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

AMANDA FARIA DE FIGUEIREDO

ESTUDO DO PERFIL CITOGENÉTICO E DE EXPRESSÃO DE GENES DO COMPLEXO *POLYCOMB* NA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA DA INFÂNCIA

Orientador (es): Prof. Dra. Eliana Abdelhay
Prof. Dra. Maria Luiza M Silva

RIO DE JANEIRO
2014

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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

AMANDA FARIA DE FIGUEIREDO

ESTUDO DO PERFIL CITOGENÉTICO E DE EXPRESSÃO DOS GENES DO COMPLEXO *POLYCOMB* NA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA DA INFÂNCIA

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

Orientador (es): Prof. Dra. Eliana Abdelhay
Prof. Dra. Maria Luiza Macedo Silva

RIO DE JANEIRO
2014

F475e Figueiredo, Amanda Faria de.

Estudo do perfil citogenético e de expressão dos genes do complexo Polycomb na leucemia mielóide aguda da infância. / Amanda Faria de Figueiredo. - Rio de Janeiro: INCA, 2014.

xxi,156 f.: il.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2014.

Orientadores: Eliana Abdelhay e Maria Lucia Macedo Silva.

1. Leucemia Mieloide Aguda – genética. 2. Proteínas Repressoras. 3. Análise Citogenética. 4. Criança. 5. Adolescente. I. Abdelhay, Eliana (orient.). II. Silva, Maria Lucia Macedo (orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99419

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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

AUTOR: AMANDA FARIA DE FIGUEIREDO

ESTUDO DO PERFIL CITOGENÉTICO E DE EXPRESSÃO DOS GENES DO COMPLEXO *POLYCOMB* NA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA DA INFÂNCIA

ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Eliana Abdelhay
Prof. Dra. Maria Luiza Macedo Silva

Aprovada em: _____/_____/_____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Fernando Regla Vargas
Prof. Dra. Claudia Esther Rocio Hassan
Prof. Dr. Andre Luiz Mencalha
Prof. Dra. Elaine Costa Sobral
Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira
Prof. Dra. Tatiana de Almeida Simão

RIO DE JANEIRO
2014

À minha família, ao meu noivo e ao meu avô *in memoriam*.
Dedico.

Agradecimentos

-Primeiramente, a **Deus** por me dar a oportunidade de realizar este sonho, finalizando mais uma etapa em minha vida! E sabendo que Ele esteve e estará sempre junto de mim, onde eu estiver.

- A minha orientadora **Dra. Maria Luiza** por aceitar mais este desafio ao meu lado me incentivando e acreditando em mim sempre! Muito Obrigada!

-A minha orientadora **Dra. Eliana Abdelhay** pelo apoio e incentivo na carreira acadêmica!

-À minha querida e admirada **mãe** pelo enorme incentivo, confiança, carinho e amor que sempre me deu desde o momento em que eu ainda estava em seu ventre! Pelas sempre presentes demonstrações de amor durante os dias mais difíceis, que não foram poucos, destes quatro anos que se passaram! Te amo, mãe!

-À minha querida **avó** pelo incentivo e pelo carinho, não deixando que eu desanimasse nunca! Sempre me fazendo acreditar que quando queremos muito algo, nosso limite somos nós mesmos!

- Ao meu **avô**, *in memoriam,* por ser na verdade um pai para mim. E onde você estiver, **vô**, estará vendo, com extremo orgulho, que estou completando mais uma etapa importante em minha vida!

-À minha **família**: tios, tias, primos, primas e agregados por sempre depositarem em mim confiança e pelos momentos de conversa que me fortaleceram bastante.

- Ao meu **noivo,** por acreditar junto comigo neste meu sonho! Por me incentivar na carreira acadêmica e por ter ultrapassado os obstáculos destes quatro anos junto comigo! Muito Obrigada! Te amo!

- A toda a **equipe** da **Dra. Maria Luiza**, muito obrigada! **Luana, Deborah, Daniela, Mariana, Roberto e Thiago** por vocês terem me proporcionado momentos inesquecíveis de aprendizado! Cada um de vocês tem um lugar especial em meu coração!

- As minhas amigas de faculdade **Amanda Santos, Carla Gabriela, Fernanda, Lívia e Karen** por me incentivar mesmo quando não entendiam o porquê de tanto trabalho! A **Karen** em especial por estar sempre presente com as palavras mais doces nos momentos mais difíceis!

-- A minha amiga do Inca, **Amanda Maia**, pelos puxões de orelha nos momentos mais oportunos e pelas palavras amigas!

- A **Ana Maria** pelo incentivo, pelas conversas de domingo não me deixando esmorecer nunca! Muito obrigada!

- A **Dra. Terezinha e Eliane**, pelo debate dos casos e ajuda com os alguns experimentos.

- A **Dra. Bethânia**, pelas palavras carinhosas e pela disposição em me ajudar sempre que eu precisava.

-À **Dra. Hasmik**, pelos ensinamentos de bancada durante os experimentos de MCB.

-Ao **Dr. Thomas Liehr**, por me receber em seu laboratório para a realização de alguns experimentos e por se mostrar tão acessível quando mais precisei!

-Ao **Dr. Raul Ribeiro** por acreditar em mim, por me incentivar e por servir de exemplo para toda a minha vida!

- Aos **médicos** colaboradores, mas principalmente, aos **pacientes** que foram o objetivo maior deste estudo.

- As **agências de fomento**, principalmente a **CAPES** (projeto número 419/14) por conceder a minha bolsa de doutorado sanduíche.

O caráter é mais importante do que a inteligência,
E o coração tem precedência sobre a cabeça.
Denis Person Burkitt

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

ESTUDO DO PERFIL CITOGENÉTICO E DE EXPRESSÃO DOS GENES DO COMPLEXO POLYCOMB NA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA DA INFANCIA

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Amanda Faria de Figueiredo

A LMA é uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação anormal de precursores mielóides na medula óssea decorrente de uma parada no processo de diferenciação destas células. A etiologia da leucemia ainda é desconhecida, mas alguns fatores, incluindo a presença de translocações cromossômicas podem contribuir para o aparecimento desta neoplasia.Três subgrupos de alterações genéticas vêm sendo definidos nos últimos anos como os de maior freqüência em LMA primária da criança. O grupo que envolve rearranjos do gene *CBF* (*core binding factor*): t(8;21)(q22;q22) e inv(16)(p13;q22); as leucemias associadas a alterações no gene *MLL* (anormalidades da região 11q23); e as leucemias associadas ao rearranjo *PML-RAR*α: t(15;17)(q22;q12). Apesar de todo o conhecimento já acumulado sobre as bases moleculares dos processos leucemogênicos da LMA, alterações em reguladores epigenéticos vem ganhando destaque na patologia da leucemia. Neste contexto, os genes pertencentes ao complexo Gênico Polycomb (PcG) estão associados ao silenciamento epigenético durante o desenvolvimento embrionário e durante a carcinogênese de diversos tumores, incluindo a leucemia mielóide aguda (LMA). Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar uma análise citogenética e de expressão dos genes do complexo PcG em crianças diagnosticadas com LMA para contribuir para o entendimento da biologia desta neoplasia tão heterogênea. As amostras de medula óssea de 84 pacientes foram tratadas de acordo com os protocolos padrões e, as técnicas de citogenética, envolvendo técnicas moleculares foram realizadas, sendo possível evidenciar uma alta taxa de anormalidades cromossômicas de 89%. Além disso, uma alta taxa da t(15;17)(q22;q12) pode ser observada, assim como, várias alterações não-recorrentes puderam ser identificadas, já que várias técnicas de citogenética molecular de alta resolução foram utilizadas. Dos 84 pacientes, 52 pacientes foram avaliados quanto ao perfil de expressão de alguns dos genes PcG, utilizando a metodologia de PCR em tempo real (RT-qPCR). Com isso, foi possível observar altos níveis relativos de mRNA dos genes PcG nos pacientes quando comparados com os doadores saudáveis. Quando foram comparados os níveis de expressão destes genes de acordo com os subtipos morfológicos, o subtipo LMA-M3 apresentou os níveis mais aumentados, principalmente nos pacientes menores de 8 anos de idade. Com relação aos dados clínicos, apesar da grande variação, a LMA apresentou altos níveis de mRNA dos genes PcG em pacientes com mais de 50.000 leucócitos e a LMA-M3 apresentou níveis aumentados de mRNA destes genes nos pacientes com baixa contagem de plaquetas. Com isso, podemos concluir que apesar da variação nos níveis de mRNA dos genes PcG estudados na LMA, foi possível observar uma correlação destes níveis com os dados clínicos dos pacientes, como os subtipos morfológicos, com a idade, contagem leucocitária e plaquetas na LMA-M3.

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

CYTOGENETICS AND POLYCOMB GENE EXPRESSION PROFILES STUDY IN CHILDHOOD ACUTE MYELOID LEUKEMIA

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Amanda Faria de Figueiredo

AML is a hematologic malignancy characterized by the abnormal proliferation of myeloid precursors in the bone marrow due to an arrest of differentiation process of these cells. The etiology of leukemia is unknown, but some factors, including the presence of chromosomal translocations may contribute to the emergence of this neoplasia. Three subgroups of genetic alterations have been defined in recent years as the most frequent in primary childhood AML. The group involving core binding factor gene rearrangements: t(8;21)(q22; q22), and inv(16)(p13;q22); leukemias associated with alterations in the *MLL* gene (11q23 abnormalities in the region); leukemias associated with PML-RARa rearrangement: t(15;17)(q22;q12). Despite all the knowledge already accumulated regarding the molecular basis of AML leukemogenic processes, changes in epigenetic regulators have been gaining attention in the pathology of leukemia. In this context, the Polycomb Complex genes (PcG) are associated with epigenetic silencing during embryonic development and during carcinogenesis of several tumors, including acute myeloid leukemia (AML). Therefore, the aim of this study was to evaluate a cytogenetic and PcG genes expression profiles in children diagnosed with AML to contribute to the understanding of the biology of this heterogeneous tumor. The bone marrow samples of 84 patients were treated according to standard protocols, and the cytogenetic analysis involving molecular techniques were performed, and were able to demonstrate a high rate of chromosomal abnormalities in 89% of cases. In addition, a high rate of t(15;17)(q22;q12) may be observed, as well as several non -recurring changes could be identified, since several high resolution molecular cytogenetic techniques were used. From the 84 patients' samples, 52 were evaluated for the expression of some of the PcG genes profile, using the real-time PCR methodology. Thus, it was possible to observe mRNA high relative levels of PcG genes in patients compared with healthy donors. When the expression levels of these genes according to the morphological subtypes were compared, AML-M3 subtype showed the most increased levels, mainly in children under the age of 8. Regarding clinical data, despite the wide variation AML showed high mRNA levels of PcG genes in patients with more than 50,000 leukocytes and AML - M3 showed increased mRNA levels of these genes in patients with low platelet counts. Thus, we conclude that despite the variation in mRNA levels of PcG genes studied in AML, we observed a correlation of these levels with clinical patient data, such as morphological subtypes, with age, white blood count and platelets in AML - M3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	*Esquema simplificado da diferenciação das células hematopoiéticas e as possíveis linhagens correspondentes aos subtipos FAB das leucemias mielóide*	*4*
Figura 1.2	*Comparação das técnicas de citogenética para a identificação de anormalidades*	*11*
Figura 1.3	*Identificação de alterações cromossômicas utilizando técnicas de citogenética molecular e alterações genômicas utilizando técnicas moleculares*	*14*
Figura 1.4	*Desenvolvimento da leucemia como um processo multistep.*	*19*
Figura 1.5	*Modelo da estrutura do epigenoma de células humanas normais*	*26*
Figura 1.6	*Modelo de silenciamento Gênico mediado pelo Complexo Polycomb*	*27*
Figura 1.7	*Os diferentes componentes dos 4 complexos Polycomb de silenciamento gênico*	*28*
Figura 1.8	*Mudanças na cromatina geradas pelos genes do Complexo Polycomb na promoção da diferenciação hematopoiética*	*29*
Figura 1.9	*Diferentes componentes dos complexos Polycomb em diferentes tipos de cânceres*	*30*
Figura 4.1	*Frequência dos subtipos morfológicos FAB encontrados neste estudo*	*41*
Figura 4.2	*Distribuição dos subtipos FAB nas diferentes faixas etárias encontradas neste estudo*	*43*
Figura 4.3	*Comparação das frequências de cariótipos normais e anormais e das frequências das anormalidades recorrentes e não recorrentes*	*44*
Figura 4.4	*Hibridização in situ por fluorescência ilustrando o rearranjo gênico PML/RARA em uma metáfase*	*45*
Figura 4.5	*MCB do cromossomo 6,mostrando uma alteração cromossômica do tipo inversão*	*48*
Figura 4.6	*Utilização de BACs para caracterização dos exatos pontos de quebra da deleção encontrada no cromossomo 6 em um segundo clone do paciente 58.*	*49*
Figura 4.7	*Perfil das alterações cromossômicas encontradas neste estudo da LMA da Infância.*	*53*
Figura 4.8	*Associação das anormalidades citogenéticas nas diferentes faixas etárias*	*54*
Figura 4.9	*Níveis de expressão dos mRNAs dos genes YY1 e BMI1 na LMA*	*58*
Figura 4.10	*Níveis de expressão dos mRNAs dos genes SUZ12 e EZH2 na LMA*	*58*
Figura 4.11	*Níveis de expressão dos mRNAs dos genes YY1 e BMI1 na LPA*	*59*
Figura 4.12	*Níveis de expressão dos mRNAs dos genes SUZ12 e EZH2 na LPA*	*59*
Figura 4.13	*Níveis de expressão dos mRNAs dos genes YY1 e BMI1 nos subtipos morfológicos*	*60*
Figura 4.14	*Níveis expressão dos mRNAs dos genes SUZ12 e EZH2 nos subtipos morfológicos da LMA*	*61*
Figura 4.15	*Perfil de expressão de genes do complexo PRC1 nos diferentes subgrupos citogenéticos*	*62*
Figura 4.16	*Perfil de expressão dos genes do complexo PRC2 nos diferentes subgrupos citogenéticos*	*63*
Figura 4.17	*Perfil de expressão dos mRNAs dos genes do PRC1 na LMA em dois grupos de idade*	*64*

Figura 4.18	*Perfil de expressão dos genes do PRC2 na LMA em dois grupos de idade*	*64*
Figura 4.19	*Perfil de expressão dos mRNAs dos genes YY1 e BMI1 na LPA em diferentes faixas etárias*	*65*
Figura 4.20	*Perfil de expressão dos mRNAs dos genes SUZ12 e EZH2 na LPA em diferentes faixas etárias*	*66*
Figura 4.21	*Perfil de expressão dos mRNAs do complexo PRC1 na LMA de acordo com a leucometria no momento do diagnóstico*	*67*
Figura 4.22	*Perfil de expressão dos mRNAs dos genes PRC2 na LMA de acordo com a leucometria no momento do diagnóstico*	*67*
Figura 4.23	*Perfil de expressão dos genes do PRC1 na LPA de acordo com a leucometria no momento do diagnóstico*	*68*
Figura 4.24	*Perfil de expressão dos genes do PRC2 na LPA de acordo com a leucometria no momento do diagnóstico*	*69*
Figura 4.25	*Perfil de expressão dos genes PRC1 na LMA em dois grupos de contagem plaquetária diferentes*	*69*
Figura 4.26	*Perfil de expressão dos genes do PRC2 na LMA em dois grupos de contagem plaquetária diferentes*	*70*
Figura 4.27	*Perfil de expressão dos genes do PRC1 na LPA em dois grupos de pacientes com numeros de plaquetas diferentes*	*70*
Figura 4.28	*Perfil de expressão dos genes do PRC2 na LPA em dois grupos de pacientes com numero de plaquetas diferentes*	*71*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	*Classificação Morfológica, imunológica e citoquímica da LMA*	*6*
Tabela 1.2	*Comparação da classificação FAB e da OMS(2001) para a LMA*	*8*
Tabela 1.3	*Classificação da OMS(2008) para as LMAs*	*9*
Tabela 1.4	*Parâmetros clínicos para classificação de risco de recaída da LMA e da LPA*	*18*
Tabela 1.5	*Alterações Genéticas de classe I presentes na LMA e suas características*	*20*
Tabela 1.6	*Alterações genéticas de classe II e suas características*	*22*
Tabela 1.7	*Alterações genéticas em reguladores epigenéticos*	*23*
Tabela 3.1	*Tabela contendo as sequências dos iniciadores usados para a amplificação dos genes em questão, tamanho dos amplicons e localização no mRNA*	*41*
Tabela 4.1	*Casos de LMA-M3 que apresentaram cariótipo normal pela técnica de citogenética convencional*	*46*
Tabela 4.2	*Anormalidades Citogenéticas reveladas por Bandeamento G e multicolor FISH*	*47*
Tabela 4.3	*Anormalidades citogenéticas encontradas no estudo*	*49*
Tabela 4.4	*Dados clínicos dos 52 pacientes analisados para o perfil de expressão dos genes PcG*	*55*
Tabela 8.1	*Dados citogenéticos e clínicos do diagnóstico dos 52 pacientes analisados para o perfil de expressão dos genes PcG estudados*	*127*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATRA	*Áll Transretinoic Acid* - Ácido *all*-transretinóico
ATRO	Trióxido de Arsênico
BACs	*Bacteria Artificial Chromosomes* – Cromossomos artificiais de bactéria
BCR	*Breakpoint Cluster Region*
BSA	*Bovine Serum Albumine*
CCD	*Charge Coupled Device* / Dispositivo de carga acoplada
CD	*Cluster diferentiation* / Antígeno de diferenciação
CD11b	Antígeno de superfice presente em células de origem monocitica
CD13	Antígeno de diferenciação de basófilo, eosinófilo, neutrófilo e monócito
CD33	Antígeno de diferenciação mielomonocítico reage com monócito e granulócito
CD34	Glicoproteína de superfície celular
cDNA	DNA complementar
CEMO	Centro de Transplante de Medula Óssea
CGH	*Comparative Genomic Hybridization* / Hibridização Genômica Comparativa
CHIP	*Chromatin imunoprecipitation*/Imunoprecipitação da cromatina
c-KIT	mast/stem cell growth factor receptor Kit
Cl	Cloro
cm	Centímetro
DAPI	4,6-Diamino-2-Fenilindol
DNA	*Desoxorribonucleic acid* / Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DOP-PCR	*Degenerate oligonucleotide primed - polymerase chain reaction* / Reação da polimerase em cadeia com oligonucleotídeos degenerados
ETV6	*ETS variant gene 6 (TEL oncogene)*
EWP	*European Working Party*
FAB	*French-American-British Classification* / Classificação Franco-americano-britânica
FISH	*Fluoresence in situ Hybridization* – Hibridização *in situ* por fluorescência
GBP4	*Guanylate Binding Protein 4*
G-CSF	*Granulocyte colony-stimulating factor*/fator de estimulação de colônia de granulócito
GM-CSF	*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*/fator de estimulação de colonias de

	macrofagos-granulócitos
GRP78	endoplasmic reticulum lumenal Ca(2+)-binding protein
GTPase	Guanosina trifosfato hidrolase
H3K27me3	Histona H3 trimetilada na lisina 27
HCl	Ácido Clorídrico
HDAC	*Histone deacetylase complex* - Complexo das Histonas Deacetilases
HLA-DR	Antígeno humano do complexo de histocompatibilidade de classe 2
IEF	Isoeletrofocalização
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPPMG	Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira
ISCN	*International System for Chromosome Nomenclature* / Sistema Internacional de Nomenclatura Cromossômica
KCl	Cloreto de Potássio
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crônica
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
LSI	*Locus specific probe* / Sonda lócus específica
M	Molar
M3v	Subtipo M3 variante
M4Eo	Subtipo M4 com eosinofilia
MALDI-TOF	*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight*
Mb	Megabase
MCB	*Multicolor Chromosome Banding* / Bandeamento cromossômico Multicolorido
M-FISH	*Multiplex*-FISH
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
microRNA	RNA pequeno
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidase
M-CSF	*Macrophage colony-stimulating factor*
n	Número de pacientes
NaCl	Cloreto de Sódio
N-CoR	*nuclear receptor co-repressor*/co-repressor de receptor nuclear
NF	Não Feito

OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	*Phosphate buffered saline* / Tampão salino de fosfato
PcG	*Polycombs*
PCP	*Partial Chromosome Painting* – Pintura cromossômica parcial
PCR	*Polymerase Chain Reaction* / Reação em cadeia da polimerase
Ph	Cromossomo *Philadelphia*
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Peso Molecular
PML	*Promyelocytic Leukemia*
PRC1	Polycomb-repressive complex 1/complexo repressivo 1
PRC2	*Polycomb-repressive complex 2*/complexo repressivo 2
PRC4	*Polycomb-repressive complex 4*/Complexo repressivo 4
RAS	*GTPase activating protein*
RNA	*Ribonucleic Acid* – Ácido Ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
RPM	Rotações por minuto
RPMI-1640	*Roswell Park Memorial Institute* / Meio de cultura do Instituto do Parque Memorial Roswell
RTK	*Receptor tyrosine kinases*
RTq-PCR	*Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*
SB	*Sudan Black*
SD	Síndrome de Down
SKY	*Spectral karyotype* / Cariótipo Espectral
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SMRT	*nuclear receptor corepressor 2*
SNP	*Single Nucleotide Polimorphism* / Polimorfismo de nucleotídeo
SSC	Solução salina de citrato
tCGH	*Tilling Comparative Genomic Hybridization*
TdT	*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*
TFA	*Trifluoroacetic acid*
TP53	*tumor protein p53/*proteina p53
Tris	*Tromethamine*
WCP	*Whole Chromosome Painting* – Pintura de cromossomo inteiro
w/v	Weight/volume
μg/mL	micrograma/mililitro
μl	Microlitro
μg	Micrograma

μm	Micrômetro
2D	Duas dimensões
ºC	Graus centígrados
%	Por cento
+	positividade para algum marcador
:	Razão
-	à
>	Maior
<	Menor
=	Igual a
(gene) / (gene)	Fusão gênica entre os genes descriminados

Termos citogenéticos/Símbolos utilizados na nomenclatura:

c	constitucional
del	Deleção
der	Cromossomo derivativo
dic	Dicêntrico
dup	Duplicação
inv	Inversão cromossômica
mar	Cromossomo marcador
p	Braço curto do cromossomo
q	Braço longo
subtel	Região Subtelomérica
t	translocação
(-) sinal negativo	Perda de material genético
(+) sinal positivo	Ganho de material genético
( ) parênteses	Delimita os cromossomos alterados e os pontos de quebra
[Nº], nº entre [ ]	Representa o número de células com determinada alteração
(,) vírgula	Separa nº de cromossomos, cromossomos sexuais e anormalidades cromossômicas
(;) ponto e vírgula	Separa cromossomos e as regiões cromossômicas quando os rearranjos estruturais envolvem mais de um cromossomo
(/) barra inclinada	Separa os clones de um cariótipo
(?) interrogação	Identificação questionável de cromossomo ou estrutura cromossômica
X e Y	Cromossomos sexuais
(:) dois pontos	Quebra
(::) dois pontos duplos	Quebra e união

->	de - à

Genes

ABL	*Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1*
ASLX	*additional sex combs like gene*
BMI1	*BMI1 polycomb ring finger oncogene*
CBF	*Core Binding Factor*
CBFβ	*Core Binding Factor subunit beta*
CBL	*Casitas B-cell lymphoma gene*
CBX	*chromobox protein homolog 1*
CEBPA	*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*
DCLK1	*Double cortin-like kinase 1*
DNMT1	*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1/*DNA metiltranferase 1
DNMT3A	*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 /*DNA metiltranferase 3A
DNMT3B	*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3/*DNA metiltranferase 3B
EED	*Embryonic ectoderm development*
ETS	*E-twenty six gene*
EZH2	*Enhancer of zeste homolog 2*
FLT3	*FMS-like Tyrosina Kinase 3*
hnRNPA2/B1	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
HOX	Homeobox
H-RAS	*Ras family small GTP binding protein*
IDH1	*Isocitrate Dehydrogenase 1*
IDH2	*Isocitrate Dehydrogenase 2*
IL-3	*Interleukin 3*
JAK2	*Janus kinase 2*
K-RAS	*GTPase KRas*
MEL18	*polycomb group ring finger 2*
MLL	*Mixed Lineage Leukemia gene*/ Gene da linhagem leucêmica mista
MYH11	*myosin heavy chain 11/gene de cadeia pesada 11 da miosina*
NAF	*interleukin 8*
NPM	*Nucleophosmin*
NPM1	*Nucleophosmin 1*
N-RAS	GTPase NRas
NuMA	*Nuclear Mitotic Apparatus Gene*
PLZF	*Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Gene*
PTPN11	*tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11*
PU.1	*hematopoietic transcription factor PU.1*
RARα	*Retinoic Acid Receptor alpha*

RING1	*polycomb complex protein RING1*
RNF2	*ring finger protein 2*
RIPK4	*receptor-interacting serine-threonine kinase 4*
RUNX1	*core-binding factor subunit alpha-2*
RUNX1T1	*runt-related transcription factor 1*
SLC25A12	*solute carrier family 25*
STAT5b	*signal transducer and activator of transcription 5B*
STK4	*serine/threonine kinase 4*
STOX2	*storkhead box 2*
SUZ12	*Supressor of zeste 12 homolog*
TCRβ	*T cell receptor subunit beta*
TET	*tet methylcytosine dioxygenase/*Dioxigenase metilcitosina tet
TET1	*tet methylcytosine dioxygenase 1/*Dioxigenase metilcitosina tet 1
TET2	*tet methylcytosine dioxygenase 2/ Dioxigenase metilcitosina tet 2*
TET3	*TET methylcytosine dioxygenase 3/Dioxigenase metilcitosina tet 3*
TrxG	Trithorax
UTX	*lysine-specific demethylase 6A*
WT1	*Wilms tumor 1/*gene tumor de Wilms 1
YY1	*Yin and Yang 1*

SUMÁRIO

Resumo V
Abstrac. VI
Lista de figuras VII
Lista de tabelas IX
Lista de abreviaturas e siglas X
1. Introdução 1
1.1.Leucemias 1
1.2.Leucemia Mielóide Aguda 2
1.3.Classificação da LMA 4
1.4. Importância da Caracterização Citogenética das neoplasias 9
1.5. Padrão Citogenético da LMA 15
1.6. Prognóstico de pacientes com LMA 16
1.7. Alterações genéticas e epigenéticas da LMA 18
1.7.1. Alterações genéticas de classe I 19
1.7.2. Alterações genéticas de classe II 21
1.7.3. Alterações genéticas em reguladores epigenéticas 22
1.8. Genes do Complexo Polycomb 25
1.9. Abordagem de novas tecnologias de larga escala em diferentes estudos da LMA 31
2. Objetivo 34
2.1. Objetivos Específicos 34
3. Materiais e Métodos 35
3.1. Desenho experimental 35
3.2. Amostra 36
3.3.Estudo cromossômico por Bandeamento G 36
3.4. Citogenética Molecular 37
3.4.1. FISH e M-FISH 37
3.4.2. MCB 38
3.5. Estudos Moleculares 39
3.5.1. Obtenção de células de medula óssea 39
3.5.2. Extração de RNA 39
3.5.3 Tratamento com a DNase e a transcrição reversa do RNA 40
3.5.4. Níveis de expressão dos genes Polycomb por RT-qPCR 40
3.6 Análise Estatística 42
4. Resultados 43
4.1 Subtipos morfológicos encontrados no estudo 43
4.2. Padrão cariotípico por Bandeamento G 44
4.3. Refinamento citogenético das aberrações genéticas encontradas no estudo 45
4.3.1. Com a utilização do FISH 45
4.3.2. Com a utilização do Multicolor FISH (mFISH) 47
4.4. Correlação entre a citogenética e os dados clinicos 55
4.4.1. Correlação das anormalidades Citogenéticas e a idade 55
4.5. Análise do Perfil de Expressão de Genes do complexo Polycomb 56
4.5.1 .Perfil de expressão gênica nos diferentes subtipos FAB 61
4.5.2. Perfil de expressão gênica nos subgrupos citogenéticos 62
4.5.3. Perfil de expressão gênica nas diferentes faixas etárias 64

4.5.4. Perfil de expressão gênica de acordo com os fatores clínicos de risco 67
5. Discussão *73*
6. Conclusões..... *81*
7. Referências Bibliográficas..... *82*
8. Anexos..... *97*
8.1. Publicação em 2010 *97*
8.2. Publicação em 2011 *99*
8.3. Publicação em 2012 *103*
8.4. Publicação em 2013 *106*
8.5. Publicações em colaboração *107*
8.6. Termo de consentimento livre esclarecido *131*
8.7. Registro de aprovação do Comitê de Ética do INCA *135*
8.8. Registro de aprovação do relatório Parcial do projeto aprovado no Comitê de Ética do INCA *136*

1. Introdução

1.1. Leucemias

As leucemias são um grupo heterogêneo de hemopatias malignas caracterizadas pela proliferação clonal de células multipotentes da linhagem hematopoiética que sofreram alterações genéticas que se manifestam em uma determinada fase durante a sua diferenciação. Estas alterações afetam genes importantes que controlam mecanismos naturais de proliferação, diferenciação/maturação e apoptose (HEAD, 2004a).

Magee e colaboradores (2012), assim como, Nguyen e colaboradores(2012) descreveram que a leucemia, assim como outros cânceres, pode resultar da ocorrência de múltiplas etapas, nas quais, alterações genéticas em múltiplos genes podem acontecer tanto nas células-tronco hematopoéticas do espaço medular como em precursores já acometidos com alguma das linhagens celulares específicas.

Segundo Gilland e colaboradores (2004), o primeiro evento levaria a um aumento no processo de proliferação e diminuição de apoptose, resultando em uma hematopoese clonal. Nesta etapa, são muito comuns alterações genéticas, como as mutações que geram ganho ou perda de funções de genes envolvidos nos processos de proliferação celular e apoptose. Porém, esta única alteração não é suficiente para o desenvolvimento da leucemia, sendo necessário um novo evento, como por exemplo, a presença de outras alterações genéticas como as fusões gênicas, que resultariam na geração de proteínas quiméricas, assim como, de outras mutações em fatores de transcrição importantes para a hematopoese.

Mais recentemente, esse modelo de Gilland e colaboradores (2004), passou por uma significativa revisão (JAN & MAJETI, 2013). Isso porque com os novos estudos de sequenciamento do genoma completo e de partes codificantes e não-codificantes do genoma das leucemias, outras alterações puderam ser descritas (LEY *et al.,* 2008; MARDIS *et al.,* 2009; LEY *et al.*, 2010; SANDRES & VALK, 2013), tais como, as alterações em reguladores epigenéticos e também alterações na sinalização do microambiente medular (URIBESALGO & DI CROCE, 2011).

As hemopatias malignas são classificadas de acordo com critérios, como o tipo celular envolvido, o grau de diferenciação e a evolução clínica seguida na doença. Nas leucemias crônicas, há um aumento de células-neoplásicas maduras não-funcionais que substituem os elementos normais da medula óssea, enquanto

que nas leucemias agudas, acontece a proliferação de elementos celulares imaturos e de rápida evolução clínica (GILLIAND *et al.,* 2004).

As leucemias agudas são divididas em linfóides e mielóides e diferem em seus aspectos clínicos, assim como, no curso da doença e na resposta ao tratamento. Essa diferenciação entre leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA) é essencial às intervenções terapêuticas (HEAD, 2004a).

1.2. Leucemia Mielóide Aguda

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é caracterizada por um acúmulo excessivo de precursores mielóides na medula óssea que perderam a capacidade de se diferenciar e de responder a reguladores normais de proliferação. O evento leucemogênico pode ocorrer em uma célula-tronco comprometida com a linhagem mielóide, impedindo a maturação e a diferenciação das células (Fig. 1.1). O mecanismo que leva a célula progenitora a perder o controle da proliferação celular, ocasionando a expansão do clone leucêmico, permanece incerto. No entanto, alterações genéticas e epigenéticas parecem estar envolvidas na patogênese das leucemias. Estes defeitos genéticos podem ser resultado de diversos eventos possíveis, tais como deleções e translocações cromossômicas, mutações pontuais, entre outras (SANDERS & VALK, 2013).

