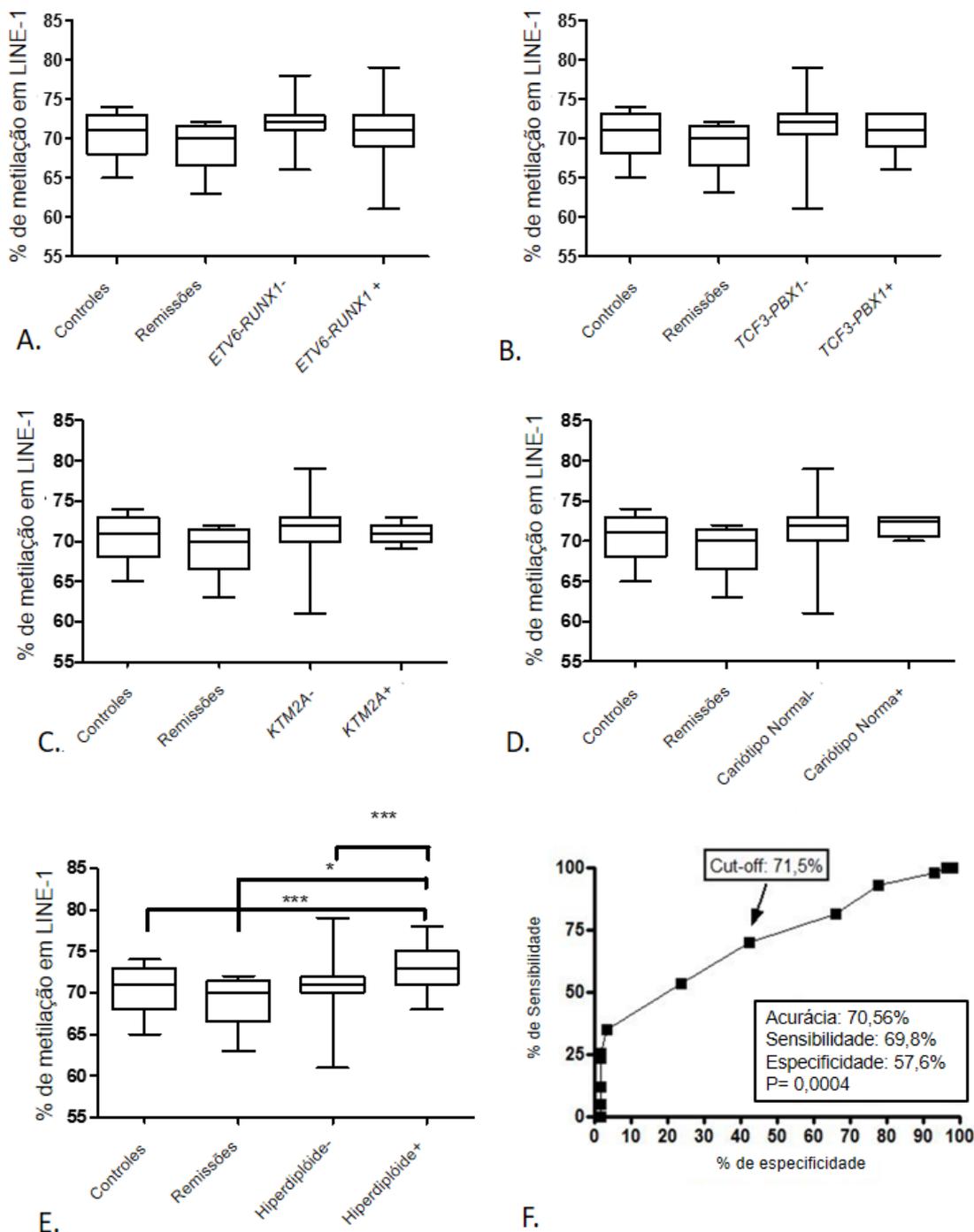


Figura 4.40: Metilação em LINE-1 em controles, remissões e nos diferentes subtipos de LLA-CPB. A. Boxplot mostrando os níveis de metilação de LINE-1 em controles, remissões, casos *ETV6-RUNX1-* e *ETV6-RUNX1+*. B. Boxplot mostrando os níveis de metilação de LINE-1 em controles, remissões, casos *TCF3-PBX1-* e *TCF3-PBX1+*. C. Boxplot mostrando os níveis de metilação de LINE-1 em controles, remissões, casos *KMT2A-*, *KYM2A+*. D. Boxplot mostrando os níveis de metilação de LINE-1 em controles, remissões, casos cariótipo normal- e cariótipo normal+. E. Boxplot mostrando os níveis de metilação de LINE-1 em controles, remissões, casos hiperdiplóides- e hiperdiplóides+. F. Curva ROC demonstrando a validade da análise de metilação em LINE-1 na distinção dos casos hiperdiplóides.

Tabela 4.14: Mediana da metilação em LINE-1 de acordo com as características clínico e demográficas dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda, Brasil, 2002-2015

Características	Mediana da metilação em LINE-1 (Min-Máx)	P valor
Sexo		
Masculino	72 (66-79)	
Feminino	72 (61-79)	0.804
Idade (anos)		
≤1	71 (69-76)	
2-10	72 (66-79)	
>10	72 (61-77)	0.233
Leucometria, x10⁹/L		
<50	72 (61-79)	
>50	72 (68-78)	0.672
Imunofenótipo		
CD10 -	71 (69-72)	
CD10 +	72 (61-79)	0.004
Grupo de risco		
Risco padrão	72 (66-79)	
Alto risco	72 (61-78)	0.781
Status		
Vivo	72 (69-76)	
Óbito	74 (69-78)	0.129

Abreviações: Min, mínimo; Máx, máximo; negrito, valor de $p < 0,05$.

4.4.7. Associação entre o polimorfismo *MTHFR* rs1801133e a metilação global do DNA

Neste estudo, nós buscamos avaliar se existe associação entre o polimorfismo no gene *MTHFR* rs1801133e diferentes perfis de metilação global e gene-específico. A frequência genotípica para o polimorfismo *MTHFR* rs1801133 está apresentada na Tabela 4.6. A maior parte dos casos apresentou o genótipo homozigoto selvagem (53%), enquanto 40% dos casos apresentaram o genótipo em heterozigose e 7% foram homozigotos mutantes. As distribuições alélicas estão em consistência com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (p -valor do teste de $\chi^2 = 0,79$).

Para demonstrar tais associações, testamos se as variantes genotípicas estavam associadas com diferentes níveis de metilação dentro do grupo controle e do grupo de casos.

Os casos e controles incluídos nessa análise foram os mesmos da análise de metilação global e gene-específica. O grupo controle foi composto por 27 amostras com a seguinte frequência genotípica: 17CC, 9CT e 1TT. Aplicando o teste não paramétrico, visto que as frequências de metilação não tiveram distribuição normal (Kruskal Wallis anova one way), comparando a metilação entre os três diferentes genótipos, houve significância estatística para a metilação no gene *PDE9A* ($p=0,032$) (Tabela 4.11), porém, esta análise incluiu apenas um caso homocigoto mutante. Desse modo, comparamos a metilação entre os casos homocigotos selvagens (genótipo *MTHFR* 677CC) e heterocigotos (genótipo *MTHFR* 677CT) (teste de Mann Whitney), e a significância se manteve ($p=0,019$). Curiosamente, o genótipo heterocigoto foi associado com hipermetilação neste gene (Figura 4.32). Porém, quando analisamos o grupo de homocigotos selvagens vs heterocigotos e homocigoto mutante juntos (CC vs CT+TT), não houve diferença estatisticamente significativa na metilação do gene ($p=0,056$).

Tabela 4.15: Associação entre o polimorfismo *MTHFR* rs1801133e a metilação de DNA no grupo controle

Genótipo/ Gene	<i>MTHFR</i> CC % metilação Med (min-max)	<i>MTHFR</i> CT % metilação Med (min-max)	<i>MTHFR</i> TT % metilação Med (min-max)	P valor
ARID3A	52,24 (26,12-80,50)	53,34 (39,90-69,78)	62,37 (62,37-62,37)	0,625
ERG	40,09 (25,92-87,45)	38,10 (30,29-45,32)	46,82 (46,82-46,82)	0,139
ETS2	0,00 (0,00-7,89)	5,20 (0,00-14,03)	0,00 (0,00-0,00)	0,316
PBX1	70,40 (51,28-99,99)	71,07 (39,58-78,71)	61,34 (61,34-61,34)	0,764
PDE9A	94,65 (71,08-100,00)	99,03 (94,52-100)	90,16 (90,16-90,16)	0,032
PRDM9	70,04 (58,49-79,40)	73,48 (68,72-84,47)	78,45 (78,45-78,45)	0,215
PRDM15	93,11 (91,13-94,04)	93,18 (82,09-94,61)	91,94 (91,94-91,94)	0,371
LINE-1	71,60 (65,40-74,40)	71,20 (66,20-73,00)	73,00 (73,00-73,00)	0,559

Abreviações: Med, mediana; min, mínimo; max, máximo; negrito, valor de $p < 0,05$.

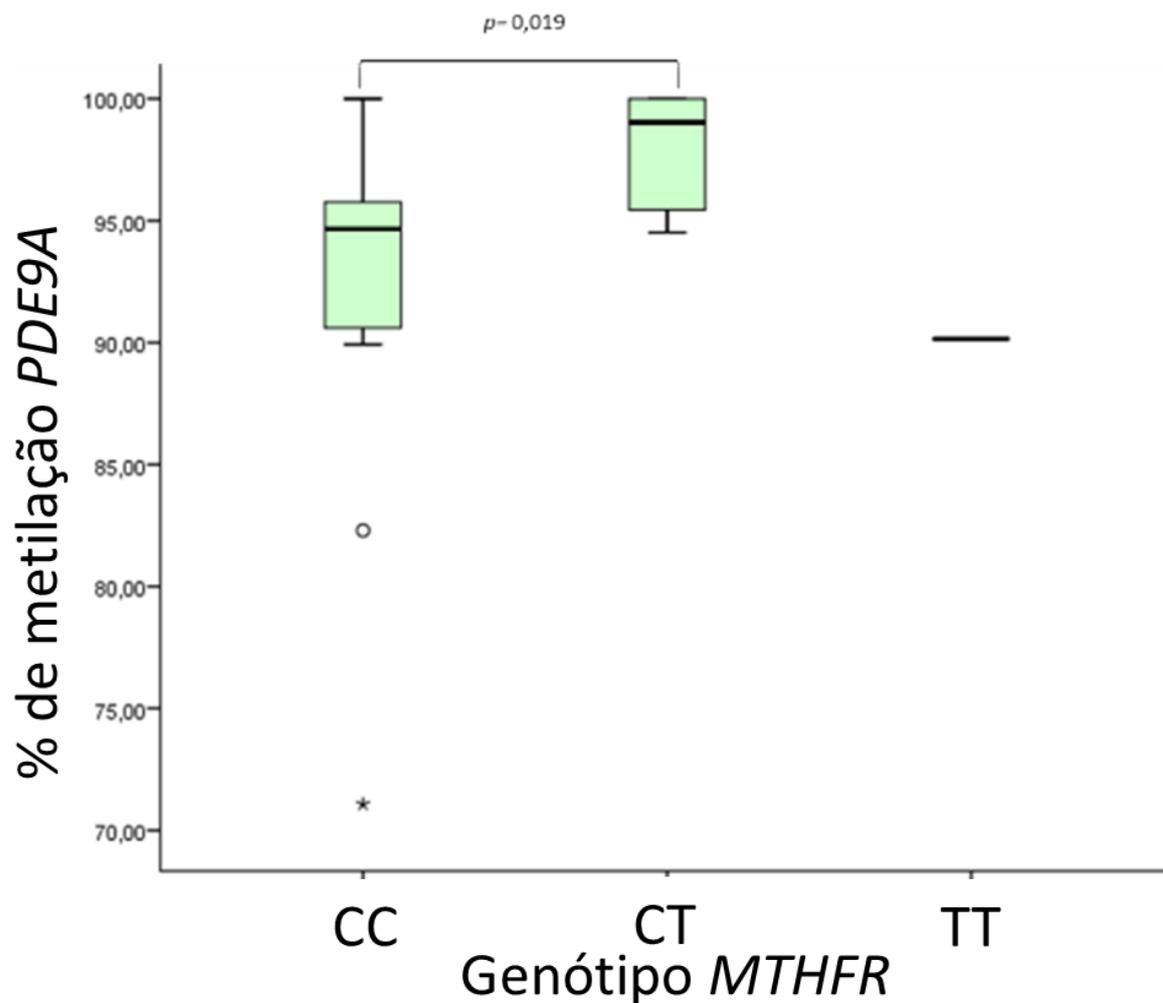


Figura 4.41: Metilação no gene *PDE9A* de acordo com o genótipo do gene *MTHFR*. As categorias foram comparadas aos pares pelo teste de Mann-Whitney.

Dando seguimento à influência do polimorfismo na metilação, também verificamos se existia alguma diferença entre essas características no grupo de casos. Porém, não houve qualquer significância estatística entre os níveis de metilação em genes específicos ou em LINE-1 e os diferentes genótipos para o gene *MTHFR* (Tabela 4.12) nas comparações entre os três genótipos (CC vs CT vs TT), nas comparações 2 por 2 (CC vs CT, CC vs TT, CT vs TT) ou na comparação homocigoto selvagem vs o somatório dos heterocigotos e homocigotos mutantes (CC vs CT+TT).

Tabela 4.16: Associação entre o polimorfismo *MTHFR* rs1801133e a metilação de DNA no grupo de casos LLA-CPB

Genótipo/	<i>MTHFR</i> CC	<i>MTHFR</i> CT	<i>MTHFR</i> TT	P valor
Gene	% metilação Med (min-max)	% metilação Med (min-max)	% metilação Med (min-max)	
<i>ARID3A</i>	5,78 (0,00-97,02)	9,00 (0,00-90,28)	5,36 (0,83-82,22)	0,108
<i>ERG</i>	6,05 (0,00-85,13)	6,37 (0,00-79,88)	5,49 (2,05-50,00)	0,749
<i>ETS2</i>	0,00 (0,00-25,23)	0,00 (0,00-37,75)	0,00 (0,00-3,17)	0,577
<i>PBX1</i>	98,24 (86,30-100,00)	97,65 (79,33-100,00)	97,08 (87,80-99,09)	0,527
<i>PDE9A</i>	17,73 (0,00-100,00)	42,97 (0,00-100,00)	39,1700 (6,40-97,75)	0,074
<i>PRDM9</i>	88,75 (50,58-97,89)	88,74 (55,13-100,00)	86,42 (65,97-99,17)	0,600
<i>PRDM15</i>	53,24 (0,00-96,47)	76,12 (0,00-95,86)	69,58 (5,78-94,22)	0,612
<i>LINE-1</i>	61,40 (61,40-78,60)	71,70 (66,20-77,40)	71,30 (69,40-77,60)	0,290

Abreviações: Med, mediana; min, mínimo; max, máximo.

Parte dos resultados deste trabalho já foram descritos em dois manuscritos que estão em vias de publicação (Anexos IV e V).

5. DISCUSSÃO

A importância da caracterização citogenética (e/ou citogenético-molecular) dos diferentes subtipos de LLA-CPB é um consenso comum na estratificação de risco preditivo de recaída e sobrevida das LLA-CPB (PUI *et al.*, 2011; MOORMAN *et al.*, 2014). Tendo isso em mente, recentemente, Irving *et al.*, dissecaram a relevância clínica das anormalidades cromossômicas, analisando CNA e mutações gênicas que foram preditoras de recaída em uma coorte robusta de LLA-CPB. A caracterização por meio da citogenética convencional não é capaz de fornecer todas as informações necessárias para a estratificação de risco, deste modo, uma caracterização citogenética mais precisa, visando identificar translocações em regiões crípticas, se faz necessária no diagnóstico das LLA-CPB (IRVING *et al.*, 2016).

O algoritmo de testes usados para a caracterização da leucemia se inicia com a citogenética convencional, como ferramenta para incorporar risco preditivo. Adicionalmente, os testes moleculares (RT-PCR) e/ou FISH são utilizados para a identificação da maioria das fusões gênicas (*ETV6-RUNX1*, *E2A-PBX1*, *MLL-AFF1*, *MLL-MLLT3*, *BCR-ABL1*) e ainda, faz-se uso do índice de DNA como uma *proxy* na determinação da ploidia, por citometria de fluxo (HOLMFELDT *et al.*, 2013). Estes são testes que preenchem as deficiências da técnica de citogenética convencional.

O uso do FISH para identificação das alterações cromossômicas recorrentes, embora de alto custo, é uma abordagem que deve ser utilizada na identificação dos subtipos de LLA-CPB com alterações no cromossomo 21. Dentre eles, a fusão gênica *ETV6-RUNX1* e a alta hiperdiploidia, subtipos frequentes que consistem em alterações de bom prognóstico, ou a distinção da iAMP21, alteração rara, porém, associada com prognóstico adverso (HAAS, 2014; MOORMAN, 2016). Apesar da característica comum desses subtipos ser o envolvimento do cromossomo 21, no caso da hiperdiploidia há ganho de cópias inteiras do cromossomo, enquanto na iAMP21, há a amplificação de regiões específicas. A discriminação entre esses dois subgrupos torna-se essencial mediante a intensificação terapêutica requerida nos pacientes com iAMP21.

Este estudo iniciou-se pela identificação de diferentes perfis de ganho em número de cópias no cromossomo 21 em LLA-CPB. Em seguida, foram excluídos casos com fusões gênicas excludentes entre si: *ETV6-RUNX1*, *BCR-ABL1*, *TCF3-PBX1*, *KMT2A-r*. Dada a carência dos resultados de citogenética convencional aliada

ao desenho de estudo retrospectivo, usamos inicialmente a estratégia de triagem através do MLPA para identificar ganhos e perdas cromossômicas, pois essa técnica não necessita de células viáveis, tampouco da obtenção de metáfase, sendo realizada apenas com DNA em pequenas concentrações.

Nas primeiras análises, foram identificados 83 casos com CNA no cromossomo 21. Estes seguiram para a análise de FISH (*ETV6-RUNX1*) a fim de identificar casos com iAMP21. Essa análise revelou que a maioria dos casos era hiperdiplóide. Porém, treze amostras apresentaram ≥ 5 sinais de *RUNX1*, preenchendo os critérios definidos por Harrison et al., para a classificação de iAMP21 (HARRISON et al., 2010). Porém, com análises subsequentes, nas quais analisamos todo o genoma a partir do microarranjo, verificamos que a maioria dos casos classificados como iAMP21, eram na verdade LLA-CPB hiperdiplóides com ganho do cromossomo 21. Mediante este achado, partimos para a reavaliação de todos os casos com evidências de CNA pelo MLPA, utilizando sondas centroméricas e teloméricas para os principais cromossomos adicionados na hiperdiploidia. Essa estratégia nos permitiu a distinção entre o único caso iAMP21 e os demais casos hiperdiplóides, tornando a nossa série de casos bem caracterizada, apesar da carência de resultados de citogenética convencional, que certamente identificaria os ganhos e perdas cromossômicas.

Apesar de aproximadamente 20% dos casos iAMP21 abrigarem também uma cópia extra do cromossomo X (HARRISON, 2014), o mecanismo de ganho envolvendo o cromossomo 21 é distinto nos casos com iAMP21. Este constitui uma entidade distinta cujo perfil de CNA é complexo, podendo haver alterações ao longo de todo o cromossomo. O gene *RUNX1* sempre está amplificado, pois este localiza-se na RCA (Llet al., 2014; (RAND et al., 2011). Baseado nesta evidência, foi determinado que a classificação internacional da iAMP21 consiste na presença de ≥ 5 sinais *RUNX1* por FISH (HARRISON et al., 2010). Porém, nossos resultados mostraram que sinais adicionais de *RUNX1* (≥ 3 sinais) podem ser encontrados ao acaso, gerando incerteza quanto à existência de iAMP21 ou simplesmente hiperdiploidia. Uma vez que haja fragmentação de DNA, o sinal de *RUNX1* quebrado pode aparentar ser um sinal adicional. Para esclarecer esta questão, o uso de sondas centroméricas e teloméricas direcionadas ao cromossomo 21 se faz necessário nos casos em que não foi possível estabelecer o diagnóstico usando inicialmente a citogenética convencional.

Usando a abordagem de FISH na identificação de CNA, foi possível distinguir os casos que apresentavam sinais adicionais do gene *RUNX1* devido ao ganho do

cromossomo como um todo, do caso que apresentou sinais adicionais do gene *RUNX1* em decorrência da iAMP21. Neste último, os altos níveis de ganho em *RUNX1* foram associados com perda da região subtelomérica, o que é esperado para iAMP21. Nos casos com ≥ 5 de *RUNX1*, o FISH com sonda telomérica foi fundamental para confirmar a perda do 21q. Usando essa abordagem, foi possível afirmar e separar sem qualquer dúvida os casos hiperdiploides do único caso com iAMP21. Nós então identificamos um caso cujo perfil de CNA foi compatível com iAMP21. Este subtipo leucêmico é caracterizado por um perfil complexo de alterações (LI *et al.*, 2014), com a região de maior nível de amplificação envolvendo o gene *RUNX1* e deleção na região telomérica, que ocorre em 80% dos casos (RAND *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2013).