O curso clínico natural da LMA pode ser fatal, em termos de dias ou semanas a partir do diagnóstico. Isto se deve, principalmente, às complicações advindas da insuficiência medular, podendo ser citadas como as mais comuns: infecções ligadas à neutropenia e hemorragias relacionadas à trombocitopenia (CLARKE & GLASER, 2000).

A LMA é a neoplasia mielóide mais comum em adultos, com uma média de idade de 70 anos e corresponde a cerca de 80% dos casos de leucemias agudas em adultos. Além disso, ela é mundialmente descrita em 4 casos a cada 100 mil habitantes, correspondendo a cerca de 20% dos casos totais de leucemias na população em geral (Head, 2004a). Na infância, a LMA é um tipo raro de hemopatia maligna, sendo a sétima neoplasia mais comum em crianças e, pode chegar a cerca de 15% a 20% das leucemias agudas em crianças até os 18 anos de idade. A incidência da LMA em pessoas com menos de 15 anos de idade aumenta rapidamente após o nascimento, correspondendo a 49% de todos os casos de

leucemia em lactentes, atingindo o seu pico um pouco antes dos 5 anos de idade (HEAD, 2004b; CREUTZIG *et al.*, 2012).

Com relação a sua apresentação, a LMA pode apresentar-se como uma doença *de novo* ou pode ser secundária a uma crise blástica de Leucemia mielóide Crônica (LMC), a uma evolução de mielodisplasia e a tratamentos que utilizam agentes alquilantes, inibidores de topoisomerase e/ou radiação ionizante (CREUTZIG *et al.,* 2012).

De acordo com Puumala e colaboradores (2013), há uma considerável diferença geográfica no aparecimento de leucemias na infância e, estas diferenças podem ajudar no esclarecimento dos mecanismos etiológicos. Por exemplo, nos Estados Unidos e em alguns países desenvolvidos da Europa, os gráficos de incidências de leucemias mostram um pico significativo de LLA na infância, entre 2 e 5 anos. Com relação aos países em desenvolvimento, Howard e colaboradores (2004) observaram o pico de incidência de LLA entre 3 e 5 anos de idade em 375 crianças diagnosticadas entre 1980 e 2002. Em relação à LMA, também foram observadas diferenças geográficas no seu aparecimento. Em crianças de origem latina, hispânica e asiática, um subtipo da LMA caracterizado pelo acúmulo de promielócitos anormais na medula óssea, a leucemia promielocitica aguda (LMA-M3), foi o subtipo mais encontrado entre as crianças de origem hispânica e latina (JACOMO *et al,* 2008).

No entanto, no Brasil, devido aos poucos estudos epidemiológicos e a raridade desta doença na infância, são poucos os trabalhos que estudam e descrevem os principais aspectos da LMA da infância brasileira. Pombo-de-Oliveira e colaboradores (2009) demonstraram que as regiões do Brasil apresentam incidências diferentes de LMA, sendo as regiões Sudeste e Nordeste as que apresentam uma maior frequência desta neoplasia. Além disso, Pezzi e colaboradores (2012) descreveram uma alta frequência do subtipo M3 em um estudo de crianças e adultos na população brasileira da região Sul do Brasil.

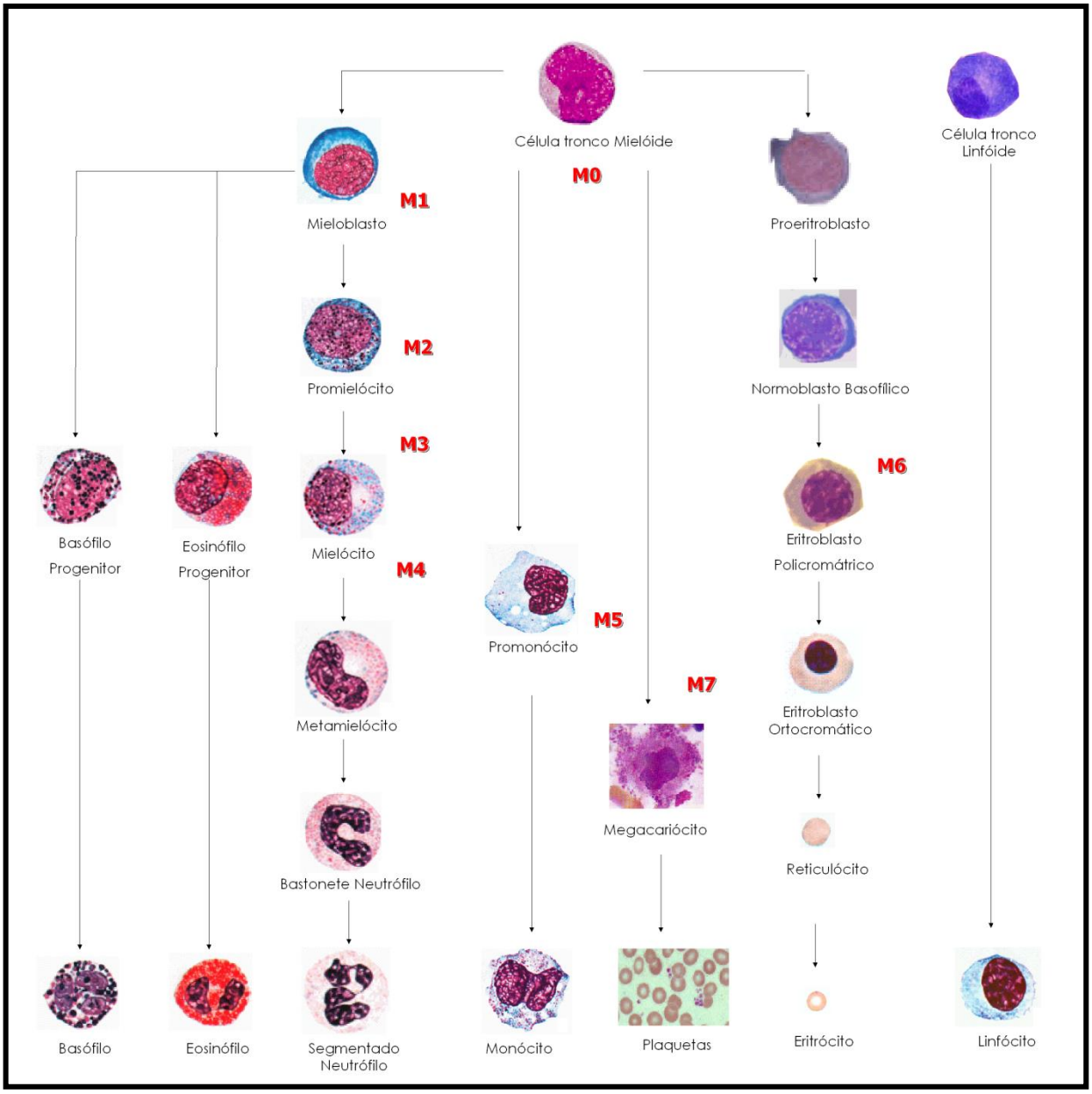


Figura 1.1- Esquema simplificado da diferenciação das células hematopoiéticas e as possíveis linhagens correspondentes aos subtipos FAB das leucemias mielóides. Fonte: modificado de http:// www. userlogic. com/anll/ studyaids/ maturationchart/ maturation_chart.html
M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7 – Subtipos morfológicosFAB da LMA

1.3. Classificação da LMA

Com o objetivo de separar os pacientes em subgrupos dentro da LMA, em função da heterogeneidade desta neoplasia, foram desenvolvidas as classificações: morfológica, que leva em consideração o tipo celular predominante e o grau de maturação da célula envolvida e, imunofenotípica, que se baseia na presença ou na ausência de determinados antígenos de superfície nas células blásticas. A classificação morfológica, desenvolvida pelo grupo de hematologistas franceses,

americanos e britânicos (BENNETT *et al.*, 1976,; BENNETT et al., 1985 a,b) descreve a LMA em 8 subtipos principais (classificação FAB), cada um dos quais podendo apresentar características singulares (Tabela 1.1). A seguir, estão destacadas as características de cada subtipo de acordo com o tipo celular predominante.

O subtipo FAB M0, LMA sem diferenciação, apresenta blastos muito indiferenciados, sem a presença de marcadores citológicos e imunocitoquimicos definitivos de mieloblastos, mas expressam pelo menos um antígeno de linhagem mielóide (CD13, CD33) por estudos de marcadores de superfície celular. Os blastos são pequenos e agranulares com cromatina frouxa, nucléolo evidente e assemelham-se a mieloblastos do ponto de vista ultraestrutural. Este subtipo é raro e representa apenas 2% dos casos de LMA.

A LMA minimamente diferenciada, subtipo FAB M1, apresenta elevada percentagem de blastos indiferenciados (>30%) na contagem diferencial do mielograma com pouca diferenciação para mieloblasto. Neste subtipo, os bastonetes de Auer são ocasionalmente visualizados. A LMA M1 representa cerca de 20% dos casos. Por outro lado, o subtipo M2, LMA com diferenciação granulocítica, representa cerca de 30% dos casos e é caracterizado pela presença da série de maturação até pró-mielócitos (< 20% de monoblastos) com bastonetes de Auer proeminentes.

A leucemia promielocítica aguda (LPA), subtipo M3, apresenta prevalência de promielócitos anormais hipergranulares, nos quais se observam muitos bastonetes de Auer por célula, núcleo geralmente bilobulado ou reniforme. Os pacientes com este tipo de leucemia freqüentemente desenvolvem coagulopatias (coagulação intravascular disseminada, fibrinólise e proteólise). A LMA-M3v (M3 variante) se caracteriza pela presença de granulações finas, núcleo com profundas fendas e pequeno número de bastões de Auer.

Tabela 1.1 – Classificação morfológica, imunológica e citoquímica da LMA

Subtipo FAB	Nome comum e % dos casos	Citoquímica e Imunofenotipagem
M0	LMA com diferenciação mínima (2%)	SB e EN (-), TdT(+/-), aMPO (+), CD33 ou CD13 (+), CD7+/-, CD14, CD15+/-,CD34, (marcadores de células T)
M1	LMA sem maturação (10- 18%)	MPO(+) e SB (+),aMPO (+),TdT, CD13 ou CD33, HLA-DR +, CD14, CD15, CD34, CD4+/-
M2	LMA c/ maturação (27-29%)	MPO (+)SB (+), EN (-):, CD14(+/-);CD11(+), CD33 e ou CD13 (+), aMPO(+), HLA-DR +,CD14, CD4
M3	Leucemia promielocítica aguda (5-19%)	MPO (+),SB (+), CD14(-);CD11(+);CD15(+);HLA(-), CD33/CD13 (+), aMPO (+)
M4	Leucemia mielomonocítica (16-25%)	MPO (+) SB (+) e EN (+)CD14(+);CD11(+/-);HLA(+), CD33/CD13 (+), CD13, CD33, CD15, CD36, HLA-DR +/-, CD4, CD34+/-, TdT+/-
M4Eo	Leucemia mielomonocítica c/ eosinófilos anormais(5-10%)	MPO (+) SB (+) EN (+)CD14(+/-);CD11(+); HLA (+), CD33/CD13 (+/-), CD15, CD36,CD34+/-, TdT+/-
M5	Leucemia monocítica aguda (13-22%)	CD11c, CD13, CD33, CD36, HLA-DR +, CD15, CD14, CD4, CD34, CD7+/- ,MPO (-) SB (-),EN (+)
M6	Eritroleucemia (1-3%)	Eritrócito: Glicoproteina A+, CD71, CD45+/-, Mieloblasto: os mesmos da M1, SB (+), MPO (+), EN (-)
M7	Leucemia megacariocítica Aguda (4-8%)	CD36, CD41, CD42, ou CD61+, CD34, CD13, CD33+/-,HLA-DR+, SB (-), MPO(-), EN (+)

FAB: *French, American and British group*; LMA: Leucemia mieloide aguda; Eo: eosinófilos; SB:*suddan black*; EN:esterase não-específica; TdT: *Terminal deoxynucleotidyl tranferase;* MPO: mieloperoxidase; aMPO: anti- mieloperoxidase ; CD: *Cluster differentiation;* HLA-DR: Antigeno humano do complexo de histocompatibilidade de clase II; c: citoplasmático. Fonte: Modificado de Bennett *et a*l., 1976.

O subtipo FAB M4 conhecido como leucemia mielomonocítica aguda, comum em 15-20% das LMAs, apresenta tanto diferenciação mielocítica como monocítica sendo que 20% a 80% das células não-eritróides são compostas de monoblastos. A variante M4 eosinofílica (M4Eo) está associada à presença de >5% de precursores eosinofilicos displásicos na medula óssea.

O subtipo FAB M5, leucemia monocítica aguda, caracteriza-se pela presença de pelo menos 80% de células monoblásticas grandes com citoplasma abundante contendo granulações finas, são raros os bastões de Auer, de núcleo convoluto e cromatina frouxa, podendo conter grandes nucléolos. Pode também apresentar promonócitos e monócitos. Ocorre em aproximadamente 10% das LMAs. Este subtipo abrange as variantes M5a e M5b. No subtipo M5a ocorre o predomínio de monoblastos sem diferenciação, células grandes com citoplasma livre de granulações e núcleo de cromatina frouxa, representando mais de 80% dos componentes celulares não-eritróides. Enquanto a M5b apresenta mais de 80% de células de linhagem monocitária (monoblastos, promonócitos e monócitos), demonstrando diferenciação.

A eritroleucemia aguda, FAB M6, é pouco freqüente, representando apenas de 2-5% dos casos de LMA. Nesta leucemia eritroblastos anormais são numerosos na medula e muitas vezes no sangue. Algumas destas células são megaloblastóides ou possuem núcleos gigantes e/ou múltiplos. Mieloblastos também estão presentes em pelo menos 30%.

O subtipo FAB M7, leucemia megacarioblástica aguda, também é raro e é caracterizado pela ocorrência de megacarioblastos com fibrose medular associada. Apresenta blastos pequenos com citoplasma pálido agranular e com protrusões, podendo assemelhar-se a linfoblastos. Para um diagnóstico preciso faz-se necessária um teste para peroxidase plaquetária, utilizando microscopia optica ou a imunofenotipagem, através de citometria de fluxo ou imunohistoquímica.

Apesar da sua importância para a determinação do grau de maturação e identificação da linhagem das células leucêmicas, a classificação FAB se tornou obsoleta, uma vez que restringia os aspectos biológicos, terapêuticos e prognósticos por não atender a necessidade de introdução das características citogenéticas e moleculares que se tornavam cada vez mais proeminentes à fisiopatologia desse grupo de doenças.

A criação de uma nova classificação para as neoplasias hematopoéticas era necessária para que fossem incorporados todos esses aspectos. E em 2001, a

Organização Mundial da Saúde(OMS) juntamente com a Sociedade dos Hematopatologistas e a Associação de Hematopatologistas Europeus divulgaram uma nova classificação que incorpora os achados citogenéticos (Jaffe *et al.*, 2001). A introdução de informações citogenéticas e moleculares ajudou a definir mais claramente as distintas entidades envolvidas na LMA. A tabela 1.2 apresenta os subtipos da LMA de acordo com as classificações FAB e OMS (2001)(CUCUIANU, 2005).

Tabela 1.2 – Comparação entre as classificações FAB e OMS (2001)

Classificação Francesa-Americana-Britânica (FAB) da LMA	Classificação da Organização mundial de Saúde (OMS) para a LMA
M0 - LMA sem diferenciação	LMA com anormalidades genéticas recorrentes - LMA com t(8;21) - LMA com eosinófilos anormais na medula óssea e inv(16) ou t(16;16) - Leucemia promielocítica aguda (LPA) com t(15;17) e variantes - LMA com anormalidades da 11q23
M1 - LMA minimamente diferenciada	LMA com displasia de múltiplas linhagens - Seguida de Síndrome Mielodisplásica (SMD) - Sem antecedente de SMD
M2 - LMA com diferenciação granulocítica	LMA e SMD associadas a tratamento - Associada a agentes alquilantes/radiação - Associada a inibidores de topoisomerase-II
M3 - Leucemia promielocítica aguda	LMA não categorizada nos itens anteriores
M4 - Leucemia mielomonocítica aguda	
M5 - Leucemia monocítica aguda	
M6 - Eritroleucemia aguda	
M7 - Leucemia megacarioblástica aguda	

t-translocação, LMA-leucemia mielóide aguda, q =braço longo do cromossomo.

Fonte: Cucuianu, 2005

Em 2008, a OMS revisou a classificação de 2001 para atender a necessidade de identificação e categorização dos casos onde nenhuma anormalidade citogenética era identificada, sendo considerados como citogeneticamente normais (LMA-CN), os quais correspondem de 30 a 50% dos casos de LMA *de novo* do adulto e 20% da infância. Diversas anormalidades genéticas não identificáveis ao microscópio têm sido encontradas nesse grande grupo, dentre elas estão mutações e/ou modificações na expressão gênica de genes alvos associados à leucemogênese e a resposta ao tratamento das LMAs. Estes genes são marcadores prognósticos que contribuem para a melhoria da caracterização e estratificação de risco dos pacientes com LMA. Atualmente, os marcadores prognósticos mais estudados na LMA são as mutações dos genes

NPM1, FLT3, MLL e *CEBPalpha* (GREGORY *et al.,* 2009; ROCKOVA *et al.*, 2011). A tabela abaixo apresenta a atual classificação da OMS (2008)(Tabela 1.3).

Tabela 1.3- Classificação da OMS (2008) para as LMAs

Classificação OMS(2008) para a LMA
LMA com anormalidades genéticas recorrentes **-**LMA com t(8;21)(q22;q22);*RUNX1-RUNX1T1* -LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22), *CBFB-MYH11* -LPA com t(15;17)(q22;q12); *PML-RARA* -LMA com t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL* -LMA com t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214* -LMA com inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVI1* -LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1* -*Subtipo provisório:* LMA com mutação *NPM1* -*Subtipo provisório:* LMA com mutação *CEBPA*
LMA com alterações relacionadas a mielodisplasia(SMD)
Neoplasias mielóides secundárias a tratamento
LMA não categorizada nos itens anteriores -LMA com diferenciação mínima -LMA sem maturação -LMA com maturação -Leucemia mielomonocítica aguda -Leucemia monoblástica e monocítica -Leucemias eritróides aguda *Leucemia eritróide pura *Eritroleucemia, Mielóide/eritróide -Leucemia megacarioblástica aguda -Leucemia basofílica aguda -Pan-mielose aguda com mielofibrose
Sarcoma mielóide
Proliferações mieloides relacionadas à Sindrome de Down **-Mielopoiese anormal transiente** **-LMA relacionadas com a síndrome de Down**

Fonte: Modificado de Vardiman *et al*., 2009.

1.4. Importância da Caracterização Citogenética nas Neoplasias

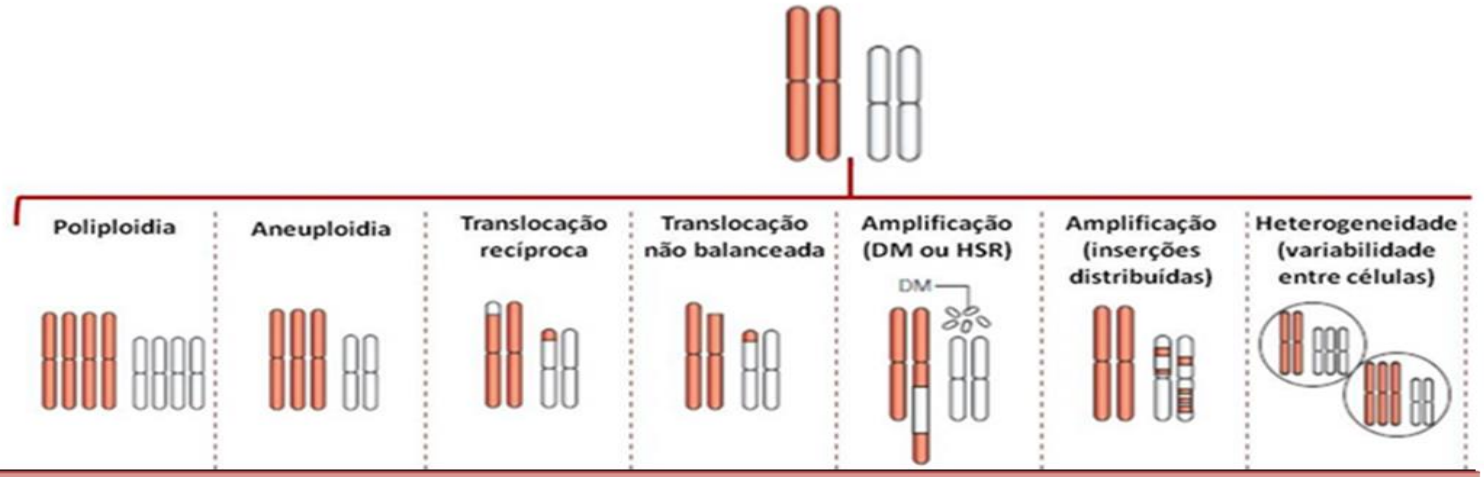
A análise citogenética das células malignas representou o início de um dos maiores avanços na compreensão da natureza biológica das neoplasias, em especial no campo da leucemogênese e nas implicações prognósticas. Isso porque, com o advento da citogenética, foi possível descobrir várias anomalias cromossômicas recorrentes e específicas em diferentes tipos de leucemias. Este tipo de descoberta possibilitou a determinação dos genes envolvidos no processo de aparecimento da leucemia através do mapeamento e da clonagem desses genes, sugerindo que a leucemia era uma doença genética. A presença de determinadas anomalias cromossômicas caracterizou marcadores tumorais no diagnóstico e na determinação do prognóstico.

No entanto, a citogenética tumoral foi dependente do melhoramento das técnicas de obtenção cromossômica como também das técnicas de análise cariotípica. Assim, de modo esquemático, podemos dividir o desenvolvimento da análise dos cromossomos em 5 fases. A primeira começou com a descoberta de métodos para obter células metafásicas em culturas celulares *in vitro* e se estendeu até 1969, levando à descoberta do cromossomo Philadelphia (Ph) na LMC (NOWELl& HUNGERFORD, 1960). Nesta época, os cromossomos eram corados por corante de *Giemsa* sem tratamento prévio, o que tornava difícil a distinção confiável entre os cromossomos não-homólogos.

A segunda fase se iniciou com o desenvolvimento da técnica de bandeamento (1969–1971), que possibilitou a individualização precisa dos pares de cromossomos, assim como, a natureza das alterações cromossômicas de diversas neoplasias. Nesta época, foi descrita a primeira translocação no câncer humano, a t(8;21)(q22;q22), em pacientes com LMA (ZECH, 1969) e a natureza do cromossomo Ph como resultante de uma translocação recíproca, envolvendo os cromossomos 9 e 22, a t(9;22)(q34; q11) (ROWLEY, 1998).

A terceira fase começou com o uso de sondas de DNA específicas para identificar genes ou regiões cromossômicas. Estas sondas marcadas com material fluorescente deram origem ao desenvolvimento da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) (VAN PROOIIJEN-KNEGT *etal.*, 1982), técnica esta, que deu início a citogenética molecular (Fig 1.2). Com essa técnica, é possível identificar, de forma rápida, anormalidades cromossômicas que envolvem pequenos segmentos de DNA, como por exemplo, os genes envolvidos na inversão pericêntrica do cromossomo 16, encontrada em pacientes com LMA (KUNDU & LIU, 2001).

A quarta fase começou com o uso, não de sondas de regiões cromossômicas, mas sondas de cromossomos inteiros e com a utilização de mais de três fluorocromos, gerando um padrão diferente de cor para cada um dos 23 pares de cromossomos humanos (SCHROCK *etal*., 1996; SPEICHER *etal.* 1996). Essa poderosa técnica chamada de cariótipo espectral (SKY) ou FISH multiplex (M-FISH) tem se mostrado de extrema importância para detectar não só translocações, mas, principalmente, para detectar anomalias cromossômicas complexas. Como por exemplo, na detecção da amplificação de regiões nos braços longos dos cromossomos 11 (11q), 21 (21q) e 22 (22q) que não haviam sido detectadas antes em pacientes com LMA que apresentavam cariótipos complexos, mas que podiam ter um papel importante na leucemogênese (MROZEK *etal*., 2002).



Técnica	Detecção						
Bandeamento	+		+	+	+	-	+
M-FISH/SKY	+	+	+	+	+	+	+
(Array) CGH	-	+	-	+	+	+	(+)*
SNP-Array	-	+	-	+	+	+	(+)*
Intérfase	+	+	+	+	+	+	+

Figura 1.2 – Comparação das técnicas de citogenética para a identificação de anormalidades.O sinal de "+ " indica que a técnica é útil para a identificação de rearranjos cromossômicos. O sinal de "-" indica que a anormalidade citogenética não pode ser detectada pela técnica em questão. M-FISH, multiplex fluorescence *in situ* hybridization; SKY, *spectral karyotyping*; CGH, *comparative genomic hybridization*; SNP, single nucleotide polymorphism.O *Digital Karyotyping* é uma técnica que consegue realizar uma quantificação do número de cópias de uma pequena sequência de DNA de um *loci* genômico especifico pelo isolamento e enumeração desta sequencia.*Indica que vários experimentos são necessários. A taxa de detecção das anormalidades em interfase depende da seleção das sondas utilizadas. Modificado de Speicher et al., 2005.

Juntamente com o M-FISH, surgiu uma quinta fase que se caracteriza pelo uso de sondas que foram confeccionadas a partir da microdissecção de pedaços de todos os cromossomos. Essas sondas são marcadas com cinco diferentes fluorocromos, gerando padrões de cores para cada um dos 24 cromossomos pela sobreposição desses inúmeros fragmentos de DNA (WEISE *et al.,* 2008) (Fig. 1.3). Essa técnica denominada de *Multicolor Banding Chromosome* (MCB) tem se mostrado muito importante para a caracterização de cariótipos complexos, pequenas anormalidades citogenéticas e cariótipos com anormalidades crípticas nas LMAs (MACEDO SILVA et *al.*, 2005; SILVA *et al*., 2008; MARQUES-SALLES *et al*., 2009).

Entretanto, há algumas limitações para o emprego destas técnicas, pois estas necessitam da presença de metáfases de relativa qualidade na amostra para a análise. Com isso, houve a necessidade de se estabelecer uma técnica de FISH que não necessitasse de metáfases de qualidade. Então, a hibridização genômica comparativa (CGH) conseguiu ultrapassar esse obstáculo através da comparação do DNA genômico normal e do DNA genômico neoplásico. Esses DNAs são diferencialmente marcados com fluorocromos verde e vermelho, respectivamente, misturados em quantidades iguais e co-hibridizados. Com a utilização dessa técnica, um grande avanço foi alcançado, principalmente, na citogenética de tumores sólidos que apresentam limitações na qualidade das metáfases (KEARNEY, 2001). Porém, para os rearranjos que não envolvem perdas genômicas, como é o caso das translocações balanceadas e as inversões, o uso da CGH é limitado, por não conseguir detectar rearranjos estruturais em que não ocorrem nem perdas e nem ganhos de materiais cromossômicos, não fornecendo, portanto, informações sobre os segmentos cromossômicos envolvidos nestes rearranjos.

Na década de 90, o uso do *array* CGH foi descrito pela primeira vez, utilizando pequenas regiões específicas do genoma humano. O desenvolvimento de *arrays* CGH que cobriam todo o genoma humano, utilizando um clone para cada megabase (Mb) do DNA, foi rapidamente desenvolvido e, hoje é largamente utilizado, tanto na pesquisa em genética clínica quanto em genética tumoral. A flexibilidade desses *arrays* permitiu que eles fossem também utilizados para detectar perdas de heterozigosidade de nucleotídeos únicos ou de alterações no número de cópias de determinados segmentos cromossômicos. Esses *arrays* receberam o nome de *Single Nucleotide Polymorphism (SNP) array*. Diferentemente do CGH *array,* no *SNP array* somente uma amostra genômica é hibridizada, sendo então,

possível, a identificação de alterações no número de cópias pela comparação com uma hibridização de um controle independente (EMANUEL & SAITTA, 2007).

Recentemente, *the next generation sequencing (NGS)* permitiu a caracterização do transcriptoma, exoma e dos genomas completos de diferentes tipos de câncer, incluindo várias hemopatias malignas. Isso porque, mesmo utilizando, métodos baseados na fluorescência e na quimioluminescência, métodos estes baseados na hibridização *in situ* (ISH), o foco da detecção das anormalidades presentes no câncer passou do nível de cromossomo para um único nucleotídeo alterado ou uma variação do mesmo (DAS & TAN, 2013). No entanto, a quantidade de dados gerados, além do custo financeiro e da heterogeneidade dos tumores, demonstra que essa técnica ainda está no seu início de uso para a clinica, já que mesmo com os dados já gerados poucos biomarcadores já foram incorporados como indicadores de prognóstico.

A combinação de várias técnicas de citogenética demonstra que uma melhor análise dos rearranjos cromossômicos presentes na doença pode ser feita. Isso porque a técnica de banda G pode revelar a presença de rearranjos citogenéticos complexos, mas não pode identificar a origem deste material, enquanto que, o M-FISH pode identificar os rearranjos cromossômicos presentes, mas não consegue nos dar informação sobre os desbalanços genômicos. O CGH *array* consegue nos dar informações sobre as deleções e amplificações presentes na amostra, no entanto, não consegue detectar translocações balanceadas. O *Tilling* CGH (tCGH) consegue detectar as translocações balanceadas já conhecidas, mas não consegue descobrir novas alterações que possam aparecer (GREISMAN *et a*l., 2011). Isso tudo confirma que para uma melhor análise de rearranjos cromossômicos complexos, a combinação de várias técnicas de citogenética é a escolha mais adequada para o estudo destas anormalidades citogenéticas.

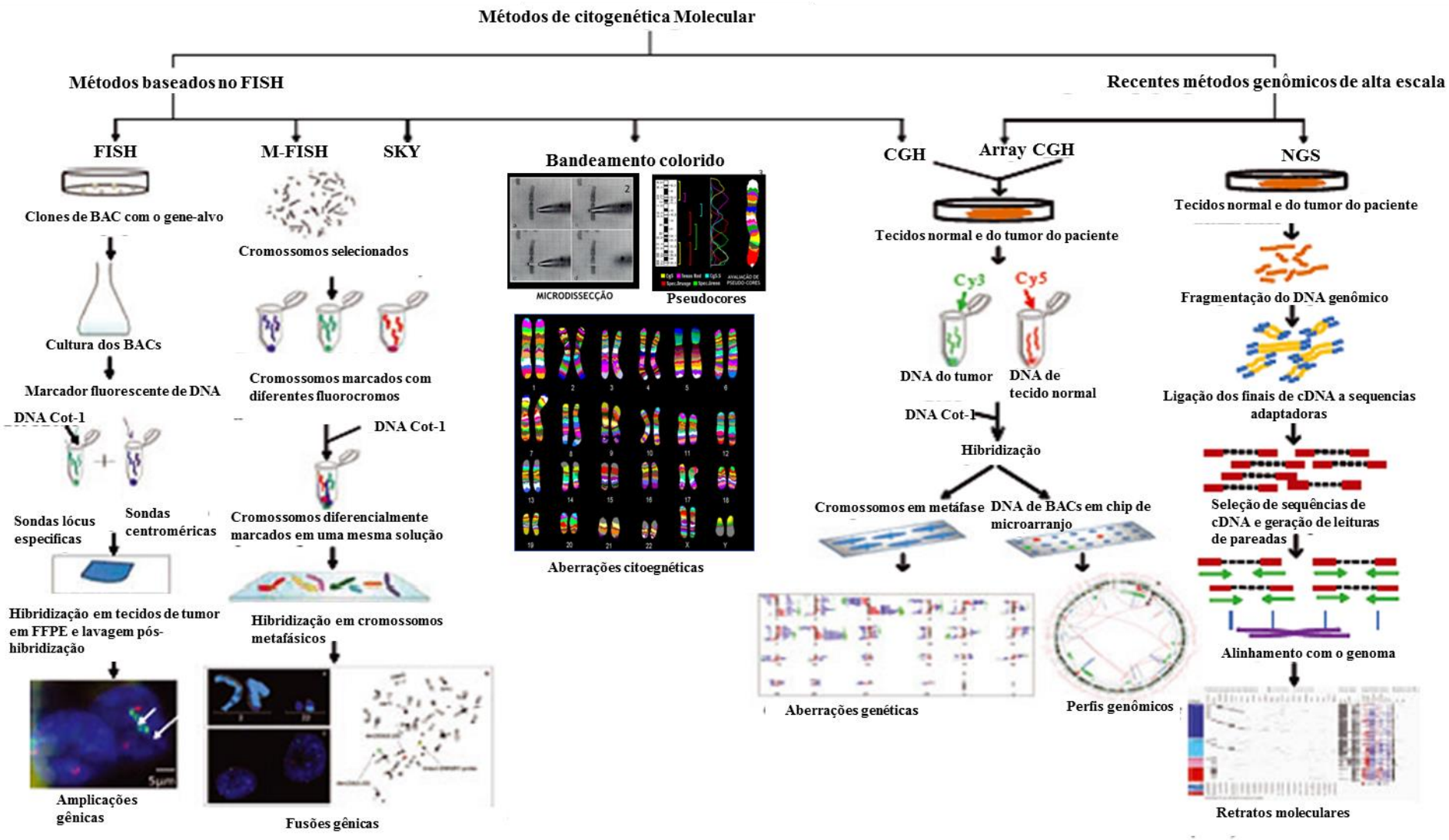


Figura 1.3 -Identificação de alterações cromossômicas utilizando FISH, M-FISH, SKY e bandeamento colorido, alterações genômicas, utilizando CGH, *array* CGH e NGS. CGH: *comparative genomic hybridization*,; Fonte: Modificado de Das&Tan, 2013

1.5. Padrão Citogenético da LMA

A literatura tem mostrado que, aproximadamente, 85% das crianças com LMA apresentam alterações cromossômicas na medula óssea e ou sangue periférico no momento do diagnóstico (MANOLA, 2009; RAIMONDI *et al*., 1999), enquanto que cariótipos anormais são detectados em aproximadamente 60% dos pacientes adultos (MROZEK *et a*l., 2004). Os tipos de alterações citogenéticas encontradas na LMA podem ser numéricas e/ou estruturais.