A abordagem de análise de CNA usando como ferramenta o microarranjo com o Human Methylation 450 Bead Chip ainda é muito nova. Poucos trabalhos demonstraram a utilização desta técnica com o objetivo de identificar CNA (KWEET *et al.*, 2012; XU, X. *et al.*, 2013; FEBER *et al.*, 2014; NORDLUND *et al.*, 2015a). Nós, então, validamos este teste ao compararmos os dados do microarranjo com os resultados da abordagem por FISH. Dentre todas as análises, houve apenas uma discordância, o caso P49 apresentou ganho apenas na análise de microarranjo. Para tentar explicar esta diferença, podemos atentar para o fato de que a sonda usada no FISH para o cromossomo 14 não foi uma sonda centromérica, mas sim, direcionada ao gene *IGH*. Translocações envolvendo o gene ocorrem em aproximadamente 8% dos casos de LLA-CPB, ocorrendo com diferentes genes parceiros, ressaltando que casos de LLA-CPB são atualmente considerados um subgrupo distinto com relevância prognóstica (MOORMAN *et al.*, 2012). Apesar de uma translocação não justificar nosso achado, visto que a sonda usada era *breakapart* e não foram identificadas translocações. Acreditamos que a melhor forma a explicar a discordância encontrada é a sensibilidade de cada técnica, já que o microarranjo possui maior sensibilidade e, além disso, avaliou o cromossomo inteiro.

Debruçando o olhar sobre as análises de CNA, observamos que as alterações encontradas na nossa coorte são heterogêneas, o que é comum nas hiperdiploidias (HEEREMA, RAIMONDI *et al.*, 2007). Porém, é interessante chamarmos atenção para alterações mais raras identificadas na nossa série de casos. O caso iAMP21 constitui uma alteração rara que já foi citada acima. Além deste, identificamos um caso (P66) com a fusão gênica *ETV6-RUNX1*, ganho do cromossomo 21 e amplificação do Xq. A

fusão gênica *ETV6-RUNX1* já foi vista, anteriormente, em concomitância com ganho um cromossomo 21 ou derivativo do 21 (PETER *et al.*, 2009; ENSHAEI *et al.*, 2013).

Em um outro caso (P52), foi observada, além da fusão gênica *ETV6-RUNX1*, ganho dos cromossomos 17, 18, 21 e X. A fusão gênica *ETV6-RUNX1* consiste em uma alteração primária de origem intrauterina, assim como a hiperdiploidia. Já foi descrito que, embora seja uma alteração genômica fundadora no processo de leucemogênese, a fusão gênica *ETV6-RUNX1* não é capaz de desencadear por si só a leucemia, necessitando de alterações genômicas adicionais que cooperem entre si no processo de leucemogênese (ATTARBASCHI *et al.*, 2004). De um modo geral, a fusão resulta em bom prognóstico, porém, alterações secundárias podem estar associadas a maior risco de recaída. A alteração secundária de maior frequência é a deleção do *ETV6*, vista em mais que 30% dos casos, seguida pela cópia adicional do 21 (23%) e derivativo do cromossomo 21 (16%). A hiperdiploidia foi descrita em <5% dos casos concomitantes com a fusão *ETV6-RUNX1* (FORESTIER *et al.*, 2007; ENSHAEI *et al.*, 2013). A importância clínica desses achados é que a caracterização de LLA-CPB com *ETV6-RUNX1* categoriza um grupo de bom prognóstico, porém a identificação das alterações secundárias está associada a maior risco de recaída, fazendo com que estes casos necessitem de mais detalhamento investigativo (ENSHAEI *et al.*, 2013).

Assim como as LLA-CPB com a fusão *ETV6-RUNX1*, a hiperdiploidia também pode ter origem intrauterina e igualmente necessita de lesões gênicas adicionais para o desenvolvimento clínico da leucemia (PANZER-GRUMAYER *et al.*, 2002; TAUB *et al.*, 2002; MAIA *et al.*, 2003). Algumas alterações, tais como ganho de 1q, deleção de 6q e isocromossomos 7q e 17q já foram descritas, porém, as alterações estruturais não parecem estar associadas com o prognóstico, ao passo que os ganhos dos cromossomos 4 e 18 conferem melhor sobrevida (HEEREMA *et al.*, 2000; HARRISON *et al.*, 2003). Nesta coorte de estudo, foram observadas tanto alterações numéricas quanto estruturais, porém, não foram realizadas análises de prognóstico para as diferentes alterações devido ao número limitado de casos para as análises referentes à sobrevida.

Uma característica das LLA-CPB com hiperdiploidia é a distribuição modal dos ganhos cromossômicos, ou seja, os cromossomos são adicionados de maneira não-aleatória em diferentes proporções, sendo que o ganho do cromossomo 21 ocorre em quase 100% dos casos hiperdiploides, seguido pelo ganho do X. Para tentar explicar essa diferença na distribuição de ganhos entre os cromossomos, pesquisadores postularam que a distribuição modal pode ser decorrente de dois mecanismos: i) os

cromossomos não randomicamente distribuídos dentro do núcleo, mas estão compartimentados em territórios cromossômicos específicos, apresentando pequenas movimentações ao longo do tempo (CREMER; CREMER, 2001). Essa distribuição de territórios intranucleares pode estar relacionada com a sequência de separação das cromátides resultando em uma não disjunção preferencial dos cromossomos específicos geralmente adicionados nas LLAs hiperdiplóides; ii) A segunda hipótese é de que a superexpressão dos genes localizados nesse cromossomo confere vantagem proliferativa com formação do clone leucêmico (HEEREMA *et al.*, 2007).

Vários estudos prévios vêm demonstrando a relevância dos genes localizados no cromossomo 21 nos diversos tipos de leucemias (CHOU *et al.*, 2008; VYAS; CRISPINO, 2007; WECHSLER *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2003). Apesar disso, tal relevância não explica a alta frequência de alguns cromossomos adicionados na hiperdiploidia, por exemplo, o cromossomo X, e a raridade da adição de outros, como o cromossomo 1. Acreditamos que algumas combinações conferem vantagem proliferativa e que a disposição dos cromossomos no momento da mitose também pode contribuir com a distribuição modal dos cromossomos. Neste contexto, acreditamos que mecanismos de regulação epigenética cooperam com estas lesões genéticas como alterações necessárias para a leucemogênese. Por isso, neste estudo investimos na caracterização do perfil epigenético das LLA-CPBs.

O perfil de metilação das LLA-CPB com alterações no cromossomo 21 foi caracterizado usando a técnica de microarranjo de metilação de DNA. Nas primeiras análises, foi observado que o perfil de metilação era distinto nos casos, quando comparados aos controles e amostras de casos em remissão, como é esperado. Curiosamente, controles e amostras de remissão, apesar de muito semelhantes, apresentaram 19 sítios CpG diferencialmente metilados. Levando a crer que o tratamento poderia ser um dos fatores envolvidos nesta diferença.

Dentre os sítios CpG identificados alterados na análise casos vs controles ou casos vs remissões, não identificamos uma distribuição por região gênica distinta da distribuição do total de sondas incluídas no microarranjo, sugerindo que em LLA-CPB, nenhuma região gênica é preferencialmente alterada. Por outro lado, a proporção de sítios localizados em ilhas CpG alterados nos casos em comparação aos controles foi maior que a proporção do total de sondas nessa região. Isto pode indicar que as ilhas CpG são um alvo preferencial de alterações de metilação em LLA-CPB. Tal observação é interessante, já que as ilhas CpG, geralmente, são regiões regulatórias da expressão gênica (JONES, 2012), e muitas vezes estão associadas a regiões

promotoras. Portanto, tais alterações de metilação, provavelmente, teriam uma consequência fenotípica.

A hipermetilação de promotores geralmente está associada a silenciamento gênico, enquanto a metilação no corpo do gene pode estar associada à maior expressão gênica. Porém, existem exceções. Por exemplo, a metilação em diferentes regiões do corpo do gene podem promover a ligação ou desligamento de proteínas indutoras/bloqueadoras de transcrição gênica, além de atuarem nos mecanismos de *splicing* (JONES, 2012). Uma vez que as consequências da metilação em regiões promotoras são mais bem estabelecidas, decidimos focar nessas regiões para as análises de enriquecimento. No microarranjo de metilação utilizado no presente estudo, as regiões promotoras foram definidas pelas regiões TSS200 e TSS1500, ou seja, sítios a até 200 ou 1500 bases do sítio de início de transcrição. Os genes afetados nessas regiões foram então selecionados para avaliarmos se alguma via de sinalização ou rede gênica era preferencialmente alterada.

As análises de enriquecimento mostraram que as alterações de metilação identificadas nos casos em comparação aos controles podem resultar no silenciamento de genes envolvidos em diferenciação de linfócitos B, levando ao bloqueio desse processo. Por outro lado, foi observada uma hipometilação da região promotora de genes envolvidos na proliferação celular, podendo resultar em indução desse processo. Apesar do bloqueio de diferenciação celular e estímulo à proliferação serem comumente observados em tumores, nossos dados sugerem que a desregulação destes processos pode estar intimamente relacionada a alterações de metilação do DNA em LLA-CPB.

Além da análise supervisionada caso vs controle, também verificamos se genes com alterações estruturais recorrentes em leucemia apresentavam alteração no nível de metilação, tomando como referência a lista de genes previamente descritos (FIGUEROA *et al.*, 2013). Nossos achados apontam que genes cruciais para a leucemogênese não sofrem apenas desregulação por mutações ou fusões gênicas, mas também por alteração no perfil de metilação, mais uma vez sugerindo que este pode ser um fator relevante para a determinação do fenótipo leucêmico.

Dando seguimento às análises de metilação, selecionamos alguns genes para a validação do perfil encontrado no microarranjo. Incluímos 7 genes com alteração no perfil de metilação, sendo o *ARID3A* diferencialmente metilado na análise controle vs remissão e os genes *ERG*, *ETS2*, *PBX1*, *PDE9A*, *PRDM9* e *PRDM15* diferencialmente metilados na análise caso vs controle. O critério utilizado na escolha foi genes a

relevância do gene na fisiologia no desenvolvimento de células B e sua descrição prévia com alteração estrutural e/ou de expressão em leucemias.

O gene *ARID3A* foi encontrado hipometilado no corpo do gene nos casos em relação aos controles. Além disso, de forma interessante, os níveis de metilação nas amostras de remissão foram semelhantes àqueles observados nos casos. Portanto, é possível que tal alteração tenha sido adquirida no processo de leucemogênese e tenha sido mantida mesmo após a remissão completa.

O gene *ARID3A* é um fator de transcrição membro da família de proteínas ARID (A+T domínio de interação) (WEBB *et al.*, 2011), cuja expressão é necessária tanto para o desenvolvimento de células-tronco quanto de linfócitos B. *ARID3A* desempenha importante papel na embriogênese, regulação gênica de linhagem celular (maturação de linfócitos B), controle do ciclo celular, remodelamento da cromatina e regulação transcricional. Além disso, *ARID3A* pode interagir com a proteína retinoblastoma (RB), sendo possível que essa ligação silencie este importante supressor tumoral e ative E2F1 e Ciclina E1 (LIN *et al.*, 2007). Além disso, *ARID3A* é reprimido em LLA-CPB com translocação envolvendo o gene *IGH*, t(11;14)(q24;q32), e tal supressão leva à expressão de marcadores associados a pluripotência (PUISSEGUR *et al.*, 2012).

Por outro lado, um estudo recente mostrou que o gene *ARID3A* é progressivamente demetilado dos 0-60 meses de idade em linfócitos humanos (ACEVEDO *et al.*, 2015). Como os nossos controles foram amostras de SCUP e os casos tiveram em média 4 anos de idade, sendo 40% (247) com idade ≤ 6 anos, é possível que a hipometilação vista nos casos e remissões tenha ocorrido como consequência da maturação de linfócitos. Neste estudo, o gene *ARID3A* demonstrou ser diferencialmente metilado nos subtipos de LLA-CPB. Apesar de as células normais apresentarem maiores níveis de metilação nos primeiros meses de vida, os níveis de metilação deste gene nos casos *KMT2A-r* foram muito superiores aos níveis de metilação nas células de SCUP. Levando em consideração que a maior frequência do *KMT2A-r* ocorre em lactentes (≤ 1 ano) e o grupo controle é de recém-nascidos, esta hipermetilação não parece estar associada apenas a idade, mas parece ser linhagem-específica, dada a alta acurácia na qual altos níveis de metilação são capazes de prever o *KMT2A-r*. Em contrapartida, a hipometilação no gene *ARID3A* foi associada com hiperdiploidia, que ocorre frequentemente em idade ≥ 2 anos, corroborando com a hipometilação de linfócitos após os 60 meses. Mesmo assim, esse perfil de hipometilação não foi caracterizado nos casos *ETV6-RUNX1* e *TCF3-PBX1*, tampouco

no grupo de LLA-CPB com citogenética normal, ambos os subtipos mais frequentes em idades > 60 meses.

O gene *ERG*, por sua vez, apresentou menores níveis de metilação nos casos, quando comparados aos demais subgrupos. Este gene também é um fator de transcrição que codifica um membro da família *erythroblast transformation-specific (ETS)*. *ERG* é essencial para o desenvolvimento de células-tronco hematopoiéticas, assim como para a hematopoese definitiva, colaborando com outros fatores de transcrição, tais como *RUNX1* (LOUGHRAN *et al.*, 2008). Este gene encontra-se na RCA característica de iAMP21 (STREFFORD *et al.*, 2006) e deleções de *ERG* constituem um subgrupo de LLA caracterizado pela superexpressão do gene *DUX4*, sugerindo uma possível colaboração entre estes dois eventos (LIU *et al.*, 2016). O subgrupo de leucemias com deleções no *ERG* foi associado a bom prognóstico (CLAPPIER *et al.*, 2014). Interpretamos, então, que a hipometilação encontrada no corpo do gene, em nossa série de casos LLA-CPB, pode estar associada a uma menor expressão de *ERG*, de modo semelhante às deleções já descritas. Adicionalmente, os casos hiperdiploides apresentaram menores níveis de metilação nesse gene em comparação aos demais subtipos de LLA-CPB, podendo esta hipometilação ser associada ao mecanismo de geração dessas aneuploidias com ganho do cromossomo 21.

O gene *ETS2* (do inglês, *V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2*) é um proto-oncogene cuja expressão é alta e vital no desenvolvimento embrionário (YAMAMOTO *et al.*, 1998). No nosso estudo, a metilação do gene *ETS2* no sítio de início de transcrição foi menor nos casos em comparação aos controles, podendo estar relacionada com a superexpressão desse gene. É importante ressaltar que o gene *ETS2* está localizado no cromossomo 21, na RCA dos casos iAMP21, e foi demonstrada a superexpressão do gene neste subtipo de leucemia (STREFFORD *et al.*, 2006). O padrão de metilação deste gene não teve associação com os subtipos incluídos no estudo, e o único caso iAMP21 não seria suficiente para tirar nenhuma conclusão consistente.

O gene *PBX1* apresentou-se hipermetilado nos casos, quando comparados aos controles e remissões. Além disso, as amostras de remissão apresentaram um perfil de metilação intermediário em relação a casos e controles, ou seja, os controles apresentaram os menores níveis de metilação de *PBX1*, enquanto nos casos esses níveis foram máximos. Este gene faz parte da família *homeobox* de fatores de transcrição e é frequentemente translocado em LLA pré-B com a translocação

t(1;19)(q23; p13) que gera a fusão *TCF3-PBX1* (INABA *et al.*, 2013). A proteína resultante desta fusão gênica apresenta a substituição do domínio de ligação de DNA TCF3 pelo domínio de ligação de DNA PBX1, transformando as células pela ativação constitutiva da transcrição de genes regulados pela família de proteínas *PBX1* (LU; WRIGHT; KAMPS, 1994). Na nossa análise, a região promotora do gene *PBX1* estava hipometilada, enquanto o corpo do gene (região de referência das análises de validação) estava hipermetilado. Hipotetizamos que ambas as alterações podem estar relacionadas com a superexpressão do gene, que pode ativar a transcrição gênica de modo semelhante ao que acontece quando há a fusão gênica *TCF3-PBX1*. Interessantemente, os casos com citogenética normal também apresentaram hipermetilação no corpo do gene *PBX1* em níveis mais altos que os demais subtipos de LLA-CPB. É possível que essa alteração no nível de metilação nesse gene esteja associada aos mecanismos de leucemogênese, mesmo nos casos sem alterações genéticas recorrentes evidenciadas pelos métodos atuais. Estes achados necessitam de novas investigações com análises mais robustas que incluam maior número de casos.

O corpo do gene *PDE9A* (fosfodiesterase9A) foi encontrado hipometilado em nossa série de casos de LLA-CPB. Este gene faz parte da família de fosfatidilesterases, desempenha importante papel na transdução de sinais pela regulação das concentrações celulares de nucleotídeos cíclicos (FISHER *et al.*, 1998). Mais recentemente, foi visto que este gene está envolvido no ponto de quebra do cromossomo 21 nas LLA-CPB com *iAMP21* (SINCLAIR *et al.*, 2011). Além disso, ele é pouco expresso em MO normal (FAGERBERG *et al.*, 2014).

O gene *PDE9A* estava hipometilado no grupo total de casos, no entanto, na análise subtipo-específica, este gene estava hipometilado nos casos hiperdiplóides e hipermetilado nos casos LLA-CPB com *KMT2A-r*, demonstrando que ambos os perfis que se distanciam do padrão de normalidade estejam envolvidos na leucemogênese, segregando perfis patogênicos desses dois subtipos de LLA-CPB distintos em relação aos riscos preditivos.

Dando sequência à validação do microarranjo, selecionamos dois genes da família *PRDM*, *PRDM9* e *PRDM15*. A família *PRDM* tem em comum um domínio PR na região N-terminal, que está relacionado ao domínio SET (metiltransferase) de proteína-arginina metiltransferases, portanto reguladores epigenéticos (HUANG; SHAO; LIU, 1998).

Dois estudos recentes identificaram a presença de variantes alélicas raras do gene *PRDM9* associadas a LLA-CPB de origem familiar (variantes C/C-like, D e L20), especialmente envolvidas na susceptibilidade de LLA-CPB com aneuploidias (HUSSIN *et al.*, 2013; WOODWARD *et al.*, 2014). A variante mais comum deste gene é codificada pelo alelo A, que apresenta um domínio de ligação *k-finger*. As diferentes variantes alélicas foram associadas com instabilidade genômica (BAUDAT *et al.*, 2010) de modo que, os alelos variantes foram encontrados em maior frequência em pais de crianças com LLA hiperdiplóide (HUSSIN *et al.*, 2013; WOODWARD *et al.*, 2014). No nosso estudo, a região analisada neste gene foi um sítio de início de transcrição, que se apresentou hipermetilada nos casos de LLA-CPB. Porém, os casos hiperdiplóides foram associados a níveis menores de metilação, ainda superiores ao grupo controle.

O gene *PRDM15* (ZNF298) apresenta 25 éxons em aproximadamente 80 kb, produzindo quatro transcritos por meio de *splicing* alternativo (ZNF298a, ZNF298b, ZNF298c e ZNF298d). *PRDM15* é expresso em tecidos fetais e adultos, e já existem especulações a respeito do papel oncogênico do mesmo (SHIBUYA *et al.*, 2005). Ele está superexpresso em linfomas, que são um tipo de neoplasia linfoide semelhante à LLA (GIALLOURAKIS *et al.*, 2013). Em nossas análises, o corpo do gene *PRDM15* apresentou-se hipometilado, sendo possível então que este gene esteja pouco expresso nos casos de LLA-CPB. O perfil de hipometilação deste gene foi fortemente associado aos casos hiperdiplóides, ao passo que a hipermetilação do mesmo foi fortemente associada aos casos *KMT2A-r*. Ambas as alterações distinguem esses dois subtipos do grupo controle. É possível que ambas as alterações estejam relacionadas com a desregulação no ciclo celular e sejam mais uma evidência de desregulação nos caminhos que distinguem os subtipos de LLA-CPB.

Apesar da relevância funcional das proteínas codificadas pelos genes encontrados alterados neste estudo, assim como a importância dos mesmos na homeostase, o presente estudo não permite uma relação clara entre a metilação e o fenótipo, pois trata-se de um estudo descritivo em que a expressão gênica não foi avaliada, tampouco foram feitas análises funcionais em modelos experimentais. Porém, este estudo fornece indícios de que a metilação aberrante pode ser um mecanismo de desregulação adicional às fusões gênicas, translocações e mutações em leucemias, mais especificamente em LLA-CPB. Além disso, é importante ressaltar que todas as alterações selecionadas para análise por pirosequenciamento foram validadas em uma série independente de casos, em amostras de controles saudáveis e remissões, mostrando a robustez de nossos achados.

A partir das análises de validação, também verificamos se o perfil de metilação para os genes selecionados era diferente nos subtipos de LLA-CPB e foi possível identificar assinaturas de metilação subtipo-específicas. Estes achados corroboram com estudos anteriores que demonstraram assinaturas epigenéticas nos diferentes subtipos de LLA (FIGUEROA *et al.*, 2013; GABRIEL *et al.*, 2015; NORDLUND *et al.*, 2015a). Algo curioso visto nas análises de validação foi que as alterações de metilação nos genes estudados foram predominantemente de hipermetilação nos casos com *KMT2A-r* e hipometilação nos casos hiperdiploides. É importante salientar que esses dois subtipos de LLA-CPB são doenças fenotipicamente distintas quanto ao nível maturativo dos blastos, com demografia e aspectos clínicos também distintos quanto a faixa etária dos pacientes ao diagnóstico e reposta terapêutica (MOORMAN, 2016). Esse perfil de hipermetilação nos genes *ARID3A*, *PDE9A* e *PRDM15* encontrado nos casos *KMT2A-r* foi também observado na faixa ≤ 1 ano e em casos CD10-. É possível que os perfis de hipermetilação estejam associados ao pior prognóstico observado nos casos *KMT2A-r* e a hipometilação, ao melhor prognóstico visto nos casos hiperdiploides.