As anomalias estruturais encontradas na LMA são, principalmente, as translocações e inversões. As alterações estruturais mais frequentemente encontradas na LMA da infância são aquelas que afetam a região q23 do cromossomo 11, especialmente nos subtipos M4 e M5, podendo ser observadas em 14%a 22% dos casos de LMA. Os rearranjos, que envolvem essa região, mais comumente observados são a t(9;11)(p21;q23), a t(10;11)(p13;q23) e a t(11;19)(q23;p13) (MANOLA, 2009).

A segunda alteração citogenética estrutural mais encontrada na LMA da infância é a t(8;21)(q22;q22), reportada em 7% a 16% dos casos e, que é, preferencialmente, correlacionada com o subtipo morfológico M2. Quando são detectadas alterações citogenéticas do tipo translocações, ocorrem fusões de genes que codificam fatores transcricionais que, geralmente, estão envolvidos na proliferação, diferenciação e apoptose de células sanguíneas precursoras (PUI *et al.,* 2011).

As alterações cromossômicas numéricas podem ser do tipo monossomias e nulissomias, conferindo um cariótipo com menos de 46 cromossomos e, podem ser do tipo trissomias, tetrassomias entre outras, conferindo um cariótipo hiperdiplóide, com mais de 46 cromossomos. A trissomia do cromossomo 8 é a anomalia cromossômica numérica mais frequente na LMA, tanto no adulto como na infância, exceto na M0. Esse cromossomo extra é geralmente visto com outras anormalidades citogenéticas recorrentes como a t(8;21)(q22;q22), a t(15;17)(q22;q21) e outras. Porém, também pode ser visto como uma única aberração cromossômica do cariótipo em 2,1% dos casos de LMA na infância (RAIMONDI *et al*., 1999) e em 3% a 4% em pacientes adultos. Mesmo não estando associada com um subtipo específico de LMA, ela é mais comumente observada nos subtipos M1, M4 e M5 (MANOLA, 2009).

Outras alterações cromossômicas numéricas mais raramente observadas na infância são as monossomias do cromossomo 5 ou 7, encontradas respectivamente, em 5% e 1% dos casos de LMA pediátrica. Já em adultos, esses números aumentam para, respectivamente, 7% e 5% dos casos (GRIMWADE, 2001). A trissomia do cromossomo 21 é a segunda alteração numérica mais frequente em crianças, estando associada às anomalias citogenéticas recorrentes. Mas também pode ser encontrada como única anormalidade citogenética no clone em 1,5% dos casos (RAIMONDI *et al*.,1999). Além dessas alterações, as trissomias dos cromossomos 4, 11, 13 e 21 também podem ser encontradas em adultos com menor frequência do que a trissomia do cromossomo 8 (BACHER *et al*., 2005).

Apesar de alguns subtipos morfológicos raros não apresentarem anomalias cromossômicas específicas, como o M0, o M1 e o M6, alguns trabalhos já descreveram que o subtipo M0 e M1 caracterizam-se por uma alta frequência de aberrações cromossômicas clonais (BACHER *et al*., 2005), mostrando uma associação com a trissomia dos cromossomos 4, 11, 13 e 21, tanto como anomalias cromossômicas isoladas como adicionais a outras anomalias citogenéticas (KLAUS *et al*., 2004). O outro subtipo raro, M6, inclui uma alta incidência de cariótipos complexos, chegando a cerca de 61%, mas ainda não há uma descrição das anomalias cromossômicas mais frequentemente encontradas neste subtipo FAB (BACHER *et al.,*2005).

1.6. Prognóstico de pacientes com LMA

O prognóstico das crianças com LMA melhorou discretamente nos últimos 20 anos. Atualmente, a sobrevida livre de recidiva em 5 anos pode chegar a quase 60% para o conjunto de pacientes (HEAD, 2004b). Nos dias de hoje, o resultado da análise citogenética, realizada no diagnóstico, é o fator prognóstico mais importante. Ou seja, as estratificações de risco nos diversos protocolos de tratamento de LMA dependem praticamente desses resultados (MROZEK *et al.,* 2000). Sendo assim, os subgrupos citogenéticos são classificados de acordo com o prognóstico em favorável, intermediário ou desfavorável.

Um prognóstico mais favorável parece estar relacionado com algumas das anomalias cromossômicas da LMA, tais como a t(8;21)(q22;q22) sem a deleção do

braço longo do cromossomo 9 (9q) ou sem anomalias citogenéticas adicionais, a t(15;17)(q22;q21) associada ou não a outras anormalidades cromossômicas e a inv(16)/t(16;16)/del(16q). Os pacientes apresentando anomalias cromossômicas numéricas, tais como, trissomias dos cromossomos 8 e 6 e, nulissomia do cromossomo Y e anomalias estruturais, como, a del(12p) e cariótipos normais são selecionados para protocolo de tratamento intermediário. Já os pacientes que apresentam a monossomia do cromossomo 5 ou a del(5q), a monossomia do cromossomo 7 ou a del(7q), a inv(3q)/t(3;3), a t(6;9), a del(9q), a t(9;22), anormalidades da região 11q23 e cariótipos complexos são selecionados para protocolos de alto risco. Muitas das alterações encontradas na LMA apresentam um prognóstico desconhecido. Os pacientes com a t(9;22)(q34;q11) e com as anomalias envolvendo a região 11q23, apresentam mau prognóstico e, são em vários protocolos, candidatos ao transplante alogênico das células progenitoras hematopoiéticas, após a obtenção da primeira remissão completa (DEWALD *et al*., 2002).

Em um estudo recente com pacientes adultos, cerca de 45% das LMAs apresentaram cariótipo normal pela análise da citogenética convencional (KLAUS *et al.,* 2004), sendo necessário então, estudos moleculares para detectar rearranjos ocultos (invisíveis ao nível de cromossomo por causa do tamanho dos rearranjos que podem variar de 1 a 2 Mb) ou aberrações moleculares, como por exemplo, mutações em ponto que não podem ser detectadas por análise de citogenética convencional ou molecular (YAMAMOTO. *et al*., 2001; CUNEO *et al*., 2002; GAMERDINGER *et al*., 2003; KLAUS *et al*., 2003; KLAUS *et al*., 2004).

Análises recentes por FISH e por reação em cadeia da polimerase (PCR) nas LMAs com cariótipo normal detectaram aberrações genéticas. A ocorrência dessas translocações ocultas em LMA pôde ser mostrada nos casos de LMA M1 e M2 com os cromossomos 8 e 21 normais e com a fusão gênica *AML1/ETO* a nível molecular em aproximadamente 3% das LMA (ROWE *et al*., 2000; GAMERDINGER *et al.,* 2003; KLAUS *et al*., 2004). Este fenômeno de rearranjos submicroscópicos pode ser comparado com o mecanismo que foi primeiro observado em 3% a 9% dos casos de LMC sem o cromossomo Philadelphia, mas com a fusão entre os genes BCR e ABL (HEIM & MITELMAN, 1995).

Outro grupo de pacientes adultos com LMA apresentando cariótipo normal pode ser caracterizado pela detecção de marcadores moleculares como, mutações em extensão no gene *FLT3* (35-40%), mutações no domínio tirosina kinase do gene

FLT3 (5-10%), duplicações parciais em seqüência do gene *MLL* (6-10%), mutações *NRAS* (6-10%) ou mutações de *CEBPA*, *PU.1* e do gene *AML1* (5-8%) (TAKAHASHI, 2011).

Além dos aspectos citogenéticos, Radhi e colaboradores em 2010, assim como Rubnitz e colaboradores em 2007, conseguiram determinar uma estratificação prognóstica que combinava as contagens leucocitárias (WBC) e plaquetárias medidas no momento do diagnóstico para a LMA. Dois estudos em crianças com LPA também conseguiram estabelecer outros fatores que poderiam influenciar no prognóstico dos pacientes com LPA (SANZ *et al.,* 2000; BALLY *et al*., 2012). Esses fatores são determinados de forma separada para a LPA, pois a LPA apresenta características singulares, sendo a única a apresentar uma terapia especifica, utilizando o ácido trans-retinóico (ATRA) (JÁCOMO *et al.,* 2007). Esses dados estão descritos na tabela abaixo (Tabela 1.4)

Tabela 1.4- Parâmetros clínicos para classificação de risco de recaída da doença

LMA		**LPA**	
Risco	**Parâmetros**	**Risco**	**Parâmetros**
Risco baixo	WBC ≤50000/uL e plaquetas >500000/uL	**Risco baixo**	WBC≤10000/uL e plaquetas>40000/uL
Risco intermediário	WBC ≤ 50000/uL e plaquetas ≤50000/uL	**Risco intermediário**	WBC≤10000/uL e plaquetas ≤40000/uL
Risco alto	WBC >50000/uL	**Risco alto**	WBC>10000/uL

WBC=contagem leucocitária global. Fonte: Bally *et al.,* (2012) e Sanz *et al.,* 2000)

1.7. Alterações genéticas e epigenéticas na LMA

Além de apresentar uma heterogeneidade morfológica, clínica e citogenética, a LMA também é caracterizada por uma grande diversidade de alterações genéticas e epigenéticas. Uma das hipóteses mais relevantes que explicam o surgimento desta neoplasia é aquela que afirma a existência de uma célula-tronco leucêmica que possui uma capacidade de auto-renovação conferida por um acúmulo de alterações genômicas que afetam vários processos essenciais em uma célula, como a proliferação, morte celular e desregulação de genes envolvidos nas vias de sinalização da diferenciação hematopoética (Fig. 1.4). Esses eventos oncogênicos são frequentemente divididos em duas classes, concordando com a hipótese de dois

eventos para a leucemogênese. As mutações denominadas de classe I são aquelas que ocorrem em genes relacionados com a vantagem proliferativa ou de sobrevivência. Enquanto que, as de classe II impedem o processo de diferenciação mielóide (DASH & GILLAND, 2001).

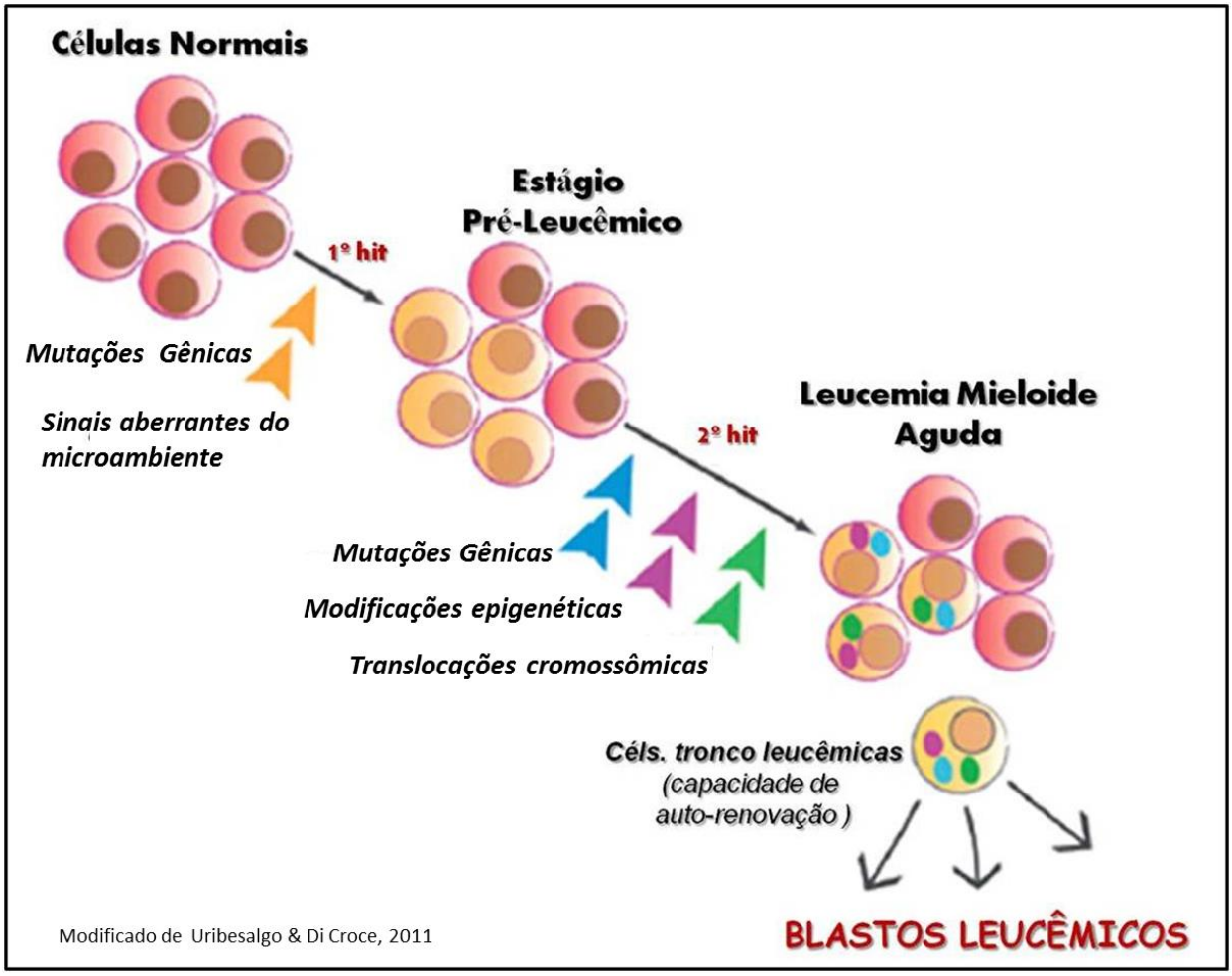


Figura 1.4-. Desenvolvimento da leucemia como um processo *multistep*. Translocações cromossômicas tanto em progenitores já acometidos para uma linhagem celular específica ou em células-tronco hematopoéticas levam a um estágio anterior a leucemia. Neste estágio, várias alterações genéticas levam ao aparecimento da leucemia propriamente dita. Dentro desta população celular da LMA, que apresentam mutações envolvidas na patogênese desta neoplasia, a subpopulação de células-tronco leucêmicas irá permanecer na medula óssea, dando início ao fenótipo da LMA.

1.7.1. Alterações genéticas de classe I:

As mutações de classe I são aquelas que conferem uma vantagem proliferativa e de sobrevivência as células hematopoéticas. Mutações nestas vias de transdução de sinal incluem componentes das vias RAS-MAPK, PI3/AKT, entre outros. A identificação destas mutações pode melhorar o entendimento do processo de leucemogênese, principalmente, nos pacientes que apresentam um cariótipo

normal. Já que, mesmo sem alterações citogenéticas detectáveis, muitos apresentam um curso muito ruim da doença.

As mutações no gene *FLT3* são as mais frequentemente encontradas na LMA, correspondendo a cerca de 50% dos casos, incluindo adultos e crianças. O tipo mais comum tanto em adultos quanto em crianças são as duplicações *in tandem* nos éxons 14 e 15. Essas mutações conferem um mau prognóstico ao pacientes adultos ou pediátricos, independente das outras características genéticas ou clínicas apresentadas no diagnóstico, sendo considerado um fator prognóstico independente dos outros fatores de risco (TAKAHASHI, 2011).

Tabela 1.5- Alterações Genéticas de classe I presentes na LMA e suas características

Gene	Aspectos clínicos	Subtipo FAB ou Subgrupos citogenéticos	Frequência
FLT3	Associação com alta contagem leucocitária; aumentado RR; baixa taxa de SLD e SG.	LMA-M5, CN	50% na LMA
KIT	Afeta negativamente a SG nos casos que apresentam a inv(16).Impacto adverso no RR nos casos com t(8;21). Mutações neste gene tem um impacto negativo independente na SG e SLE em pacientes com t(8;21), mas não em paciente com CN.	LMAs CBF	1.7% AML,22% a 45% t(8;21;)29% a 48% inv(16)
N-RAS	Não foi verificado até o momento impacto prognóstico na SG, SLE e SLD.	Inv(16), Inv(3)	10.3% na LMA
PTPN11	Sem significância prognóstica. Porém, pacientes com mutações nos genes NPM1 e PTPN11 revelaram ser um fator de risco para a SG.	-	5.1% na LMA
JAK2		-	1.6% na LMA
CBL		Leucemias CBF, 11q23	1.1% AML/MDS, 16% inv(16)AML

Fonte: Modificado de Takahashi *et. al*, 2011.

RR- risco de recaída; SLD- sobrevida livre de doença; SG- Sobrevida Global; CN- cariótipo normal; SLE- Sobrevida livre de evento; inv- inversão, t- translocação

Outras mutações de classe I, que também já foram descritas para a LMA, estão resumidas na tabela 1.4, tais como as mutações nos genes *KIT e PTNP11 que* apresentam valor prognóstico quando comparadas com as outras mutações da tabela. Os pacientes que apresentam t(8;21) e inv(16) parecem apresentar uma correlação com mutações no gene *KIT* em, respectivamente,45% e 48% dos casos,

conferindo um prognóstico desfavorável para estes pacientes (RENNEVILLE *et al.*, 2008). As mutações no gene *PTNP11* foram descritas em uma frequência muito baixa na infância, correspondendo a cerca de 5,1% dos casos. Com isso, não foi possível correlacionar a presença desta mutação com nenhum subtipo citogenético da LMA infantil. Por outro lado, mutações nos genes *RAS* e *CBL* apresentaram uma correlação com alguns subtipos da LMA, porém sem poder avaliar o valor prognóstico destas alterações genéticas na infância (TAKAHASHI, 2011).

1.7.2. Alterações genéticas de Classe II

As alterações genéticas de classe II afetam fatores de transcrição que, primeiramente, impedem a diferenciação hematopoética. Alterações cromossômicas recorrentes, tais como a t(8;21)(q22;q22), a inv(16)(p13;q22) e t(15;17)(q22;q21), assim, seus respectivos produtos de fusão RUNX1/RUNX1T1, CBFB/MYH11, PML/RARA e as mutações nos fatores de transcrição RUNX1, CEBPA e MLL também são classificados neste grupo.

As mutações mais frequentes são que ocorrem no gene *NPM1*, correspondendo a cerca de 35% dos casos de LMA e nos casos de cariótipo normal, esta frequência ultrapassa os 50% dos casos. Sua incidência é muito mais baixa em crianças (2% a 6% dos casos) do que em adultos, nos quais a sua frequência pode chegar a 30% dos casos. Estas mutações podem ocorrer em todos os subtipos FAB, no entanto, são mais frequentes nos subtipos M4 e M5 e nos casos de cariótipo normal. Estas alterações genéticas conferem um bom prognóstico ao paciente.

Outras mutações de classe II que já foram descritas na LMA estão na tabela 1.5 .A segunda mutação mais frequente na LMA é a que envolve o gene *WT1* que confere um mal prognóstico para os pacientes que apresentam CN, a t(7;11)(p15;p15) e para os casos de LMA-M6 (RENNEVILLE *et al.*, 2008). Outras mutações que se apresentam quase na mesma frequência na LMA são as que envolvem os genes *RUNX1, CEBPA e TP53.* Essas alterações podem corresponder a cerca de 10% dos casos. Os pacientes que apresentam mutações nos genes *RUNX1* e *TP53* apresentam um pior prognóstico e são mais frequentemente encontradas nos subtipos M0 com ou sem trissomia do cromossomo 21 e nos casos que apresentam anormalidades envolvendo o braço logo dos cromossomos 5 e 7, respectivamente. Já as mutações no gene *PU.1* não apresentam um valor prognóstico ainda determinado, provavelmente pela baixa incidência desta mutação tanto em adultos como em crianças (TAKAHASHI, 2011).

Tabela 1.6- Alterações genéticas de classe II presentes na LMA e suas características

Gene	Aspectos clínicos	Subtipo FAB ou Subgrupos citogenéticos	Frequência
RUNX1	Foi considerado um marcador de prognóstico independente para uma baixa SLE e para SG	LMA-M0, trissomia do 21	6-10% na LMA
CEBPA	Pacientes com esta mutação tem uma tendência a uma melhora na taxa de RC e um significante aumento na taxa de SLE, SLD e na SG.	M1, M2, M4	6-9% na LMA
WT1	As mutações foram consideradas um fator prognóstico de risco para a SG, SLR dentro do grupo total de pacientes e no grupo dos que apresentavam CN	M6, CN e t(7;11)(p15;p15)	10-15%% na LMA,8.3-10.7% na LMA-CN,6.8% na LMA não M3
PU.1	-	-	3% na LMA
NPM1	Melhor taxa de SG, de SLD e uma baixa incidência de recaída	M4, M5 e LMA-CN	27.5- 35.2% na LMA,45.7-53% na LMA-CN
TP53	Pacientes com esta mutação apresentam um pior prognóstico	Anomalias em 5q e 7q	10% na LMA,30% na LMA secundária

Fonte: Modificado de Takahashi et al., 2011.
SLE- sobrevida livre de evento; SG- sobrevida global; SLD- sobrevida livre de evento; Sobrevida livre de doença; SLR- sobrevida livre de recaída; CN- cariótipo normal; Inv- inversão.

1.7.3.Alterações genéticas em reguladores epigenéticos na LMA

Vários estudos têm demonstrado que nem todos pacientes apresentam mutações de classe I ou de classe II, sugerindo que outros genes podem estar envolvidos na LMA e que não podem ser classificados dentro do modelo de dois hits mais amplamente aceito para a leucemogênese mielóide (SHIH *et al.*, 2012).

Mais recentemente, foi demonstrado que perturbações nos processos epigenéticos também podem contribuir com a transformação leucêmica, proporcionando uma maior plasticidade à célula tumoral para se adaptar a diferentes situações na medula óssea, ou ainda, tornando o ambiente medular mais permissivo ao processo da leucemogênese durante a aquisição de mutações adicionais (FEINBERG, 2007; NTZIACHRISTOS *et al*., 2013). Todas as alterações genéticas em reguladores epigenéticos descritas até o momento para a LMA estão na tabela 1.6.

Tabela 1.7 - Alterações genéticas em reguladores epigenéticos

Gene	Aspectos clínicos	Subtipo FAB ou Subgrupos citogenéticos	Frequência
DNMT3A	A SLG é significantemente menor	LMA-M5	22% na LMA; 1,2% na LMA infância com cariótipo normal e com rearranjo do *MLL*
TET2	Pacientes de risco favorável tem uma baixa SLE, por causa da baixa taxa de RC; baixa SLD e SG quando comparados com pacientes sem esta mutação	CN	23% na LMA- CN; 1,7% LMA pediátrica com CN e t(8;21)
IDH1	Mutações IDH1 estão altamente associadas a CN; alta taxa de recaída e uma baixa SG e SLE.	CN	6%-9% na LMA;1,1% na infância
IDH2	Nos pacientes com CN e com esta mutação, há um alto risco de falha na indução, alta taxa de RR e pequena SG.	CN	3 a 8.7% na LMA; 0,6% na infância
ASXL1	Baixa SG. Não pode ser considerada como um fator prognóstico independente em uma análise multivariada.	CN	10.8% na LMA;1,1% na LMA pediátrica com t(8;21)

Fonte: Modificado de Takahashi et al., 2011

SLG- Sobrevida livre global; SLE- sobrevida livre de evento; RC- Recaída, SLD- sobrevida livre de doença; SG- sobrevida global; CN- cariótipo normal; SG- sobrevida global; RR – risco de recaída

As mutações dos genes *IDH1 e IDH2,* que codificam duas isoformas da isocitrato desidrogenase responsáveis pela defesa celular contra o estresse oxidativo, ocorrem em cerca de 10% a 25% dos casos de LMA, sendo as mutações no gene *IDH2* mais frequentes do que as do gene *IDH1* em uma frequência quase duas vezes maior (11% e 6%) em pacientes mais jovens do que 60 anos (DANG *et al*., 2010). No entanto, somente em pacientes pediátricos, essas mutações acontecem em uma frequência bem mais baixa, chegando a cerca de 1,1% e 0,6%, respectivamente para *IDH1* e *IDH2.* Nos pacientes adultos que apresentam cariótipo normal, a frequência das mutações que envolvem o gene *IDH2* corresponde a 19%, enquanto que as do *IDH1* a 14% (CHOU *et al*., 2011). Estas mutações também foram descritas com uma alta frequência em pacientes com cariótipos com anormalidades citogenéticas consideradas de risco intermediário. No entanto, em pacientes que apresentavam anormalidades recorrentes como a t(8;21), a inv(16) e

a t(15;17) não foram detectadas mutações nestes genes. As mutações destes genes estão associadas com um prognóstico pior.

As mutações do gene *TET2* que codifica uma proteína responsável pela conversão da 5-metilcitosina em 5-hidroximetilcitosina, são as mais frequentemente encontradas em neoplasias mielóides, sendo relatada em uma frequência de 8% a 19% nos casos de LMA de adulto (TAKAHASHI, 2011) e, em cerca de 1,7%-4% nos casos de LMA pediátrica (LANGEMEIJER et al., 2011; LIANG *et al,*2013). Estas mutações estão associadas a pacientes que apresentam cariótipo normal em cerca de 23% dos casos, mas também já foram associadas, em um estudo de Liang e colaboradores (2013), com a presença da t(8;21). Com relação ao prognóstico, esta mutação parece estar relacionada a uma reposta desfavorável. As mutações em *TET3 e TET1* também não foram descritas nos casos de LMA (ABDEL-WAHAB *et al*., 2009).

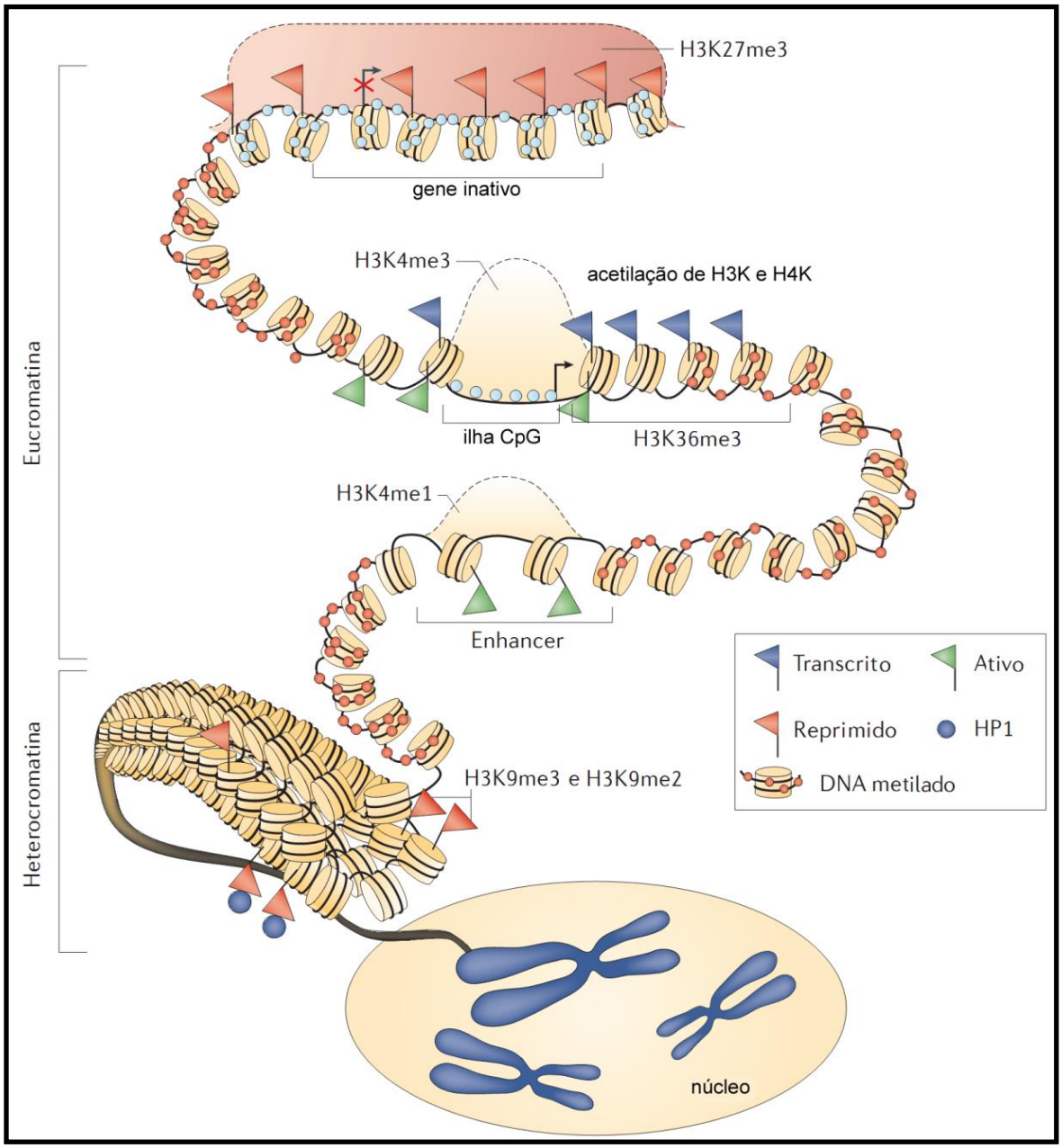
As mutações no gene *DNMT3A* que codifica uma DNA metiltransferase, foram frequentemente descritas em casos de leucemia acompanhadas de mutações no gene *NPM1*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, mas não foram descritas em leucemias que apresentavam as seguintes fusões protéicas: PML-RARα, RUNX1-RUNX1T1 ou CBFβ-MYH11. Essas mutações já foram descritas em 22% dos casos de LMA, sendo mais frequente no subtipo M5 e, estão associadas com um pior prognóstico (SHAN & LICHT, 2011). Em pacientes pediátricos, alterações atingindo este gene foram descritas em uma frequência de 1.2% dos casos e estavam correlacionadas com a presença do rearranjo do gene *MLL* e com cariótipos normais (LIANG *et al.*, 2013).

As mutações em *ASLX1* foram principalmente descritas em neoplasias mielóides, sendo mais frequentemente encontradas em doenças mieloproliferativas. No entanto, a frequência desta mutação na LMA pode chegar a 17% dos casos, não tendo até o momento nenhuma correlação com os subtipos FAB. As mutações neste gene foram mais associadas até o momento com adultos, a presença da trissomia do cromossomo 8, mutações no gene *RUNX1* e a expressão de HLA-DR (TAKAHASHI., 2011). No estudo de Liang e colaboradores (2013), foi possível confirmar a baixa frequência desta alteração na população pediátrica, chegando a apenas 1,1% dos casos. No entanto, todos os pacientes apresentavam a t(8;21), mostrando uma possível correlação desta anormalidade citogenética e a presença da mutação neste membro da família Polycomb.

1.8- Genes do Complexo Polycomb

Como já foi dito anteriormente, além da presença de alterações genéticas que incluem mutações em genes supressores de tumor, em oncogenes e alterações cromossômicas nas neoplasias, também já se sabe que estas neoplasias podem apresentar mudanças epigenéticas que se caracterizam por um padrão alterado da expressão gênica gerado por mecanismos que não afetam a sequência de DNA primária. Essas alterações epigenéticas englobam várias alterações no nível de compactação da cromatina em células neoplásicas em comparação com as células normais, das quais estas células neoplásicas são derivadas. Essas alterações epigenéticas são compostas por perdas e ganhos do grupamento metil no DNA (Metilação do DNA), alterações no padrão de modificações pós-tradução das histonas (metilação, acetilação, fosforilação), mas também alterações nos fatores do complexo remodelador da cromatina (BAYLIN & JONES, 2011)(Fig 1.5).

As proteínas PcG foram primeiramente descritas em *Drosophila,* na qual são responsáveis pela manutenção da atividade dos genes *homeobox (Hox)* em segmentos apropriados durante o desenvolvimento de moscas. Essas proteínas agem como repressores destes genes, enquanto que as proteínas do grupo Trithorax (TrxG) agem como antagonista das proteínas PcG, mantendo a ativação em tecidos, nos quais, cada gene *HOX* foi inicialmente ativo (SCHUETTENGRUBER et al., 2011). Porém, os genes da família *CDX* também podem estimular a transcrição dos genes *HOX* através da sua própria ligação em lugares específicos ao longo dos *clusters* destes genes (HE *et al.,* 2011).



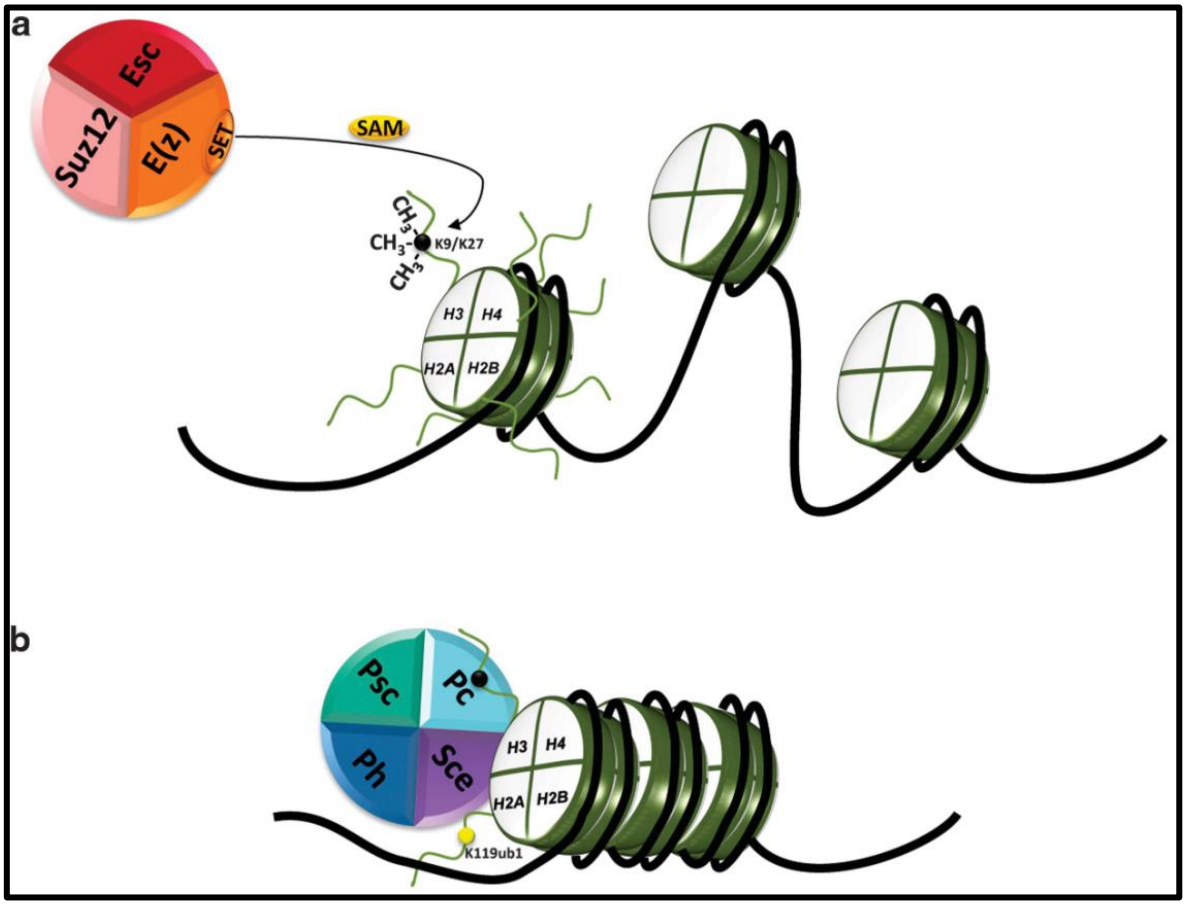
H3K27me3- trimetilação da lisina 27 da histona H3; H3K4me1-metilação da lisina 4 da histona H3; H3K36me3-trimetilação da lisina 36 da histona H3; H3K9me3- trimetilação da lisina 9 da histona H3; H3K9me2- dimettilação da lisina 9 da histona H3; H3K- lisina da histona H3; H4K- lisina da histona H4; HP1-*heterocronatin protein 1.*

Fonte: Modificado de Baylin & Jones, 2011

Figura 1. 5- Modelo da estrutura do epigenoma de células humanas normais

As proteínas PcG formam dois complexos, de constituição variável e dinâmica, que se ligam ao DNA e que desempenham funções envolvidas no silenciamento de genes durante a embriogênese, em processos de diferenciação normal de tecidos e na senescência de diferentes tipos celulares. Um dos complexos é composto pelas proteínas EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*), SUZ12(*supressor*

of zeste 12 homolog), EED (*embryonic ectoderm development*), os quais formam o núcleo do complexo PRC2 (*Polycomb-repressive complex* 2).O EZH2 tem a atividade de metiltransferase de histonas, podendo além de adicionar um grupamento metil, adicionar dois ou três ao aminoácido lisina da histona H3 (Fig 1.6).



SUZ12- supressor of zeste 12 homolog; Esc- Extra sex combs ; SAM- S-adenosyl methionine; E(z) SET- dominio SET do ennhancer of zest; H3- histona 3; H4- histona 4; H2A- histona 2A; H2B Histona 2B ; Psc- *Posterior sex combs; Pc-Dropholia Polycomb; Ph- Polyhomeotic; Sce-Sex comb extra*

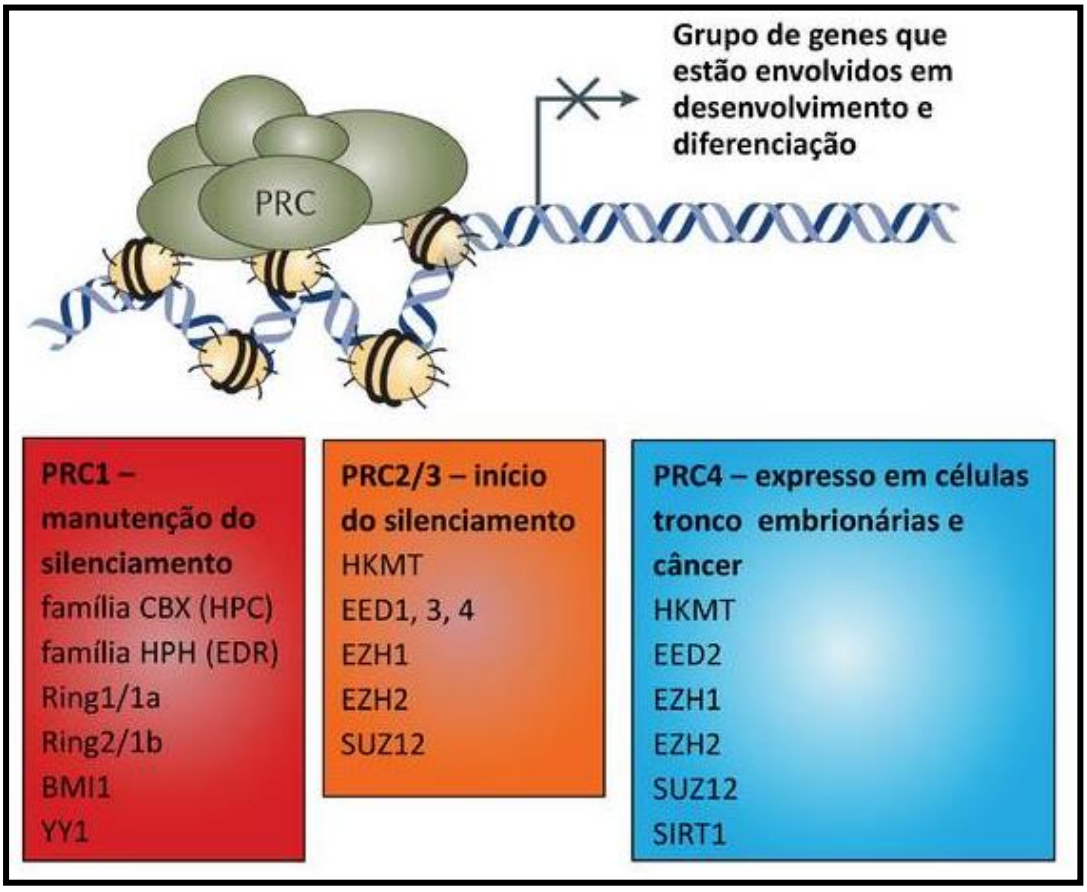
Fonte Radulovic e colaboradores (2013)

Figura 1.6- Modelo de silenciamento gênico mediado pelo complexo Polycomb. (a) PCR2 inicia a repressão gênica pela metilação da lisina 9 e 27 da histona H3(H3K9/H3K27) catalisada pela atividade histona metiltransferase EZH2 atraves de seu domínio SET, utilizando cofator SAM como doador de grupos metil. (b) Essa marcação H3K9/H3K27 é reconhecida especificamente pelo PRC1. A ligação do PRC1 pode levar a repressão gênica pela mono-ubiquitinização da H2A na lisina 119.

No entanto, a composição do PCR2 é variável. O padrão de expressão destes vários complexos depende do status de diferenciação e da linhagem celular envolvida (Fig. 1.7). Por exemplo, o PRC4 já foi detectado em células diferenciadas, mas não em células indiferenciadas, ou do status de célula normal/tumoral, como

por exemplo, o PRC4 já foi encontrado em células tumorais, mas não em células normais e diferenciadas (BAYLIN & OHM, 2006)

O segundo complexo, PRC1, é muito mais heterogêneo que o PRC2, mas o principal conjunto formador do complexo pode ser composto por RING1, RNF2, BMI1, MEL18 e as proteínas CBX. Porém, em alguns casos pode haver a presença do gene YY1. Acredita-se que este complexo tem a capacidade de reconhecer a adição do grupamento metil realizada pelo PRC2, H3K27me3, e, ser recrutado para o DNA em localizações genômicas apropriadas (Fig. 1.7). Esse complexo também pode ter diferentes composições com alvos distintos, dependendo do contexto celular, do tipo celular, do ciclo celular ou do estágio de diferenciação (BAYLIN & JONES, 2011)

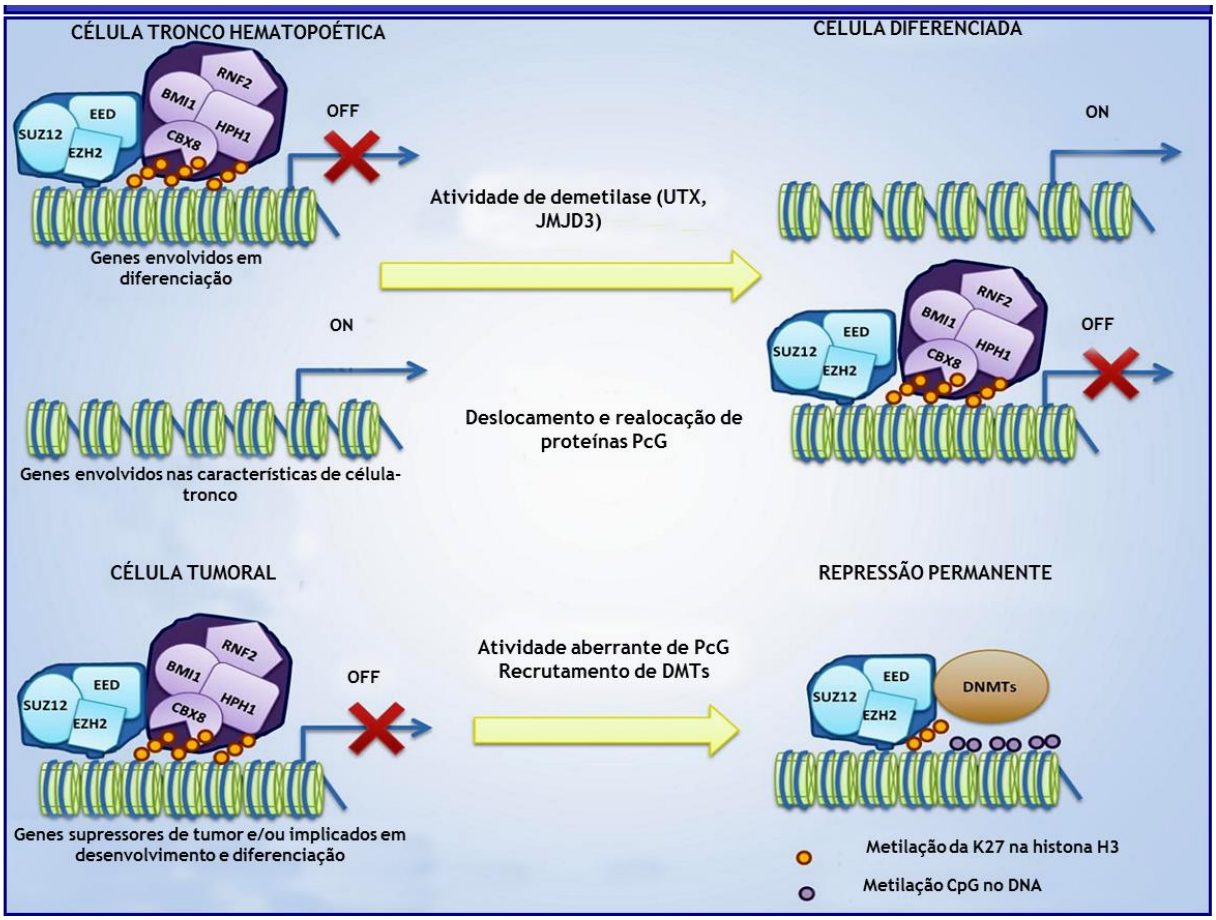


Fonte: Modificado de Baylin & Ohm, 2006

Figura 1.7- Os diferentes componentes dos 4 complexos Polycomb de silenciamento gênico. PRC- *Polycomb repressive complex*

Os genes Polycomb têm um papel importante na regulação da função hematopoética, já que, devido aos mecanismos epigenéticos controlados pelas proteínas PcG, o sistema hematopoético consegue gerar um número maciço de novas células sanguíneas durante toda a vida de um ser humano através de um número de células-tronco hematopoéticas que normalmente residem na medula

óssea e que passam por um constante balanço entre a auto renovação e a diferenciação celular (Figura 1.8)(RADULOVIC *et al,* 2013). Vários estudos vêm demonstrando nos últimos anos, que alterações genéticas, ou mesmo, alterações no nível de expressão dos genes dos complexos PcG podem gerar diferentes neoplasias linfoides e mieloides e, também tumores sólidos.



Fonte: Modificado de Martin-Perez *et al.,*2010

Figura 1.8- Mudanças na cromatina geradas pelos genes do Complexo Polycomb na promoção da diferenciação hematopoiética.

Alterações no PRC1, tais como, alterações do tipo mutações no gene *BMI1*(10p11) já foram descritas, pois muitos estudos tem tentando demonstrar como esta proteína consegue sustentar a auto-renovação das células-tronco hematopoéticas no ambiente medular. Oguro e colaboradores (2006), assim como, Liu e colaboradores (2009) conseguiram demonstrar o efeito protetor do *BMI1* na presença de estresse oxidativo e de dano ao DNA. Na ausência de *BMI1,* os níveis de espécies reativas de oxigênio foram elevados, resultando numa taxa aumentada

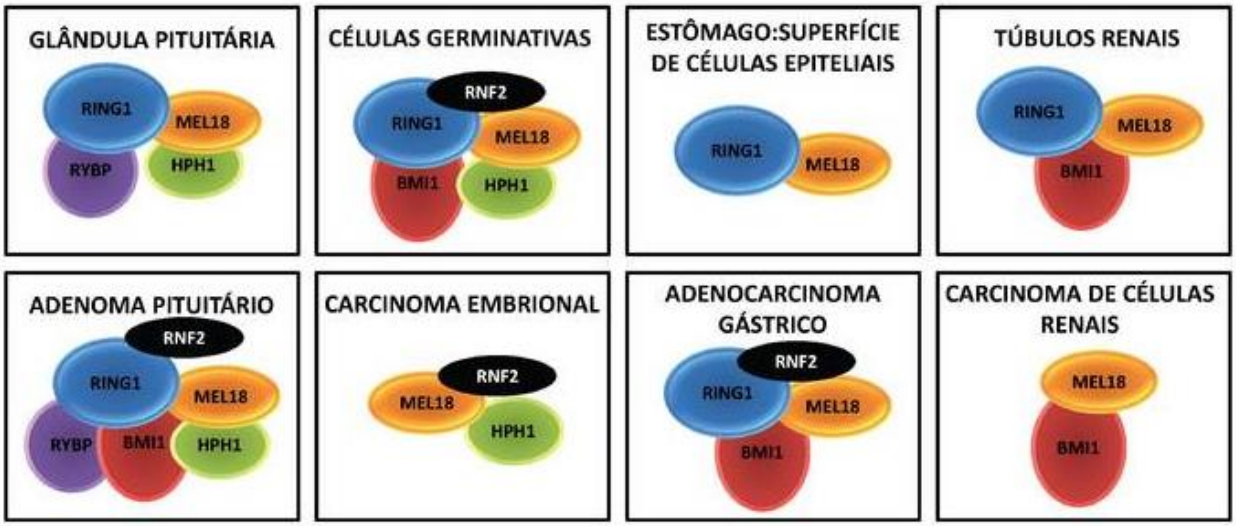
de apoptose e um reduzido número de células-tronco hematopoéticas, assim como uma diminuição da atividade dessas células.

Alterações em outros componentes PcG também afetam a função hematopoética, como por exemplo, a expressão aumentada de *EZH2(*7q35-q36), que confere um potencial de repopularização a longo prazo das células-tronco hematopoéticas, prevenindo o esgotamento após o stress replicativo destas células-tronco. A expressão de um alelo nulo de *EED*(11q14.2) ou a expressão de dois alelos hipomórficos, em camundongos, resulta em uma proliferação linfóide aumentada, uma parada no desenvolvimento durante a diferenciação dos timócitos e um risco aumentado de desenvolver tumores hematológicos. Por outro lado, deleções de MEL18 causam graves defeitos nos órgãos linfóides, enquanto que na medula óssea, a maioria das células hematopoéticas é substituída por adipócitos.

Alterações na expressão de *SUZ12(*17q11.2), que é outro componente do PCR2, já foram descritas na medula óssea de pacientes com leucemia mielóide crônica que estavam na fase blástica, mostrando diferenças nas diversas fases presentes neste tipo de leucemia (PIZZATTI *et al*., 2010). Alterações genéticas deste gene já foram descritas em outras neoplasias mielóides como as síndromes mielodisplásicas e em leucemias linfóides do tipo T (RADULOVIC *et al,* 2013).

Vários estudos têm demonstrado uma intrínseca relação entre as alterações em diferentes membros do complexo Polycomb e diferentes tipos de cânceres, como o câncer de próstata, de endométrio, linfomas, mas uma atenção maior foi dada às neoplasias hematológicas (Fig. 1.9) (SANCHEZ-BEATO *et al.,* 2006). Isso porque, vários estudos têm demonstrado o papel dos genes Polycomb na hematopoese anormal, regulando a proliferação/auto-renovação das células-tronco hematopoiéticas (MARTIN-PEREZ *et al.,* 2010; PAUL *et al.,* 2010; RICE *et al.,* 2007).

Além disso, mesmo com a demonstração da importância do complexo PcG para o funcionamento da célula hematopoética tumoral na LMC e/ou Linfomas, pouco ainda é conhecido sobre o funcionamento dos complexos Polycomb na LMA. Sendo assim, novos estudos se fazem necessários para melhor se conhecer o papel destes genes na LMA e, consequentemente, para o desenvolvimento de possíveis novas drogas que possam impedir a função deste complexo na LMA, facilitando a expressão de determinados genes que estariam silenciados (genes supressores de tumor) ou genes que, na verdade, não deveriam ser expressos (oncogenes).



Fonte: Modificado de Sanchez-Beato et al, 2006

Figura 1.9- Diferentes componentes dos complexos Polycomb em tecidos normais e tumorais.

1.9.Abordagem de novas tecnologias de larga escala em diferentes estudos de LMA

Como a LMA da infância é uma neoplasia bastante agressiva e que apresenta uma taxa de cura de somente 60%, muitos estudos vem tentando buscar um melhor entendimento desta neoplasia que tem como principal característica a sua heterogeneidade genética. Sendo assim, vários estudos utilizando tecnologias de larga escala vem sendo feitos por diversos pesquisadores em todo mundo. Radtke e colaboradores em 2009, para tentar identificar alterações genéticas na LMA pediátrica, realizaram uma análise utilizando plataformas de SNP *array* que tinha um poder de resolução de 100k e 500k e, puderam verificar que poucas alterações genéticas no número de cópias de 25 genes estudados, assim como, o número de perdas de heterozigosidade foi baixo. Surpreendentemente, somente 2,38 alterações no número de cópias dos genes estudados foram detectadas e, que menos de uma mutação em ponto por leucemia foi encontrada por paciente. Além disso, 34% dos casos estudados não apresentaram nenhuma alteração no número de cópias de genes identificáveis e 28% dos casos com anormalidades citogenéticas recorrentes não apresentaram nenhuma alteração numérica ou sequencial identificável.

Ding L e colaboradores (2012) conseguiram demonstrar que a presença de algumas mutações estavam relacionadas ao processo de recaída da doença, tais como, as mutações em genes *STOX2, SLC25A12, RIPK4, ABCD2, ETV6,WAC, STK4, GBP4, IDH2, DCLK1,* entre outras, em mais de 200 casos de LMA, utilizando

novas técnicas de sequenciamento completo do genoma humano. Com isso, já foi possível inferir que algumas dessas mutações possam ter algum papel na resistência às drogas usadas para o tratamento da LMA. No entanto, quando o sequenciamento agora é feito somente em regiões codificantes do DNA, Yan e colaboradores (2011) puderam mostrar que cerca de 1/5 das LMA-M5 apresentam mutações recorrentes no gene *DNMT3A*, confirmando um estudo anterior em blastos CD34+ de LMA e em desordens mieloproliferativas que também apresentaram este tipo de substituição (YASHAMITA *et al.,* 2010).

Embora existam várias tentativas de se identificar as alterações genéticas nos diferentes subgrupos citogenéticos, parece que estas alterações genéticas não são suficientes para explicar a diversidade biológica da LMA. Vários estudos vêm tentando identificar assinaturas moleculares de subgrupos da LMA e conseguiram identificá-las, baseado em um padrão mais global de expressão gênica, para os diferentes casos que apresentavam alterações citogenéticas recorrentes (WOUTERS *et al.,* 2009; MILLER & STAMATOYANNOPOULOS, 2010). No entanto, pouco ainda se sabe da significância deste resultado para os eventos envolvidos no processo de leucemogênese e para a progressão da doença. É necessária a realização de mais estudos, principalmente estudos prospectivos com uma grande coorte para os atuais resultados serem confirmados.

Vários estudos tem tentado demonstrar o papel das alterações epigenéticas no processo leucêmico. Figueroa e colaboradores (2010) conseguiu identificar 45 genes que apresentavam um perfil de metilação aumentado que era comum para todos os subtipos da LMA. Além disso, foi possível identificar que o status de metilação do DNA de genes específicos pode ajudar na predição de sobrevida de pacientes com LMA, sugerindo que biomarcadores de metilação do DNA deveriam ser avaliados juntamente com outros aspectos em futuros estudos.

Outros trabalhos tentaram demonstrar um perfil de assinaturas epigenéticas nos definidos subgrupos citogenéticos, mostrando que um perfil de metilação do DNA existe tanto para estes subgrupos citogenéticos quanto para os subgrupos com diferentes alterações moleculares. Sendo assim, aqueles grupos que apresentaram a t(8;21), a inv(16) e a t(15;17) e suas respectivas proteínas de fusão, teriam um perfil de metilação único, mesmo quando mutações no gene *c-kit* estavam presentes. Já os casos que apresentaram cariótipo normal foram separados em 5 diferentes grupos de acordo com os aspectos clínicos e morfológicos. Cada um destes grupos apresentou um perfil de metilação diferente, que depois foi

correlacionado com a expressão aberrante de genes envolvidos em vias de sinalização do sistema imune, na via do p53, na via de reparo de DNA e na regulação do ciclo celular (ALVAREZ *et al.,* 2010; DENEBERG *et al.,* 2011).

A descoberta do papel dos microRNAs na diferenciação hematopoética, na regulação epigenética, na apoptose e na resistência a múltiplas drogas, fez com que vários estudos, desde 2009, tentassem demonstrar as assinaturas moleculares também para os microRNAs nas LMAs (KIM *et al*., 2009; SCHOTT *et al*., 2012; PLASS *et al.,* 2008), sendo possível agrupar as leucemias com alterações cromossômicas nos genes *CBF* em um único grupo com um perfil característico. No entanto, os casos que apresentaram alterações genéticas nos genes *NPM1, CEBPA* e *FLT3* apresentaram um perfil distinto. Muitos trabalhos ainda são divergentes quanto aos perfis de microRNAs nos diferentes grupos genéticos da LMA, principalmente porque muitos estudos utilizam diferentes métodos de extração deste RNAs, assim como, o tipo de normalização utilizada (SECA *et al.,* 2010). Por isso, mais estudos são necessários em uma maior coorte de pacientes melhor caracterizados geneticamente.

Mais recentemente, com as análises de sequenciamento de nova geração para o DNA metilado,Marcucci e colaboradores (2013) conseguiu demonstrar que os promotores de genes envolvidos com adesão celular, reorganização de citoesqueleto, entre outros, que estavam diferencialmente metilados podem estar associados com a sobrevida do grupo citogenético que apresenta cariótipo normal na LMA, mas com alterações moleculares importantes, como mutações no gene *NPMI1.* Enquanto que, Saied e colaboradores (2012) puderam verificar que essas alterações não estavam presentes somente nos promotores, mas em regiões de DNA repetitivo de casos com t(8;21), t(15;17), cariótipo normal e trissomia do cromossomo 8.

Apesar do grande progresso no entendimento da patogênese da LMA, muitos estudos vêm tentando buscar um melhor entendimento desta neoplasia para melhorar o prognóstico e identificar novos alvos terapêuticos. Porém, como foi dito anteriormente, muitos desses estudos ainda não conseguiram correlacionar os seus achados com a prática clínica. Por isso, torna-se importante mais estudos na LMA da infância para que se possa entender melhorar a biologia desta neoplasia tão rara nesta faixa etária.

2.Objetivo

Realizar uma análise citogenética e de expressão dos genes do complexo *Polycom* em crianças diagnosticadas com LMA para contribuir para o entendimento da biologia desta doença.

2.1.Objetivos específicos:

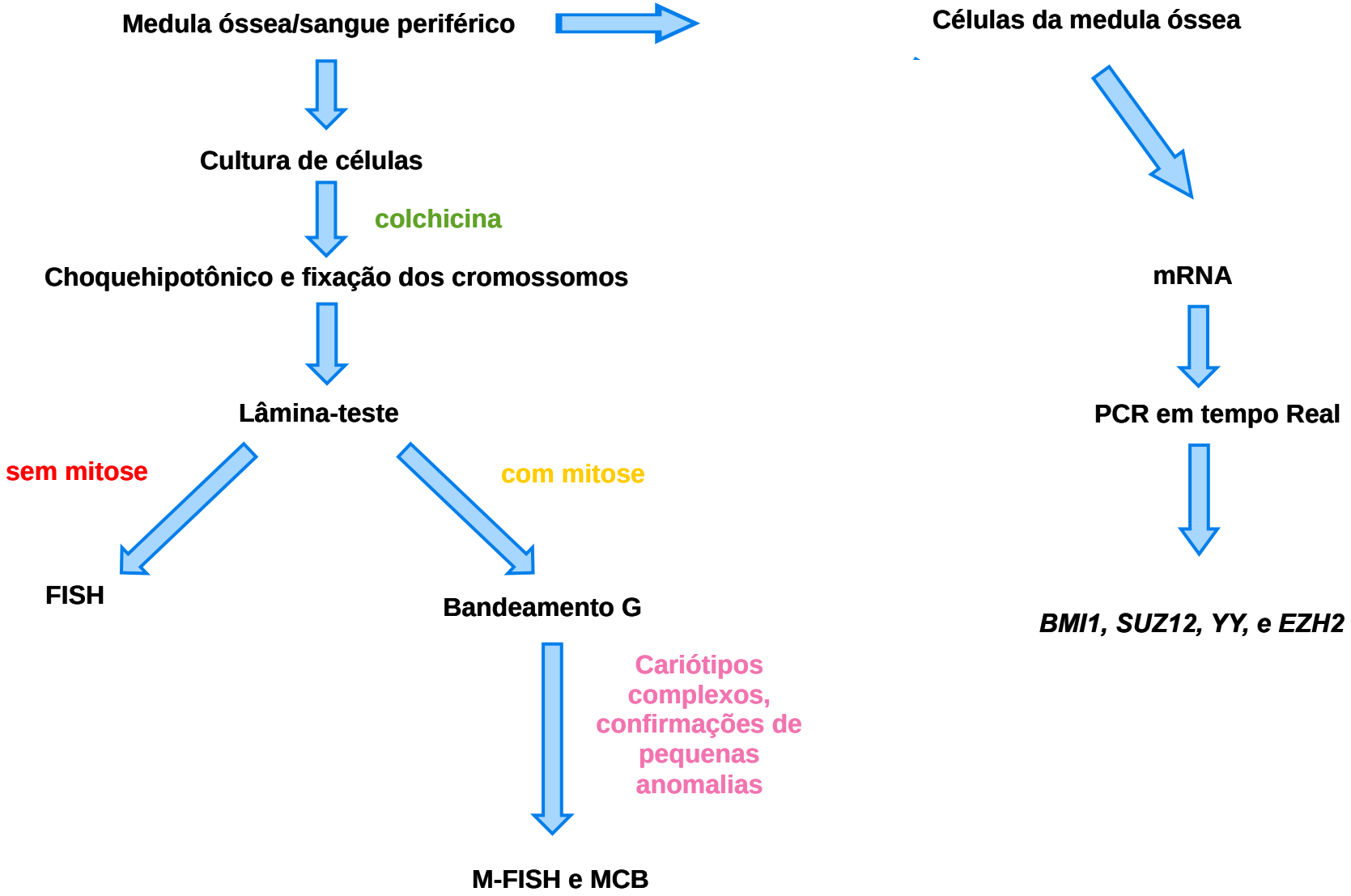
a) Definir o cariótipo de 84 crianças com LMA da infância utilizando técnicas de citogenética convencional e molecular (FISH, *multicolo*r FISH e MCB).

b) Análise da expressão de determinados genes dos complexos *polycomb*: *BMI1, SUZ12, YY1 e EZH2* nas células de medula óssea de pacientes pediátricos por PCR em Tempo Real, comparando com a medula óssea de pacientes normais.

c) Relacionar os dados clínicos, citogenéticos e moleculares para definir subtipos de LMA primária da infância de importância prognóstica.