Já o gene *PRDM9*, apresentou maiores níveis de metilação nos casos de LLA-CPB com idade superior a 10 anos ao diagnóstico e alto risco de recaída. Além disso, os altos níveis de metilação nesse gene também foram associados a outro marcador de mau prognóstico, o *KMT2A-r*, ao passo que os casos hiperdiploides foram caracterizados por hipometilação no mesmo gene. A hipermetilação no gene *PRDM9* nestes dois subgrupos de pior prognóstico induz a conclusão de que este consiste em um biomarcador de mau prognóstico, sugerindo que o perfil de metilação do mesmo tem impacto na agressividade da doença. Na nossa análise, não houve nenhuma associação estatisticamente significativa entre os níveis de metilação e o *status* de sobrevida global desta série de pacientes. Porém, esta análise quanto ao desfecho dos pacientes pode ser criticada quanto ao pequeno número de pacientes com informação de sobrevida. Apesar disso, um estudo anterior também não observou associação entre alterações nos perfis globais de metilação e sobrevida global (GABRIEL *et al.*, 2015).

A terceira e última parte do estudo compreendeu a análise de metilação global. Esta foi realizada nas mesmas 146 amostras incluídas nas análises de metilação gene-específicas para os diferentes subtipos de LLA-CPB. A metilação global foi inferida a partir de regiões de LINE-1. Não foram observadas diferenças nos níveis de metilação de LINE-1 entre casos, controles e remissões. No entanto, os casos

hiperdiplóides claramente apresentaram um perfil de hipermetilação em LINE-1 em comparação com os casos não-hiperdiplóides e os demais grupos de amostras.

A contribuição da metilação de DNA já foi demonstrada em algumas investigações nas quais autores realizaram análises epigenômicas baseadas em microarranjo, sendo que já foi proposta a implementação de análises de metilação na prática diagnóstica de LLA-CPP dadas as assinaturas epigenéticas subtipo-específicas (FIGUEROA *et al.*, 2013; NORDLUND *et al.*, 2015a). Porém, a implementação desta técnica, sobretudo na realidade brasileira, ainda não é factível, devido ao alto custo e tempo necessário desde a coleta do material, processamento dos dados e liberação do resultado. Neste contexto, o perfil de metilação em LINE-1 pode ser um biomarcador promissor.

A metilação em LINE-1 fornece uma estimativa do *status* de metilação global e esta avaliação é muito mais tempo e custo-efetiva. Esta foi mais extensivamente explorada em leucemias mielóides que em LLA. Apenas dois trabalhos descreveram metilação em LINE-1 em pacientes com LLA-CPB. O primeiro teve como foco pacientes com *KMT2A-r* (STUMPEL *et al.*, 2013). O segundo estudo incluiu apenas 32 amostras de LLA-CPB e demonstrou que as amostras contendo blastos leucêmicos, tanto linfóides quanto mielóides, apresentavam maiores níveis de metilação quando comparados aos controles (BUJKO *et al.*, 2014). Adicionalmente, eles também caracterizaram as LLAs com os maiores níveis de metilação quando comparadas às LMAs, em relação aos controles e às remissões (BUJKO *et al.*, 2014).

No presente estudo, nós fornecemos dados inovadores no que diz respeito à relevância da metilação em LINE-1 em uma coorte maior, cujas características citogenéticas e moleculares das amostras foram minuciosamente determinadas e exploradas. Nós demonstramos pela primeira vez que as LLA-CPB hiperdiplóides apresentam hipermetilação em LINE-1, quando comparadas aos demais subtipos de LLA-CPB, controles e remissões. A razão pela qual os blastos hiperdiplóides apresentam altos níveis de metilação, contrapondo-se à hipometilação encontrada em tumores sólidos, ainda não está bem estabelecida em termos de modelos experimentais.

No nosso estudo, o perfil de metilação em LINE-1 apresentou sensibilidade de 76,27% na distinção entre o subtipo hiperdiplóide e os demais subtipos. Apesar da baixa especificidade, é possível propor que análises de metilação em LINE-1 podem ajudar no aprimoramento do diagnóstico quando não são disponíveis outros marcadores moleculares para a avaliação da hiperdiploidia.

Além das análises de metilação global subtipo-específico, nós nos baseamos na hipótese de que a baixa atividade enzimática decorrente do polimorfismo *MTHFR* rs1801133 poderia ocasionar diminuição nos níveis de metilação global e gene-específica. Portanto, testamos essa associação em amostras de LLA-CPB e controles. Não obstante, tais associações foram observadas por outros autores em modelos de câncer colorretal, mama, pulmão e doença da artéria coronária (FRISO *et al.*, 2002; PAZ *et al.*, 2002). Uma meta-análise recente incluindo dados em *pool* de 1147 indivíduos mostrou que não havia associação entre o polimorfismo e os níveis de metilação global (TT vs CC: $z=0.25$; $p=0.80$; CT vs CC: $z=1.04$; $p=0.30$) (WANG *et al.*, 2016).

A deficiência de folato está associada à incorporação errônea de uracila, o que proporciona quebras na fita de DNA durante a excisão dessa base pelo sistema de reparo, aumentando potencialmente o risco de aberrações cromossômicas, como por exemplo, adição de cromossomos característicos de hiperdiploidia. Além disso, a carência de folato também está associada com hipometilação global, outra via que tem potencial de participar dos mecanismos de leucemogênese (BLOUNT *et al.*, 1997; JAMES *et al.*, 1997).

O mecanismo de formação de quebra na dupla fita de DNA decorrente da carência de folatos e incorporação errônea de uracil pode ocorrer de duas formas não excludentes, 1) *base excision repair* (BER), na tentativa de remover a base incorporada erroneamente e, 2) recombinação homóloga em resposta aos intermediários de BER ou colapso na forquilha de replicação durante o fenômeno de *thymineless stress*. A quebra na dupla fita de DNA pode resultar em recombinação cruzada, eventos de conversão ou em rearranjos cromossômicos (BERGER; PITTMAN; WYATT, 2008). Rearranjos gênicos são alterações comuns em leucemias, que apresentam como característica a presença de translocações, inversões cromossômicas e deleções em genes regulatórios do desenvolvimento celular. Como citado anteriormente, existem fortes evidências da origem intrauterina das leucemias pediátricas. Neste período, é necessária uma grande quantidade de folato para a grande demanda de multiplicação celular, formação dos sistemas hematopoiético e endotelial. A suplementação tem sido descrita como fator protetor contra LLA pediátrica (THOMPSON *et al.*, 2001).

Nesta série de casos de LLA-CPB, verificamos um perfil de hipermetilação no gene *PDE9A* associado ao genótipo *MTHFR* CT. Porém, apesar da significância estatística, o nosso grupo controle não é grande o suficiente para afirmar que este

achado é verdadeiro. No grupo de casos, não houve qualquer associação entre o perfil de metilação gene-específico, metilação global e polimorfismo no gene *MTHFR*. No caso da metilação global, a falta de associação pode ser uma consequência da alta frequência de amostras hiperdiploides no nosso grupo de casos, uma vez que estes apresentaram perfil de hipermetilação de LINE-1.

Este estudo cobriu os aspectos genéticos e epigenéticos das LLA-CPBs, trazendo contribuições no que diz respeito ao diagnóstico diferencial das LLA com *iAMP21* e hiperdiploides. Conseguimos descrever alterações raras, assim como a aplicabilidade do uso do microarranjo de metilação (HumanMethylation450 BeadChip Kit, Illumina, Califórnia, Estados Unidos) na identificação de alterações em número de cópias dentro das leucemias. Também percorremos todo um caminho na caracterização do perfil de metilação global e gene-específica nos diferentes subtipos de LLA-CPB. Esta abordagem pode ser uma alternativa, uma vez que utiliza apenas DNA, e pode ainda ser aliada a outras técnicas, como o índice de DNA, não necessitando a obtenção de mitose para ser realizadas. Nós não avaliamos a sensibilidade e especificidade desses dois testes em conjunto, visto que se tratou de um estudo retrospectivo e não dispomos dos dados de índice de DNA dessas amostras.

Apesar disso, conseguimos gerar uma grande quantidade de dados, demonstramos que as LLA-CPBs com alterações no cromossomo 21 constituem subgrupos heterogêneos do ponto de vista genético, de metilação e clínico. Identificamos a metilação de genes específicos como biomarcadores de subtipos de LLA-CPB, muitos deles, como *ARID3A* e *PRDM15*, foram capazes de distinguir diferentes subtipos de LLA-CPB com alta acurácia. Adicionalmente, foi feita a caracterização do perfil de metilação global em uma coorte de LLA-CPB estratificada por subtipo e nós também fornecemos novos dados no que diz respeito à relação entre o polimorfismo *MTHFR* rs1801133 e a metilação global em LLA. Ambos os achados contribuem para o melhor conhecimento das lesões genéticas e do papel da metilação de DNA na patogênese das LLA-CPBs, assim como na identificação de novos biomarcadores.

6. CONCLUSÕES

- Pela adição de sondas centroméricas e teloméricas direcionadas ao cromossomo 21, foi possível distinguir sem qualquer dúvida o caso iAMP21 dos casos hiperdiplóides.
- O perfil de CNA encontrado nas amostras com ganho em número de cópias foi heterogêneo, envolvendo ganho de cromossomos 21 inteiros, o somatório da fusão *ETV6-RUNX1* e trissomia do cromossomo 21, além de iAMP21. Além destas, foram identificadas alterações estruturais e numéricas em outros cromossomos. A maior parte dos casos foram classificados como hiperdiplóides.
- Os casos de LLA-CPB com ganho no cromossomo 21 apresentaram perfil de metilação gene-específico distinto dos controles e amostras de remissão.
- Foram encontradas assinaturas epigenéticas em genes específicos dentre as LLA-CPBs. Os subtipos com a fusão *ETV6-RUNX1* (*ARID3A*), *TCF3-PBX1* (*PRDM15*), *KMT2A-r* (*ARID3A*, *PDE9A*, *PRDM9* e *PRDM15*), cariótipo normal (*PBX1*) e hiperdiplóides (*ARID3A*, *ERG*, *PDE9A*, *PRDM9* e *PRDM15*) apresentaram diferentes níveis de metilação quando comparados aos demais subtipos de LLA-CPB.
- Os casos hiperdiplóides foram caracterizados por apresentar hipermetilação global (LINE-1) quando comparados aos demais subtipos de LLA-CPB, controles e amostras de remissão.
- O polimorfismo *MTHFR* rs1801133 não está relacionado com diferenças no perfil de metilação em blastos leucêmicos.

7. REFERÊNCIAS

ACEVEDO, N. *et al.* Age-associated DNA methylation changes in immune genes, histone modifiers and chromatin remodeling factors within 5 years after birth in human blood leukocytes. **Clin Epigenetics**, v. 7, p. 34, 2015.

AHN, E. E. *et al.* SON protein regulates GATA-2 through transcriptional control of the microRNA 23a~27a~24-2 cluster. **J Biol Chem**, v. 288, n. 8, p. 5381-8, Feb 22 2013.

ARRON, J. R. *et al.* NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. **Nature**, v. 441, n. 7093, p. 595-600, Jun 1 2006.

ATTARBASCHI, A. *et al.* Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukemia: an interphase FISH analysis. **Leukemia**, v. 18, n. 10, p. 1611-6, Oct 2004.

ATTARBASCHI, A. *et al.* Minimal residual disease values discriminate between low and high relapse risk in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and an intrachromosomal amplification of chromosome 21: the Austrian and German acute lymphoblastic leukemia Berlin-Frankfurt-Munster (ALL-BFM) trials. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 18, p. 3046-50, Jun 20 2008.

BAKSHI, R. *et al.* The leukemogenic t(8;21) fusion protein AML1-ETO controls rRNA genes and associates with nucleolar-organizing regions at mitotic chromosomes. **J Cell Sci**, v. 121, n. Pt 23, p. 3981-90, Dec 1 2008.

BAUDAT, F. *et al.* PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 836-40, Feb 12 2010.

BELL, K. N.; OAKLEY, G. P., JR. Update on prevention of folic acid-preventable spina bifida and anencephaly. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 85, n. 1, p. 102-7, Jan 2009.

BERCOVICH, D. *et al.* Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. **Lancet**, v. 372, n. 9648, p. 1484-92, Oct 25 2008.

BERGER, S. H.; PITTMAN, D. L.; WYATT, M. D. Uracil in DNA: consequences for carcinogenesis and chemotherapy. **Biochem Pharmacol**, v. 76, n. 6, p. 697-706, Sep 15 2008.

BIRGER, Y. *et al.* Perturbation of fetal hematopoiesis in a mouse model of Down syndrome's transient myeloproliferative disorder. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 988-98, Aug 8 2013.

BIRGER, Y.; IZRAELI, S. DYRK1A in Down syndrome: an oncogene or tumor suppressor? **J Clin Invest**, v. 122, n. 3, p. 807-10, Mar 1 2012.

BLOUNT, B. C. *et al.* Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 7, p. 3290-5, Apr 1 1997.

BRANDWEIN, J. M. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. **Curr Oncol Rep**, v. 13, n. 5, p. 371-8, Oct 2011.

- BUITENKAMP, T. D. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. **Blood**, v. 123, n. 1, p. 70-7, Jan 2 2014.
- BUJKO, M. *et al.* Repetitive genomic elements and overall DNA methylation changes in acute myeloid and childhood B-cell lymphoblastic leukemia patients. **Int J Hematol**, v. 100, n. 1, p. 79-87, Jul 2014.
- BURGHARDT, K. J. *et al.* DNA methylation in schizophrenia subjects: gender and MTHFR 677C/T genotype differences. **Epigenomics**, v. 4, n. 3, p. 261-8, Jun 2012.
- BYDŁOWSKI, S. P.; MAGNANELLI, A. C.; CHAMONE DDE, A. [Hyperhomocysteinemia and vaso-occlusive diseases]. **Arq Bras Cardiol**, v. 71, n. 1, p. 69-76, Jul 1998.
- CHEN, D. W. *et al.* Erg and AP-1 as determinants of glucocorticoid response in acute lymphoblastic leukemia. **Oncogene**, v. 32, n. 25, p. 3039-48, Jun 20 2013.
- CHEN, Y. A. *et al.* Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. **Epigenetics**, v. 8, n. 2, p. 203-9, Feb 2013.
- CHEUNG, H. H. *et al.* Genome-wide DNA methylation profiling reveals novel epigenetically regulated genes and non-coding RNAs in human testicular cancer. **Br J Cancer**, v. 102, n. 2, p. 419-27, Jan 19 2010.
- CHIANG, E. P.; WANG, Y. C.; TANG, F. Y. Folate restriction and methylenetetrahydrofolate reductase 677T polymorphism decreases adoMet synthesis via folate-dependent remethylation in human-transformed lymphoblasts. **Leukemia**, v. 21, n. 4, p. 651-8, Apr 2007.
- CHOU, S. T. *et al.* Trisomy 21 enhances human fetal erythro-megakaryocytic development. **Blood**, v. 112, n. 12, p. 4503-6, Dec 1 2008.
- CHRISTENSEN, K. E.; MACKENZIE, R. E. Mitochondrial one-carbon metabolism is adapted to the specific needs of yeast, plants and mammals. **Bioessays**, v. 28, n. 6, p. 595-605, Jun 2006.
- CHUEH, A. C. *et al.* LINE retrotransposon RNA is an essential structural and functional epigenetic component of a core neocentromeric chromatin. **PLoS Genet**, v. 5, n. 1, p. e1000354, Jan 2009.
- 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**, v. 28, n. 1, p. 70-7, Jan 2014.
- COGLIANO, V. J.; BAAN, R.; STRAIF, K. Updating IARC's carcinogenicity assessment of benzene. **Am J Ind Med**, v. 54, n. 2, p. 165-7, Feb 2011.
- CREMER, T.; CREMER, C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. **Nat Rev Genet**, v. 2, n. 4, p. 292-301, Apr 2001.
- CRIDER, K. S. *et al.* Genomic DNA methylation changes in response to folic acid supplementation in a population-based intervention study among women of reproductive age. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28144, 2011.

- DAVIDSSON, J. *et al.* The DNA methylome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. 21, p. 4054-65, Nov 1 2009.
- DE JONGE, R. *et al.* Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 113, n. 10, p. 2284-9, Mar 05 2009.
- DE SOUZA REIS, R., SR. *et al.* Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. **Pediatr Blood Cancer**, v. 56, n. 1, p. 58-64, Jan 2011.
- DOLINOY, D. C.; JIRTLE, R. L. Environmental epigenomics in human health and disease. **Environ Mol Mutagen**, v. 49, n. 1, p. 4-8, Jan 2008.
- DUNLAP, B. *et al.* Folic acid and human reproduction-ten important issues for clinicians. **J Exp Clin Assist Reprod**, v. 8, p. 2, 2011.
- EMERENCIANO, M. *et al.* Challenges in the use of NG2 antigen as a marker to predict MLL rearrangements in multi-center studies. **Leuk Res**, v. 35, n. 8, p. 1001-7, Aug 2011.
- ENSHAEI, A. *et al.* Long-term follow-up of ETV6-RUNX1 ALL reveals that NCI risk, rather than secondary genetic abnormalities, is the key risk factor. **Leukemia**, v. 27, n. 11, p. 2256-9, Nov 2013.
- ESCHER, R. *et al.* Two clonal occurrences of tetrasomy 21 in an atypical chronic myeloid leukemia with wild-type RUNX1 alleles. Additional support for a gene dosage effect of chromosome 21 or RUNX1 in leukemia. **Haematologica**, v. 89, n. 8, p. ECR26, Aug 2004.
- FAGERBERG, L. *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. **Mol Cell Proteomics**, v. 13, n. 2, p. 397-406, Feb 2014.
- FEBER, A. *et al.* Using high-density DNA methylation arrays to profile copy number alterations. **Genome Biol**, v. 15, n. 2, p. R30, Feb 03 2014.
- FERREIRA, J. D. *et al.* Pregnancy, maternal tobacco smoking, and early age leukemia in Brazil. **Front Oncol**, v. 2, p. 151, 2012.
- FIGUEROA, M. E. *et al.* Integrated genetic and epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Invest**, v. 123, n. 7, p. 3099-111, Jul 2013.
- FISHER, D. A. *et al.* Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase. **J Biol Chem**, v. 273, n. 25, p. 15559-64, Jun 19 1998.
- FORD, A. M. *et al.* Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 8, p. 4584-8, Apr 14 1998.
- FORD, A. M. *et al.* Monoclonal origin of concordant T-cell malignancy in identical twins. **Blood**, v. 89, n. 1, p. 281-5, Jan 1 1997.
- FORESTIER, E. *et al.* Cytogenetic patterns in ETV6/RUNX1-positive pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: A Nordic series of 245 cases and review of the literature. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 46, n. 5, p. 440-50, May 2007.

FORESTIER, E. *et al.* Cytogenetic features of acute lymphoblastic and myeloid leukemias in pediatric patients with Down syndrome: an iBFM-SG study. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1575-83, Feb 1 2008.

FRISO, S.; CHOI, S. W. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. **J Nutr**, v. 132, n. 8 Suppl, p. 2382S-2387S, Aug 2002.

FRISO, S. *et al.* A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 8, p. 5606-11, Apr 16 2002.

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**, v. 8, p. 35, 2015.

GABRIEL, A. S. *et al.* Epigenetic landscape correlates with genetic subtype but does not predict outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Epigenetics**, v. 10, n. 8, p. 717-26, 2015.

GARCIA, D. R. *et al.* Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) detected by ETV6/RUNX1 FISH screening in childhood acute lymphoblastic leukemia: a case report. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 35, n. 5, p. 369-71, 2013.

GARROW, T. A. *et al.* Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization. **J Biol Chem**, v. 268, n. 16, p. 11910-6, Jun 5 1993.

GE, Y. *et al.* The role of the proto-oncogene ETS2 in acute megakaryocytic leukemia biology and therapy. **Leukemia**, v. 22, n. 3, p. 521-9, Mar 2008.

GIALLOURAKIS, C. C. *et al.* Genome-wide analysis of immune system genes by expressed sequence Tag profiling. **J Immunol**, v. 190, n. 11, p. 5578-87, Jun 01 2013.

GIOVANNUCCI, E. *et al.* Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. **Ann Intern Med**, v. 129, n. 7, p. 517-24, Oct 1 1998.

GLASS, D. C. *et al.* Risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia following parental occupational exposure to pesticides. **Occup Environ Med**, v. 69, n. 11, p. 846-9, Nov 2012.

GREAVES, M. In utero origins of childhood leukaemia. **Early Hum Dev**, v. 81, n. 1, p. 123-9, Jan 2005.

GREAVES, M. F. Aetiology of acute leukaemia. **Lancet**, v. 349, n. 9048, p. 344-9, Feb 1 1997.

_____. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. **Eur J Cancer**, v. 35, n. 14, p. 1941-53, Dec 1999.

GREAVES, M. F. *et al.* Leukemia in twins: lessons in natural history. **Blood**, v. 102, n. 7, p. 2321-33, Oct 1 2003.

GREAVES, M. F.; WIEMELS, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 9, p. 639-49, Sep 2003.

GREENE, N. D.; STANIER, P.; COPP, A. J. Genetics of human neural tube defects. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. R2, p. R113-29, Oct 15 2009.

GRUHN, B. *et al.* Prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia, association with birth weight and hyperdiploidy. **Leukemia**, v. 22, n. 9, p. 1692-7, Sep 2008.

HAJIAN-TILAKI, K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. **Caspian J Intern Med**, v. 4, n. 2, p. 627-35, Spring 2013.

HALSTED, C. H. The intestinal absorption of dietary folates in health and disease. **J Am Coll Nutr**, v. 8, n. 6, p. 650-8, Dec 1989.

HAREWOOD, L. *et al.* Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases. **Leukemia**, v. 17, n. 3, p. 547-53, Mar 2003.

HARRISON, C. J. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 144, n. 2, p. 147-56, Jan 2009.

_____. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. **Blood**, v. 125, n. 9, p. 1383-6, Feb 26 2015a.

_____. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. **Blood**, v. 125, n. 9, p. 1383-1386, Feb 26 2015b.

HARRISON, C. J. *et al.* Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfurt-Munster study group. **Br J Haematol**, v. 151, n. 2, p. 132-42, Oct 2010.

HARRISON, C. J. *et al.* An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. **Leukemia**, v. 28, n. 5, p. 1015-21, May 2014.

HARRISON, C. J. *et al.* An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. **Leukemia**, v. 28, n. 5, p. 1015-21, May 2014.

HATTORI, M.; FUJIYAMA, A.; SAKAKI, Y. [The DNA sequence of human chromosome 21]. **Tanpakushitsu Kakusan Koso**, v. 46, n. 16 Suppl, p. 2254-61, Dec 2001.

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**, v. 31, n. 27, p. 3397-402, Sep 20 2013.

HEEREMA, N. A. *et al.* Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 46, n. 7, p. 684-93, Jul 2007.

HEEREMA, N. A. *et al.* Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). **J Clin Oncol**, v. 18, n. 9, p. 1876-87, May 2000.

HOLMFELDT, L. *et al.* The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet**, v. 45, n. 3, p. 242-52, Mar 2013.

HOWARD, G. *et al.* Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. **Oncogene**, v. 27, n. 3, p. 404-8, Jan 10 2008.

HUANG, S.; SHAO, G.; LIU, L. The PR domain of the Rb-binding zinc finger protein RIZ1 is a protein binding interface and is related to the SET domain functioning in chromatin-mediated gene expression. **J Biol Chem**, v. 273, n. 26, p. 15933-9, Jun 26 1998.

HUSSIN, J. *et al.* Rare allelic forms of PRDM9 associated with childhood leukemogenesis. **Genome Res**, v. 23, n. 3, p. 419-30, Mar 2013.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943-55, Jun 01 2013.

INFANTE-RIVARD, C.; WEICHENTHAL, S. Pesticides and childhood cancer: an update of Zahm and Ward's 1998 review. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, v. 10, n. 1-2, p. 81-99, Jan-Mar 2007.

IRVING, J. A. *et al.* Integration of genetic and clinical risk factors improves prognostication in relapsed childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 128, n. 7, p. 911-22, Aug 18 2016.

JAFFE, E. S. *et al.* Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. **Blood**, v. 112, n. 12, p. 4384-99, Dec 01 2008.

JAIR, K. W. *et al.* De novo CpG island methylation in human cancer cells. **Cancer Res**, v. 66, n. 2, p. 682-92, Jan 15 2006.

JAMES, S. J. *et al.* Apoptosis and proliferation under conditions of deoxynucleotide pool imbalance in liver of folate/methyl deficient rats. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 2, p. 287-93, Feb 1997.

JII, H. *et al.* Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. **Nature**, v. 467, n. 7313, p. 338-42, Sep 16 2010.

JOHNSON, K. J. *et al.* Parental age and risk of childhood cancer: a pooled analysis. **Epidemiology**, v. 20, n. 4, p. 475-83, Jul 2009.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 7, p. 484-92, May 29 2012.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 6, p. 415-28, Jun 2002.

KATZ, A. J. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia: an assessment of international incidence, survival, and disease burden. **Cancer Causes Control**, v. 26, n. 11, p. 1627-42, Nov 2015.

KEMPSKI, H. *et al.* Prenatal chromosomal diversification of leukemia in monozygotic twins. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 37, n. 4, p. 406-11, Aug 2003.

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**, v. 16, n. 21, p. 5339-50, Nov 1 2010.

KIM, Y. I. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. **J Nutr Biochem**, v. 10, n. 2, p. 66-88, Feb 1999.

_____. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 13, n. 4, p. 511-9, Apr 2004.

KNUDSON, A. G., JR. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 68, n. 4, p. 820-3, Apr 1971.

KOIFMAN, S.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. High birth weight as an important risk factor for infant leukemia. **Br J Cancer**, v. 98, n. 3, p. 664-7, Feb 12 2008.

KORBEL, J. O. *et al.* The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 29, p. 12031-6, Jul 21 2009.

KWEE, I. *et al.* Integrated DNA copy number and methylation profiling of lymphoid neoplasms using a single array. **Br J Haematol**, v. 156, n. 3, p. 354-7, Feb 2012.

LEE, J. W. *et al.* Treatment of children with acute lymphoblastic leukemia with risk group based intensification and omission of cranial irradiation: A Korean study of 295 patients. **Pediatr Blood Cancer**, v. 63, n. 11, p. 1966-73, Nov 2016.

LI, Y. *et al.* Constitutional and somatic rearrangement of chromosome 21 in acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 508, n. 7494, p. 98-102, Apr 3 2014.

LIN, D. *et al.* Bright/ARID3A contributes to chromatin accessibility of the immunoglobulin heavy chain enhancer. **Mol Cancer**, v. 6, p. 23, 2007.

LIU, Y. F. *et al.* Genomic Profiling of Adult and Pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **EBioMedicine**, v. 8, p. 173-83, Jun 2016.

LOUGHRAN, S. J. *et al.* The transcription factor Erg is essential for definitive hematopoiesis and the function of adult hematopoietic stem cells. **Nat Immunol**, v. 9, n. 7, p. 810-9, Jul 2008.

LU, Q.; WRIGHT, D. D.; KAMPS, M. P. Fusion with E2A converts the Pbx1 homeodomain protein into a constitutive transcriptional activator in human leukemias carrying the t(1;19) translocation. **Mol Cell Biol**, v. 14, n. 6, p. 3938-48, Jun 1994.

LUO, Y.; LU, X.; XIE, H. Dynamic Alu methylation during normal development, aging, and tumorigenesis. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 784706, 2014.

MAIA, A. T. *et al.* Identification of preleukemic precursors of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in cord blood. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 40, n. 1, p. 38-43, May 2004.

MAIA, A. T. *et al.* Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins. **Leukemia**, v. 17, n. 11, p. 2202-6, Nov 2003.

MEDICI, V.; HALSTED, C. H. Folate, alcohol, and liver disease. **Mol Nutr Food Res**, v. 57, n. 4, p. 596-606, Apr 2013.

MEINERT, R. *et al.* Leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in childhood and exposure to pesticides: results of a register-based case-control study in Germany. **Am J Epidemiol**, v. 151, n. 7, p. 639-46; discussion 647-50, Apr 1 2000.

METAYER, C.; BUFFLER, P. A. Residential exposures to pesticides and childhood leukaemia. **Radiat Prot Dosimetry**, v. 132, n. 2, p. 212-9, 2008.

METAYER, C. *et al.* Genetic variants in the folate pathway and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Causes Control**, v. 22, n. 9, p. 1243-58, Sep 2011.

MICHAUD, J.; SCOTT, H. S.; ESCHER, R. AML1 interconnected pathways of leukemogenesis. **Cancer Invest**, v. 21, n. 1, p. 105-36, 2003.

MOORES, C. J.; FENECH, M.; O'CALLAGHAN, N. J. Telomere dynamics: the influence of folate and DNA methylation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1229, p. 76-88, Jul 2011.

MOORMAN, A. V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 101, n. 4, p. 407-16, Apr 2016.

MOORMAN, A. V. *et al.* A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 124, n. 9, p. 1434-44, Aug 28 2014.

MOORMAN, A. V. *et al.* Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 102, n. 8, p. 2756-62, Oct 15 2003.

MOORMAN, A. V. *et al.* Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 102, n. 8, p. 2756-62, Oct 15 2003.

MOORMAN, A. V. *et al.* Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). **Blood**, v. 109, n. 6, p. 2327-30, Mar 15 2007.

MOORMAN, A. V. *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**, v. 31, n. 27, p. 3389-96, Sep 20 2013.

MOORMAN, A. V. *et al.* IGH@ translocations, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 25, p. 3100-8, Sep 01 2012.

- MORI, H. *et al.* Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 12, p. 8242-7, Jun 11 2002.
- MORRIS, T. J. *et al.* ChAMP: 450k Chip Analysis Methylation Pipeline. **Bioinformatics**, v. 30, n. 3, p. 428-30, Feb 01 2014.
- MOYERS, S.; BAILEY, L. B. Fetal malformations and folate metabolism: review of recent evidence. **Nutr Rev**, v. 59, n. 7, p. 215-24, Jul 2001.
- MULLIGHAN, C. G. *et al.* Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet**, v. 41, n. 11, p. 1243-6, Nov 2009.
- NARAYANAN, S. *et al.* Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes in vivo. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 13, n. 9, p. 1436-43, Sep 2004.
- NIZETIC, D.; GROET, J. Tumorigenesis in Down's syndrome: big lessons from a small chromosome. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 10, p. 721-32, Oct 2012.
- NORDLUND, J. *et al.* DNA methylation-based subtype prediction for pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Clin Epigenetics**, v. 7, p. 11, 2015a.
- _____. DNA methylation-based subtype prediction for pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Clin Epigenetics**, v. 7, n. 1, p. 11, 2015b.
- ONGARO, A. *et al.* Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival. **Haematologica**, v. 94, n. 10, p. 1391-8, Oct 2009.
- PANZER-GRUMAYER, E. R. *et al.* Nondisjunction of chromosomes leading to hyperdiploid childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is an early event during leukemogenesis. **Blood**, v. 100, n. 1, p. 347-9, Jul 01 2002.
- PAZ, M. F. *et al.* Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. **Cancer Res**, v. 62, n. 15, p. 4519-24, Aug 01 2002.
- PEREIRA, T. V. *et al.* 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia risk: a meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 15, n. 10, p. 1956-63, Oct 2006.
- PERERA, F. P. Environment and cancer: who are susceptible? **Science**, v. 278, n. 5340, p. 1068-73, Nov 7 1997.
- PETER, A. *et al.* Interphase FISH on TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemia relapses--analysis of clinical relevance of additional TEL and AML1 copy number changes. **Eur J Haematol**, v. 83, n. 5, p. 420-32, Nov 2009.
- POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S.; KOIFMAN, S. Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 15, n. 12, p. 2336-41, Dec 2006.

- POMBO DE OLIVEIRA, M. S. *et al.* Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. **Blood Cells Mol Dis**, v. 42, n. 2, p. 121-5, Mar-Apr 2009.
- PUI, C. H. Acute lymphoblastic leukemia: introduction. **Semin Hematol**, v. 46, n. 1, p. 1-2, Jan 2009.
- PUI, C. H. *et al.* Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 5, p. 551-65, Feb 10 2011.
- PUI, C. H.; EVANS, W. E. Acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 339, n. 9, p. 605-15, Aug 27 1998.
- PUI, C. H. *et al.* Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? **Blood**, v. 120, n. 6, p. 1165-74, Aug 9 2012.
- PUI, C. H. *et al.* Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 118-45, 2004.
- PUISSEGUR, M. P. *et al.* B-cell regulator of immunoglobulin heavy-chain transcription (Bright)/ARID3a is a direct target of the oncomir microRNA-125b in progenitor B-cells. **Leukemia**, v. 26, n. 10, p. 2224-32, Oct 2012.
- PYATT, D.; HAYS, S. A review of the potential association between childhood leukemia and benzene. **Chem Biol Interact**, v. 184, n. 1-2, p. 151-64, Mar 19 2010.
- RAND, V. *et al.* Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 117, n. 25, p. 6848-55, Jun 23 2011.
- ROBERTSON, K. D. DNA methylation and human disease. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 8, p. 597-610, Aug 2005.
- ROBINSON, H. M. *et al.* Amplification of AML1 in acute lymphoblastic leukemia is associated with a poor outcome. **Leukemia**, v. 17, n. 11, p. 2249-50, Nov 2003a.
- _____. Amplification of AML1 in acute lymphoblastic leukemia is associated with a poor outcome. **Leukemia**, v. 17, n. 11, p. 2249-2250, 2003b.
- ROBINSON, H. M. *et al.* Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) may arise from a breakage-fusion-bridge cycle. **Genes Chromosomes.Cancer**, v. 46, n. 4, p. 318-326, 2007.
- RODIC, N.; BURNS, K. H. Long interspersed element-1 (LINE-1): passenger or driver in human neoplasms? **PLoS Genet**, v. 9, n. 3, p. e1003402, Mar 2013.
- ROMANA, S. P. *et al.* The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. **Blood**, v. 85, p. 3662-3670, 1995.
- ROSS, J. A. Birth weight and childhood leukemia: time to tackle bigger lessons. **Pediatr Blood Cancer**, v. 58, n. 1, p. 1-2, Jan 2012.

- ROSS, J. A. *et al.* Epidemiology of childhood leukemia, with a focus on infants. **Epidemiol Rev**, v. 16, n. 2, p. 243-72, 1994.
- ROWLEY, J. D. Identificaton of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. **Ann Genet**, v. 16, n. 2, p. 109-12, Jun 1973.
- SAWAN, C. *et al.* Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. **Mutat Res**, v. 642, n. 1-2, p. 1-13, Jul 3 2008.
- SCÉLO, G. *et al.* Household exposure to paint and petroleum solvents, chromosomal translocations, and the risk of childhood leukemia. **Environ Health Perspect**, v. 117, n. 1, p. 133, 2009.
- SCHAFER, E. *et al.* Promoter hypermethylation in MLL-r infant acute lymphoblastic leukemia: biology and therapeutic targeting. **Blood**, v. 115, n. 23, p. 4798-809, Jun 10 2010.
- SCHOLZ, B.; MARSCHALEK, R. Epigenetics and blood disorders. **Br J Haematol**, v. 158, n. 3, p. 307-22, Aug 2012.
- SEILER, R. Physical setting and natural sources of exposure to carcinogenic trace elements and radionuclides in Lahontan Valley, Nevada. **Chem Biol Interact**, v. 196, n. 3, p. 79-86, Apr 5 2012.
- SELHUB, J.; MILLER, J. W. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. **Am J Clin Nutr**, v. 55, n. 1, p. 131-8, Jan 1992.
- SHERBORNE, A. L. *et al.* Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. **Nat Genet**, v. 42, n. 6, p. 492-4, Jun 2010.
- SHIBUYA, K. *et al.* Identification of a novel zinc finger protein gene (ZNF298) in the GAP2 of human chromosome 21q. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 332, n. 2, p. 557-68, Jul 01 2005.
- SINCLAIR, P. B. *et al.* Analysis of a breakpoint cluster reveals insight into the mechanism of intrachromosomal amplification in a lymphoid malignancy. **Hum Mol Genet**, v. 20, n. 13, p. 2591-602, Jul 01 2011.
- SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 3-4, p. 375-83, Aug 2000.
- SMITH, M. *et al.* Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 1, p. 18-24, Jan 1996.
- STREFFORD, J. C. *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**, v. 103, n. 21, p. 8167-72, May 23 2006.
- STUMPEL, D. J. *et al.* Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, influences clinical outcome, and provides therapeutic options. **Blood**, v. 114, n. 27, p. 5490-8, Dec 24 2009.

STUMPEL, D. J. *et al.* Absence of global hypomethylation in promoter hypermethylated Mixed Lineage Leukaemia-rearranged infant acute lymphoblastic leukaemia. **Eur J Cancer**, v. 49, n. 1, p. 175-84, Jan 2013.

TAUB, J. W. *et al.* High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 99, n. 8, p. 2992-6, Apr 15 2002.

TAYLOR, G. M. *et al.* Correspondence re: R. Varon et al., Mutations in the Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.*, 61: 3570-3572, 2001. **Cancer Res**, v. 63, n. 19, p. 6563-4; author reply 6565, Oct 1 2003.

TAYLOR, K. H. *et al.* Ultradeep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by 454 sequencing. **Cancer Res**, v. 67, n. 18, p. 8511-8, Sep 15 2007.

TEUFFEL, O. *et al.* Prenatal origin of separate evolution of leukemia in identical twins. **Leukemia**, v. 18, n. 10, p. 1624-9, Oct 2004.

THOMPSON, J. R. *et al.* Maternal folate supplementation in pregnancy and protection against acute lymphoblastic leukaemia in childhood: a case-control study. **Lancet**, v. 358, n. 9297, p. 1935-40, Dec 8 2001.

TURNER, M. C.; WIGLE, D. T.; KREWSKI, D. Residential pesticides and childhood leukemia: a systematic review and meta-analysis. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 1, p. 33-41, Jan 2010.

U, M. *et al.* Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor. **Leukemia**, v. 18, n. 11, p. 1850-6, Nov 2004.

URAYAMA, K. Y. *et al.* Current evidence for an inherited genetic basis of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Int J Hematol**, v. 97, n. 1, p. 3-19, Jan 2013.

VAN MAELE-FABRY, G. *et al.* Residential exposure to pesticides and childhood leukaemia: a systematic review and meta-analysis. **Environ Int**, v. 37, n. 1, p. 280-91, Jan 2011.

VANHEES, K. *et al.* Prenatal exposure to flavonoids: implication for cancer risk. **Toxicol Sci**, v. 120, n. 1, p. 59-67, Mar 2011.

VERTINO, P. M. *et al.* De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 8, p. 4555-65, Aug 1996.

VIEIRA, T. M. F. O papel dos polimorfismos nos genes RFC1, MTHFR, e SHMT1 na susceptibilidade e sobrevida das LLAs da primeira infância. p. 116, 26/03q2013 2013.

VIJAYAKRISHNAN, J.; HOULSTON, R. S. Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. **Haematologica**, v. 95, n. 8, p. 1405-14, Aug 2010.

VYAS, P.; CRISPINO, J. D. Molecular insights into Down syndrome-associated leukemia. **Curr Opin Pediatr**, v. 19, n. 1, p. 9-14, Feb 2007.

WALSH, C. P.; XU, G. L. Cytosine methylation and DNA repair. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 301, p. 283-315, 2006.

WANG, L. *et al.* Determining the association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and genomic DNA methylation level: A meta-analysis. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 106, n. 8, p. 667-74, Aug 2016.

WEBB, C. F. *et al.* The ARID family transcription factor bright is required for both hematopoietic stem cell and B lineage development. **Mol Cell Biol**, v. 31, n. 5, p. 1041-53, Mar 2011.

WECHSLER, J. *et al.* Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. **Nat Genet**, v. 32, n. 1, p. 148-52, Sep 2002.

WIEMELS, J. L. Perspectives on the causes of childhood leukemia. **Chem Biol Interact**, v. 196, n. 3, p. 59-67, Apr 5 2012.

WIEMELS, J. L. *et al.* Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. **Blood**, v. 94, n. 3, p. 1057-62, Aug 1 1999.

WIEMELS, J. L. *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 7, p. 4004-9, Mar 27 2001.

WOODWARD, E. L. *et al.* Allelic variants of PRDM9 associated with high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 166, n. 6, p. 947-9, Sep 2014.

XU, G. *et al.* Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. **Blood**, v. 102, n. 8, p. 2960-8, Oct 15 2003.

XU, X. *et al.* The advantage of using SNP array in clinical testing for hematological malignancies--a comparative study of three genetic testing methods. **Cancer Genet**, v. 206, n. 9-10, p. 317-26, Sep-Oct 2013.

YAMAMOTO, H. *et al.* Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2. **Genes Dev**, v. 12, n. 9, p. 1315-26, May 01 1998.

YAN, J. *et al.* A meta-analysis of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and risk of acute lymphoblastic leukemia in children. **Pediatr Blood Cancer**, v. 58, n. 4, p. 513-8, Apr 2012.

YODER, J. A.; WALSH, C. P.; BESTOR, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends Genet**, v. 13, n. 8, p. 335-40, Aug 1997.

ZAZA, G. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion has lower expression of genes involved in purine metabolism and lower de novo purine synthesis. **Blood**, v. 104, n. 5, p. 1435-41, Sep 1 2004.

ZHANG, Y. *et al.* Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in human cancer. **J Biol Chem**, v. 287, n. 39, p. 32494-511, Sep 21 2012.

ZIPURSKY, A. Susceptibility to leukemia and resistance to solid tumors in Down syndrome.
Pediatr Res, v. 47, n. 6, p. 704, Jun 2000.