3. Materiais e Métodos

3.1.Desenho Metodológico



3.2. Amostra

As amostras de medula óssea utilizadas foram provenientes de diversas unidades hospitalares do Rio de Janeiro e outros estados do Brasil durante o período de abril de 2007 a março de 2013. As amostras incluídas foram de pacientes do próprio INCA(RJ), do Hospital da Lagoa(RJ), do Hospital dos Servidores(RJ), do Hospital ONCOSUL(BA), da Santa Casa de Misericórdia de Itabuna (BA), IPPMG(RJ), do Hospital Pequeno Príncipe(SC) e do Hospital de Jaú (SP) que apresentaram de 0 a 18 anos de idade no momento do diagnóstico de LMA, sem nenhum tipo de tratamento. Foram excluídas as amostras de medula óssea de pacientes que tinham mais de 18 anos de idade ou que tivessem um diagnóstico diferente de LMA *de novo*.

Os diagnósticos clínicos, de citoquímica, de imunofenotipagem e de morfologia foram fornecidos pelos hematologistas das instituições de internação dos pacientes.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do INCA, número 088/07.

3.3. Estudo Cromossômico por Bandeamento G

Os estudos cromossômicos foram realizados em aspirado de medula óssea e/ou sangue periférico dos 84 pacientes, utilizando técnicas de obtenção e identificação cromossômica descritas por Silva e colaboradores (2008).

Para obtenção de mitoses, foram cultivadas 5 x 10^6 células em 5ml de meio de cultura composto de RPMI 1640 (80%) e soro bovino fetal (20%) em tubos Falcon. As células foram incubadas durante 24 horas em estufa a 37°C. Após 22 - 23 horas, foi adicionada uma solução colchicina (Difco) numa concentração de 0,05μg/ml. Ao término do período de incubação seguiu-se a retirada da cultura e preparo das lâminas.

Após o período de 24 horas de incubação as células foram centrifugadas e o precipitado obtido foi submetido a choque hipotônico utilizando uma solução de KCl a 0,07M em banho-maria a 37ºC. Após 15 minutos as células foram fixadas três vezes em solução de Carnoy (3 metanol : 1 ácido acético glacial). Na primeira fixação, o material foi deixado à temperatura ambiente por 20 minutos. Na última fixação, o material foi ressuspenso em um pequeno volume de fixador para preparo das lâminas pingando-se uma gota da suspensão em lâmina limpa e umedecida. Uma lâmina de cada tubo Falcon foi observada em microscopia para verificação dos

resultados e então o material foi estocado na geladeira para posterior análise cromossômica.

Para análise cromossômica, as lâminas de 2 - 10 dias de preparo foram incubadas numa solução de tripsina 0,1% aquecida a 37°C em tempos que variaram de um segundo a um minuto. Em seguida as lâminas foram lavadas com soro fisiológico e coradas em solução de *Giemsa* (Merck) a 2% em tampão fosfato (pH 6,8), por 10 minutos.

O padrão cariotípico dos pacientes foi determinado pela análise de uma média de 20 células metafásicas em microscopia ótica. Um caso foi considerado anormal quando mais de três células apresentarem a mesma anomalia cromossômica. A presença de células normais concomitantes com as anormais foi usada como parâmetro para eliminar a possibilidade de uma anomalia cromossômica constitucional. Nos pacientes que apresentarem, na análise cromossômica, 100% de células anormais com anomalias cromossômicas não recorrentes e naqueles portadores de anomalias cromossômicas dos cromossomos X e Y, a eliminação de anomalias constitucionais foi determinada pela análise cariotípica do sangue periférico estimulado por fitohemaglutinina segundo Hungerford (1965), quando o paciente estava em remissão da doença.

A documentação dos cariótipos foi realizada no computador por um programa analisador de imagem (Ikaros-MetaSystem), utilizando-se para isso, uma câmera CCD acoplada ao microscópio Olympus BX51.

Os cromossomos foram identificados e classificados de acordo com os sistemas internacionais para nomenclatura de citogenética humana de 2013 (ISCN, 2013).

3.4. Citogenética molecular

3.4.1.FISH e M-FISH

Para investigação de rearranjos moleculares, pela técnica FISH, foram utilizadas sondas comerciais de seqüência homóloga de DNA para *loci* específicos LSI *AML1/ETO, CBFβ/MUH11, PML/RARα,* o gene *MLL* (Vysis,Inc) e sondas específicas para translocações complexas não recorrentes. Além disso, nos casos em que foi detectada a presença de cromossomos marcadores ou de rearranjos crípticos, foram utilizados diferentes conjuntos de sondas para a técnica do mFISH

("multicolor FISH") que consiste na utilização simultânea de pelo menos três diferentes ligantes ou fluorocromos para a marcação específica de DNA.

A técnica de FISH foi aplicada no restante do material das culturas, mantidas em fixador sob refrigeração. Depois de preparadas, as lâminas foram mantidas por dois dias à temperatura ambiente, pré-tratadas por imersão em 2X SSC, pH 7,0 a 37°C por 20 min, seguidamente pela solução de pepsina 0,005% por 10 min. Depois as lâminas foram submetidas a soluções de PBS 1x por 3 min e formaldeído por 10 min e, em seguida, as lâminas foram desidratadas em série de etanol 75%, 85% e 100% por dois minutos em cada álcool. Para a hibridação, 8µl da sonda (5,6µl de tampão de hibridação; 1,9µl de água; 0,5µl de sonda) foram colocadas sobre as lâminas e cobertas com lamínulas de vidro de 25x25mm e vedadas com borracha selante, sendo mantidas aquecidas em placa térmica a 75°C por sete minutos.

Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas em um banho de 2XSSC 0.001% /Tween pH 7,0 a 72ºC por 2 minutos e, um segundo banho de imersão em 2X SSC, por 2 minutos. Para análise, foi usado a contra coloração com DAPI II. A análise pelo FISH foi feita em microscópio de fluorescência Olympus BX51 munido de lâmpada HBO 100W e filtros apropriados. A documentação foi realizada através de uma câmera CCD e analisador de imagem (Isis da MetaSystem).

3.4.2. MCB

Para a investigação de rearranjos crípticos[1] e a confirmação de cariótipos anormais, a técnica de MCB foi realizada a partir de sondas que foram geradas pelo processo de microdissecção de regiões específicas dos cromossomos, como descrito previamente (LÜDECKE *et al*, 1989; SENGER *et al,* 1990). Cada uma das sondas foi baseada em um número de fragmentos cromossômicos que variou de 15 a 20 fragmentos que foram retirados de cada cromossomo, intencionalmente, de forma imprecisa, para que eles se sobrepusessem. Com isso, foram geradas 169 sondas de regiões específicas que cobrem todo o genoma humano (LIEHR & CLAUSSEN, 2002; LIEHR *et al* 2002; WEISE *et al.,* 2008).

O DNA isolado foi, então, amplificado pela técnica DOP-PCR (TELENIUS *et al*, 1992). A reação de PCR original foi feita em um volume de 50µl da amostra inicial. Desta amostra, um volume de 0.5µl foi re-amplificado e um volume de 50µl foi

[1] Crípticos: ocultos

obtido no final. Depois esse processo foi repetido e, então, foi feita a marcação das sondas com 5 diferentes fluorocromos: *SpectrumOrange, Rhodamine 110, TexasRed, Cyanine 5* e *Cyanine 5.5*. Essa marcação também foi feita pela técnica de DOP-PCR. Com isso, de 2 a 10 bibliotecas de sondas foram criadas para cada cromossomo. Essas sondas quando sobrepostas criaram um padrão de pseudocores para cada um dos 24 cromossomos humanos. A técnica de MCB é baseada na mudança da taxa de intensidade de fluorescência ao longo dos cromossomos.

O processo de hibridização, a pós-lavagem e a detecção do sinal foram feitos de acordo com os experimentos realizados para a técnica de FISH. Os resultados da hibridização foram documentados em um microscópio de fluorescência da Zeiss Axioplan equipado com o sistema de análise de imagem Ikaros e Isis de imagem digital para FISH (MetaSystem), utilizando uma câmera XC77 CCD.

3.5.Estudos Moleculares

3.5.1.Obtenção de células da Medula Óssea

Para a obtenção de células mononucleares de medula óssea ou sangue periférico, as amostras do aspirado foram submetidas a uma centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente para a separação do plasma. Depois o pellet de células foi lavado com PBS 1X e novamente centrifugado por 5 minutos. Em seguida, foi adicionada duas vezes a solução de lise de hemácias (10mM Tris pH 8.0, 5mM MgCl2, 10mM NaCl), submetido a nova centrifugação a 1000 rpm por 1 minuto novamente a temperatura ambiente tendo seu sobrenadante descartado. O pellet de células foi separado e a partir dele foi preparado, o RNA, assim como, o DNA.

3.5.2.Extração de RNA

A extração do RNA total foi feita utilizando o reagente TRIzol conforme as instruções do fabricante (Invitrogen). O RNA extraído foi quantificado e armazenado para posterior reação de PCR.

Resumidamente, após a adição do Trizol na proporção de 10^7 células/ml de Trizol, as células foram homogeneizadas e incubadas por 5 min a 25°C. As suspensões foram centrifugadas por 10 min a 12.000g e 4°C, e o sobrenadante foi passado para microtubo de 1,5 mL novo, a fim de eliminar restos celulares. Ao

sobrenadante foram adicionados 200µL de Clorofórmio P.A. para cada 1mL de Trizol, e em seguida as soluções foram misturadas vigorosamente por 15 seg em vórtex de bancada e incubadas por 2 a 3 min a 25°C. Os tubos foram então centrifugados por 15 min a 12.000g e 4°C, e a fase aquosa do sobrenadante foi passada para um microtubo novo. Foram adicionados então 500µL de Isopropanol P.A. para cada 1ml de Trizol, e o tubo mantido na temperatura ambiente por 15 min. Após a incubação, o material foi centrifugado por 10 min a 12.000g a 4°C, e o sobrenadante descartado. O sedimento (RNA) foi reconstituído em 30µL de água tratada com DEPC (Dietil Pirocarbonato – Sigma-Aldrich).

Para a quantificação da massa de RNA extraída das culturas, foi realizada análise em espectrofotômetro *NanodropND-100* (*Thermo Scientific*, EUA) a 260nm.

3.5.3.Tratamento com DNAse e transcrição reversa do RNA

Depois da extração de RNA, as amostras foram incubadas com DNAse para remoção de restos de moléculas de DNA remanescentes da extração de RNA. Para tal, foi utilizado a DNAse *amplification grade I* (Invitrogen), segundo a Invitrogen™. Cerca de 2 µg de RNA total foram incubados com 1U de DNAse e 1X de Tampão DNAse 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl) e ajustado o volume total de 6µL com água DEPC, durante 15 min a 25°C. A reação foi interrompida adicionando 1 µL de EDTA 25 mM e incubando a 65°C por 10 min no termociclador MyCycle (BioRad®).

Os cDNAs foram sintetizados utilizando-se 1µg de RNA, com 1µL de *mix* de dNTPs (10 mM de cada, Invitrogen), 1µL de *Annealing buffer* em volume final de 8µL incubando por 5 min durante 65°C, seguido de incubação no gelo por 1 min. Posteriormente, adicionou-se 10µL de 2x *First-Strand Reaction Mix* e 2µL de SuperScript™ III/RNaseOUT™/Enzyme Mix incubando a 50ºC durante 50 min.

3.5.4. Níveis de expressão dos genes Polycomb por RT-qPCR

O nível de expressão de *BMI1, YY1, SUZ12, EZH2* e *β-actina* (gene de referência), da medula óssea dos pacientes, foi analisado através da técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR), utilizando o sistema de detecção por SYBR Green. Os iniciadores foram desenhados usando o programa OligoAnalyzer

(http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/), e estão dispostos na tabela 3.1.

Tabela 3.1- tabela contendo as seqüências dos iniciadores usados para amplificação dos genes em questão, tamanho dos amplicons e localização no mRNA.

Gene	*Tm*	*Amplicon*	Localização	Posição	Seqüência
SUZ12	59°C	197 pb	Éxon 2	Fow	5'AGCAAATCCAGGTTGGCGATGA3'
			Éxon 2	Rev	5'TGCATTGCCCTTGGTGTACTCT3'
EZH2	58°C	123 pb	Éxon 13	Fow	5'TTGTGACAGTTCGTGCCCTTGT3'
			Éxon 14	Rev	5'TGCTTGGTGTTGCACTGTGCTT3'
BMI1	56°C	104 pb	Éxon 14 e 15	Fow	5'ATGTGTGTGCTTTGTGGAGGGT3'
			Éxon 15	Rev	5'TTGCTGGTCTCCAGGTAACGAA3'
β-act	59°C	86 pb	Éxon 5	Fow	5´ACCTGAGAACTCCACTACCCT3´
			Éxon 6	Rev	5´GGTCCCACCCATGTTCCAG3´

Esta técnica é baseada na detecção de uma molécula fluorescente – SYBR Green I – que se liga a moléculas dupla-fita. Durante a reação, a fluorescência aumenta a cada novo ciclo de polimerização e através de um limiar (*threshold*) comum a todas as amplificações, todas as amostras puderam ser comparadas. Este limiar é definido no início da fase exponencial da reação de PCR, quando a quantidade de produto formada traduz de forma satisfatória a concentração inicial de fitas-molde (cDNA). A confirmação da especificidade da amplificação é determinada pela temperatura de dissociação (temperatura do *melting*-*Tm*) por meio da análise da curva de dissociação (*melting curve*), onde cada fragmento amplificado possui uma *Tm* específica.

As RT-qPCRs foram realizadas com auxílio do *Power SYBR Green PCR Master Mix*® (Applied Biosystems), no termociclador *Rotor-Gene 6000* (Corbett). As análises foram realizadas com auxílio do programa *Rotor-Gene 6000 Series Software* (Corbett). Os níveis relativos de mRNA foram obtidos através do método de Livak e Schmittgen(2001).

A análise da expressão gênica por RT-qPCR utilizada representa uma quantificação relativa dos genes de interesse. Para controle endógeno, foram

utilizados iniciadores específicos para a β-actina, um gene expresso constitutivamente, sendo utilizado como normalizador.

3.6. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o GraphPad Prism 5.0(GraphPad Software Inc) . Múltiplas comparações foram feitas usando o ANOVA *test*, enquanto que comparações de somente dois grupos foram feitas usando o *test T student.* Os valores de $P<0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. Resultados

Neste estudo, foram estudados por técnicas de citogenética convencional e molecular 84 pacientes, sendo 51 do sexo masculino e 31 do sexo feminino. Destes 84 pacientes, 52 puderam ser estudados pelas técnicas moleculares propostas neste trabalho. A mediana de idade dos 84 paciente foi de 9 anos, variando de 0-18 anos de idade.

4.1. Subtipos morfológicos encontrados no estudo

Dentre os 8 subtipos FAB descritos para a LMA, o subtipo M0 foi encontrado em 6 casos, o subtipo M1 em apenas 13 casos e o subtipo M2 em 10 casos. Já o subtipo M3 foi o mais frequente neste estudo, sendo encontrado em 29 casos. O subtipo M4 foi encontrado em apenas 6 casos, sendo dois deles com a presença de eosinófilos e o subtipo M5 em 17 casos. O subtipo M7 foi encontrado em apenas 2 casos neste estudo. Já o subtipo M6 não foi observado neste estudo. Porém, 1 caso se apresentou como sarcoma mielóide (Fig. 4.1).

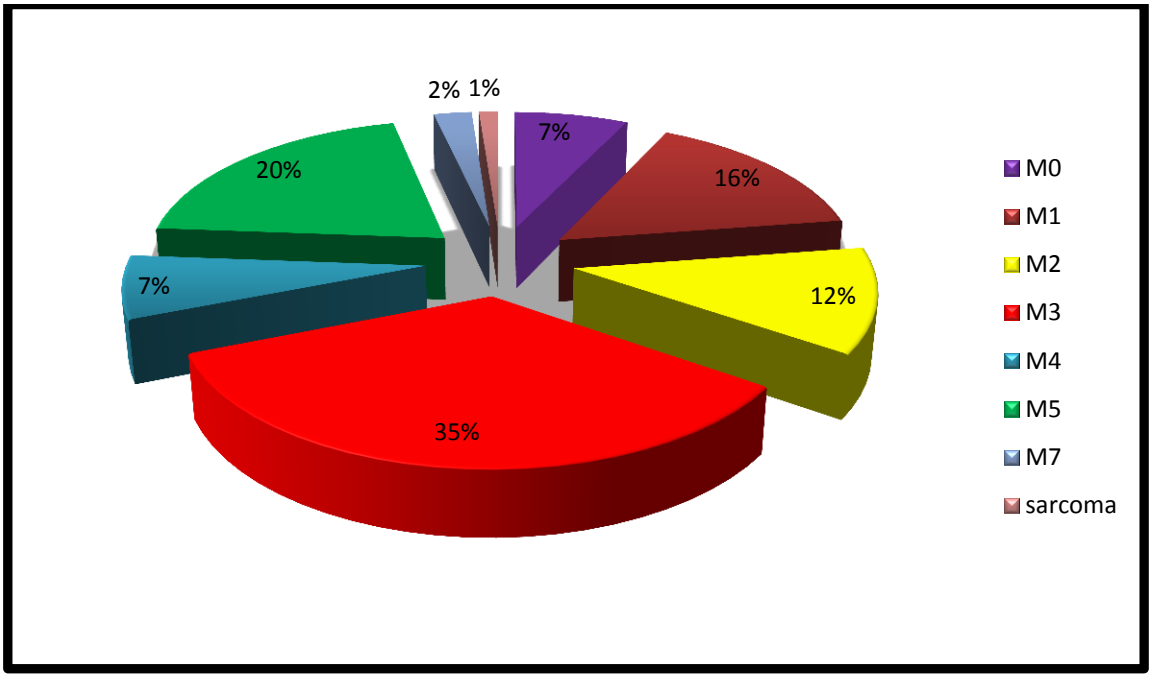


Figura 4.1 – Frequência dos subtipos morfológicos FAB encontrados neste estudo

Quase todos os subtipos FAB apresentaram uma correlação entre as idades dos pacientes, sendo mais frequentes ou menos frequentes em uma determinada faixa etária. Quatro subtipos FAB foram mais frequentemente observados em crianças com idade menor que 10 anos: os subtipos M1 (n= 8; 27%), M4 (n=6; 21%),

M5 (n=13; 45%) e M7(n=2; 7%), enquanto que, os subtipos mais frequentes em crianças maiores que 10 anos de idade foram: subtipos M0 (n=4; 15%) M2 (n=7; 27%) e M3 (n=15; 58%) (Fig 4.2).

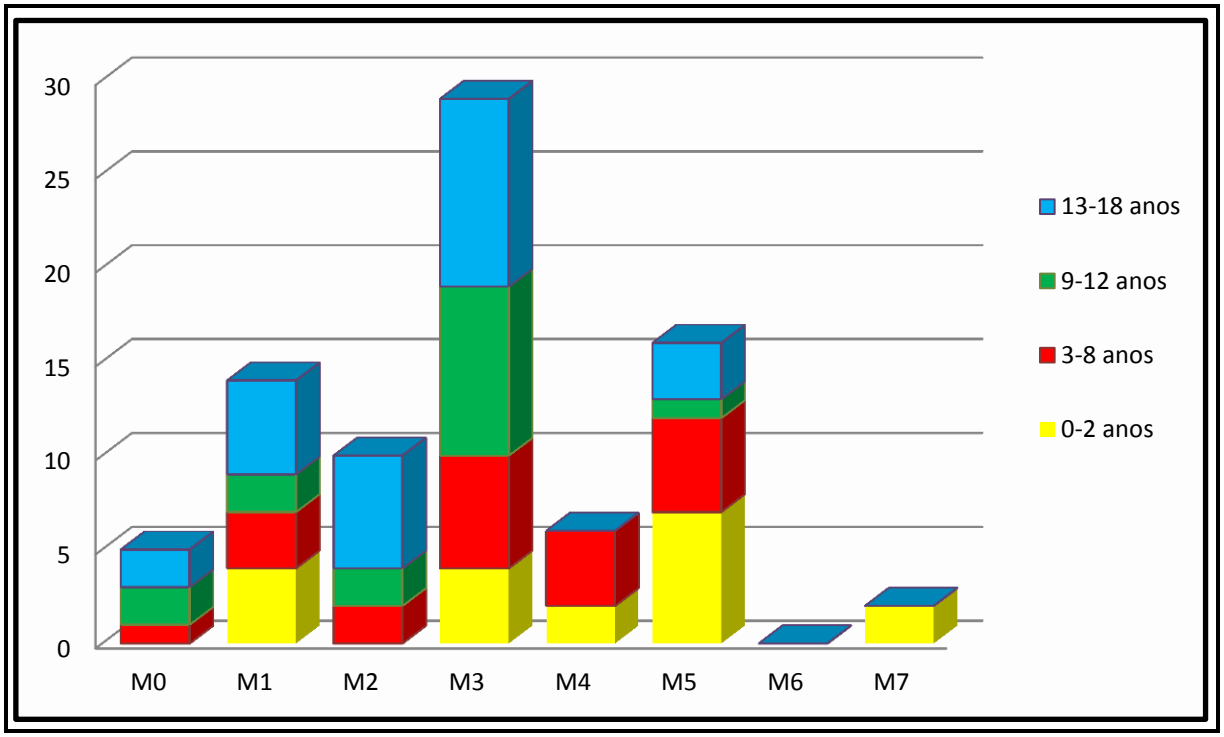


Figura 4.2.- Distribuição dos subtipos FAB nas diferentes faixas etárias encontradas neste estudo. M1, M2, M3, M4, M5- subtipos FAB.

4.2. Padrão cariotípico por Bandeamento G

Neste presente estudo de 84 pacientes, 74 (88%) apresentaram índice mitótico adequado para a análise citogenética convencional. Em 10 pacientes, não foi possível a realização da análise pela citogenética convencional devido à ausência de metáfases e/ou ao pobre índice mitótico (12%). A análise citogenética dos 74 pacientes, pela citogenética convencional, mostrou: 12 (16%) pacientes com cariótipos normais e 62 pacientes apresentaram aberrações cromossômicas (84%). Dos 62 pacientes com cariótipos anormais, 45 (71%) apresentaram anormalidades recorrentes e 18 (29%) apresentaram anormalidades não recorrentes (Fig 4.3).

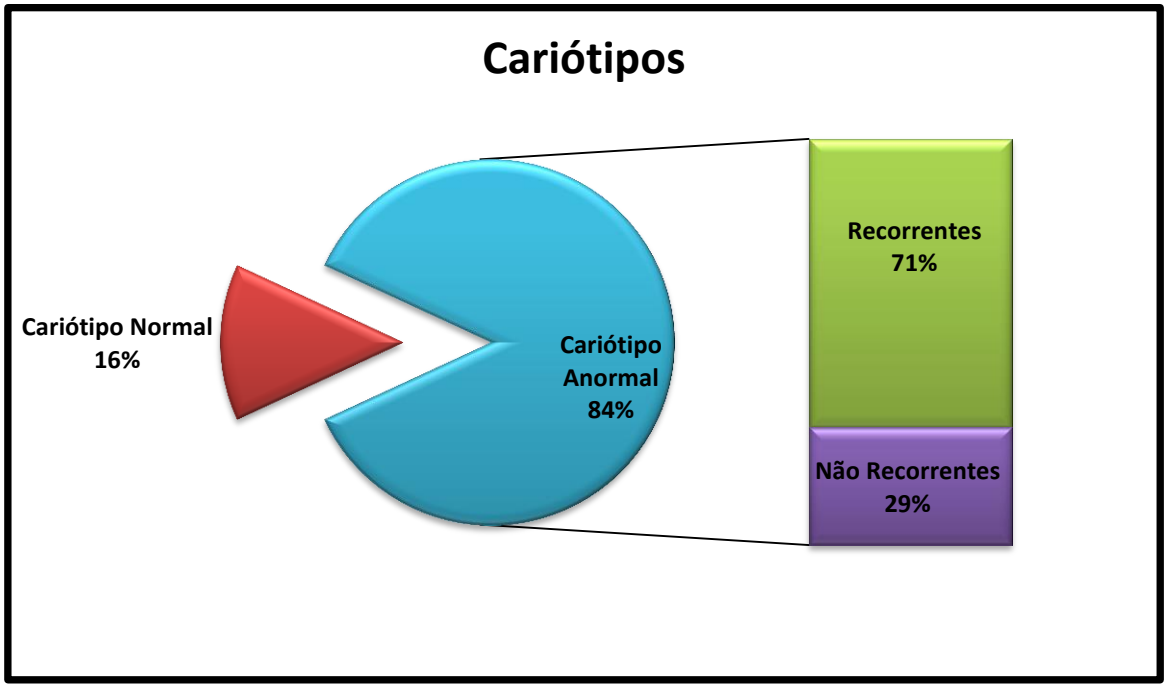


Figura 4.3– Comparação das frequências de cariótipos normais e anormais encontrados e das frequências das anormalidades recorrentes e não-recorrentes encontradas neste estudo.
Cariótipo normal - não apresentou anormalidades citogenéticas, cariótipo anormal apresentou anormalidades citogenéticas. Anormalidades recorrentes- t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q21;q12), inv(16)(p13q22) e anormalidades envolvendo a região 11q23. Anormalidades não-recorrentes –todas as que não foram descritas como recorrentes.

4.3. Refinamento citogenético das aberrações genéticas encontradas no estudo

4.3.1.Com a utilização do FISH

Para aqueles casos em que não foi obtida metáfase e havia material com preparação cromossômica disponível foi realizada a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência. Entre as 10 amostras que não apresentaram índice mitótico, em 7 foi possível realizar a técnica de FISH, porém 3 não foi possível devido a ausência de material de preparação cromossômica. Entre estes 7 pacientes, 5 eram do subtipo morfológico M3 e foi testado a presença do rearranjo gênico entre os genes *PML e RARA.* Somente 4 pacientes mostraram a presença da fusão gênica *PML-RARA*. A figura 4.4 demonstra o resultado esperado em um caso com a presença desta fusão. Os outros dois pacientes eram do subtipo M5 e do subtipo M7, nos quais foram testados possíveis rearranjos do gene *MLL* que se confirmaram somente no caso do subtipo morfológico M7. Com isso, foi possível a recuperação de 50% dos casos que não apresentaram índice mitótico para a análise citogenética.

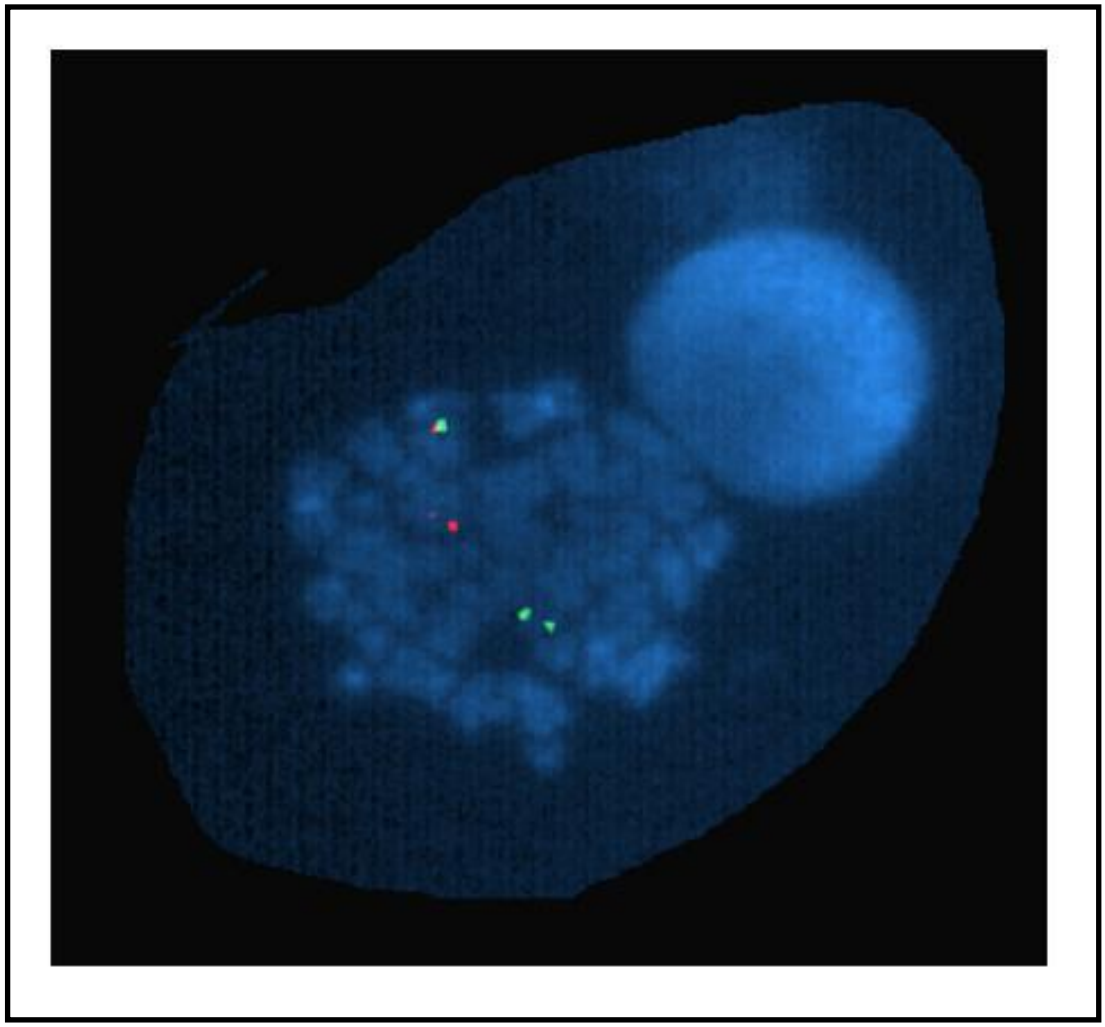


Figura 4.4 – Hibridização *in situ* por fluorescência ilustrando o rearranjo gênico *PML/RARA* em uma metáfase.
Sonda *Dual Color (Vysis):* sinal verde – hibridização na região gênica q22 do cromossomo 15 (*PML*). Sinal vermelho- hibridização na região q12 do cromossomo 17 (*RARA*). Os dois sinais juntos demonstram o rearranjo *PML/RARA*

Nos casos dos pacientes do subtipo M3 que apresentaram cariótipo normal por bandeamento G, a técnica de FISH foi aplicada, utilizando a sonda *locus* específica para o rearranjo *PML/RARA.* Nos 7 casos que apresentaram cariótipo normal, 3 foram positivos para a fusão gênica *PML/RARA,* enquanto 3 casos foram negativos para a rearranjo entre os genes *PML* e *RARA.* Esses dados estão resumidos na tabela abaixo (Tabela 4.1).

Tabela 4.1- Casos de LMA-M3 que apresentaram cariótipo normal pela técnica de citogenética convencional

Paciente	Subtipo FAB	Citogenética Convencional	Citogenética Molecular
13	LMA-M3	46, XX [22]	*NF*
30	LMA-M3	46, XX [40]	*PML/RARA negativo*
49	LMA-M3	46, XX [15]	*PML/RARA*
50	LMA-M3	46, XX [12]	*PML/RARA*
68	LMA-M3	46, XY [20]	*PML/RARA negativo*
74	LMA-M3	46, XX [20]	*PML/RARA negativo*
79	LMA-M3	46, XY [25]	*PML/RARA*

4.3.2. Com a utilização do Multicolor FISH (mFISH)

As técnicas de mFISH foram realizadas naqueles casos que apresentavam cariótipos complexos ou rearranjos crípticos para que pudessem ser revelados esses rearranjos ocultos a técnica de Bandeamento G e os exatos pontos de quebra que esses rearranjos geravam. Para isso foram utilizadas sondas de diferentes tipo: WCP (*Whole Chromosome Painting*), PCP (*Partial Chromosome Painting*), sondas de *Multiplex* FISH (M-FISH), sndas clonadas em BAC (*Bacteria Artificial Chromosome*) e os MCBs de todos os cromossomos.

Essas técnicas foram utilizadas em conjunto na maioria dos 13 casos que estão descritos na tabela 4.1.

Tabela 4.2 – Anormalidades Citogenéticas reveladas por Bandeamento G e mFISH

t- translocação; del-deleção; inv- inversão; ins- inserção; p- braço curto do cromossomo; q- braço longo do cromossomo

Paciente	Citogenética Convencional	Citogenética Molecular
19	46, XY, del(9)(q31), t(X;11)(p22;q22) [11]/ 46, XY [9]	46,XY, del(9)(q12q31),del(11)(q13or q14)[4]/ 46,XY, del(9)(q12q31)[2]/46,XY[7]
20	46,XY, inv(16)(p13q22), +19,-22 [18]/ 46, XY [4]	46, XY, inv(16)(p13q22), dic(22)(qter->p10::p10->qter)
24	44, XX, ?der(4), -5, -7, -10,?dic(13), -15, +2mars	44, XX, der(5)t(5;19)(q13.3q12), t(6;18;17)(q24.3;q21;q23.2), der(7)t(7;13)(p11.2;q120, der(10(7qter->7q11.23::12q22->12q21.2::10p14->10q21::12q12->12qter), r(12)(::p13->q12::), -15, del(19)(q12), der(20)t(20;21)(p11.2;q11.2), +der(21)t(12;210(q22;q22)
39	47, XY, +8, der(11)(q23)	47, XY, +8, del(11)(q23)
42	46, XY, t(1;11;8)(q21;p21;q23)	46, XY, der(1)t(1;8)(q21;p21), der(8)t(1;8)(q31;p21), der(11)ins(11;1)(q23;q21q31)
43	47, XY, t(15;17)(q21;p21), +mar	47, XY, t(15;17)(q21;p21), +8
46	47, XX, t(15;17)(q21;p21), +mar	47, XX, t(15;17)(q21;p21), +8
47	45, X,-Y,-8,-22,-22,+3 mars	45,X,-Y,t(8;22;21)(q21.3;q13.3;q22.12) ,der(22)t(1;22)(q23;q13.3)
51	46, XX, del(16)(q22)	46, XX, inv(16)del(16)(q22)
58	46, XY,del(11)(q21), t(15;17), inv(12)(q?q?)	46, XY, t(15;17), del(6)(…) 46, XY, t(15;17), inv(6)(..)
59	46, XY, del(10)(p12)	46, XY, inv(10)(pq),ins(11;10)(q23p12p13)
63	45, XY, t(8;17)(q?22;?p12), -18	45, XY, t(8;17)q21;p13), -18
80	46, XX, t(3;13)(q13;p11), t(16;21)(p11;q22) [14]/ 47, XX, der(2)t(2;?)(q2?;?), t(3;13)(q13;p11), add(5)(q35), t(16;21)(p11;q22), +mar [3]/ 45, XX, t(3;13)(q13;p11), -16, der(21), t(16;21)(p11;q22) [3]	46,XX,der(2)t(2;3)(q2?;?), t(3;13)(q13;p11),der(5)t(3;5)(?;q35), t(16;21)(p11;q22)

Primeiramente, se fazia necessário à utilização de sondas do tipo WCPs e PCPs para verificar e confirmar os envolvimentos de determinados cromossomos nas translocações encontradas. Consequentemente, era necessária a determinação dos pontos de quebra gerados pelos rearranjos, e, então se utilizava as sondas de MCBs para os cromossomos envolvidos e, em alguns casos, sondas obtidas a partir de BACs. Alguns desses resultados estão nas figuras 4.5 e 4.6.

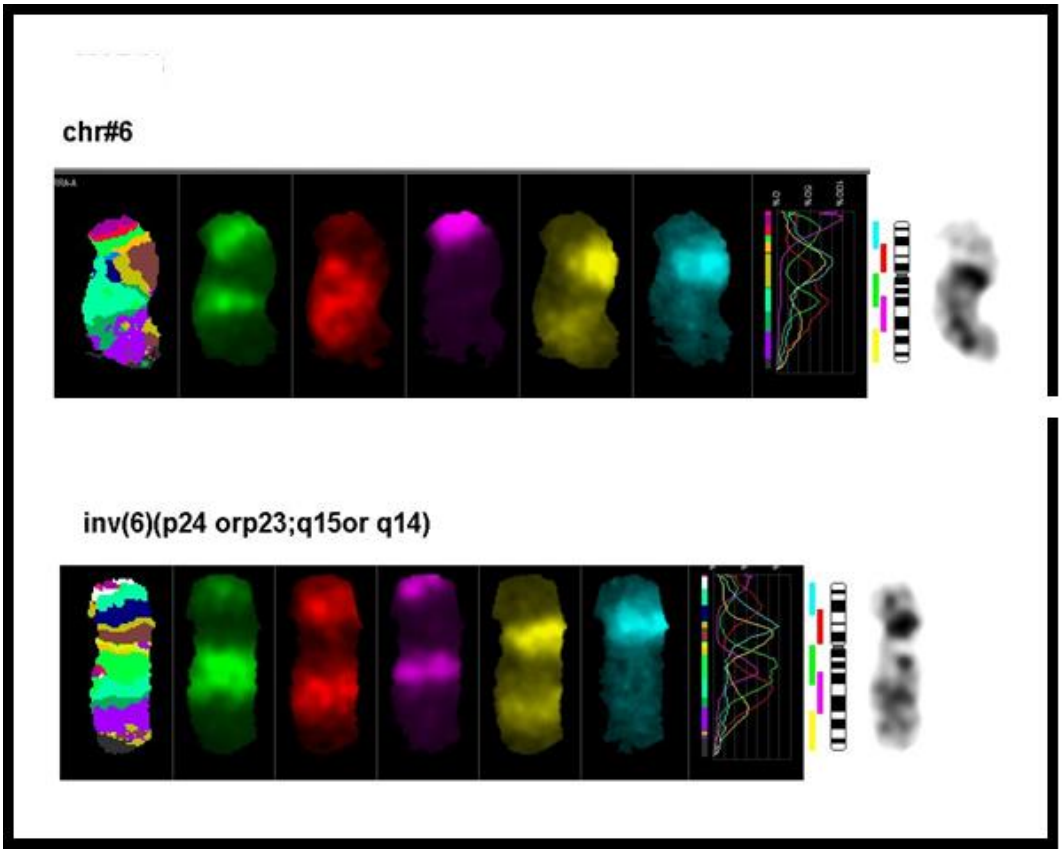


Figura 4.5 – MCB do cromossomo 6,mostrando uma alteração cromossômica do tipo inversão no caso 58.

As anormalidades encontradas foram: deleções, cromossomos dicêntricos, inversões associadas com duplicações e translocações. Somente em 1 paciente, essa técnica não revelou diferenças entre o cariótipo determinado pela citogenética convencional e a citogenética molecular. Anormalidades citogenéticas não específicas também foram detectadas.

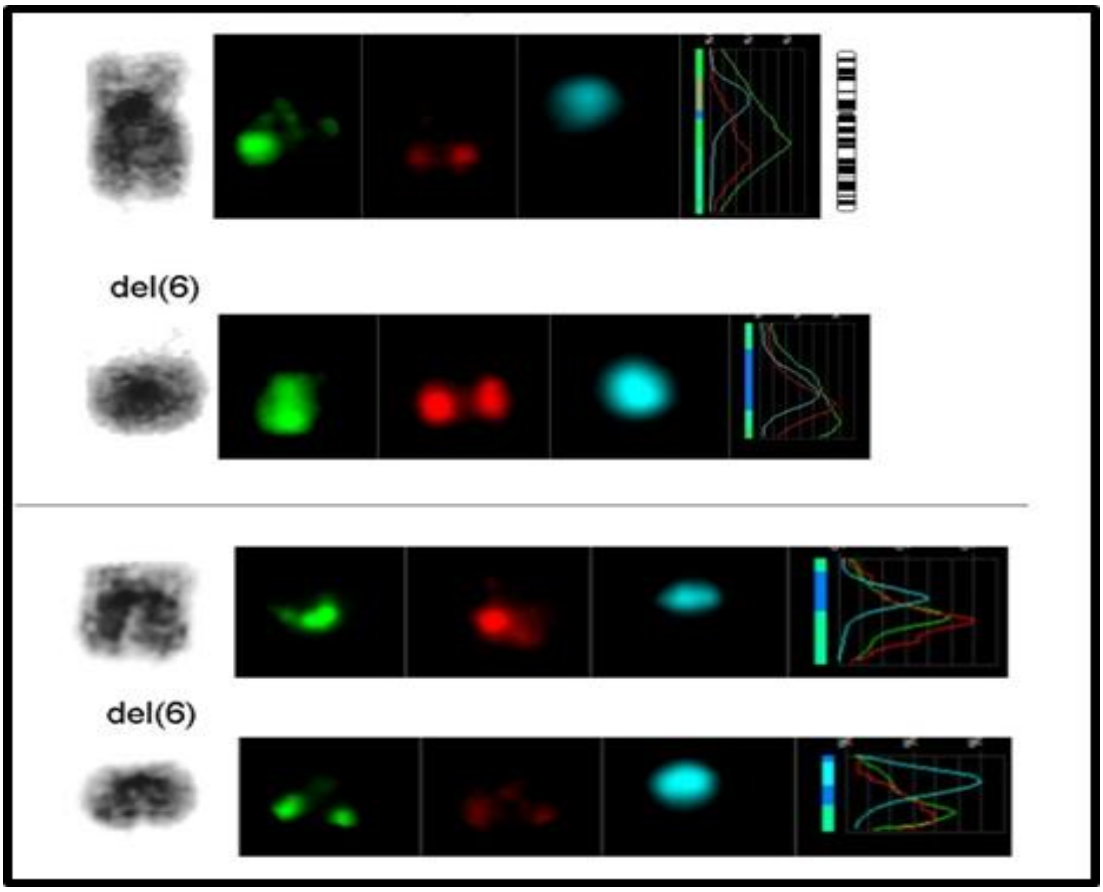


Figura 4.6- Utilização de BACs para caracterização dos exatos pontos de quebra da deleção encontrada no cromossomo 6 em um segundo clone do paciente 58.
Sonda proveniente de BAC RP11-100A16: sinal vermelho na região 6q22. Sonda proveniente de BACRP11-1145D19: sinal verde na região 6q16.3. Sonda centromérica para o cromossomo 6: Sinal azul

Sendo assim, com a utilização das técnicas de citogenética molecular foi possível então detectar um número maior de anormalidades citogenéticas no estudo, passando para 89% a frequência de aberrações citogenéticas no estudo(Tabela 4.2).

Tabela 4.3– Anormalidades citogenéticas encontradas no estudo

Paciente	Subtipo FAB	Idade	Citogenética Convencional	Citogenética Molecular
1	LMA-M1	10 anos	46, XX, del(9)(p21)	NF
2	LMA-M5	8 anos	46, XY, del(11)(q23)	NF
3	LMA-M1	7 anos	Sem mitose	NF
4	LMA-M4	5 anos	Sem mitose	NF
5	LMA-M1	7 meses	49, XY, +6,+9,+14	NF
6	LMA-M5	12 anos	46, XY, del(11)(q23)	NF
7	LMA-M2	15 anos	46, XY, del(20)(q12)	*AML/ETO (-)*
8	LMA M3	11 anos	46, XX, t(15;17)(q22;q12)[3]/ 46, XX	NF

			[23]	
9	LMA M0	2 a e 8 m	45, XY, -7, del(12)(p12)	NF
10	LMA M3	12 anos	46, XY t(15;17)(q22;q12)	*PML/RARA*
11	LMA M0	13 anos	46, XX, del(7)(q32) [4]/ 46, XX [18]	NF
12	LMA M3	3 anos	46, XY t(15;17)(q22;q12)	NF
13	LMA M3	6 anos	46,XY [22]	NF
14	LMA M0	17 anos	46, XY [20]	NF
15	LMA M3	16 anos	46, XY, t(15;17)(q22q12), del(11)(q23) [2]/ 46, XY, t(15;17)(q22;q12) [16]/ 46, XY [4]	NF
16	LMA M2	13 anos	Sem mitose	NF
17	LMA M3	12 anos	Sem mitose	*PML/RARA*
18	LMA M5	6 anos	46, XX[23]	NF
19	LMA M1	8 anos	46, XY, del(9)(q31), t(X;11)(p22;q22) [11] / 46, XY [9]	46,XY,del(9)(q12q31),del(11)(q13orq14)[4]/46,XY,del(9)(q12q31)[2]/46,XY[7]
20	LMA M4	5 anos	46, XY, inv(16)(p13q22),+19, -22 [18] / 46, XY [4]	46,XY,inv(16)(p13q22),dic(22)(qter->p10::p10->qter)
21	LMA M0	12 anos	46, XY[30]	46, XY
22	LMA M3	15 anos	46, XX, t(15;17)(q22;q12)	*PML/RARA*
23	LMA M3	9 anos	46, XY, t(15;17)(q22;q12)[8]/ 46, XY [14]	NF
24	LMA M5	13 anos	44, XX,?der(4), -5, -7, -10,?dic(13), -15, +2 mars	44,XX,der(5)t(5;19)(q13.3;q12),t(6;18;17)(q24.3;q21;q23.2),der(7)t(7;13)(p11.2;q12),der(10)(7qter->7q11.23::12q22->12q21.2::10p14->10q21::12q12->12qter),r(12)(::p13->q12::), -15,del(19)(q12),der(20)t(20;21)(p11.2;q11.2),+der(21)t(12;21)(q22;q22)
25	LMA M0	11 anos	45, XY, -Y, t(8;21)(q22;q22) [18]/ 46, XY [2]	NF
26	LMA M3	2 anos	46, XX, t(15;17)(q22;q12)[3]/ 46, XX [23]	NF
27	LMA M5	7 meses	46, XX, t(9;11)(p22;q23)[14]/ 46, XX [8]	Nuc ish(5'MLLsep3'MLL)[86]/(5'MLLcon3'MLLx2)[14]/MLLrearranjado
28	LMA M3	13 anos	46, XX, t(15;17)(q22;q12) [21] / 46, XX [1]	NF
29	LMA M1	4 meses	47, XY, del(5)(q), der(7)t(7;?), del(12)(p13), +19[5]/ 47, XY, der(7)t(7;?),	*MLL(-)*

			del(12)(p12), +19 [13]/ 46, XY [1]	
30	LMA M3	8 anos	46, XX [40]	46, XX
31	LMA M4	1 a e 2 m	45, XY, -7, del (12)(p)[5]/45, XY, -7[7]/46, XY[8]	NF
32	LMA M2	15 anos	45, X, -Y, t(8;21)(q22;q22) [17]/ 46, XY [7]	NF
33	LMA M2	13 anos	46, XX, t(8;21)(q22;q22), del(12)(p) [20]/ 46, XX [20] / 46, XX [1]	AML/ETO
34	LMA M5	4 anos	46, XY, der(11), del(12)(p12) [20] /46, XY [1]	46, XY
35	LMA M3	16 anos	46, XX, t(15;17)(q22;q12) [21] / 46, XX [4]	NF
36	LMA M2	8 anos	46, XX	NF
37	LMA M1	16 anos	46, XY [30]	NF
38	LMA M5a	6 meses	46, XY, t(9;11)(p22;q23)	Nuc ish(5'MLLsep3'MLL) [20]/(5'MLLcon3'MLLx2)[80]/MLLrearranjado
39	LMA M5a	1 ano	47, XY, +8, der(11)(q23)	Nuc ish(5'MLLsep3'MLL) [90]/(5'MLLcon3'MLLx2) [10]/MLLrearranjado
40	LMA M7	10 dias	47, XY, +21 [40]	NF
41	LMA M2	18 anos	46, XY, t(8;21)(q22;q22)[18]/46, XY [2]	*AML/ETO*
42	LMA M5	10meses	46, XY, t(1;11;8)(q21;p21;q23) [25]	46,XY, der(1) t(1;8)(q21;p21), der(8)t(1;8) (q31;p21), der(11) ins(11;1)(q23;q21q31)
43	LMA M3	9 anos	47, XY, t(15;17), +mar	47, XY, t(15;17),+8
44	LMA M1	17 anos	46, XX, del(12)(p12)	NF
45	LMA M5	5 e 4 m	46, XY, del(11)(q23)	Nuc ish(5'MLLsep3'MLL) [30]/del(11q23)
46	LMA M3	16 anos	47, XY,t(15;17), +mar	47, XY, t(15;17),+8, PML/RARA
47	LMA M4	6 anos	45, X,-Y,-8,-22,-22,+3 mars	45,X,-Y,t(8;22;21)(q21.3;q13.3; q22.12),der(22) t(1;22)(q23;q13.3)
48	LMA-M3	16 anos	46, XY, t(15;17)	*PML/RARA*
49	LMA-M3	10 anos	46, XX [15]	*PML/RARA*
50	LMA-M3	5 anos	46, XX [12]	*PML/RARA*
51	LMA-M4	1 a e 2 m	46, XX, del(16)(q22) [8]/ 46, XX [14]	46, XX, inv(16), del(16)[14]/ 46, XX [13]
52	LMA-M5	3 meses	46, XX, t(9;11)(p22;q23) [18]/ 46, XX [2]	NF
53	LMA-M2	10 anos	46, XY, t(8;21)(q22;q22) [23]/ 46, XY [2]	*AML1/ETO*

54	LMA -M2	4 anos	45, X, -Y, t(8;21)(q22;q22) [16]/ 46, XY [4]	*AML1/ETO*
55	LMA-M2	11 anos	46, XY, t(8;21)(q22;q22) [3]/ 46, XY [28]	*AML1/ETO*
56	LMA-M5	8 anos	46, XX, t(9;11)(p22;q23) [15]/ 46, XX [11]	NF
57	LMA-M3	3 anos	46, XY, t(15;17) [13]/ 46, XY [5]	*PML/RARA*
58	LMA-M3	10 anos	46, XY,del(11)(q21), t(15;17), inv(12) [9]/ 46, XY, del(11)(q21), t(15;17) [6]/ 46, XY, t(15;17) [6]/ 46, XY[2]	46, XY, t(15;17)(q21;q12), der(6)del(6)(6q)
59	LMA-M5	1 ano e 6m	46, XY, del(10)(p12) [12]/ 46, XY [8]	46, XY, inv(10)(pq),ins(11;10)(q23/p12p13)[13/ 46, XY[6]
60	LMA-M0	3 anos	45, XY, t(1;18)(q21;q?), -17	*BCR/ABL(-),MLL(-), CBF(-)*
61	LMA-M3	17 anos	Sem mitose	*PML/RARA*
62	LMA-M1	4 anos	46, XY, t(8;21)(q22;q22) [15]/ 46, XY [5]	*AML/ETO*
63	sarcoma/ LMA	1a e 11 m	47, XY, +8, t(8;17)(q22; q12)	47, XY, +8, der(8)t(8;17)(q22;p12) AML1/ETO(-)
64	LMA- M1	9 anos	46, XX, del(1)(q21q24?) [3]/ 46, XX [17]	MLL(-)
65	LMA-M3	16 anos	Sem mitose	*PML/RARA*
66	LMA-M7	1a e 4m	Sem mitose	*MLL*
67	LMA-M5	14 anos	Sem mitose	*MLL(-)*
68	LMA-M3	13 anos	46, XY[20]	*PML/RARA (-)*
69	LMA- M5	2a e 10m	46, XY,t(1;11)(q21;q23)[7]/46, XY [33]	*MLL*
70	LMA-M5	15 anos	47, XY, +21 [30]	*MLL(-)*
71	LMA-M3	2a e 4m	46, XX, t(15;17)(q22;q21) [18]/46, XX [4]	*PML/RARA*
72	LMA-M3	9 anos	46, XY, t(15;17)(q22;q21) [20]	*PML/RARA*
73	LMA-M3	12 anos	46, XX, t(15;17)(q22;q21) [17]/46, XX [3]	*PML/RARA*
74	LMA-M3	6 anos	46, XX[20]	*PML/RARA(-)*
75	LMA-M3	1 ano	Sem mitose	*PML/RARA*
76	LMA-M3	2 anos	Sem mitose	*PML/RARA*
77	LMA-M4	8 anos	46, XY, del(7)(q21)[18]/46, XY[7]	Deleção do sinal 7q21[90]/46,XY[40]
78	LMA-M5	6 meses	46, XX, t(9;11)(q21;q23)[19]/46, XX[1]	NF

79	LMA-M3	13 anos	*46,XY [25]*	*PML/RARA*
80	LMA-M2	9 anos	46, XX, t(3;13)(q13;p11), t(16;21)(p11;q22) [14]/ 47, XX, der(2)t(2;?)(q2?;?), t(3;13)(q13;p11), add(5)(q35), t(16;21)(p11;q22), +mar [3]/ 45, XX, t(3;13)(q13;p11), -16, der(21), t(16;21)(p11;q22) [3]	46,XX,der(2)t(2;3)(q2?;?) ,t(3;13)(q13;p11), der(5)t(3;5)(?;q35), t(16;21)(p11;q22)
81	LMA-M1	13 anos	45, XX, inv(3)(q21q26), -7 [20]	NF
82	LMA-M1	13 anos	45, X, -X, t(8;13)(q22;q34) [18]/ 46, XX, t(8;13)(q22;q34) [1]	NF
83	LMA-M1	7 meses	47, XX, +8, t(11;19)(q23;p13.)	*MLL rearranjado*
84	LMA-M1	16 anos	46, XX, t(6;11)(q27;q23)[20]	NF

t-translocação, der-derivativo, NF- não feito, inv-inversão, del-deleção,

Sendo assim, a frequência de anormalidades citogenéticas, utilizando as técnicas de citogenética molecular foi de 89%. Em resumo, o perfil cariótipo da LMA da infância encontrado neste estudo, com suas respectivas frequências, está representado na figura 4.7.

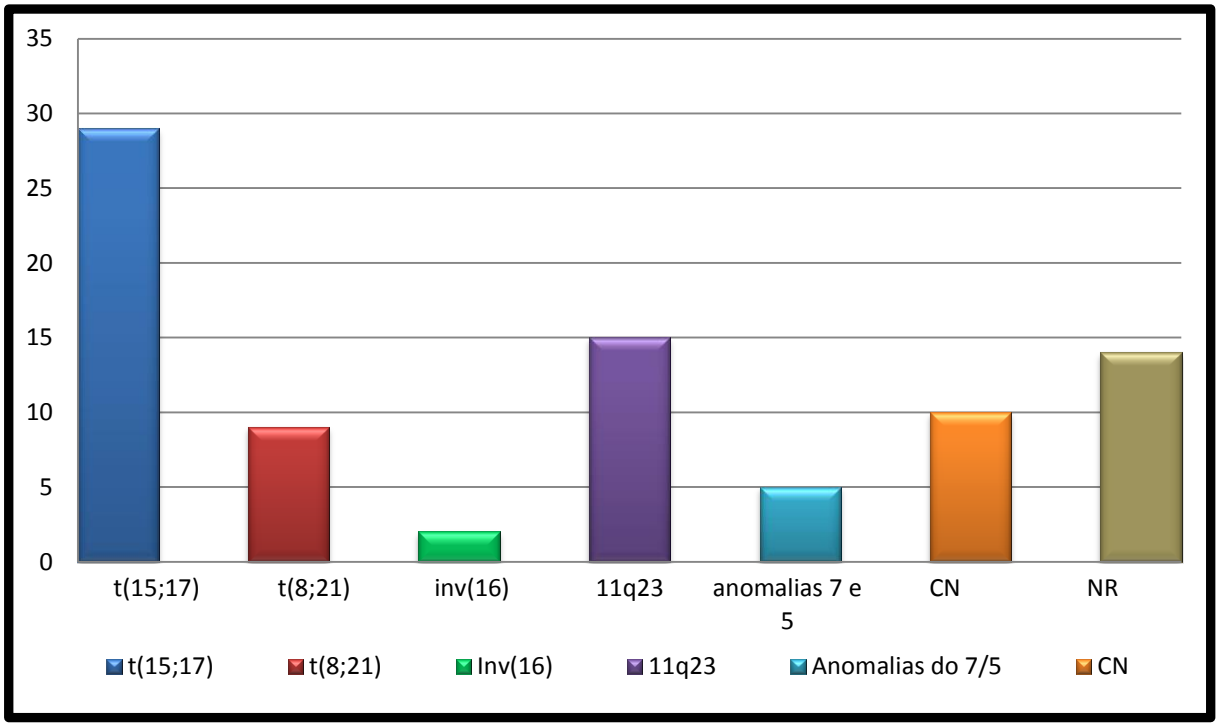


Figura 4.7 – Perfil das alterações cromossômicas encontradas neste estudo da LMA da Infância. T-translocação; inv- inversão; q –braço longo do cromossomo; CN- cariótipo normal; NR:Não-recorrentes

4.4. Correlação entre a citogenética e os dados clínicos

4.4.1. Correlação das anormalidades Citogenéticas e a idade

A faixa etária dos pacientes neste estudo variou de 10 dias de vida a 18 anos. A média de idade dos pacientes que apresentaram cariótipo normal foi 9,6 anos e 9,2 anos para os pacientes com cariótipos anormais. Dentro do subgrupo das anormalidades citogenéticas recorrentes, a média de idade dos pacientes que apresentaram a t(8;21)(q22;q22) foi de 10,2 anos, variando de 4 a 18 anos; a média de idade dos pacientes que apresentaram a t(15;17)(q22;q12) foi de 11 anos de idade, variando de 1 a 17 anos; a média de idade dos pacientes com a inv(16) foi de 3, variando de 14 meses a 5 anos; pacientes que apresentaram anormalidades envolvendo a região 11q23 apresentaram uma média de idade de 3,8 anos, variando de 3 meses a 16 anos; pacientes com as anormalidades envolvendo o cromossomo 7 e 5, apresentaram uma média de idade de 1 ano , variando de 4 meses a 13 anos. Pacientes que apresentaram as anormalidades não-recorrentes tiveram uma média de idade de 10 anos, variando de 10 dias a 17 anos de idade (Figura 4.8).

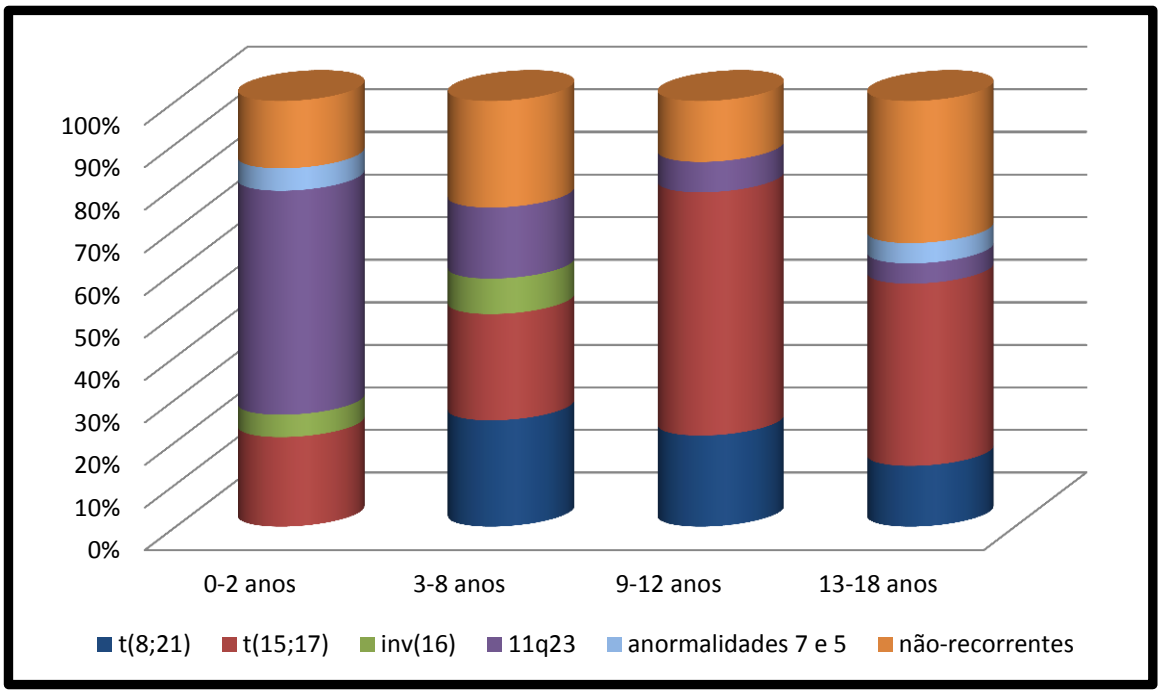


Figura 4.8 – Associação das anormalidades citogenéticas nas diferentes faixas etárias. T- translocação; inv- inversão; q- braço longo dos cromossomos.

4.5. Análise do Perfil de Expressão de Genes do complexo Polycomb

Apesar de a heterogeneidade genética ter sido verificada na LMA da infância neste presente estudo quando várias técnicas de citogenética molecular foram utilizadas, não foi possível compreender muito sobre a biologia desta doença. Então, com o intuito de verificar se os níveis de expressão dos genes do complexo PcG poderiam estar alterados na infância, como já havia sido descrito em adultos, realizamos uma análise do perfil de expressão dos genes *SUZ12, EZH2, BMI1 e YY1* pela técnica de RT-qPCR em amostras de 52 pacientes entre 0 e 18 anos de ambos os sexos e, comparamos com amostras de medula óssea de 4 doadores peditátricos saudáveis(média de idade 10.7 anos; 6-15 anos). Os dados dos pacientes estão na tabela abaixo (Tabela 4.3).