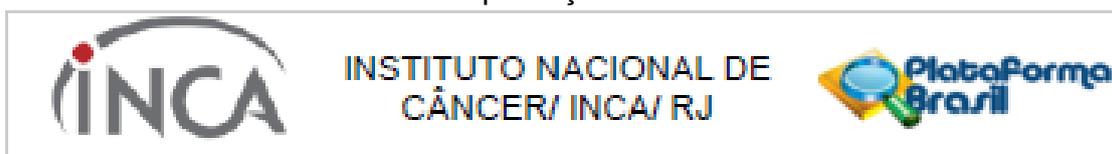
ANEXO I
Grupo Colaborativo

Região	Instituições	N	Colaboradores
Nordeste			
Bahia	Hospital Martagão Gesteira-Salvador	15	Eny Guimarães Carvalho M.D, Ana M.Marinho da Silva, Jozina Marian de Andrade Agareno
	Sociedade de Oncologia da Bahia-Salvador	25	Nubia Mendonça, Flavia Nogueira Serafim Araujo, Lilian Maria Burlachini, Maria Dolores Dorea
	Hospital Manoel Novais Sta Casa de Misericórdia- Itabuna	7	Teresa Cristina Cardoso
	Hospital Aristidez Maltez-Salvador	7	Nilma Pimentel de Brito
Pernambuco	Hospital Universitário Oswaldo Cruz CEON-Recife	14	Terezinha Marques Salles
Paraíba	Hospital Universitário Alcides Carneiro-Campina Grande	3	Renata S. Carvalho Gurgel
	Hospital Napoleão Laureano- João Pessoa	6	Andrea Gadelha Nobrega, Eloisa Cartaxo Eloy Fialho
	Instituto de Hematologia da Paraíba -João Pessoa	2	Gilson Spinol Guedes Filho
Piauí	Hospital São Marcos -Teresina	4	Gildene Alves
Alagoas	Hospital do Açúcar e Ácool, Maceió -Alagoas	3	Luana Novaes Bonfim
Centro-oeste			
Distrito Federal	Hospital da Criança de Brasília	23	Isis Magalhães e Jose Carlos Cordoba
Goiás	Hospital Araújo Jorge -Goiânia	3	Cesar Bariani, Loretta Soares Campos Oliveira, Patricia Carneiro de Brito
Mato Grosso do Sul	Hospital Regional Rosa Pedrossian - CETHOI , Campo Grande	10	Rosania Baseggio / Marcelo Santos/ Atalla
Sudeste			
Rio de Janeiro	HC1-Instituto Nacional de Câncer-Rio de Janeiro	19	Jane Dobbin, Maria Kadma Carrico, Reinaldo Dal Belo, Alexandre Apa
	Instituto Pediatria Puericultura Martagão Gesteira -Rio de Janeiro	6	Elaine Sobral/Adriana, Marcelo Land
	Hospital dos Servidores do Estado- Rio de Janeiro	2	Fernando de Almeida Wernerck, Monica Lankszner
Minas Gearais	Hospital das Clínicas -Belo Horizonte	17	Gilberto Ramos, Joaquim Cartaxo
São Paulo	Centro Infantil Dr. Domingos Boldrini -Campinas	23	Vitória Regia Pinheiro, José Andreias Yunes
	Instituto de Oncologia Pediátrica - GRAAC	9	Maria Lucia Marinho Lee
	Hospital Santa Marcelina -São Paulo	5	Renato Melaragno, Sidnei Epelman

	Instituto da Criança Professor Pedro de Alcântara -São Paulo	4	Lilian Maria Cristofani
	Hospital Amaral Carvalho-Jaú	2	Claudia Teresa Oliveira, Alejandro M Araucibia
Sul			
Paraná	Hospital das Clínicas -Curitiba	7	Mara Albonei Dudeque Pianovski
Santa Catarina	Hospital Infantil Joana de Gusmão -Florianópolis	5	Imarui Costa, Denise Bousfield
Rio Grande do Sul	Hospital Universitário de Santa Maria	6	Theresa cromossomosistina Lafaiete, Virginia Coser

ANEXO II

Carta de aprovação do comitê de ética



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: 20.231-002
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4558 E-mail: cep@inca.gov.br



Continuação do Parecer: 005.030

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, 138 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-002
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4558 E-mail: cep@inca.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
CÂNCER/ INCA/ RJ



Continuação do Parecer: 205.020

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 Nº 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: 20.231-062
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)5207-4550 Fax: (21)5207-4558 E-mail: cep@inca.gov.br

Página 03 de 03

ANEXO III

METACORE QUICK REFERENCE GUIDE

USER DATA

NETWORKS	MAPS
<p>Up-regulated (+) Object has user data with positive value</p>	
<p>Down-regulated (-) Object has user data with negative value</p>	
<p>Mixed-signal (+/-) Object has user data with both positive and negative values</p>	
<p>Gene variants Object has user data with gene variants</p>	
<p>Mixed data Object has user data with both expression values and gene variants</p>	

NETWORK OBJECTS

ENZYMES	GENERIC CLASSES
<p>Generic enzyme</p> <p>KINASE</p> <ul style="list-style-type: none"> Generic kinase Protein kinase Lipid kinase <p>PHOSPHATASE</p> <ul style="list-style-type: none"> Generic phosphatase Protein phosphatase Lipid phosphatase <p>PHOSPHOLIPASE</p> <ul style="list-style-type: none"> Generic phospholipase <p>PROTEASE</p> <ul style="list-style-type: none"> Generic protease Metalloprotease <p>CTRSE</p> <ul style="list-style-type: none"> G-alpha RAS - superfamily 	<ul style="list-style-type: none"> Receptor ligand Transcription factor Protein Compound Predicted metabolite or user's structure Inorganic ion Reaction DNA RNA Generic binding protein Cell membrane glycoprotein
CHANNELS/TRANSPORTERS	RECEPTORS
<ul style="list-style-type: none"> Generic channel Ligand-gated ion channel Voltage-gated ion channel Transporter 	<ul style="list-style-type: none"> Generic Receptor CPCR Receptors with kinase activity
G PROTEIN ADAPTOR/REGULATORS	
<ul style="list-style-type: none"> G beta/gamma Regulators (GDI, GAP, GET, etc.) 	
GROUPS OF OBJECTS	
<ul style="list-style-type: none"> A complex or a group Proteins physically connected into a complex or related as a family Logical association Proteins linked by logical relations or physical interactions Custom association Group of collapsed objects chosen by user 	

INTERACTIONS BETWEEN OBJECTS

EFFECTS
<ul style="list-style-type: none"> Positive / activation Negative / Inhibition Unspecified
MECHANISMS
<p>PHYSICAL INTERACTIONS:</p> <ul style="list-style-type: none"> B Binding Physical interaction between molecules C Cleavage Cleavage of a protein at a specific site yielding distinctive peptide fragments. Proteolytic cleavage can be carried out by both enzymes and compounds CM Covalent modifications Covalent binding of a small chemical groups to protein amino acids or DNA/RNA nucleotides AP Phosphorylation Protein activity is altered via addition of a phosphate group DP Dephosphorylation Protein activity is altered via removal of a phosphate group T Transformation Protein activity regulation by binding of regulatory of CTP Tn Transport Transport of a protein or a compound between organelles Z Catalysis Catalysis of an enzymatic reaction Tr Transcription regulation Physical binding of a transcription factor to target gene's promoter ERT Co-regulation of transcription Influences on gene expression by direct binding with transcription machinery or by chromatin remodeling Rg Regulation Influences on the biochemical reaction by changing its composition M MicroRNA binding Regulation of gene expression by binding of microRNA to target mRNA <p>FUNCTIONAL INTERACTIONS:</p> <ul style="list-style-type: none"> IE Influence on expression Indirect influence of chemical compound or protein on the amount of another protein Cn Competition When two molecules compete for the interaction with the third molecule U Unspecified interactions Interaction or activity of protein or RNA without determined mechanism PE Drug-Drug interactions. Pharmacological effect Drugs change pharmacological effects of other drugs, for instance by competing for drug metabolism enzymes or organic transporters TE Drug-Drug interactions. Toxic effect Drugs change toxic effects of other drugs, for instance by competing for drug metabolism enzymes or organic transporters <p>LOGICAL RELATIONS:</p> <ul style="list-style-type: none"> GR Group relation Object belongs to a generic group of related objects CS Complex subunit Protein is a subunit of a protein complex SR Similarity relation Chemically similar compounds with ChEMBL similarity score

LINKS ON NETWORKS
<ul style="list-style-type: none"> Incoming interaction When the mouse is over object, yellow link indicates direction to object Outgoing interaction Cyan link indicates direction FROM the object <p>INTERACTIONS FROM CUSTOM LIST (ONALINK™)</p> <ul style="list-style-type: none"> Interaction is in the network Interaction is represented by a thin solid line and is highlighted in blue Interaction is in the base, but not in network Interaction is highlighted in yellow Interaction is in the network Interaction is highlighted in orange <p>CANONICAL PATHWAYS</p> <ul style="list-style-type: none"> Canonical pathway The link is highlighted in a thick cyan or magenta line <p>LINKS ON MAPS</p> <ul style="list-style-type: none"> Disrupts in disease Weakens in disease Emerges in disease Enhances in disease Species specific interactions

OBJECTS ON MAPS

LOCALIZATION	OTHER MAP OBJECTS
<ul style="list-style-type: none"> Mitochondria EPR Golgi Nucleus Lysosome Peroxisome Cytoplasm Extracellular 	<p>Comments</p> <ul style="list-style-type: none"> Note Normal process Pathological process <p>Blocks</p> <ul style="list-style-type: none"> Normal process Pathological process Species specific object Path start

THOMSON REUTERS REGIONAL OFFICES

North America

Philadelphia
+1 800 336 4474
+1 215 386 0100

Latin America

+55 11 8370 9845

Europe, Middle East and Africa

Barcelona +34 93 459 2220
London +44 20 7433 4000

Asia Pacific

Singapore +65 6775 5088
Tokyo +81 3 5218 6500

Contact us to find out more about *MetaCore* or visit thomsonreuters.com/diseasesight

For a complete office list visit: science.thomsonreuters.com/contact

L50312

Copyright © 2013 Thomson Reuters



THOMSON REUTERS™

ANEXO IV

Long interspersed nuclear element-1 methylation levels differ in acute lymphoblastic leukemia subtypes, but are not related to *MTHFR* rs1801133 polymorphism

Running title: Line 1 methylation in acute lymphoblastic leukemia

Vieira TMF¹, Chung Filho AA¹, Soares Lima SC², Pombo-de-Oliveira MS^{1*}.

¹Pediatric Haematology-Oncology Program, Research Centre, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.²

Maria S. Pombo-de-Oliveira, MD, PhD, Pediatric Haematology-Oncology Program, Research Center, Instituto Nacional de Câncer - INCA, Rua André Cavalcanti, 37. Rio de Janeiro/RJ – Brazil. Zip code: 20231-050; Phone: +55 21 3207-6606 Fax: +55 21 3207-6505, e-mail: mpombo@inca.gov.br.

Long interspersed nuclear element-1 methylation levels differ in acute lymphoblastic leukemia subtypes, but are not related to *MTHFR* rs1801133 polymorphism

Running title: Line 1 methylation in acute lymphoblastic leukemia

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood cancer. Nevertheless, B cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) is a multifactorial disease. In this context, folate bioavailability could contribute to leukemogenesis by altering the DNA methylation. BCP-ALL subtypes have been characterized by gene-specific DNA methylation, but the global methylation profile of this disease is poorly explored. Therefore, this study aims to investigate whether the LINE-1 methylation status would be altered in BCP-ALL, if it differs in BCP-ALL subtypes, and whether *MTHFR* rs1801133 polymorphism would be associated with global methylation levels. So, we included 149 samples, BCP-ALL (n=117), cord blood controls (n=27) and remission samples (n=5). *MTHFR* rs1801133 genotype was performed by PCR-RFLP. DNA was modified with EZ DNA Methylation™ Kit, LINE-1 methylation was analyzed by pyrosequencing between the different BCP-ALL subtypes. There were no statically significant differences in the LINE-1 profile amongst BCP-ALL with chromosomal translocations or normal karyotype. Otherwise, hyperdiploid samples showed higher LINE-1 methylation levels when compared with non-hyperdiploid BCP-ALL samples ($p=0.0004$), controls ($p=0.0013$) or remission samples ($p=0.0198$). LINE-1 methylation was able to distinguish the hyperdiploid from the non-hyperdiploid cases with an accuracy of 70.56% ($p=0.0004$). *MTHFR* rs1801133 was not associated with methylation changes. Thus, we reinforced the observation that the global hypermethylation phenomena observed in ALL. Additionally, we showed that

INTRODUCTION

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood cancer, corresponding to approximately 25% of cancer diagnoses among children under 20 years (KATZ *et al.*, 2015). B cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) is clearly a genetic disease, characterized by primary and secondary genetic lesions. Chromosomal translocations are often the primary abnormalities, resulting in gene fusions, or aneuploidy (gain or loss of whole chromosomes); whereas secondary abnormalities are often characterized by copy number alterations (CNA) and point mutations.

Nevertheless, ALL is a multifactorial disease modulated not only by genetic susceptibility, but also by environmental exposure. In this context, folate bioavailability could contribute to leukemogenesis. Folate is essential for the DNA synthesis, repair and methylation and polymorphisms in folate-related genes have already been associated with both etiology and therapeutic risk in childhood ALL. The enzyme 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR), which catalyzes the reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, is encoded by a polymorphic gene and has been the focus of several studies in ALL and other tumors [4]. The *MTHFR* rs1801133 polymorphism leads to the translation of a thermolabile enzyme with reduced activity due to conformational changes in the protein structure, causing a significant reduction in the flavin adenine dinucleotide binding affinity. This enzyme is crucial for folate metabolism and its malfunctioning may, therefore, impair DNA methylation (CHIANG *et al.*, 2007; MOORES *et al.*, 2011).

DNA methylation is an epigenetic mechanism of gene expression regulation which is largely altered in cancer, leading to inactivation of tumor suppressors genes and/or activation of proto-oncogenes and mobile elements (CHEUNG *et al.*, 2010). Solid tumors usually present a global DNA hypomethylation, but in ALL this phenomenon is not completely understood. It has already been demonstrated that different ALL subtypes show distinct gene-specific DNA methylation signature, but little is known about the influence of global methylation in this disease.

The majority of the human genome consists of non-coding DNA elements (~98%). Mobile elements (transposons and retrotransposons) account for a large proportion of such non-coding regions and are mostly represented by short interspersed elements (SINEs) and long interspersed elements (LINEs), which constitute about 33% of the human genome (Lander *et al.*, 2001). Long interspersed

nuclear element-1 (LINE-1), specifically, represents about 17% of the genome. LINE-1 sequence comprises a 5'-untranslated region (UTR), two open-reading frames, and a 3'-UTR. The expression of LINE-1 elements and, therefore, their retrotransposition ability are largely regulated by DNA methylation. In this context, it has been shown that LINE-1 hypomethylation leads to retrotransposition events which, in turn, trigger chromosome breaks, genomic instability and deletions. in cancer cells. Due to the high frequency and biologic relevance of these elements, they are useful surrogate markers for global methylation status.

Despite ALL subtype-specific methylation signatures have already been described, to date, few studies have evaluated global methylation changes in ALL , they demonstrated a hypermethylated profile in leukemia samples. Therefore, this study aims to investigate whether the global methylation status, evaluated by LINE-1 methylation assessment, is altered in ALL and differs according to CPB-ALL subtypes, as well as to verify the association between *MTHFR* rs1801133 polymorphism and global methylation levels.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Patient cohort was recruited from a network of 35 childhood cancer centers located in cities across Brazil that send samples to the laboratory of Pediatric Hematology-Oncology Program (PHOP) at the Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil for diagnostic and research purposes. The referring physicians provided information regarding sample collection date (bone marrow aspiration and/or peripheral blood) and previous medication use. Demographic and clinical data were also provided and included birth date, sex, white blood cell (WBC) count, percentage of bone marrow blasts and central nervous system (CNS) involvement. Clinical follow-up information was requested later.

B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (Bcp-ALL) characterization was performed by immunophenotyping and molecular cytogenetics. Recurrent abnormalities such as *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* and *KMT2A* rearrangements were detected by RT-PCR and/or by FISH. In this study, children aged less than 18 years with a confirmed diagnosis of acute lymphoblastic leukemia between 2002 and 2015 were included (n=117). We also included cord blood controls (n=27) and remission samples (n=5).

Among the 117 Bcp-ALL samples, sixty presented gain of chromosome 21 (by MLPA). Among them, we analyzed 45 samples by FISH, forty-two were then classified as hyperdiploid or high hyperdiploid, two were *ETV6-RUNX1* +21 and one was iAMP21. Additionally, we included samples from the different ALL subtypes by chance. According to the molecular cytogenetics they were characterized as *ETV6-RUNX1* (n=18), *TCF3-PBX1* (n=15), *KMT2A-r* (n=19) and normal karyotype (n=5). The number of sample included by subtype is shown in Supplemental Figure 1. Data collection and laboratory procedures were evaluated and approved by the Research Ethics Committee from INCA, Rio de Janeiro (CEP#626.268).

Mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood samples were isolated by ficoll centrifugation or RBC lysis and stored at -20 °C in TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and DNA was isolated according to manufacturer's instructions. Additionally, we also used frozen blood cells to obtain DNA using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Analysis of LINE-1 methylation levels

A total of 500 ng of genomic DNA was treated with bisulfite using EpiTect kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to manufacturer's instructions. LINE-1 methylation levels were measured using pyrosequencing assay and primers' sequences as previously described. The PCR protocol performed included the addition of 5 mM of MgCl₂, Buffer 1x, 200 μM of dNTP, 10 pmol of each primer, one unit of taq DNA polymerase platinum and 25 ng of bisulfite treated DNA in a final volume of 50 μL. PCR thermal cycling was performed as follows: initial denaturation at 95°C for 15 minutes, followed by 50 cycles consisting of denaturation at 95°C for 40 seconds, annealing at 56°C for 40 seconds and extension at 72°C for 40 seconds, a final extension step was performed at 72°C for 10 seconds.

MTHFR rs1801133(677C>T) Genotyping

Genotyping was performed by the standard polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique for determining *MTHFR* rs1801133(677C>T) genetic variants. The PCR product was digested with *Hinf I* enzyme, and fragments were separated by electrophoresis on 3.0% agarose gels.

Statistical analysis

We first calculated the mean of the 5 CpG sites evaluated in LINE1 sequence for each sample. Next, we evaluated whether the different sample groups followed normal distribution using Kolmogorov-Smirnov test. Mann-Whitney or t test were then employed when comparing two groups, while one-way ANOVA and Bonferroni or Kruskal Wallis and Dunns test were used to compare more than two groups. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. Analyses and data visualization were performed with GraphPadPrism5 software (La Jolla, CA, USA).

RESULTS

LINE-1 methylation in BCP-ALL

The clinical and demographic characteristics of the 117 ALL patients included in the present study are shown in Table 1, the number of cases varied due to missing data. Most of the patients are CD10+ (85%) and present WBC count lower than 50,000 (64%). The remaining clinical features showed homogenous distribution among the patients. The mean survival for all samples was 12.9 years (IC 95%, 9.98-14.60) while the median was of 3.7 years.

Next, LINE-1 (L1) methylation profile was evaluated in all patients and controls. For all analyses, the mean of the five CpG sites evaluated was used. Interestingly, a similar L1 methylation profile was observed in controls (median methylation of 71%), cases (median methylation of 72%) and remission samples (media methylation of 70%) (Figure 1A). However, ALL samples showed the greatest methylation range, with a minimum of 61% and a maximum of 79%. A paired analysis between ALL and remission samples revealed that L1 methylation levels were lower in the remission samples of three out of five cases evaluated, when compared with the methylation levels at diagnosis (Figure 1B). For the other two patients, L1 methylation levels did not differ between diagnosis and remission.

The analysis of L1 methylation profile by ALL subtype showed that the methylation levels in *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *KMT2A-r* and abnormal karyotypegroups did not differ from the methylation detected in samples negative for these aberrations (Figure 2A-D). The same was true when comparing these groups to normal or remission samples (Figure 2A-D). On the other hand, hyperdiploid samples showed higher L1 methylation levels when compared with ALL non-hyperdiploid samples ($p=0.0004$), controls ($p=0.0013$) or remission samples (0.0193) (Figure 2E). Once such differences were observed, we used a ROC curve analysis to evaluate whether L1 methylation levels were able to discriminate non-hyperdiploid from hyperdiploid samples. Interestingly, with a cut-off of 72.5%, L1 methylation distinguished the two samples groups ($p=0.0004$) with an accuracy of 70.56% (Figure 2F). However, although a high specificity was observed (76.27%), the sensitivity was rather low (53.49%). We also evaluated whether L1 methylation levels differ according to NCI risk stratification criteria, survival outcome, gender, age or WBC count, but no statistically significant differences were observed (Table 2), on the other hand, the

immunophenotyped was related to different L1 methylation (p value= 0.004), the CD10 + group was hypermethylated (Table 2).

LINE-1 methylation according to *MTHFR* genotype

The genotype frequencies for the *MTHFR*rs1801133 polymorphism are shown in Table 1. Most of the patients were homozygotes for the wild-type allele (53%), while heterozygotes and polymorphic homozygotes accounted for 47% of the cases. Allelic distributions are consistent with Hardy-Weinberg equilibrium (X^2 test P value = 0.79).

In addition, we investigated if L1 methylation levels differ according to *MTHFR* genotype, but no statistically significant differences were observed (Table 2).

DISCUSSION

In this study, we defined the global methylation profile in a series of 117 ALL samples. The patients were characterized in hyperdiploid, *ETV6-RUNX1+*, *TCF3-PBX1+*, normal karyotype and *KMT2A-r* subtypes. Our sample set showed predominance of cases with chr 21 gains. We also included controls and remission samples. No differences in LINE-1 methylation levels were observed when comparing controls, remissions and all ALL samples. On the other hand, hyperdiploid cases clearly showed a hypermethylation in comparison with non-hyperdiploid ALL or the other sample groups.

The contribution of DNA methylation to ALL genesis has been addressed by different authors during the last years. Array-based analyses have demonstrated that different ALL subtypes show specific DNA methylation signatures (FIGUEROA *et al.*, 2013; NORDLUND *et al.*, 2015a). Therefore, the use of these signatures was proposed as a tool in diagnostic practices, as well as an outcome predictor at diagnosis and remission. However, the implementation of DNA methylation signatures in the clinics is not feasible due to the high cost and time required to perform the analyses. In this context, LINE-1 methylation could be a promising biomarker. LINE-1 methylation provides an estimation of global methylation status and its evaluation is much more time and cost-effective. But its relevance has been more extensively explored in acute myeloid leukemia than in ALL. To date, only two studies involving a few number of ALL cases have focused on L1 methylation analysis. The first one included infant ALL cases and focused on *KMT2A-r* subtype comparing the methylation pattern of 45 *KMT2A-r* samples with 11 *KMT2A-GL* samples showing that *KMT2A-r* ALL cells were characterised by an overall methylated genomic state (STUMPEL *et al.*, 2013). The second study included just 32 ALL cases and showed that AML and ALL samples have

had higher LINE-1 methylation when compared to corresponding normal controls (BUJKO *et al.*, 2014). Additionally, they also characterized the ALL group with the highest DNA methylation level compared to AML and controls (BUJKO *et al.*, 2014). In the present study, we provide new data regarding the relevance of LINE-1 methylation in a larger number of samples in a well characterized ALL cohort. Here we showed for the first time hyperdiploid samples showing L1 hypermethylation when compared with others ALL subtypes, controls or remission samples.

It is quite challenging to obtain mitosis in ALL samples, especially in countries like Brazil, with continental extension and where reference diagnostic centers are scarce. It may take up several days from sample collection to analysis and, therefore, hyperdiploidia is rather hard to diagnose. In our study, L1 methylation profile showed a sensitivity of 76.27% to distinguish hyperdiploid from non-hyperdiploid samples and, although the specificity was low, it is tempting to propose LINE-1 methylation analysis could help improving diagnosis. So far, no molecular biomarkers are available for hyperdiploidia diagnosis and the approach proposed here could represent an alternative just using DNA.

Based on the hypotheses that the lower enzymatic activity resulting for *MTHFR* rs1801133 polymorphism could lead to decreased global methylation levels, we tested this association in ALL samples. Notwithstanding such association has already been observed by other authors in with colorectal, breast, lung tumors and coronary artery disease models (FRISO *et al.*, 2002; PAZ *et al.*, 2002). Despite of this, one recent meta-analysis including pooled data from 1147 individuals showed no association between polymorphism and global methylation level (for TT vs. CC: z50.25; p50.80; for CT vs. CC: z51.04; p50.30) (WANG *et al.*, 2016). We didn't find any association in our cohort. This might be a consequence of the high prevalence of hyperdiploid samples in our sample set, which showed a hypermethylation profile. Therefore, the lack of association between *MTHFR* polymorphism and L1 methylation might be a specificity of the sample group evaluated in our study. Our control group was not big enough to confirm this hypothesis.

Here we characterize the global methylation landscape of an ALL cohort thoroughly stratified by subtype, we also provided a new data involving the relationship between *MTHFR* rs1801133 polymorphism and the global methylation in ALL. Both findings contribute to improve the knowledge regarding the involvement of DNA methylation in leukemia pathogenesis, susceptibility and biomarkers.

The results indicated that the Hyperdiploid ALL as characterized by an increased DNA methylation in L1 regions. It is not clear how this methylation profile could be related to this specific subtype of leukemia or why the hyperdiploid blasts present hypermethylation instead of hypomethylation, as it is seen in solid tumors. On the other hand, the *MTHFR* rs1801133 polymorphism is not contributing to this methylation changes neither in the leukemic blasts nor in normal controls.

REFERENCES

2. Greaves M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer*. 1999;35:1941-53. Epub 2000/03/11.
3. Goyette P, Rozen R. The thermolabile variant 677C-->T can further reduce activity when expressed in cis with severe mutations for human methylenetetrahydrofolate reductase. *Hum Mutat*. 2000;16:132-8. Epub 2000/08/03.
4. Chiang EP, Wang YC, Tang FY. Folate restriction and methylenetetrahydrofolate reductase 677T polymorphism decreases adoMet synthesis via folate-dependent remethylation in human-transformed lymphoblasts. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2007;21:651-8. Epub 2007/02/16.
5. Moores CJ, Fenech M, O'Callaghan NJ. Telomere dynamics: the influence of folate and DNA methylation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1229:76-88. Epub 2011/07/29.
6. Cheung HH, Lee TL, Davis AJ, Taft DH, Rennert OM, Chan WY. Genome-wide DNA methylation profiling reveals novel epigenetically regulated genes and non-coding RNAs in human testicular cancer. *Br J Cancer*. 2010;102:419-27. Epub 2010/01/07.
7. Nordlund J, Backlin CL, Zachariadis V, Cavelier L, Dahlberg J, Ofverholm I, Barbany G, Nordgren A, Overnas E, Abrahamsson J, Flaegstad T, Heyman MM, Jonsson OG, Kanerva J, Larsson R, Palle J, Schmiegelow K, Gustafsson MG, Lonnerholm G, Forestier E, Syvanen AC. DNA methylation-based subtype prediction for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clin Epigenetics*. 2015;7:11. Epub 2015/03/03.
8. Gabriel AS, Lafta FM, Schwalbe EC, Nakjang S, Cockell SJ, Iliasova A, Enshaei A, Schwab C, Rand V, Clifford SC, Kinsey SE, Mitchell CD, Vora A, Harrison CJ, Moorman AV, Strathdee G. Epigenetic landscape correlates with genetic subtype but does not predict outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics*. 2015;10:717-26. Epub 2015/08/04.
9. Figueroa ME, Chen SC, Andersson AK, Phillips LA, Li Y, Sotzen J, Kundu M, Downing JR, Melnick A, Mullighan CG. Integrated genetic and epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2013;123:3099-111. Epub 2013/08/08.
10. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z, Snyder M, Dermitzakis ET, Thurman RE, Kuehn MS, Taylor CM, Neph S, Koch CM, Asthana S, Malhotra A, Adzhubei I, Greenbaum JA, Andrews RM, Flicek P, Boyle PJ, Cao H, Carter NP, Clelland GK, Davis S, Day N, Dhami P, Dillon SC, Dorschner MO, Fiegler H, Giresi PG, Goldy J, Hawrylycz M, Haydock A, Humbert R, James KD, Johnson BE, Johnson EM, Frum TT, Rosenzweig ER, Karnani N, Lee K, Lefebvre GC, Navas PA, Neri F, Parker SC, Sabo PJ, Sandstrom R, Shafer A, Vetrie D, Weaver M, Wilcox S, Yu M, Collins FS, Dekker J, Lieb JD, Tullius TD, Crawford GE, Sunyaev S, Noble WS, Dunham I, Denoeud F, Reymond A, Kapranov P, Rozowsky J, Zheng D, Castelo R, Frankish A, Harrow J, Ghosh S, Sandelin A, Hofacker IL, Baertsch R, Keefe D, Dike S, Cheng J, Hirsch HA, Sekinger EA, Lagarde J, Abril JF, Shahab A, Flamm C, Fried C, Hackermuller J, Hertel J, Lindemeyer M, Missal K, Tanzer A, Washietl S, Korbel J, Emanuelsson O, Pedersen JS, Holroyd N, Taylor R, Swarbreck D, Matthews N, Dickson MC, Thomas DJ, Weirauch MT, Gilbert J, Drenkow J, Bell I, Zhao X, Srinivasan KG, Sung WK, Ooi HS, Chiu KP, Foissac S, Alioto T, Brent M, Pachter L, Tress ML, Valencia A, Choo SW, Choo CY, Ucla C, Manzano C, Wyss C, Cheung E, Clark TG, Brown JB,

Ganesh M, Patel S, Tammana H, Chrast J, Henrichsen CN, Kai C, Kawai J, Nagalakshmi U, Wu J, Lian Z, Lian J, Newburger P, Zhang X, Bickel P, Mattick JS, Carninci P, Hayashizaki Y, Weissman S, Hubbard T, Myers RM, Rogers J, Stadler PF, Lowe TM, Wei CL, Ruan Y, Struhl K, Gerstein M, Antonarakis SE, Fu Y, Green ED, Karaoz U, Siepel A, Taylor J, Liefer LA, Wetterstrand KA, Good PJ, Feingold EA, Guyer MS, Cooper GM, Asimenos G, Dewey CN, Hou M, Nikolaev S, Montoya-Burgos JI, Loytynoja A, Whelan S, Pardi F, Massingham T, Huang H, Zhang NR, Holmes I, Mullikin JC, Ureta-Vidal A, Paten B, Seringhaus M, Church D, Rosenbloom K, Kent WJ, Stone EA, Batzoglou S, Goldman N, Hardison RC, Haussler D, Miller W, Sidow A, Trinklein ND, Zhang ZD, Barrera L, Stuart R, King DC, Ameer A, Enroth S, Bieda MC, Kim J, Bhinge AA, Jiang N, Liu J, Yao F, Vega VB, Lee CW, Ng P, Yang A, Moqtaderi Z, Zhu Z, Xu X, Squazzo S, Oberley MJ, Inman D, Singer MA, Richmond TA, Munn KJ, Rada-Iglesias A, Wallerman O, Komorowski J, Fowler JC, Couttet P, Bruce AW, Dovey OM, Ellis PD, Langford CF, Nix DA, Euskirchen G, Hartman S, Urban AE, Kraus P, Van Calcar S, Heintzman N, Kim TH, Wang K, Qu C, Hon G, Luna R, Glass CK, Rosenfeld MG, Aldred SF, Cooper SJ, Halees A, Lin JM, Shulha HP, Xu M, Haidar JN, Yu Y, Iyer VR, Green RD, Wadelius C, Farnham PJ, Ren B, Harte RA, Hinrichs AS, Trumbower H, Clawson H, Hillman-Jackson J, Zweig AS, Smith K, Thakkapallayil A, Barber G, Kuhn RM, Karolchik D, Armengol L, Bird CP, de Bakker PI, Kern AD, Lopez-Bigas N, Martin JD, Stranger BE, Woodroffe A, Davydov E, Dimas A, Eyras E, Hallgrimsdottir IB, Huppert J, Zody MC, Abecasis GR, Estivill X, Bouffard GG, Guan X, Hansen NF, Idol JR, Maduro VV, Maskeri B, McDowell JC, Park M, Thomas PJ, Young AC, Blakesley RW, Muzny DM, Sodergren E, Wheeler DA, Worley KC, Jiang H, Weinstock GM, Gibbs RA, Graves T, Fulton R, Mardis ER, Wilson RK, Clamp M, Cuff J, Gnerre S, Jaffe DB, Chang JL, Lindblad-Toh K, Lander ES, Koriabine M, Nefedov M, Osoegawa K, Yoshinaga Y, Zhu B, de Jong PJ. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*. 2007;447:799-816. Epub 2007/06/16.

11. Stein LD. Human genome: end of the beginning. *Nature*. 2004;431:915-6. Epub 2004/10/22.

12. Hohjoh H, Singer MF. Sequence-specific single-strand RNA binding protein encoded by the human LINE-1 retrotransposon. *EMBO J*. 1997;16:6034-43. Epub 1997/10/06.

13. Moran JV, Holmes SE, Naas TP, DeBerardinis RJ, Boeke JD, Kazazian HH, Jr. High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell*. 1996;87:917-27. Epub 1996/11/29.

14. Feng Q, Moran JV, Kazazian HH, Jr., Boeke JD. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell*. 1996;87:905-16. Epub 1996/11/29.

15. Kazazian HH, Jr., Goodier JL. LINE drive. retrotransposition and genome instability. *Cell*. 2002;110:277-80. Epub 2002/08/15.

16. Gilbert N, Lutz-Prigge S, Moran JV. Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell*. 2002;110:315-25. Epub 2002/08/15.

17. Bujko M, Musialik E, Olbromski R, Przestrzelska M, Libura M, Pastwinska A, Juszczynski P, Zwierzchowski L, Baranowski P, Siedlecki JA. Repetitive genomic elements and overall DNA methylation changes in acute myeloid and childhood B-cell lymphoblastic leukemia patients. *Int J Hematol*. 2014;100:79-87. Epub 2014/05/21.

18. Stumpel DJ, Schneider P, van Roon EH, Pieters R, Stam RW. Absence of global hypomethylation in promoter hypermethylated Mixed Lineage Leukaemia-rearranged infant acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer*. 2013;49:175-84. Epub 2012/08/28.

19. Pombo de Oliveira MS, Koifman S, Vasconcelos GM, Emerenciano M, de Oliveira Novaes C. Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2009;42:121-5. Epub 2008/12/10.
 20. Lima SC, Hernandez-Vargas H, Simao T, Durand G, Krueel CD, Le Calvez-Kelm F, Ribeiro Pinto LF, Herceg Z. Identification of a DNA methylome signature of esophageal squamous cell carcinoma and potential epigenetic biomarkers. *Epigenetics*. 2011;6:1217-27. Epub 2011/09/29.
 21. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:4004-9. Epub 2001/03/29.
 22. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, Morgan G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:12810-5. Epub 1999/10/27.
 23. Weiner AS, Boyarskikh UA, Voronina EN, Mishukova OV, Filipenko ML. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and methionine synthase A2756G polymorphisms influence on leukocyte genomic DNA methylation level. *Gene*. 2014;533:168-72. Epub 2013/10/10.
 24. Farlik M, Halbritter F, Muller F, Choudry FA, Ebert P, Klughammer J, Farrow S, Santoro A, Ciaurro V, Mathur A, Uppal R, Stunnenberg HG, Ouwehand WH, Laurenti E, Lengauer T, Frontini M, Bock C. DNA Methylation Dynamics of Human Hematopoietic Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell*. 2016;19:808-22. Epub 2016/11/22.
- Bujko, M., E. Musialik, et al. (2014). "Repetitive genomic elements and overall DNA methylation changes in acute myeloid and childhood B-cell lymphoblastic leukemia patients." *Int J Hematol***100**(1): 79-87.
- Cheung, H. H., T. L. Lee, et al. (2010). "Genome-wide DNA methylation profiling reveals novel epigenetically regulated genes and non-coding RNAs in human testicular cancer." *Br J Cancer***102**(2): 419-427.
- Chiang, E. P., Y. C. Wang, et al. (2007). "Folate restriction and methylenetetrahydrofolate reductase 677T polymorphism decreases adoMet synthesis via folate-dependent remethylation in human-transformed lymphoblasts." *Leukemia***21**(4): 651-658.
- Figuroa, M. E., S. C. Chen, et al. (2013). "Integrated genetic and epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia." *J Clin Invest***123**(7): 3099-3111.
- Friso, S., S. W. Choi, et al. (2002). "A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status." *Proc Natl Acad Sci U S A***99**(8): 5606-5611.
- Katz, A. J., V. M. Chia, et al. (2015). "Acute lymphoblastic leukemia: an assessment of international incidence, survival, and disease burden." *Cancer Causes Control***26**(11): 1627-1642.
- Moore, C. J., M. Fenech, et al. (2011). "Telomere dynamics: the influence of folate and DNA methylation." *Ann N Y Acad Sci***1229**: 76-88.
- Nordlund, J., C. L. Backlin, et al. (2015). "DNA methylation-based subtype prediction for pediatric acute lymphoblastic leukemia." *Clin Epigenetics***7**: 11.
- Paz, M. F., S. Avila, et al. (2002). "Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors." *Cancer Res***62**(15): 4519-4524.

- Stumpel, D. J., P. Schneider, et al. (2013). "Absence of global hypomethylation in promoter hypermethylated Mixed Lineage Leukaemia-rearranged infant acute lymphoblastic leukaemia." Eur J Cancer**49**(1): 175-184.
- Wang, L., S. Shangguan, et al. (2016). "Determining the association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and genomic DNA methylation level: A meta-analysis." Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**106**(8): 667-674.

ANEXO V

Characterization of paediatric B-cell acute lymphoblastic leukaemia with abnormalities involving chromosome 21 in Brazil

Vieira TMF¹, Schwab C², Fuka G¹, Soares Lima SC³, Harrison CJ², Pombo-de-Oliveira MS^{1*}.

¹Pediatric Haematology-Oncology Program, Research Centre, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.²Leukaemia Research Cytogenetics Group, Wolfson Childhood Cancer Research Centre, Northern Institute for Cancer Research, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, NE1 4LP

Maria S. Pombo-de-Oliveira, MD, PhD, Pediatric Haematology-Oncology Program, Research Center, Instituto Nacional de Câncer - INCA, Rua André Cavalcanti, 37. Rio de Janeiro/RJ – Brazil. Zip code: 20231-050; Phone: +55 21 3207-6606 Fax: +55 21 3207-6505, e-mail: mpombo@inca.gov.br.

Contributions: Vieira TMF has been involved in all steps of this study. The FISH analysis was performed under Schwab C and Harrison CJ supervision, they also provided scientific support during the data interpretation and manuscript review. Fuka G performed the MLPA analysis, he also contributed in the study design as well as during the draft revision, the same as Soares Lima SC.

Leukaemia with abnormalities involving chromosome 21 in Brazil

Running Title: Chromosome 21 aberrations in ALL

ABSTRACT (150 words)

B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) is a heterogeneous disease. Chromosome 21 abnormalities occur in approximately 60% of cases and confer variable outcome. This study aims to identify high hyperdiploid and iAMP21 among BCP-ALL patients with chromosome 21 abnormalities. We selected 373 BCP-ALL cases investigated for chromosome 21 copy number alterations (CNA) using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) and Fluorescence *in situ* hybridization (FISH). The MLPA analysis showed CNA gain in 82/373 (22%), associated with *RUNX1* signals (FISH). Most of these gains were related to extra chromosome 21 in high hyperdiploid (n=53) added to other chromosomal gains: 4 (58%), 10 (57%), 14 (84%), 17 (53%), 18 (60%), X (86%) and Y(46%). Just one case was iAMP21, confirmed by 13/21 centromere and 21q probes. MLPA targeted to chromosome 21, complemented by FISH, using a range of centromeric and locus-specific probes, will accurately discriminate iAMP21-ALL from high hyperdiploid in the absence of karyotype.

Key words: Acute lymphoblastic leukemia, intrachromosomal amplification of chromosome 21, iAMP21.

Funding details. This work was supported by the [Funding Agency 1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency 2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency 3] under Grant [number xxxx].

INTRODUCTION

Paediatric B-cell precursors acute lymphoblastic leukaemia (BCP-ALL) is a heterogeneous disease in terms of demographics, immunophenotype and genetic features. Overall, it has a favourable outcome, with a 5-year event-free survival of around 90%. This excellent result has been achieved in part by risk stratification of patients for treatment according to prognostic criteria, including clinical features (age and white blood cell count), cytogenetics and response to treatment, measured by the level of minimal residual disease (MRD). Chromosomal abnormalities define distinct subgroups of B-ALL of differing prognostic significance. Good risk markers are the translocation $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1$ and high hyperdiploidy (51-65 chromosomes), while markers of poor risk include *KMT2A (MLL)* rearrangements, $t(17;19)(q22;p13)/TCF3-HLF$, near-haploidy low hypodiploidy, $t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1$ and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) (MOORMAN, 2016).

High hyperdiploidy and the *ETV6-RUNX1* fusion are the main recurrent genetic abnormalities, in total accounting for about 50% of B-ALL in children. A common feature of both subtypes is the involvement of chromosome 21. High hyperdiploidy is characterised by the specific gain of chromosome 21 in all cases, as well as frequent gains of chromosomes X, 4, 6, 10, 14, 17 and 18 (HEEREMA *et al.*, 2000; MOORMAN; RICHARDS; MARTINEAU; CHEUNG; ROBINSON; JALALI; BROADFIELD; HARRIS; TAYLOR; GIBSON; HANN; HILL; KINSEY; EDEN; MITCHELL; HARRISON; *et al.*, 2003), while the *ETV6-RUNX1* fusion results from a translocation between chromosomes 12 and 21 (ROMANA *et al.*, 1995). More recently, a rare B-ALL cytogenetic subgroup has been described, defined by an unusual abnormality of chromosome 21, known as iAMP21 (HAREWOOD *et al.*, 2003; ROBINSON *et al.*, 2003b; MOORMAN *et al.*, 2007; ATTARBASCHI *et al.*, 2008; HARRISON; MOORMAN; SCHWAB; CARROLL; RAETZ; DEVIDAS; STREHL; NEBRAL; HARBOTT; TEIGLER-SCHLEGEL; ZIMMERMAN; DASTUGE; BARUCHEL; SOULIER; AUCLERC; ATTARBASCHI; MANN; STARK; CAZZANIGA; CHILTON; VANDENBERGHE; FORESTIER; HALTRICH; RAIMONDI; PARIHAR; BOURQUIN; TCHINDA; HAFERLACH; VORA; HUNGER; HEEREMA; HAAS; *et al.*, 2014; HARRISON, 2015a). The current international definition of iAMP21 is the presence of five or more *RUNX1* signals seen by FISH, with four or more of these signals localised to one abnormal copy of chromosome 21 (HARRISON *et al.*, 2010).

It occurs predominantly in older children and is associated with a high risk of relapse on standard therapy. In the UK childhood ALL treatment trial, UKALL2003, and USA, Children's Oncology Group, COG AALL0331 and AALL0232 clinical trials, respectively, it was independently shown that intensive treatment of iAMP21-ALL patients dramatically reduced their relapse risk and increased their survival (HEEREMA *et al.*, 2013; MOORMAN *et al.*, 2013). Therefore, in order to assign these patients to the appropriate risk group for treatment, their accurate diagnosis is essential. To address this issue, the aim of this study was to identify patients with high hyperdiploidy and iAMP21-ALL among a cohort of B-ALL patients from Brazil, where samples are not routinely available for cytogenetic and FISH, and to develop a workflow suitable for integration into clinical practice.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Patients included in this study were children aged less than 18 years at diagnosis and from different Brazilian regions between 2002 and 2015. Patient cohort consists of children recruited throughout a network of 35 childhood cancer centres located in cities across Brazil, that send samples to the laboratory of Pediatric Hematology-Oncology Program (PHOP) at Rio de Janeiro, Brazil for diagnostic and research purposes (POMBO DE OLIVEIRA *et al.*, 2009). The time-frame from the sampling center and the laboratory (PHOP) varied between 8 to 36 hours, depending upon the distance between them (EMERENCIANO *et al.*, 2011). The referring physicians provided information regarding, sample collected date (bone marrow aspiration and/or peripheral blood) and whether previous medication use. Demography and clinical data also included birth data, sex, white blood cell (WBC) count, percentage of bone marrow blasts, central nervous system (CNS) involvement. Clinical follow-up information were also requested later.

Bcp-ALL characterization was performed by immunophenotype and molecular cytogenetic. Among 1,046 samples of B-ALL, 373 samples without cytogenetic results were selected to study copy number alterations (CNA) involving chromosome 21. Recurrent abnormalities such as *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* and *KMT2A* rearrangements were detected by RT-PCR and/or by FISH and excluded from further CNA involving chromosome 21 study as solely abnormalities.

Data collection and laboratory procedures were evaluated and approved by the

Research Ethics Committee from the National Cancer Institute, Rio de Janeiro (CEP#626.268, approved 28th April, 2014).

Methods.

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

The MLPA SALSA P327 probe kit (MRC Holland, <http://www.mlpa.com>) was used to investigate CNA involving chromosome 21. MLPA and capillary electrophoresis (ABI 3130xl, Life Technologies, Carlsbad, CA), based on amplification product separation, were performed according to manufacturers' instructions. Relative copy numbers of probes were generated after normalization of peaks against healthy controls (DNA extracted from cord blood). MLPA analysis was performed using Gene Marker 2.2.0 software (Soft Genetics LLC, State College, PA). Normal peaks range from 0.75 to 1.3, while peaks lower than 0.75 indicate loss and higher than 1.3 indicate gain. Peak ratios between 1.75 and 2.15 are indicative of two extra copies of a specific region.