Tabela 4.4- Dados clínicos dos 52 casos analisados para o perfil de expressão dos genes do complexo Polycomb

Paciente	Idade	Subtipo	Citogenética
1	10 anos	LMA-M1	46, XY,del(9)(p21)
2	8 anos	LMA-M5	46, XY, del(11)(q23)
3	7 anos	LMA-M1	Sem mitose
4	5 anos	LMA-M4	Sem mitose
5	7 meses	LMA-M1	49, XY, +6, +9, +14
6	12 anos	LMA-M5	46, XY, del(11)(q23)
7	15 anos	LMA-M2	46, XY, del(20)(q12)
18	6 anos	LMA-M5	46, XX [30]
27	7 meses	LMA-M5	46, XX, t(9;11)(p22;q23)
29	4 meses	LMA-M1	47, XY, del(5)(q), der(7)t(7;?), del(12)(p13), +19[5]/ 47, XY, der(7)t(7;?), del(12)(p12), +19 [13]/ 46, XY [1]
30	8 anos	LMA-M3	46, XX [40]
31	1 a e 2m	LMA-M4	45, XY, -7, del (12)(p)[5]/45, XY, -7[7]/46, XY[8]
34	4 anos	LMA-M5	46, XY
35	16 anos	LMA-M3	46, XX, t(15;17)

36	8 anos	LMA-M2	46, XX
38	6 meses	LMA-M5	46, XY, t(9;11)
39	1 ano	LMA-M5	47, XY,+8 MLL rearranjado
42	10 meses	LMA-M5	46, XY,der(1)t(1;8)(q21;p21), der(8)t(1;8)(q31;p21), der(11)ins(11;1)(q23;q21q31)
43	9 anos	LMA-M3	47, XY, t(15;17), +8
44	17 anos	LMA-M1	46, XX, del(12)(p12)
45	5 a e 4m	LMA-M5	46, XY, del(11)(q23)
46	16 anos	LMA-M3	47, XX, t(15;17), +8
47	6 anos	LMA-M4	45,X,-Y, t(8;22;21)(q21.3;q13.3;q22.12), der(22)t(1;22)(q23;q13.3)
49	16 anos	LMA-M3	46, XY, t(15;17)(q22;q21)
50	5 anos	LMA-M3	46, XX, t(15;17)(q22;q21)
53	10 anos	LMA-M2	46, XY, t(8;21)(q22;q22) [23]/ 46, XY [2]
54	4 anos	LMA-M2	45, X, -Y, t(8;21)(q22;q22) [16]/ 46, XY [4]
55	11 anos	LMA-M2	46, XY, t(8;21)(q22;q22) [3]/ 46, XY [28]
56	8 anos	LMA-M5	46, XX, t(9;11)(p22;q23) [15]/ 46, XX [11]
57	3 anos	LMA-M3	46, XY, t(15;17) [13]/ 46, XY [5]
58	10 anos	LMA-M3	46, XY, t(15;17)(q21;q12), del(6)(6q)
59	1 a e 6m	LMA-M5	46, XY, inv(10)(pq),ins(11;10)(q23/p12p13)[13/ 46, XY[6]
61	17 anos	LMA-M3	Sem mitose – *PML/RARA*
62	4 anos	LMA-M1	46, XY, t(8;21)(q22;q22) [15]/ 46, XY [5]
64	9 anos	LMA-M1	46, XX, del(1)(q21q24?) [3]/ 46, XX [17]
65	16 anos	LMA-M3	Sem mitose – *PML/RARA*
66	1 ano	LMA-M7	Sem mitose – positivo para o rearranjo do *gene MLL*
67	14 anos	LMA-M5	Sem mitose- *MLL* negativo
68	13 anos	LMA-M4	46, XY [20]

69	2 anos	LMA-M5	46, XY, t(1;11)(q21;q23)
70	15 anos	LMA-M5	47, XY, +21 [30]
72	9 anos	LMA-M3	46, XY, t(15;17)(q22;q21)
73	12 anos	LMA-M3	46, XY, t(15;17)(q22;q21)
74	6 anos	LMA-M3	46, XX[25]
75	1 anos	LMA-M3	Sem mitose – *PML/RARA*
77	8 anos	LMA-M4	46, XY, del(7)(q21)
78	1 ano	LMA-M5	46, XX, t(9;11)(p22;q23)
79	13 anos	LMA-M3	46, XY[25] – *PML/RARA*
80	9 anos	LMA-M1	46,XX,der(2)t(2;3)(q2?;?),t(3;13)(q13;p11), der(5)t(3;5)(?;q35),t(16;21)(p11;q22)
82	13 anos	LMA-M1	45, X, -X, t(8;13)(q22;q34) [18]/ 46, XX, t(8;13)(q22;q34) [1]
83	7meses	LMA-M2	47, XX, +8, t(11;19)(q23;p13)
84	16 anos	LMA-M1	46, XX, t(6;11)(q27;q23)

a-anos; m-meses; t-translocação;inv- inverão; der-derivativo; ins-inserção

Como a LPA é considerada um subtipo da LMA com características clínicas e biológicas bem definidas, sendo tratada de forma diferente dos demais subtipos da LMA, este subtipo da LMA foi analisado também para o perfil de expressão dos genes PcG selecionados para o estudo separadamente dos demais. Primeiro, verificamos a expressão dos genes polycomb selecionados na LMA em relação aos doadores. E podemos verificar que todos os níveis de mRNA dos genes em questão estavam maiores nas amostras de medula óssea de pacientes com LMA do que na medula óssea de doadores saudáveis. Os níveis de mRNA dos genes *YY1* e *BMI1* foram respectivamente, 6 vezes maior e 3 vezes maior nas amostras de medula óssea de pacientes com LMA do que na medula óssea de doadores saudáveis(Figura 4.9)

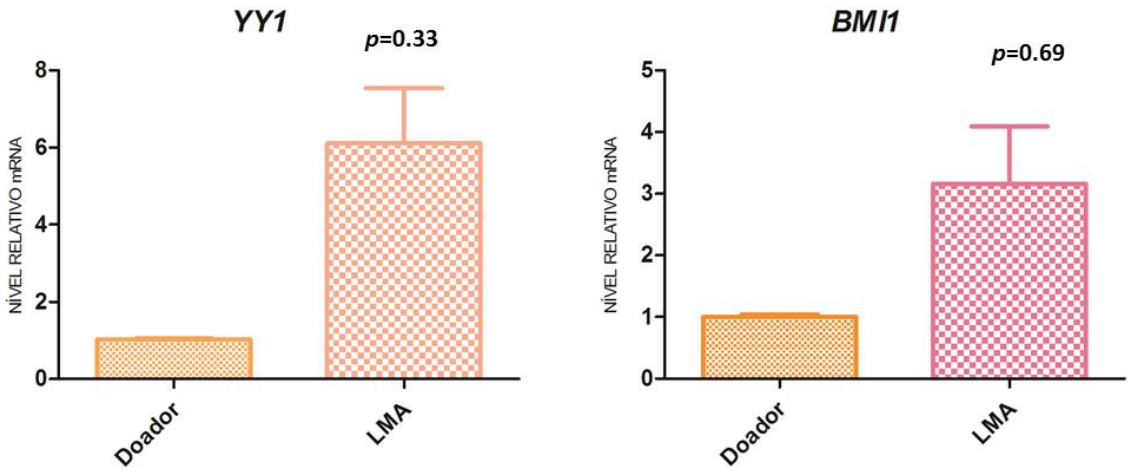


Figura 4.9- Níveis de expressão dos mRNAs dos genes *YY1* e *BMI1* na LMA. Doadores: n=4, *YY1:* n= 49 ; *BMI1*: n= 39 .

Tanto os níveis de mRNA dos genes *SUZ12* e *EZH2* foram também maiores na LMA do que nos doadores saudáveis. Sendo 6 vezes maior para o gene *SUZ12* e 3 vezes maior para o gene *EZH2* (Figura 4.10).

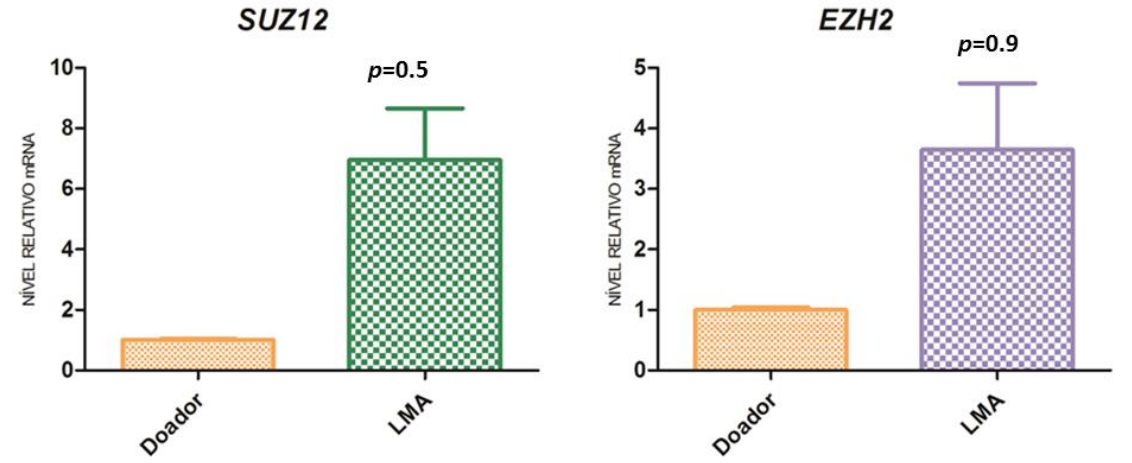


Figura 4.10- Niveis de expressão dos mRNAs dos genes *SU12 e EZH2* na LMA em relação aos doadores. Doadores: n=4; *SUZ12: n=46; EZH2;* n= 46.

Estes resultados sugerem que na LMA possa haver uma maior expressão de todos os genes do complexo PcG estudados do que em crianças saudáveis, podendo estes genes serem marcadores desta neoplasia.

O mesmo perfil de expressão aumentada dos genes PcG selecionados também pode ser observado na LPA, demonstrando que os níveis de mRNAs dos genes *YY1* e *BMI1* foram maiores na LPA do que nos doadores (Figura 4.11).

Porém, o gene *YY1* parece estar muito mais expresso, cerca de 12 vezes mais na LPA do que em doadores saudáveis.

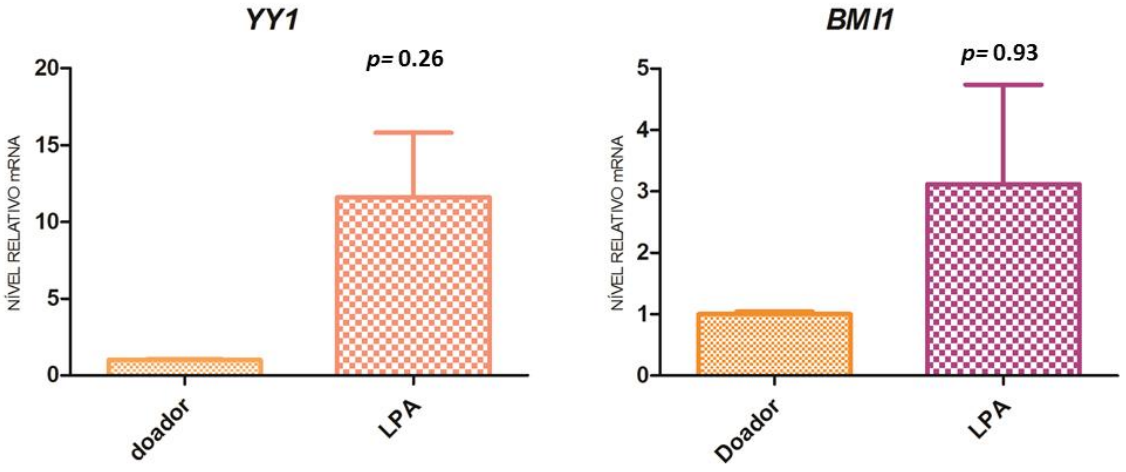


Figura 4.11- Níveis de expressão dos mRNAs dos genes *YY1 e BMI1* na LPA. Doadores: n=4; *YY1; n=14; BMI1:* n=9.

O mesmo pode ser observado para os genes *SUZ12* que também apresentou altos níveis de expressão de mRNA em relação aos doadores, sendo maior em cerca de 10 vezes nesta neoplasia. O gene *EZH2* também apresentou altos níveis de mRNA na LPA em relação aos doadores, mas este aumento foi um pouco menor, sendo cerca de 7 vezes maior nesta neoplasia do que em indivíduos saudáveis(Figura 4.12).

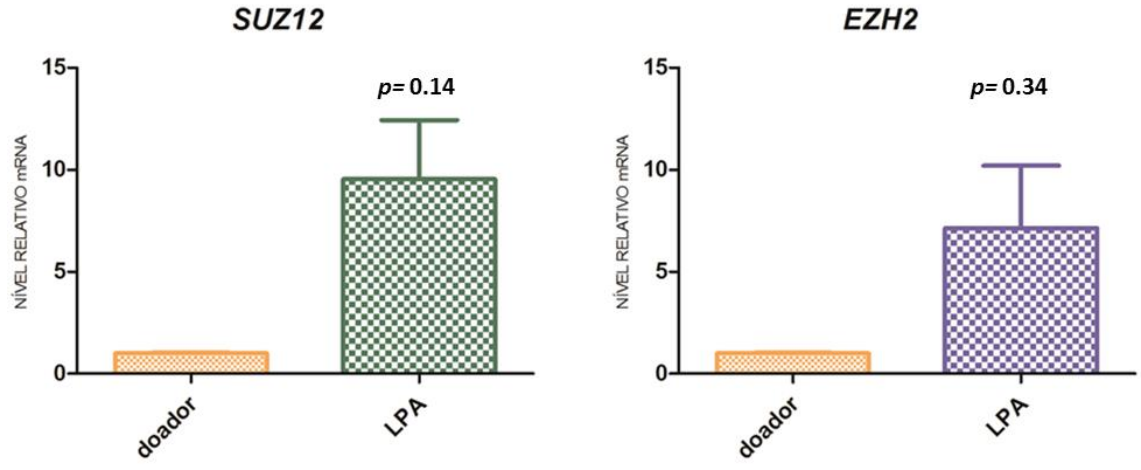


Figura 4.12 – Níveis de expressão dos mRNA dos genes *YY1* e *BMI1* na LPA. Doadores:n= 4; *YY1;* n= 15 ; *BMI1*: n= 14 .

Esses resultados na LPA sugerem que todos os genes do complexo PcG estudados possam ter um papel importante no processo de leucemogênese da LPA, principalmente aqueles que apresentaram os maiores níveis de mRNA.

4.5.1. Perfil de expressão gênica nos diferentes subtipos FAB

Neste estudo, os níveis de mRNA dos genes estudados também foi verificado para os subtipos morfológicos FAB. Esses níveis de mRNA variaram bastante nos subtipos morfológicos da LMA. Os níveis de mRNA dos genes *YY1 e BMI1* foram maiores no subtipo M3. Porém, os níveis de mRNA do *BMI* foram maiores no subtipo M4/M5 do que nos outros grupos morfológicos (Figura 4.13).

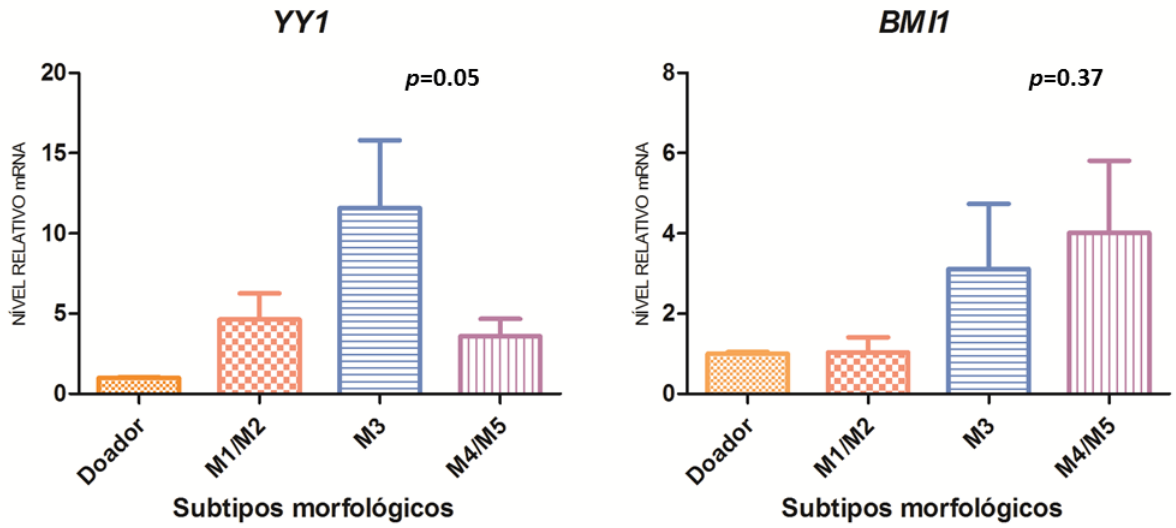


Figura 4.13 – Níveis de expressão de mRNAs dos genes *YY1* e *BMI1* nos subtipos morfológicos da LMA.. N=52; doadores= 4;*YY1:* M1/M2: n=13 ; M3: n=14 ; M4/M5: n=21. *BMI1:* M1/M2: n= 12; M3: n=9 ; M4/M5: n=17.

Os níveis de mRNA do gene *SUZ12* foram maiores no subtipo M4/M5 e M3, apresentando um pequeno aumento no subtipo M4/M5. Mas os achados não foram estatisticamente significativos para este gene (p=0.27). Já em relação ao gene *EZH2*, este apresentou níveis aumentados de mRNA nos casos de M3 (p=0.07) (Figura 4.14).

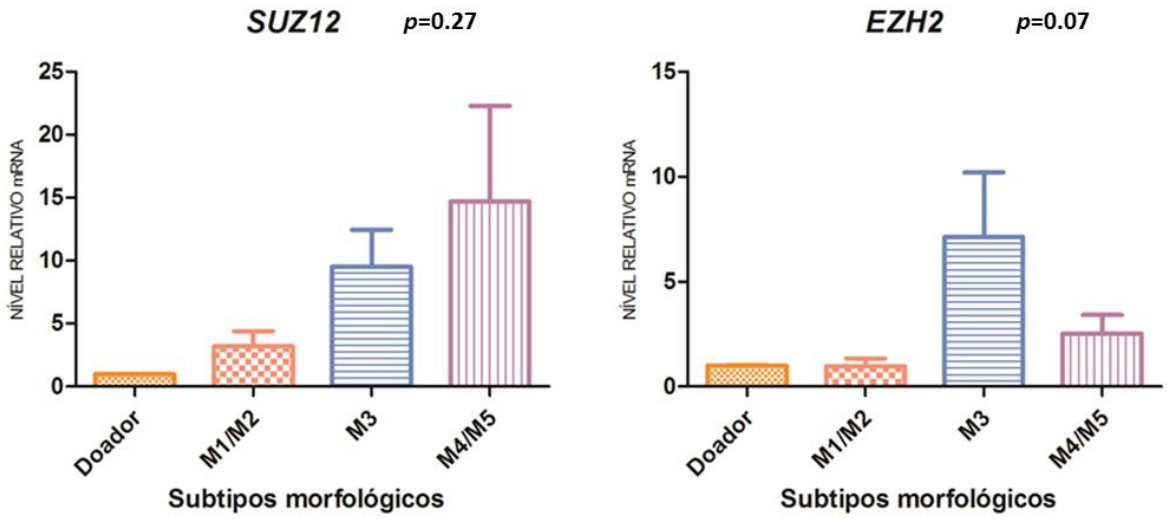


Figura 4.14- Níveis de expressão dos mRNAs dos genes *SUZ12* e *EZH2* nos diferentes subtipos morfológicos da LMA. N= 52, doadores=4; *SUZ12:* M1/M2: n= 14 ; M3: n= 16 ; M4/M5: n=16. *EZH2:* M1/M2:n=12; M3:n=15; M4/M5:n=18.

Estes resultados sugerem que o gene *EZH2* possa estar mais expresso no subtipo M3 do que nos outros subtipos FAB, sugerindo que este gene pode ter um papel importante durante o processo de patogênese da LPA da infância.

4.5.2. Perfil de expressão gênica nos diferentes subgrupos citogenéticos

Como os achados citogenéticos nos pacientes com LMA apresentam um valor prognóstico independente dos outros fatores clínicos de risco, podendo estratificar estes pacientes em diferentes grupos de risco, os níveis de expressão dos genes PcG foram também verificados em diferentes subgrupos citogenéticos.

Foi observada uma homogeneidade na expressão dos genes PcG nos doadores, enquanto que nas amostras dos pacientes variou consideravelmente. Para ver se isso refletia nas diferentes anormalidades citogenéticas dos pacientes, os perfis de expressão dos diferentes genes do complexo Polycomb foram feitos em distintos subgrupos citogenéticos: leucemias *CBF*, leucemias com rearranjo *PML/RARA*, cariótipo normal (CN), LMA com outras anormalidades citogenéticas não recorrentes, anormalidades no cromossomo 5 e 7 e leucemias com rearranjo do gene *MLL*. Observamos que os perfis de expressão foram diferentes nos 6 subgrupos citogenéticos. (Figura 4.15) do que os níveis de mRNA dos genes que compõem o PRC2. Os níveis de mRNA do gene *YY1* foi maior para o grupo das leucemias CBF e das que tem rearranjo do *RARA,* enquanto que

os níveis de mRNA do gene *BMI1* foi maior no grupo das anormalidades de 7 e 5, no grupo das leucemias com rearranjo da região 11q23 e nas leucemias com rearranjo de *RARA.*

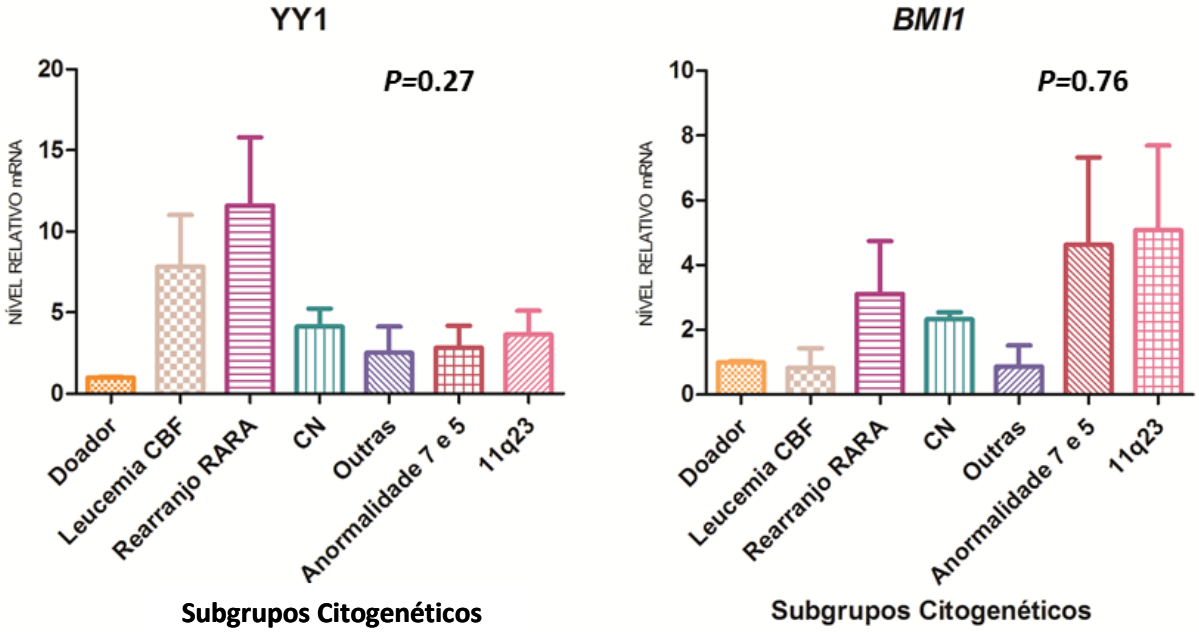


Figura 4.15- Perfil de expressão de genes do complexo PRC1 nos diferentes subgrupos citogenéticos. Doadores:n= 4; para *YY1*- Leucemias *CBF*: n=6 ; *PML/RARA*: n=14;CN: n=2;Outras: n=6; anormalidade de 7 e 5:n= 3; Leucemia 11q23: n= 14

O mesmo ocorreu para os genes do PRC2 nos casos com rearranjo de *RARA* e anomalias envolvendo os cromossomos 7 e 5. Porém, baixos níveis de mRNA desses genes puderam ser detectados para os casos que apresentavam outras anormalidades e rearranjo do gene *MLL,* tanto para o gene *SUZ12* quanto para o gene *EZH2 (*Figura 4.16).

Embora, estes resultados não apresentem uma significância estatística, eles podem sugerir que os genes PcG estudados possam ter um papel importante na LMA, principalmente, nas leucemias com o rearranjo *PML/RARA e* naquelas que apresentam anormalidades envolvendo os cromossomos 5 e 7. Enquanto que, nas leucemias com rearranjo do gene *MLL* e naquelas que apresentam anomalias não recorrentes, os dados sugerem que estes genes não parecem ter um papel importante na patogênese deste subgrupo citogenético, já que seus níveis de expressão foram muitos mais baixos em relação aos outros subgrupos citogenéticos. Isso pode demonstrar que outros genes devem estar envolvidos no processo de silenciamento gênico nestes casos.

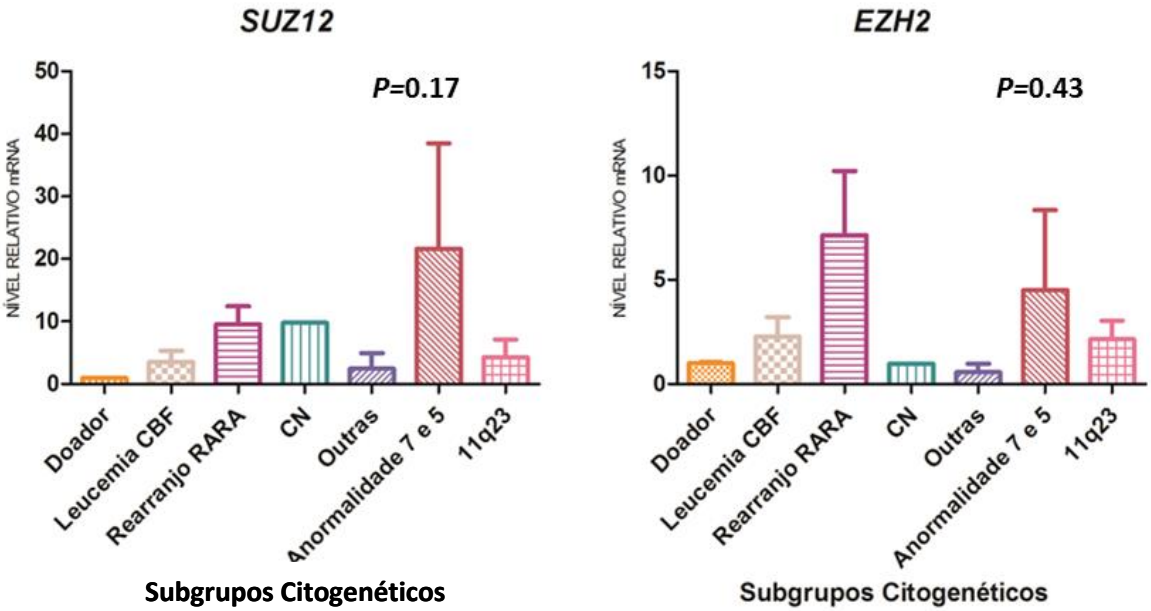


Figura 4.16- Perfil de expressão dos genes do PRC2 nos diferentes subgrupos citogenéticos. Doadores: n=4; *SUZ12*- Leucemia CBF: n=8; rearranjo de *RARA*: n=16; CN: n=2; Outras: n=3; anormalidade de 7 e 5 n=3; Leucemias *MLL: n=12.. EZH2;* Leucemia CBF: n=5; rearranjo de *RARA*: n=15; CN: n=2; Outras: n=6; anormalidade de 7 e 5 n=3; Leucemias *MLL: n=13..*

4.5.3 Perfil de expressão gênica nas diferentes faixas etárias

Como a idade também pode apresentar um valor prognóstico para os pacientes com LMA e LPA por diferir na resposta ao tratamento, o perfil de expressão dos genes PcG estudados foram correlacionados com a idade dos pacientes no momento do diagnóstico.

Com relação às faixas etárias no grupo das LMAs, os níveis de expressão dos mRNAs dos genes PcG selecionados foram verificados em dois grupos: <10 anos de idade e ≥10 anos de idade. Isso porque, de acordo com trabalhos recentes, estes dois grupos de idade podem apresentar diferente valor prognóstico (RUBINTZ *et al.,* 2007).

Embora não tenha sido verificada uma significância estatística, foi observado altos níveis de mRNAs dos genes do complexo PRC1 em pacientes com menos de 10 anos. Sendo os níveis de mRNA dos dois genes estudados deste complexo cerca de 4 vezes maior nesta faixa etária (Figura 4.17).

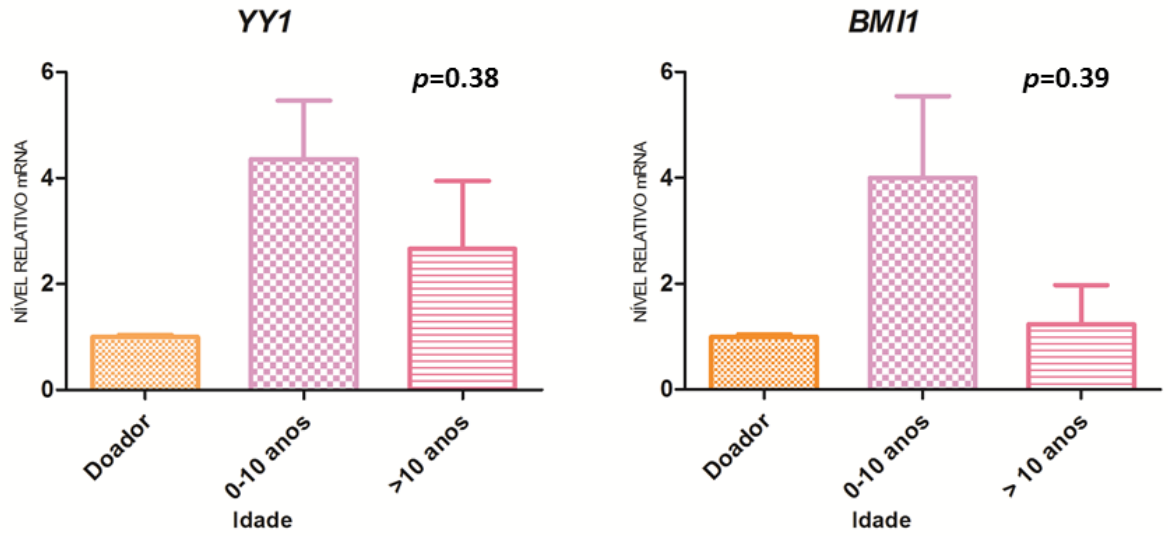


Figura 4.17- Perfil de expressão dos mRNAs dos genes do complexo PRC1 na LMA em dois grupos de idade. Doador: n=4; *YY1* Faixas etárias<10 anos: n=26, ≥10 anos: n=9; *BMI1:* Faixas etárias<10 anos :n=21, ≥10 anos, n=9 .

O mesmo foi observado para os genes do PRC2, sendo os níveis de mRNA do gene *SUZ12* mais de 10 vezes maior em pacientes menores de 10 anos de idade. Enquanto que, os níveis do gene *EZH2* se mostraram cerca de 2, 5 vezes maior nesta mesma faixa etária (Figura 4.18).

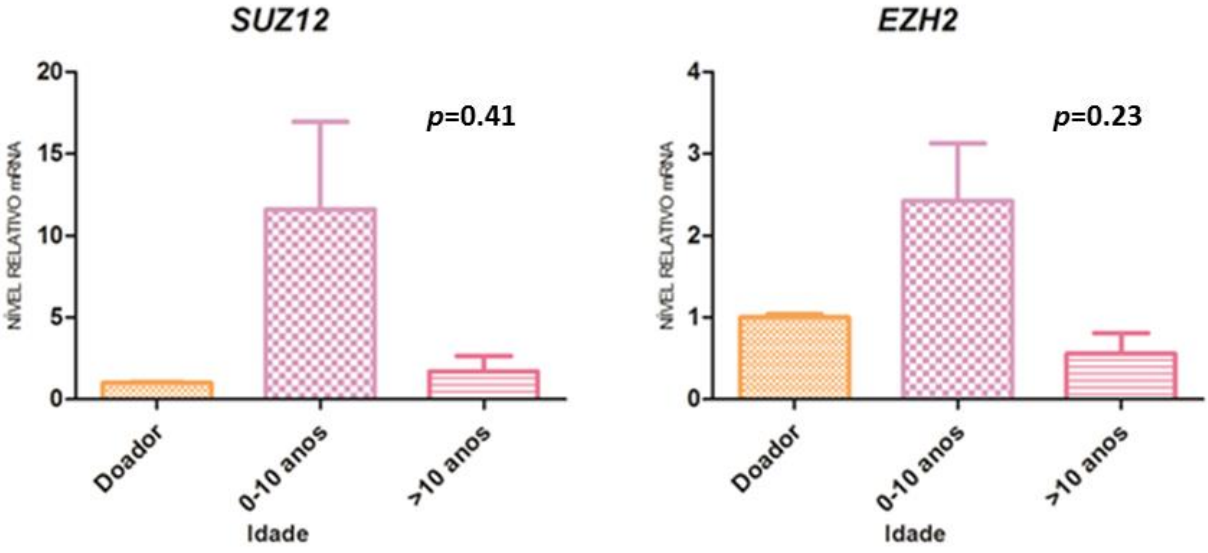


Figura 4.18- Perfil de expressão dos genes do complexo Polycomb PRC2 na LMA em dois diferentes grupos de idade**.** Doadores :n=4 ; *SUZ12*: Faixas etárias: <10 anos, n= 23; ≥10 anos, n=8 . *EZH2*: Faixas etárias: <10 anos, n= 23 ; ≥10 anos, n=8.

Estes dados sugerem que estes genes possam se comportar de forma diferente na LMA de acordo com a idade, demonstrando haver uma correlação entre os altos níveis de mRNAs dos genes PcG estudados e a idade menor que 10 anos na LMA.

Com relação às faixas etárias na LPA, os níveis de expressão dos mRNAs dos genes PcG selecionados foram verificados em dois grupos: 0-8 anos e de 9-18 anos. Da mesma forma, trabalhos recentes têm relatado que este dois grupos de idade podem apresentar diferente valor prognóstico (BALLY *et al.*, 2012).

Na LPA, os níveis de mRNA de todos os genes selecionados foram maiores no grupo de pacientes com idade de 0-8 anos, demonstrando uma relação destes genes PcG com a LPA que ocorre em pacientes pediátricos mais jovens (0-8 anos de idade). Nos genes do PRC1 estudados, os níveis de mRNA do gene *YY1* demonstrou expressão cerca de 10 vezes maior nos pacientes com menos de 8 anos de idade. Porém, o gene *BMI1* apresentou os níveis de mRNA aumentados em cerca de 2,5 vezes (Figura 4.19).