Fluorescence in situ Hybridization (FISH)

FISH was performed using the LPH012 TEL/AML1 Translocation, Dual Fusion Probe designed to detect the *ETV6-RUNX1* fusion, according to manufacturer's instructions (Cytocell, Cambridge, UK). Further FISH was carried out on samples with multiple *RUNX1* signals using specific probes for chromosomes 4, 10, 14, 17, 18, X and Y (Supplementary Table 1) to determine high hyperdiploidy. Chromosome 14 copy number was determined using an IGH break apart probe (Cytocell). A centromeric probe targeting both chromosomes 13 and 21 and an additional chromosome 21 sub-telomeric probe were used for verification of iAMP21.

Results.

MLPA testing identified 82/373 samples with copy number gains involving chromosome 21 (MLPA^{pos}), as indicated in Figure 1, whereas 291 samples showed no chromosome 21 copy number changes. The clinical and demographic features of the 82 MLPA^{pos} cases are shown in Table 1. MLPA^{pos} cases were predominantly between 2 to 10 years old and CD10^{pos} (p.0.004; <0.001, respectively).

The workflow chart that highlight the validation of MLPA results and FISH analysis are shown in Figure 1. To validate the MLPA results, FISH, using the TEL/AML1 probe, was carried out in 62 MLPA^{pos} samples with fixed cells available and a variable number of *RUNX1* signals was detected: 3 (n=18), 4 (n=23) and 5 or more signals (n=11). The 11 patients with >5 *RUNX1* signals potentially fulfilled the basic international criteria for iAMP21-ALL.

As conventional karyotypes were not available for most these patients, we performed additional FISH analysis then, to identify additional chromosome gains in hyperdiploidy. Centromeric probes for the most frequently chromosomes gains had used, such as, chromosomes 4, 10, 17, 18, X, and Y. Additionally, the IGH probe for chromosome 14, were performed in 54 MLPA^{pos} samples. The frequency of chromosome gains in each cytogenetic group subtypes varied between patients as shown in Table 2. The addition of chromosome 21 was found in all cases, followed by chromosome X (86%), chromosome 14 (84%), chromosome 18 (60%), chromosome 4 (58%), chromosome 10 (57%) and chromosome 17 (53%). In one patients with *ETV6/RUNX1* addition chromosome 17, chromosome 18, chromosome X and chromosome 21 were found (Figure 2a). High hyperdiploidy was confirmed in 50 patients defined by the gain of more than 3 chromosomes. The patient 1 present only two chromosome gains that was not further explored due to poor viability of the cells preparations. The loss of chromosome 17 in patient 4 and loss of Y chromosomes in patients 1 were also observed. In two patients (# 17 and 18), the gains of chromosome 21 identified by MLPA, were shown to be associated with *ETV6-RUNX1* fusions. The only case with true iAMP21 an additional Chromosome Y and 21q- were also observed.

The MLPA profiles and FISH pattern observed in patients not classified as high hyperdiploidy were further investigated. We observed two different copy number profiles. The first indicated homogenous gain along the entire chromosome 21, with peak ratios between 1.3 and 2.15 in 81 cases (Figure 2b). The second profile showed heterogeneous copy number changes along the length of chromosome 21 (n=1), including normal profile (peak ratio 0.75-1.3), copy number gain of more than two additional copies (peak ratio higher than 2.15) and deletion (peak ratio lower than 0.75). The latter copy number profile is typical of iAMP21 as seen by SNP arrays (LI *et al.*, 2014), including regions with normal CNA profile alongside regions with high level gain and deletion within the chromosome 21 subtelomeric region. Similarly

review of the TEL-AML1 FISH, showed two different signal distribution patterns. In some cases, the extra signals were spread throughout the nucleus, whereas other cases showed an isolated *RUNX1* signal together with a tight cluster of an uncountable number of *RUNX1* signals. This latter pattern is characteristic of iAMP21. One patient showed both a MLPA profile and *RUNX1* signal pattern consistent with iAMP21 (Figure 2b and 2c). This result was further validated using chromosomes 13/21 centromere and chromosome 21 subtelomeric probes, for which four centromere (13/21, green) and one telomere (21q, red) signals, respectively, were observed in Figure 2d. This sample was classified as true iAMP21-ALL. We also tested the 11 samples with 5 or more *RUNX1* signals by FISH (13/21 centromere and chromosome 21 subtelomeric). Between them, in 10/11 patients, the additional *RUNX1* signals were related to additional copies of the chr 21 (Figure 2e and 2f).

Discussion.

Cytogenetic classification in the diagnostic of different BCP-ALL subtypes is a common consensus to the risk stratification (PUI *et al.*, 2011; MOORMAN *et al.*, 2014). With this in mind, recently, Irving *et al.*, have dissected the clinical relevance of chromosomal abnormalities, analysing the cytogenetic profile, CNA and gene mutations that predict relapse in robust cohort of BCP-ALL in a international study. The genomic landscape of the major cytogenetic subtypes is not always correlated with predicted outcome, sustained that a very precise cytogenetic characterization should be performed at the BCP-ALL diagnosis (IRVING *et al.*, 2016). Nevertheless, in the great majority of paediatric centre the algorithm of tests to characterize BCP-ALL relies on conventional cytogenetic and molecular tests either by reverse transcriptase-PCR for the main gene fusion (*ETV6-RUNX1*, *E2A/PBX1*, *MLL-AFF1*, *MLL-MLLT3*, *BCR-ABL1*), or FISH and DNA content index as proxy of diploid by flow cytometry (HOLMFELDT *et al.*, 2013).

In Brazil, cytogenetic analysis in the diagnostic workup of paediatric ALL is not common place, due to the limited availability of samples suitable for metaphase analysis. In our laboratory, we receive samples from different regions of Brazil. Usually, samples take 2 or 3 days in the way from the original hospital to our diagnosis centre. The sample viability can be committed and we have low metaphases ratio. Therefore, the accurate classification of patients into predictive risk groups dependent on additional techniques. RT-PCR testing is routinely performed

for the detection of fusion genes of prognostic significance, including *ETV6-RUNX1* (good risk), *E2A-PBX1* (intermediate) and poor risk groups, *KMT2A-AFF1* and *BCR-ABL1*.

The routine use of FISH for the major fusion genes and hyperdiploid subjects is still very costly in Brazil. However, this approach should be used for the detection of high hyperdiploidy, which is a frequent copy number change associated with good risk, or iAMP21, a rare abnormality associated with poor risk. A common feature of these two cytogenetic subgroups is the involvement of chromosome 21; gain of entire copies and amplification of specific regions of chromosome 21, respectively. It is important to accurately discriminate high hyperdiploidy from iAMP21, as patients with high hyperdiploidy experience good outcomes when treated with standard chemotherapy, whereas patients with iAMP21 show high levels of relapse unless treated intensively.

To accurately identify patients with high hyperdiploidy, we used MLPA and interphase FISH targeted to the chromosomes most commonly gained in this subtype of ALL. As expected the majority of patients with gain of 21 by MLPA were confirmed as having high hyperdiploidy.

In the remaining patients, we exploited the unique copy number profile associated with iAMP21 to identify patients with this ALL subtype. Complex mechanisms of breakage-fusion-bridge cycles followed by chromothripsis, give rise to iAMP21, leading to unequal amplification along the length of chromosome 21 (LI *et al.*, 2014), with the most highly amplified region encompassing the *RUNX1* gene and a characteristic telomeric deletion present in approximately 80% of iAMP21-ALL (ROBINSON *et al.*, 2007; RAND *et al.*, 2011). We plotted the copy number of probes included in the MLPA kit according to their genomic position along the length of chromosome 21. We were able to determine whether all probes were represented at the same copy number level, consistent with gain of a normal copy of chromosome 21, or whether the distribution was heterogeneous, including high levels of gain associated with loss of the subtelomeric region as expected in iAMP21. In cases, with an iAMP21-like profile further FISH was carried out to confirm loss of the 21q telomere. Using this approach, we were able to confidently confirm high hyperdiploidy in 50 patients and iAMP21-ALL in one patient.

Conclusions.

In the absence of a karyotype in B-ALL, *RUNX1* specific FISH may produce similar FISH signal patterns for high hyperdiploidy and iAMP21 leading to

misclassification of their cytogenetic group for risk stratification for treatment. Additional FISH using probes targeted to chromosome 21 centromere and telomere will distinguish additional copies of intact chromosomes 21 from iAMP21. However, in this study we have shown that the MLPA SALSA P327 kit provides reliable discrimination of these two abnormalities from the chromosome 21 copy number profile, without the need for SNP arrays. MLPA^{pos} cases should be verified by FISH, using *RUNX1* specific probes in conjunction with probes chromosomes commonly gained in high hyperdiploidy and the telomere of chromosome 21. Based on this experience, we recommend a simple workflow for diagnosis of high hyperdiploidy and iAMP21-ALL within routine clinical practice (Figure 3).

References.

- ACEVEDO, N. *et al.* Age-associated DNA methylation changes in immune genes, histone modifiers and chromatin remodeling factors within 5 years after birth in human blood leukocytes. **Clin Epigenetics**, v. 7, p. 34, 2015.
- AHN, E. E. *et al.* SON protein regulates GATA-2 through transcriptional control of the microRNA 23a~27a~24-2 cluster. **J Biol Chem**, v. 288, n. 8, p. 5381-8, Feb 22 2013.
- ARRON, J. R. *et al.* NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. **Nature**, v. 441, n. 7093, p. 595-600, Jun 1 2006.
- ATTARBASCHI, A. *et al.* Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukemia: an interphase FISH analysis. **Leukemia**, v. 18, n. 10, p. 1611-6, Oct 2004.
- ATTARBASCHI, A. *et al.* Minimal residual disease values discriminate between low and high relapse risk in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and an intrachromosomal amplification of chromosome 21: the Austrian and German acute lymphoblastic leukemia Berlin-Frankfurt-Munster (ALL-BFM) trials. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 18, p. 3046-50, Jun 20 2008.
- BAKSHI, R. *et al.* The leukemogenic t(8;21) fusion protein AML1-ETO controls rRNA genes and associates with nucleolar-organizing regions at mitotic chromosomes. **J Cell Sci**, v. 121, n. Pt 23, p. 3981-90, Dec 1 2008.
- BAUDAT, F. *et al.* PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 836-40, Feb 12 2010.
- BELL, K. N.; OAKLEY, G. P., JR. Update on prevention of folic acid-preventable spina bifida and anencephaly. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 85, n. 1, p. 102-7, Jan 2009.
- BERCOVICH, D. *et al.* Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. **Lancet**, v. 372, n. 9648, p. 1484-92, Oct 25 2008.
- BERGER, S. H.; PITTMAN, D. L.; WYATT, M. D. Uracil in DNA: consequences for carcinogenesis and chemotherapy. **Biochem Pharmacol**, v. 76, n. 6, p. 697-706, Sep 15 2008.
- BIRGER, Y. *et al.* Perturbation of fetal hematopoiesis in a mouse model of Down syndrome's transient myeloproliferative disorder. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 988-98, Aug 8 2013.
- BIRGER, Y.; IZRAELI, S. DYRK1A in Down syndrome: an oncogene or tumor suppressor? **J Clin Invest**, v. 122, n. 3, p. 807-10, Mar 1 2012.
- BLOUNT, B. C. *et al.* Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 7, p. 3290-5, Apr 1 1997.
- BRANDWEIN, J. M. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. **Curr Oncol Rep**, v. 13, n. 5, p. 371-8, Oct 2011.

- BUITENKAMP, T. D. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. **Blood**, v. 123, n. 1, p. 70-7, Jan 2 2014.
- BUJKO, M. *et al.* Repetitive genomic elements and overall DNA methylation changes in acute myeloid and childhood B-cell lymphoblastic leukemia patients. **Int J Hematol**, v. 100, n. 1, p. 79-87, Jul 2014.
- BURGHARDT, K. J. *et al.* DNA methylation in schizophrenia subjects: gender and MTHFR 677C/T genotype differences. **Epigenomics**, v. 4, n. 3, p. 261-8, Jun 2012.
- BYDŁOWSKI, S. P.; MAGNANELLI, A. C.; CHAMONE DDE, A. [Hyperhomocysteinemia and vaso-occlusive diseases]. **Arq Bras Cardiol**, v. 71, n. 1, p. 69-76, Jul 1998.
- CHEN, D. W. *et al.* Erg and AP-1 as determinants of glucocorticoid response in acute lymphoblastic leukemia. **Oncogene**, v. 32, n. 25, p. 3039-48, Jun 20 2013.
- CHEN, Y. A. *et al.* Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. **Epigenetics**, v. 8, n. 2, p. 203-9, Feb 2013.
- CHEUNG, H. H. *et al.* Genome-wide DNA methylation profiling reveals novel epigenetically regulated genes and non-coding RNAs in human testicular cancer. **Br J Cancer**, v. 102, n. 2, p. 419-27, Jan 19 2010.
- CHIANG, E. P.; WANG, Y. C.; TANG, F. Y. Folate restriction and methylenetetrahydrofolate reductase 677T polymorphism decreases adoMet synthesis via folate-dependent remethylation in human-transformed lymphoblasts. **Leukemia**, v. 21, n. 4, p. 651-8, Apr 2007.
- CHOU, S. T. *et al.* Trisomy 21 enhances human fetal erythro-megakaryocytic development. **Blood**, v. 112, n. 12, p. 4503-6, Dec 1 2008.
- CHRISTENSEN, K. E.; MACKENZIE, R. E. Mitochondrial one-carbon metabolism is adapted to the specific needs of yeast, plants and mammals. **Bioessays**, v. 28, n. 6, p. 595-605, Jun 2006.
- CHUEH, A. C. *et al.* LINE retrotransposon RNA is an essential structural and functional epigenetic component of a core neocentromeric chromatin. **PLoS Genet**, v. 5, n. 1, p. e1000354, Jan 2009.
- 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**, v. 28, n. 1, p. 70-7, Jan 2014.
- COGLIANO, V. J.; BAAN, R.; STRAIF, K. Updating IARC's carcinogenicity assessment of benzene. **Am J Ind Med**, v. 54, n. 2, p. 165-7, Feb 2011.
- CREMER, T.; CREMER, C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. **Nat Rev Genet**, v. 2, n. 4, p. 292-301, Apr 2001.
- CRIDER, K. S. *et al.* Genomic DNA methylation changes in response to folic acid

supplementation in a population-based intervention study among women of reproductive age. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28144, 2011.

DAVIDSSON, J. *et al.* The DNA methylome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. 21, p. 4054-65, Nov 1 2009.

DE JONGE, R. *et al.* Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 113, n. 10, p. 2284-9, Mar 05 2009.

DE SOUZA REIS, R., SR. *et al.* Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. **Pediatr Blood Cancer**, v. 56, n. 1, p. 58-64, Jan 2011.

DOLINOY, D. C.; JIRTLE, R. L. Environmental epigenomics in human health and disease. **Environ Mol Mutagen**, v. 49, n. 1, p. 4-8, Jan 2008.

DUNLAP, B. *et al.* Folic acid and human reproduction-ten important issues for clinicians. **J Exp Clin Assist Reprod**, v. 8, p. 2, 2011.

EMERENCIANO, M. *et al.* Challenges in the use of NG2 antigen as a marker to predict MLL rearrangements in multi-center studies. **Leuk Res**, v. 35, n. 8, p. 1001-7, Aug 2011.

ENSHAELI, A. *et al.* Long-term follow-up of ETV6-RUNX1 ALL reveals that NCI risk, rather than secondary genetic abnormalities, is the key risk factor. **Leukemia**, v. 27, n. 11, p. 2256-9, Nov 2013.

ESCHER, R. *et al.* Two clonal occurrences of tetrasomy 21 in an atypical chronic myeloid leukemia with wild-type RUNX1 alleles. Additional support for a gene dosage effect of chromosome 21 or RUNX1 in leukemia. **Haematologica**, v. 89, n. 8, p. ECR26, Aug 2004.

FAGERBERG, L. *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. **Mol Cell Proteomics**, v. 13, n. 2, p. 397-406, Feb 2014.

FEBER, A. *et al.* Using high-density DNA methylation arrays to profile copy number alterations. **Genome Biol**, v. 15, n. 2, p. R30, Feb 03 2014.

FERREIRA, J. D. *et al.* Pregnancy, maternal tobacco smoking, and early age leukemia in Brazil. **Front Oncol**, v. 2, p. 151, 2012.

FIGUEROA, M. E. *et al.* Integrated genetic and epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Invest**, v. 123, n. 7, p. 3099-111, Jul 2013.

FISHER, D. A. *et al.* Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase. **J Biol Chem**, v. 273, n. 25, p. 15559-64, Jun 19 1998.

FORD, A. M. *et al.* Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 8, p. 4584-8, Apr 14 1998.

FORD, A. M. *et al.* Monoclonal origin of concordant T-cell malignancy in identical twins. **Blood**, v. 89, n. 1, p. 281-5, Jan 1 1997.

FORESTIER, E. *et al.* Cytogenetic patterns in ETV6/RUNX1-positive pediatric B-cell

precursor acute lymphoblastic leukemia: A Nordic series of 245 cases and review of the literature. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 46, n. 5, p. 440-50, May 2007.

FORESTIER, E. *et al.* Cytogenetic features of acute lymphoblastic and myeloid leukemias in pediatric patients with Down syndrome: an iBFM-SG study. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1575-83, Feb 1 2008.

FRISO, S.; CHOI, S. W. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. **J Nutr**, v. 132, n. 8 Suppl, p. 2382S-2387S, Aug 2002.

FRISO, S. *et al.* A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 8, p. 5606-11, Apr 16 2002.

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**, v. 8, p. 35, 2015.

GABRIEL, A. S. *et al.* Epigenetic landscape correlates with genetic subtype but does not predict outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Epigenetics**, v. 10, n. 8, p. 717-26, 2015.

GARCIA, D. R. *et al.* Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) detected by ETV6/RUNX1 FISH screening in childhood acute lymphoblastic leukemia: a case report. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 35, n. 5, p. 369-71, 2013.

GARROW, T. A. *et al.* Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization. **J Biol Chem**, v. 268, n. 16, p. 11910-6, Jun 5 1993.

GE, Y. *et al.* The role of the proto-oncogene ETS2 in acute megakaryocytic leukemia biology and therapy. **Leukemia**, v. 22, n. 3, p. 521-9, Mar 2008.

GIALLOURAKIS, C. C. *et al.* Genome-wide analysis of immune system genes by expressed sequence Tag profiling. **J Immunol**, v. 190, n. 11, p. 5578-87, Jun 01 2013.

GIOVANNUCCI, E. *et al.* Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. **Ann Intern Med**, v. 129, n. 7, p. 517-24, Oct 1 1998.

GLASS, D. C. *et al.* Risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia following parental occupational exposure to pesticides. **Occup Environ Med**, v. 69, n. 11, p. 846-9, Nov 2012.

GREAVES, M. In utero origins of childhood leukaemia. **Early Hum Dev**, v. 81, n. 1, p. 123-9, Jan 2005.

GREAVES, M. F. Aetiology of acute leukaemia. **Lancet**, v. 349, n. 9048, p. 344-9, Feb 1 1997.

_____. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. **Eur J Cancer**, v. 35, n. 14, p. 1941-53, Dec 1999.

GREAVES, M. F. *et al.* Leukemia in twins: lessons in natural history. **Blood**, v. 102, n. 7, p.

2321-33, Oct 1 2003.

GREAVES, M. F.; WIEMELS, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 9, p. 639-49, Sep 2003.

GREENE, N. D.; STANIER, P.; COPP, A. J. Genetics of human neural tube defects. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. R2, p. R113-29, Oct 15 2009.

GRUHN, B. *et al.* Prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia, association with birth weight and hyperdiploidy. **Leukemia**, v. 22, n. 9, p. 1692-7, Sep 2008.

HAJIAN-TILAKI, K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. **Caspian J Intern Med**, v. 4, n. 2, p. 627-35, Spring 2013.

HALSTED, C. H. The intestinal absorption of dietary folates in health and disease. **J Am Coll Nutr**, v. 8, n. 6, p. 650-8, Dec 1989.

HAREWOOD, L. *et al.* Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases. **Leukemia**, v. 17, n. 3, p. 547-53, Mar 2003.

HARRISON, C. J. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 144, n. 2, p. 147-56, Jan 2009.

_____. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. **Blood**, v. 125, n. 9, p. 1383-1386, Feb 26 2015a.

_____. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. **Blood**, v. 125, n. 9, p. 1383-6, Feb 26 2015b.

HARRISON, C. J. *et al.* Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfurt-Munster study group. **Br J Haematol**, v. 151, n. 2, p. 132-42, Oct 2010.

HARRISON, C. J. *et al.* An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. **Leukemia**, v. 28, n. 5, p. 1015-21, May 2014.

HATTORI, M.; FUJIYAMA, A.; SAKAKI, Y. [The DNA sequence of human chromosome 21]. **Tanpakushitsu Kakusan Koso**, v. 46, n. 16 Suppl, p. 2254-61, Dec 2001.

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**, v. 31, n. 27, p. 3397-402, Sep 20 2013.

HEEREMA, N. A. *et al.* Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 46, n. 7, p. 684-93, Jul 2007.

HEEREMA, N. A. *et al.* Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50

chromosomes). **J Clin Oncol**, v. 18, n. 9, p. 1876-87, May 2000.

HOLMFELDT, L. *et al.* The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet**, v. 45, n. 3, p. 242-52, Mar 2013.

HOWARD, G. *et al.* Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. **Oncogene**, v. 27, n. 3, p. 404-8, Jan 10 2008.

HUANG, S.; SHAO, G.; LIU, L. The PR domain of the Rb-binding zinc finger protein RIZ1 is a protein binding interface and is related to the SET domain functioning in chromatin-mediated gene expression. **J Biol Chem**, v. 273, n. 26, p. 15933-9, Jun 26 1998.

HUSSIN, J. *et al.* Rare allelic forms of PRDM9 associated with childhood leukemogenesis. **Genome Res**, v. 23, n. 3, p. 419-30, Mar 2013.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943-55, Jun 01 2013.

INFANTE-RIVARD, C.; WEICHENTHAL, S. Pesticides and childhood cancer: an update of Zahm and Ward's 1998 review. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, v. 10, n. 1-2, p. 81-99, Jan-Mar 2007.

IRVING, J. A. *et al.* Integration of genetic and clinical risk factors improves prognostication in relapsed childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 128, n. 7, p. 911-22, Aug 18 2016.

JAFFE, E. S. *et al.* Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. **Blood**, v. 112, n. 12, p. 4384-99, Dec 01 2008.

JAIR, K. W. *et al.* De novo CpG island methylation in human cancer cells. **Cancer Res**, v. 66, n. 2, p. 682-92, Jan 15 2006.

JAMES, S. J. *et al.* Apoptosis and proliferation under conditions of deoxynucleotide pool imbalance in liver of folate/methyl deficient rats. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 2, p. 287-93, Feb 1997.

JII, H. *et al.* Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. **Nature**, v. 467, n. 7313, p. 338-42, Sep 16 2010.

JOHNSON, K. J. *et al.* Parental age and risk of childhood cancer: a pooled analysis. **Epidemiology**, v. 20, n. 4, p. 475-83, Jul 2009.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 7, p. 484-92, May 29 2012.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 6, p. 415-28, Jun 2002.

KATZ, A. J. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia: an assessment of international incidence, survival, and disease burden. **Cancer Causes Control**, v. 26, n. 11, p. 1627-42, Nov 2015.

KEMPSKI, H. *et al.* Prenatal chromosomal diversification of leukemia in monozygotic twins.

Genes Chromosomes Cancer, v. 37, n. 4, p. 406-11, Aug 2003.

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**, v. 16, n. 21, p. 5339-50, Nov 1 2010.

KIM, Y. I. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. **J Nutr Biochem**, v. 10, n. 2, p. 66-88, Feb 1999.

_____. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 13, n. 4, p. 511-9, Apr 2004.

KNUDSON, A. G., JR. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 68, n. 4, p. 820-3, Apr 1971.

KOIFMAN, S.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. High birth weight as an important risk factor for infant leukemia. **Br J Cancer**, v. 98, n. 3, p. 664-7, Feb 12 2008.

KORBEL, J. O. *et al.* The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 29, p. 12031-6, Jul 21 2009.

KWEE, I. *et al.* Integrated DNA copy number and methylation profiling of lymphoid neoplasms using a single array. **Br J Haematol**, v. 156, n. 3, p. 354-7, Feb 2012.

LEE, J. W. *et al.* Treatment of children with acute lymphoblastic leukemia with risk group based intensification and omission of cranial irradiation: A Korean study of 295 patients. **Pediatr Blood Cancer**, v. 63, n. 11, p. 1966-73, Nov 2016.

LI, Y. *et al.* Constitutional and somatic rearrangement of chromosome 21 in acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 508, n. 7494, p. 98-102, Apr 3 2014.

LIN, D. *et al.* Bright/ARID3A contributes to chromatin accessibility of the immunoglobulin heavy chain enhancer. **Mol Cancer**, v. 6, p. 23, 2007.

LIU, Y. F. *et al.* Genomic Profiling of Adult and Pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **EBioMedicine**, v. 8, p. 173-83, Jun 2016.

LOUGHRAN, S. J. *et al.* The transcription factor Erg is essential for definitive hematopoiesis and the function of adult hematopoietic stem cells. **Nat Immunol**, v. 9, n. 7, p. 810-9, Jul 2008.

LU, Q.; WRIGHT, D. D.; KAMPS, M. P. Fusion with E2A converts the Pbx1 homeodomain protein into a constitutive transcriptional activator in human leukemias carrying the t(1;19) translocation. **Mol Cell Biol**, v. 14, n. 6, p. 3938-48, Jun 1994.

LUO, Y.; LU, X.; XIE, H. Dynamic Alu methylation during normal development, aging, and tumorigenesis. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 784706, 2014.

MAIA, A. T. *et al.* Identification of preleukemic precursors of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in cord blood. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 40, n. 1, p. 38-43, May 2004.

- MAIA, A. T. *et al.* Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins. **Leukemia**, v. 17, n. 11, p. 2202-6, Nov 2003.
- MEDICI, V.; HALSTED, C. H. Folate, alcohol, and liver disease. **Mol Nutr Food Res**, v. 57, n. 4, p. 596-606, Apr 2013.
- MEINERT, R. *et al.* Leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in childhood and exposure to pesticides: results of a register-based case-control study in Germany. **Am J Epidemiol**, v. 151, n. 7, p. 639-46; discussion 647-50, Apr 1 2000.
- METAYER, C.; BUFFLER, P. A. Residential exposures to pesticides and childhood leukaemia. **Radiat Prot Dosimetry**, v. 132, n. 2, p. 212-9, 2008.
- METAYER, C. *et al.* Genetic variants in the folate pathway and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Causes Control**, v. 22, n. 9, p. 1243-58, Sep 2011.
- MICHAUD, J.; SCOTT, H. S.; ESCHER, R. AML1 interconnected pathways of leukemogenesis. **Cancer Invest**, v. 21, n. 1, p. 105-36, 2003.
- MOORES, C. J.; FENECH, M.; O'CALLAGHAN, N. J. Telomere dynamics: the influence of folate and DNA methylation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1229, p. 76-88, Jul 2011.
- MOORMAN, A. V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 101, n. 4, p. 407-16, Apr 2016.
- MOORMAN, A. V. *et al.* A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 124, n. 9, p. 1434-44, Aug 28 2014.
- MOORMAN, A. V. *et al.* Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 102, n. 8, p. 2756-62, Oct 15 2003.
- MOORMAN, A. V. *et al.* Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 102, n. 8, p. 2756-62, Oct 15 2003.
- MOORMAN, A. V. *et al.* Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). **Blood**, v. 109, n. 6, p. 2327-30, Mar 15 2007.
- MOORMAN, A. V. *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**, v. 31, n. 27, p. 3389-96, Sep 20 2013.
- MOORMAN, A. V. *et al.* IGH@ translocations, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 25, p. 3100-8, Sep 01 2012.
- MORI, H. *et al.* Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 12, p. 8242-7, Jun 11 2002.

MORRIS, T. J. *et al.* ChAMP: 450k Chip Analysis Methylation Pipeline. **Bioinformatics**, v. 30, n. 3, p. 428-30, Feb 01 2014.

MOYERS, S.; BAILEY, L. B. Fetal malformations and folate metabolism: review of recent evidence. **Nutr Rev**, v. 59, n. 7, p. 215-24, Jul 2001.

MULLIGHAN, C. G. *et al.* Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet**, v. 41, n. 11, p. 1243-6, Nov 2009.

NARAYANAN, S. *et al.* Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes in vivo. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 13, n. 9, p. 1436-43, Sep 2004.

NIZETIC, D.; GROET, J. Tumorigenesis in Down's syndrome: big lessons from a small chromosome. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 10, p. 721-32, Oct 2012.

NORDLUND, J. *et al.* DNA methylation-based subtype prediction for pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Clin Epigenetics**, v. 7, p. 11, 2015a.

_____. DNA methylation-based subtype prediction for pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Clin Epigenetics**, v. 7, n. 1, p. 11, 2015b.

ONGARO, A. *et al.* Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival. **Haematologica**, v. 94, n. 10, p. 1391-8, Oct 2009.

PANZER-GRUMAYER, E. R. *et al.* Nondisjunction of chromosomes leading to hyperdiploid childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is an early event during leukemogenesis. **Blood**, v. 100, n. 1, p. 347-9, Jul 01 2002.

PAZ, M. F. *et al.* Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. **Cancer Res**, v. 62, n. 15, p. 4519-24, Aug 01 2002.

PEREIRA, T. V. *et al.* 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia risk: a meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 15, n. 10, p. 1956-63, Oct 2006.

PERERA, F. P. Environment and cancer: who are susceptible? **Science**, v. 278, n. 5340, p. 1068-73, Nov 7 1997.

PETER, A. *et al.* Interphase FISH on TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemia relapses--analysis of clinical relevance of additional TEL and AML1 copy number changes. **Eur J Haematol**, v. 83, n. 5, p. 420-32, Nov 2009.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S.; KOIFMAN, S. Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 15, n. 12, p. 2336-41, Dec 2006.

- POMBO DE OLIVEIRA, M. S. *et al.* Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. **Blood Cells Mol Dis**, v. 42, n. 2, p. 121-5, Mar-Apr 2009.
- PUI, C. H. Acute lymphoblastic leukemia: introduction. **Semin Hematol**, v. 46, n. 1, p. 1-2, Jan 2009.
- PUI, C. H. *et al.* Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 5, p. 551-65, Feb 10 2011.
- PUI, C. H.; EVANS, W. E. Acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 339, n. 9, p. 605-15, Aug 27 1998.
- PUI, C. H. *et al.* Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? **Blood**, v. 120, n. 6, p. 1165-74, Aug 9 2012.
- PUI, C. H. *et al.* Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 118-45, 2004.
- PUISSEGUR, M. P. *et al.* B-cell regulator of immunoglobulin heavy-chain transcription (Bright)/ARID3a is a direct target of the oncomir microRNA-125b in progenitor B-cells. **Leukemia**, v. 26, n. 10, p. 2224-32, Oct 2012.
- PYATT, D.; HAYS, S. A review of the potential association between childhood leukemia and benzene. **Chem Biol Interact**, v. 184, n. 1-2, p. 151-64, Mar 19 2010.
- RAND, V. *et al.* Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 117, n. 25, p. 6848-55, Jun 23 2011.
- ROBERTSON, K. D. DNA methylation and human disease. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 8, p. 597-610, Aug 2005.
- ROBINSON, H. M. *et al.* Amplification of AML1 in acute lymphoblastic leukemia is associated with a poor outcome. **Leukemia**, v. 17, n. 11, p. 2249-50, Nov 2003a.
- _____. Amplification of AML1 in acute lymphoblastic leukemia is associated with a poor outcome. **Leukemia**, v. 17, n. 11, p. 2249-2250, 2003b.
- ROBINSON, H. M. *et al.* Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) may arise from a breakage-fusion-bridge cycle. **Genes Chromosomes.Cancer**, v. 46, n. 4, p. 318-326, 2007.
- RODIC, N.; BURNS, K. H. Long interspersed element-1 (LINE-1): passenger or driver in human neoplasms? **PLoS Genet**, v. 9, n. 3, p. e1003402, Mar 2013.
- ROMANA, S. P. *et al.* The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. **Blood**, v. 85, p. 3662-3670, 1995.
- ROSS, J. A. Birth weight and childhood leukemia: time to tackle bigger lessons. **Pediatr Blood Cancer**, v. 58, n. 1, p. 1-2, Jan 2012.

- ROSS, J. A. *et al.* Epidemiology of childhood leukemia, with a focus on infants. **Epidemiol Rev**, v. 16, n. 2, p. 243-72, 1994.
- SAWAN, C. *et al.* Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. **Mutat Res**, v. 642, n. 1-2, p. 1-13, Jul 3 2008.
- SCÉLO, G. *et al.* Household exposure to paint and petroleum solvents, chromosomal translocations, and the risk of childhood leukemia. **Environ Health Perspect**, v. 117, n. 1, p. 133, 2009.
- SCHAFER, E. *et al.* Promoter hypermethylation in MLL-r infant acute lymphoblastic leukemia: biology and therapeutic targeting. **Blood**, v. 115, n. 23, p. 4798-809, Jun 10 2010.
- SEILER, R. Physical setting and natural sources of exposure to carcinogenic trace elements and radionuclides in Lahontan Valley, Nevada. **Chem Biol Interact**, v. 196, n. 3, p. 79-86, Apr 5 2012.
- SELHUB, J.; MILLER, J. W. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. **Am J Clin Nutr**, v. 55, n. 1, p. 131-8, Jan 1992.
- SHERBORNE, A. L. *et al.* Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. **Nat Genet**, v. 42, n. 6, p. 492-4, Jun 2010.
- SHIBUYA, K. *et al.* Identification of a novel zinc finger protein gene (ZNF298) in the GAP2 of human chromosome 21q. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 332, n. 2, p. 557-68, Jul 01 2005.
- SINCLAIR, P. B. *et al.* Analysis of a breakpoint cluster reveals insight into the mechanism of intrachromosomal amplification in a lymphoid malignancy. **Hum Mol Genet**, v. 20, n. 13, p. 2591-602, Jul 01 2011.
- SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 3-4, p. 375-83, Aug 2000.
- SMITH, M. *et al.* Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 1, p. 18-24, Jan 1996.
- STREFFORD, J. C. *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**, v. 103, n. 21, p. 8167-72, May 23 2006.
- STUMPEL, D. J. *et al.* Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, influences clinical outcome, and provides therapeutic options. **Blood**, v. 114, n. 27, p. 5490-8, Dec 24 2009.
- STUMPEL, D. J. *et al.* Absence of global hypomethylation in promoter hypermethylated Mixed Lineage Leukaemia-rearranged infant acute lymphoblastic leukaemia. **Eur J Cancer**, v. 49, n. 1, p. 175-84, Jan 2013.
- TAUB, J. W. *et al.* High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 99, n. 8, p. 2992-6, Apr

15 2002.

TAYLOR, G. M. *et al.* Correspondence re: R. Varon et al., Mutations in the Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.*, 61: 3570-3572, 2001. **Cancer Res**, v. 63, n. 19, p. 6563-4; author reply 6565, Oct 1 2003.

TAYLOR, K. H. *et al.* Ultradeep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by 454 sequencing. **Cancer Res**, v. 67, n. 18, p. 8511-8, Sep 15 2007.

TEUFFEL, O. *et al.* Prenatal origin of separate evolution of leukemia in identical twins. **Leukemia**, v. 18, n. 10, p. 1624-9, Oct 2004.

THOMPSON, J. R. *et al.* Maternal folate supplementation in pregnancy and protection against acute lymphoblastic leukaemia in childhood: a case-control study. **Lancet**, v. 358, n. 9297, p. 1935-40, Dec 8 2001.

TURNER, M. C.; WIGLE, D. T.; KREWSKI, D. Residential pesticides and childhood leukemia: a systematic review and meta-analysis. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 1, p. 33-41, Jan 2010.

U, M. *et al.* Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor. **Leukemia**, v. 18, n. 11, p. 1850-6, Nov 2004.

URAYAMA, K. Y. *et al.* Current evidence for an inherited genetic basis of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Int J Hematol**, v. 97, n. 1, p. 3-19, Jan 2013.

VAN MAELE-FABRY, G. *et al.* Residential exposure to pesticides and childhood leukaemia: a systematic review and meta-analysis. **Environ Int**, v. 37, n. 1, p. 280-91, Jan 2011.

VANHEES, K. *et al.* Prenatal exposure to flavonoids: implication for cancer risk. **Toxicol Sci**, v. 120, n. 1, p. 59-67, Mar 2011.

VERTINO, P. M. *et al.* De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 8, p. 4555-65, Aug 1996.

VIEIRA, T. M. F. O papel dos polimorfismos nos genes RFC1, MTHFR, e SHMT1 na susceptibilidade e sobrevida das LLAs da primeira infância. p. 116, 26/03q2013 2013.

VIJAYAKRISHNAN, J.; HOULSTON, R. S. Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. **Haematologica**, v. 95, n. 8, p. 1405-14, Aug 2010.

VYAS, P.; CRISPINO, J. D. Molecular insights into Down syndrome-associated leukemia. **Curr Opin Pediatr**, v. 19, n. 1, p. 9-14, Feb 2007.

WALSH, C. P.; XU, G. L. Cytosine methylation and DNA repair. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 301, p. 283-315, 2006.

WANG, L. *et al.* Determining the association between methylenetetrahydrofolate reductase

- (MTHFR) gene polymorphisms and genomic DNA methylation level: A meta-analysis. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 106, n. 8, p. 667-74, Aug 2016.
- WEBB, C. F. *et al.* The ARID family transcription factor bright is required for both hematopoietic stem cell and B lineage development. **Mol Cell Biol**, v. 31, n. 5, p. 1041-53, Mar 2011.
- WECHSLER, J. *et al.* Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. **Nat Genet**, v. 32, n. 1, p. 148-52, Sep 2002.
- WIEMELS, J. L. Perspectives on the causes of childhood leukemia. **Chem Biol Interact**, v. 196, n. 3, p. 59-67, Apr 5 2012.
- WIEMELS, J. L. *et al.* Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. **Blood**, v. 94, n. 3, p. 1057-62, Aug 1 1999.
- WIEMELS, J. L. *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 7, p. 4004-9, Mar 27 2001.
- WOODWARD, E. L. *et al.* Allelic variants of PRDM9 associated with high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 166, n. 6, p. 947-9, Sep 2014.
- XU, G. *et al.* Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. **Blood**, v. 102, n. 8, p. 2960-8, Oct 15 2003.
- XU, X. *et al.* The advantage of using SNP array in clinical testing for hematological malignancies--a comparative study of three genetic testing methods. **Cancer Genet**, v. 206, n. 9-10, p. 317-26, Sep-Oct 2013.
- YAMAMOTO, H. *et al.* Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2. **Genes Dev**, v. 12, n. 9, p. 1315-26, May 01 1998.
- YAN, J. *et al.* A meta-analysis of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and risk of acute lymphoblastic leukemia in children. **Pediatr Blood Cancer**, v. 58, n. 4, p. 513-8, Apr 2012.
- YODER, J. A.; WALSH, C. P.; BESTOR, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends Genet**, v. 13, n. 8, p. 335-40, Aug 1997.
- ZAZA, G. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion has lower expression of genes involved in purine metabolism and lower de novo purine synthesis. **Blood**, v. 104, n. 5, p. 1435-41, Sep 1 2004.
- ZHANG, Y. *et al.* Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in human cancer. **J Biol Chem**, v. 287, n. 39, p. 32494-511, Sep 21 2012.
- ZIPURSKY, A. Susceptibility to leukemia and resistance to solid tumors in Down syndrome. **Pediatr Res**, v. 47, n. 6, p. 704, Jun 2000.

Table 1: Demography and clinical features of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, Brazil, 2002-2015

Characteristics	Positive MLPA n (%)	Negative MLPA n (%)	P value
Total	82 (23)	291 (79)	
Sex			
Males	45 (55)	164 (56)	
Females	37 (45)	127 (44)	0.899
Age (ys)			
≤1	4 (5)	34 (12)	
2-10	66 (80)	177 (61)	
>10	12 (15)	80 (27)	0.004**
Ethnicity			
Whites	42 (51)	117 (43)	
Non -Whites	39 (49)	157 (57)	0.146
WBC, x10 ⁹ /l			
<50	59 (74)	198 (69)	
>50	21 (26)	88 (31)	0.491
Immunophenotype			
CD10 -	0 (0)	29 (10)	
CD10 +	82 (100)	262 (90)	<0.001***
NCI Risk group			
Standard risk	47 (57)	139 (48)	
High risk	35 (43)	152 (52)	0.135
Status			
Alive	26 (79)	28 (65)	
Dead	7 (21)	15 (35)	0.214

Abbreviation: n, number; ys, years; WBC, white blood cell count x10⁹/l; NCI, National Cancer Institute; **, p<0.05; ***, p<0,001.

Table 2: The frequency of chromosome gains according to FISH analysis

Chromosome gain	Hyperdiploid n (%)	<i>ETV6/RUNX1</i> n (%)	iAMP21 n (%)
Chr 4	28/48 (58)	--	--
Chr 10	27/47 (57)	--	--
Chr 14	42/50 (84)	--	--
Chr 17	23/43 (53)	1/2 (50)	--
Chr 18	28/47 (60)	1/2 (50)	--
Chr 21	49/49 (100)	2/2 (100)	--
Chr X	43/50 (86)	1/2 (50)	--
Chr Y	11/24 (46)	--	1/1 (100)

Abbreviation: n, number; Chr, chromosome.

Supplementary Table 1. The description of commercial FISH probes

Chromosome	Probe	Manufature	Cat n.
4	4q sub-telomere	Appligene	
10	CEP 10	Cytocell	LPE010G
14	IGH Breakapart	Cytocell	LPH 014-A
17	CEP 17	Cytocell	LPE017R
18	CEP 18	Cytocell	LPE018R
21	TEL/AML1 Translocation	Cytocell	LPH012
13/21	CEP 13/21	Cytocell	LPE013G
21	Subtelomere 21q	Cytocell	LPT21QR
X	CEP X	Cytocell	LPE0XG
Y	CEP y	Cytocell	LPE0YcR

Abbreviation: CEP, centromeric probes.

Figure 1: Flowchart of analysis of the B-ALL samples included in the study.

Figure 2: Illustration of the pattern of copy number gains along the chromosome 21 by MLPA and profile of FISH analysis with *TEL-AML1*, centromeric and telomeric probes.

a. Heat map plotting the FISH results from the telomeric probes depicted by color-coded squares. b. Screen shots of the graphics for chromosome 21 by the MLPA.

The iAMP21 sample characterized by variable copy number, including one portion with a normal CNA profile followed by one region with high level amplification (peak >2.13) involving *RUNX1* gene and deletion in the subtelomere region. c. Interphase FISH depicting the normal two copies of *ETV6* (red) and seven copies of *RUNX1*

(green) signals in an iAMP21 sample. d. Interphasic FISH showing 4 centromere signals (Chr 13/21-green) and one telomere signal (21q-red) in one iAMP21 patient.

c. Interphasic FISH showing 6 centromere signals (Chr 13/21-green) and 4 telomere signal (21q-red) in one high hyperdiploid patient. d. One more example of high hyperdiploid patient with 4 chr 21 copies.

Figure 3: Workflow of tests to identify iAMP21. B-ALL in absence of cytogenetic result tested by MLPA. MLPA positive samples confirmed by FISH (*RUNX1* probe).

Samples with ≥ 5 *RUNX1* signals evaluated by centromere/telomere FISH.