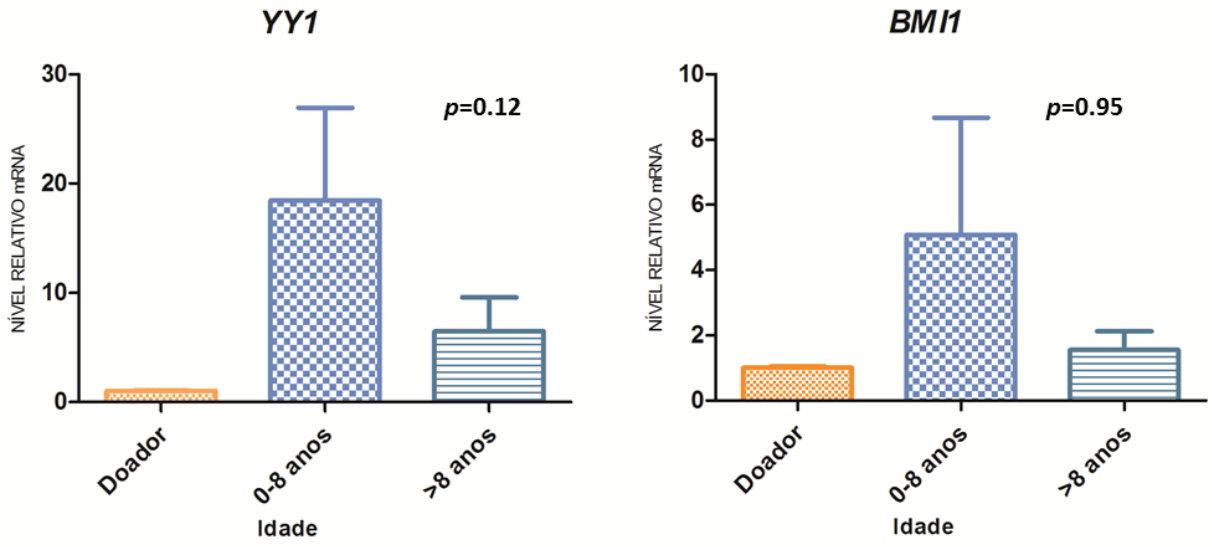


Figura 4.19- Perfil de expressão dos mRNAs dos genes *YY1* e *BMI1* na LPA em diferentes faixas etárias. Faixas etárias: 0-8 anos; 9-18 anos .Doadores: n=4 *YY1:* 0-8 anos: n=6; 9-18 anos: n=8.; *BMI1,* 0-8 anos, n=4; 9-18 anos, n=5;

No entanto, os níveis de expressão dos mRNAs dos genes do PRC2 foram maiores no grupo de pacientes com idade de 0-8 anos, apresentando-se maior em cerca de 15 vezes nos pacientes menores de 8 anos de idade do que em pacientes de 9 a 18 anos (Figura 4.20).

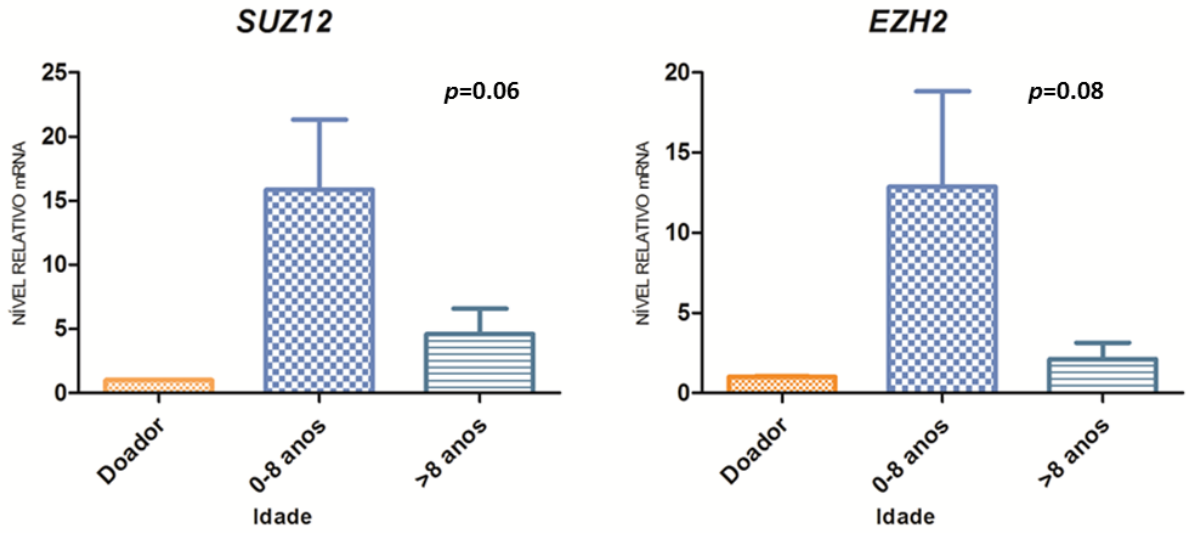


Figura 4.20- Perfil de expressão dos mRNAs dos genes *SUZ12 e EZH2* na LPA em diferentes faixas etárias. Faixas etárias; 9-18 anos. Doadores: n4=; *SUZ12*: 0-8 anos: n=7; 9-18 anos: n=9. *EZH2:* 0-8 anos, n=7; 9-18 anos, n=8.

Na LPA, os dados sugerem haver uma correlação entre os altos níveis de mRNA dos genes estudados e o grupo de pacientes de 0-8 anos de idade, demonstrando que estes genes possam ter um papel importante na LPA desta faixa etária.

4.5.4. Perfil de expressão gênica de acordo com os fatores clínicos de risco

Como a leucometria e o número de plaquetas no momento do diagnóstico são indicativos de uma possível recaída da doença e possíveis complicações clínicas, os níveis de expressão dos genes PcG foram correlacionados com dois grupos distintos. Na LMA, os grupos foram: <50.000 leucócitos/uL e ≥50.000 leucócitos/uL no sangue periférico; <50.000 plaquetas/uL e ≥50.000 plaquetas/uL no sangue periférico, Na LPA: <10.000 leucócitos/uL e ≥10.00 leucócitos/uL no sangue periférico; <40.000 plaquetas/uL e ≥40.000 plaquetas/uL (RUNITZ *et al.,* 2007;BALLY *et al.,* 2012)

Com relação à leucometria, houve uma variação entre os genes do complexo PRC1 nos dois grupos de contagem leucocitária diferente (Figura 4.21). Não sendo possível verificar diferenças nos níveis de expressão dos mRNAs dos genes *YY1,* mas parece haver uma relação dos níveis de mRNA aumentados do *BMI* e uma leucometria alta, maior que 50.000 leucócitos/uL .

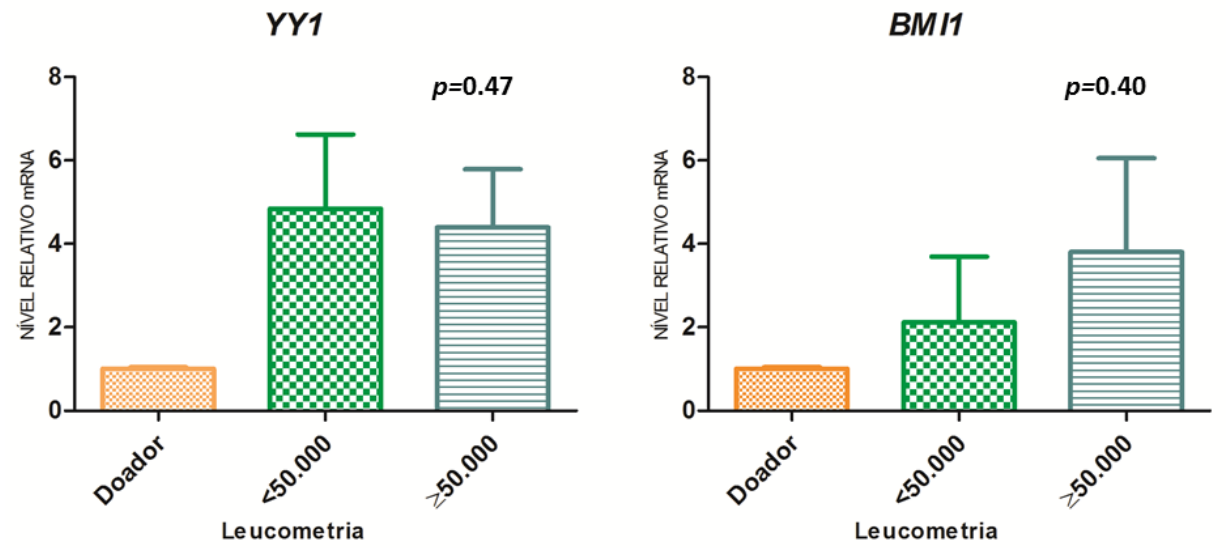


Figura 4.21– Perfil de expressão dos mRNAs dos genes do complexo PRC1 na LMA de acordo com a leucometria no momento do diagnóstico. Leucometria: <50.000 leucócitos /uL no sangue periférico; ≥50.000 leucócitos/uL no sangue periférico. Doadores: n=4; *YY1,* <50.000 leucócitos/uL: n=13; ≥50.000leucocitos/uL: n=14. *BMI1,* <50.000 leucócitos/uL, n=10; ≥50.000 leucócitos/uL, n=12.

Para os genes do PRC2, apesar de não apresentar diferenças estatisticamente significativas, os dois genes do PRC2 apresentaram maiores níveis de mRNAs no grupo das LMAs com >50.000 leucócitos/uL, demonstrando que os níveis de mRNA de *SUZ12* estaria cerca de 10 vezes aumentado no grupo de alta contagem leucocitária, enquanto que essa diferença foi muito pequena para o gene *EZH2* (Figura 4.22).

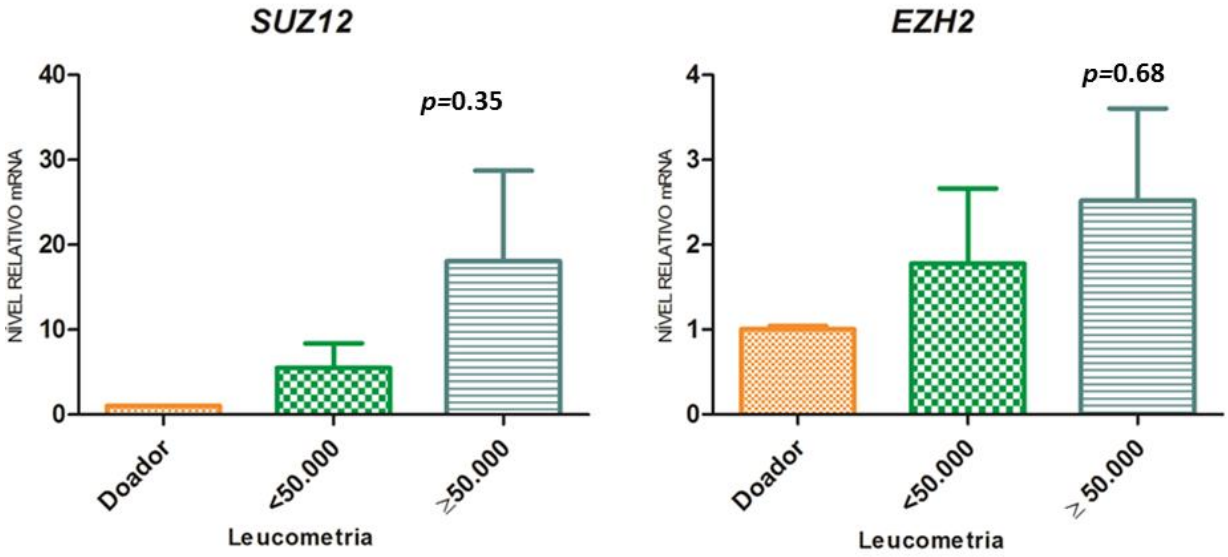


Figura 4.22- Perfil de expressão dos genes do complexo PRC2 na LMA nos dois diferentes grupos de pacientes com diferentes leucometrias. Grupos: <50.000 leucócitos/uL e ≥50.000 Leucócitosu/L no sangue periférico. Doadores, n=4;*SUZ12,* <50.000 leucócitos/uL, n=12; ≥50.000 leucócitos/uL, n=11; *EZH2,* <50.000 leucócitos/uL, n=12; ≥50.000 leucócitos/uL, n=12.

Já na LPA, os níveis de expressão dos genes *YY1 e BMI1* variaram bastante dentro dos dois grupos de contagem leucocitárias diferentes (Figura 4.23). Os níveis de mRNAs do gene *YY1* foi 2 vezes maior nos pacientes que apresentaram contagem leucocitária maior que 10.000leucocitos/uL. Enquanto que, os níveis de mRNAs do gene *BMI1* foi cerca de 5 vezes maior nos pacientes que apresentaram uma contagem leucocitária menor que 10.000 leucócitos/L.

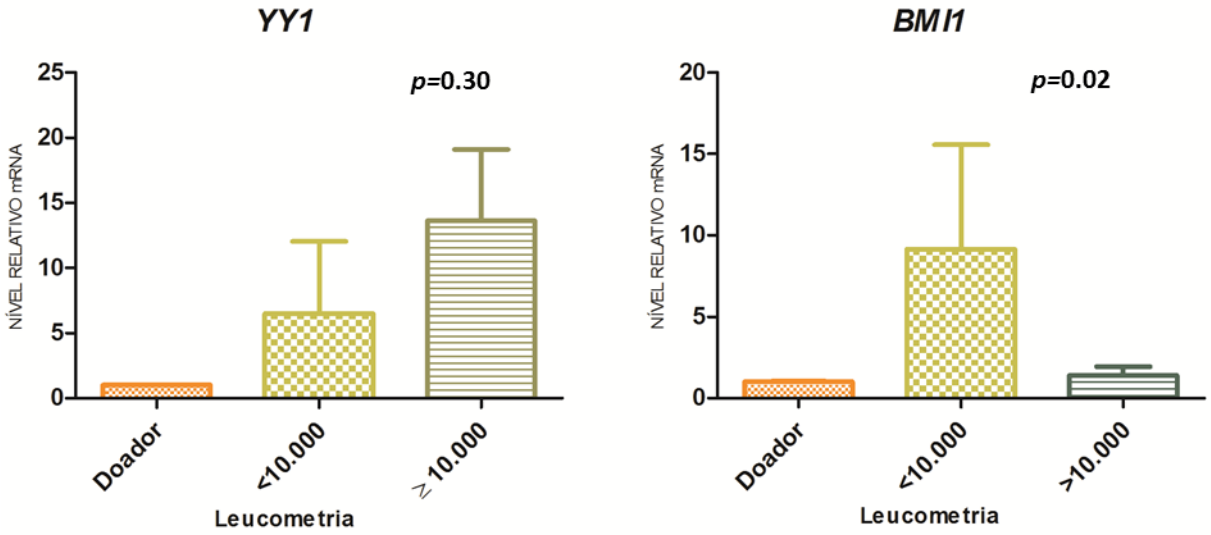


Figura 4.23– Perfil de expressão dos genes do complexo PRC1 na LPA de acordo com a leucometria no momento do diagnóstico. Leucometria: <10.000 leucócitos/uL no sangue periférico; ≥10.000 leucócitos/uL no sangue periférico Doadores, n=4; *YY1,* <10.000 leucócitosu/L, n=4; ≥10.000 leucócitos/uL, n=10; *BMI1,* <10.000 leucócitos/uL, n=2; ≥10.000 leucócitos/uL, n=7.

Embora, não tenha sido observados valores estatisticamente significativos, os níveis de expressão dos mRNAs do gene do *SUZ12* foram maiores no grupo com mais de 10.000 leucócitos/L no sangue periférico do que naqueles que apresentaram contagem leucocitária menor. No entanto, não foi possível observar diferença nos níveis de mRNA do gene *EZH2* nos dois grupos de contagem leucocitária diferente (Figura 4.24).

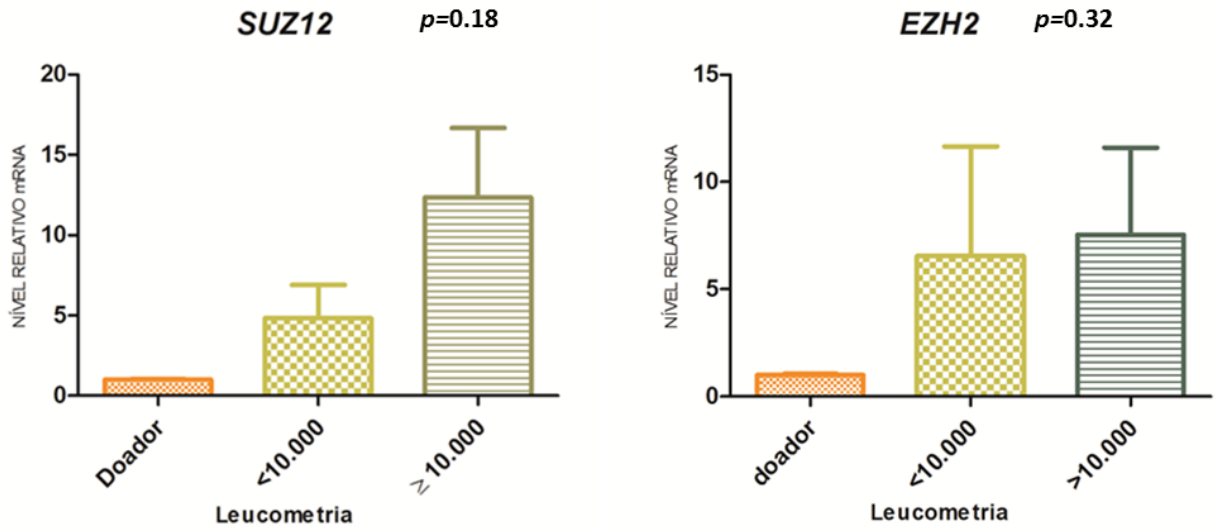


Figura 4.24 – Perfil de expressão dos genes do complexo PRC2 na LPA de acordo com a leucometria no momento do diagnóstico. Leucometria: <10.000 leucócitos/uL no sangue periférico; ≥10.000 leucócitos/uL no sangue periférico Doadores, n=4; *SUZ12,* <10.000 leucócitos/uL, n=6; ≥10.000 leucócitos/uL, n=10. *EZH2,* <10.000 leucócitos/uL, n=6; ≥10.000 leucócitos/uL, n=19.

Com relação ao número de plaquetas, os níveis de expressão dos mRNAs dos genes *YY1* e *BMI1* variaram na LMA. Foi possível observar que o gene *YY1* apresentou níveis aumentados em mais de 3 vezes nos pacientes com um número menor que 50.000 plaquetas/uL no sangue periférico. Enquanto que, os níveis de mRNAs do gene *BMI1* foi maior nos pacientes com mais de 50.000 plaquetas/uL em cerca de 6 vezes (Figura 4.25). Estes resultados foram estatisticamente significativos para o gene *BMI1* (p= 0.09).

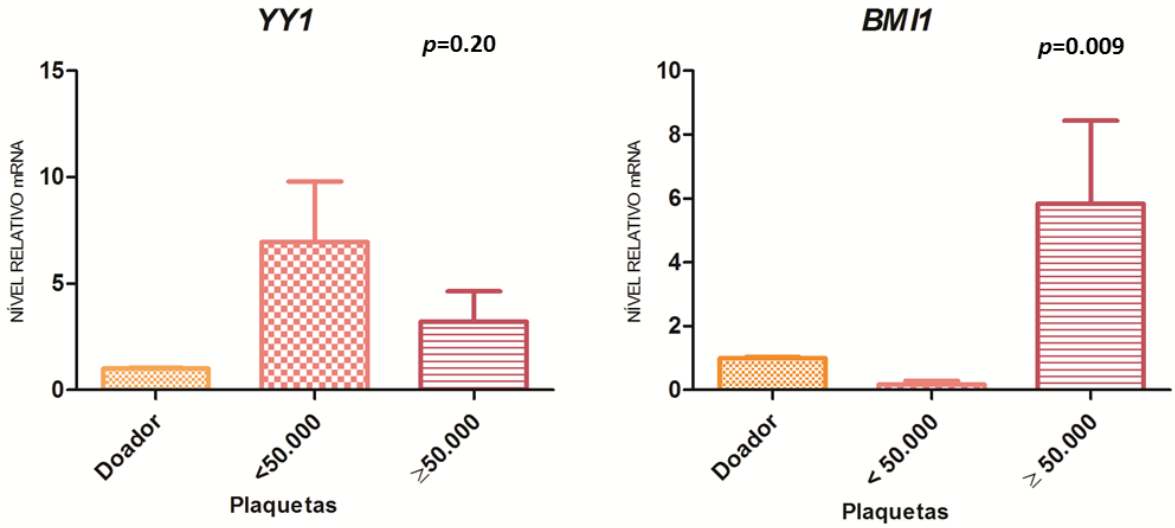


Figura 4.25- Perfil de expressão dos genes do PRC1 na LMA nos dois grupos de contagem plaquetárias diferentes. Grupos: doadores, n=4; *YY1,* <50.000 plaquetas/uL, n=7; e ≥50.000 plaquetas/uL, n=12; *BMI1,* <50.000 plaquetas/uL, n=76 e ≥50.000 plaquetas/uL, n=11.

Enquanto que os níveis de mRNAs dos genes *SUZ12* e *EZH2* foram maiores nos pacientes que apresentavam uma contagem de plaquetas no momento do diagnóstico maior ou igual a 50.000 plaquetas/L (Figura 4.26). Demonstrando que os níveis de mRNA de *SUZ12* estaria maior, em cerca de 4 vezes, nos pacientes com mais 50.000 plaquetas/uL. Já os níveis de mRNA do gene *EZH2* foi maior cerca de 2 vezes no grupo com mais 50.000 plaquetas/L no sangue periférico.

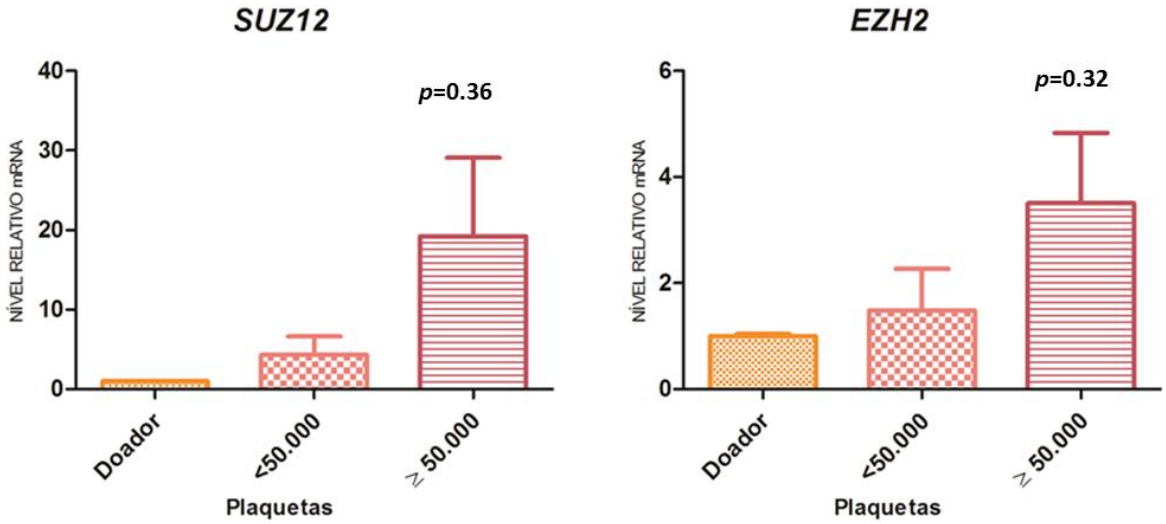


Figura 4.26- Perfil de expressão dos genes do PRC2 na LMA nos dois grupos de contagem plaquetárias diferentes. Grupos: doadores, n=4; *SUZ12,*<50.000 plaquetas/uL, n=76 e ≥50.000 plaquetas/uL, n=12; *EZH2,,*<50.000 plaquetas/uL, n=7; e ≥50.000 plaquetas/uL, n=11.

Já na LPA, os níveis de expressão dos mRNAs do genes do PRC1 foram maiores no grupo de pacientes que apresentava um baixo número de plaquetas no sangue periférico no momento do diagnóstico(Figura 4.27). Os níveis de mRNA do gene *YY1* foi quase 6 vezes maior no grupo com contagem de plaquetas menor que 40.000/uL.

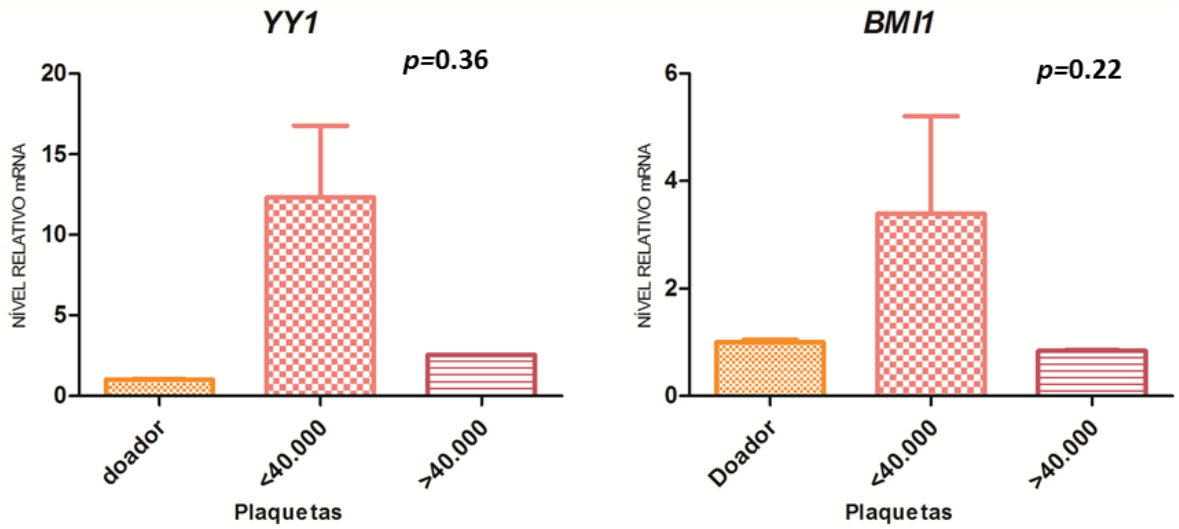


Figura 4.27- Perfil de expressão dos genes do PRC1 na LPA em dois grupos de pacientes com número de plaquetas diferentes. Grupos: doadores, n=4; *YY1,* <40.000 plaquetas/uL, n=13; ≥40.000 plaquetas/uL, n=3; *BMI1*, <40.000 plaquetas/uL, n=8; ≥40.000 plaquetas/uL, n=3.

Apesar de não apresentarem diferenças estatisticamente significativas, os níveis de mRNAs dos genes do complexo PRC2 variam na LPA(Figura 4.28). Foi possível observar que gene *SUZ12* apresentou níveis aumentados em cerca de 5 vezes nos casos que apresentaram uma contagem de plaquetas menor que 40.000/L. O inverso foi visto para o gene *EZH2*, no qual os níveis aumentados foram observados nos pacientes que apresentaram uma contagem de plaquetas maior que 40.000/L.

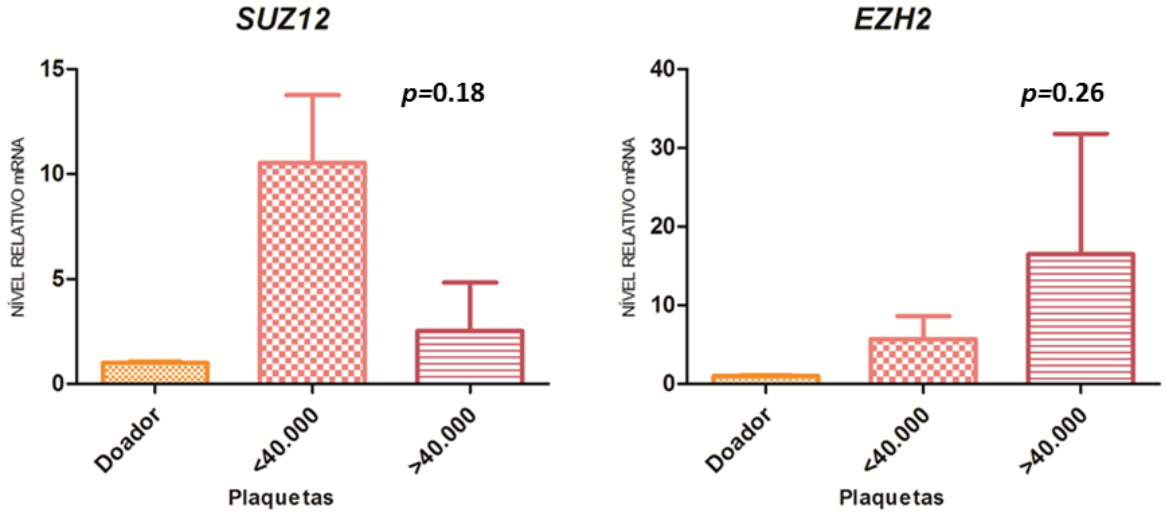


Figura 4.28– Perfil de expressão dos genes do complexo PRC2 na LPA de acordo com o número de plaquetas. Doadores, n=4; *EZH2,* plaquetas: <40.000/L, n=13; Plaquetas: ≥ 40.000/L, n=2; *SUZ12*, <40.000/L, n=14; Plaquetas: ≥ 40.000/L, n=2.

Esses resultados sugerem que *SUZ12* possa estar envolvido no quadro característico de hemorragia bastante frequente na LPA.

5.Discussão

A citogenética molecular tem se destacado na caracterização de anormalidades cromossômicas presentes em diferentes tipos de tumores sólidos, assim como em neoplasias hematológicas. Tanto o CGH *array* quanto o tCGH são de grande importância na caracterização de anormalidades cromossômicas, principalmente, em tumores sólidos que apresentam limitações quanto ao número de metáfases de qualidade para a realização do estudo citogenético. Porém, anormalidades balanceadas e não-recorrentes não são possíveis de serem detectadas utilizando estas duas técnicas de citogenética molecular, sendo, por isso, necessária a aplicação de mais uma técnica de citogenética molecular na caracterização destas anormalidades cromossômicas presentes nos diversos tipos de tumor (DAS & TAN, 2013).

No caso das leucemias, a aplicação de outras técnicas de citogenética molecular como as de multicolor FISH (WCPs, MCB, BACs) tem se mostrado de grande importância para a caracterização de anormalidades crípticas, além de anormalidades citogenéticas não-recorrentes, assim como, novas anormalidades cromossômicas que podem estar envolvidas na produção de novas fusões gênicas, na ativação de oncogenes e na perda de genes supressores de tumor que possam estar envolvidos na patogênese da LMA (DE FIGUEIREDO *et al.,* 2010; DE FIGUEIREDO *et al.,* 2012).

Com a utilização destas técnicas de citogenética molecular, foi possível observar, neste estudo, uma frequência de 89% de anormalidades cromossômicas nos casos de LMA. Esses resultados demonstram a importância da utilização das técnicas de citogenética molecular para a determinação do perfil cariotipico da LMA da infância, já que o percentual deste estudo foi mais de 10% maior do que o relatado na literatura, utilizando somente bandeamento G que foi de 75% (Manola, 2009; Raimondi et al., 1998). Quando foram aplicadas técnicas de multicolor FISH, foi possível esclarecer ou até mesmo revelar anormalidades cromossômicas crípticas em 24% dos casos. Assim, foi possível estratificar esses pacientes em grupos prognósticos distintos. Com isso, foi possível demonstrar a importância da combinação das diferentes técnicas de citogenética convencional e molecular na caracterização dos casos de LMA da infância, principalmente, quando estes casos

apresentam cariótipos complexos ou anormalidades citogenéticas crípticas (anexos 8.1, 8.2 e 8.3).

Com relação aos subtipos FAB, o subtipo M3 representou 34,5% dos casos desta amostra. Esses dados corroboram com a literatura que afirma que países latinos apresentam uma maior frequência de LPA quando comparados com outros países (MANOLA, 2009; POMBO-DE-OLIVEIRA et al., 2009). No entanto, a frequência descrita nesta coorte foi 10% maior que a já descrita pela literatura. Este estudo pode demonstrar que o Brasil apresenta uma alta taxa de LPA na população pediátrica, dados estes pouco relatados no Brasil. Nesses casos de LPA do presente estudo, a taxa de óbitos foi de 27,5% durante o primeiro bloco de quimioterapia, diferindo dos dados da literatura que afirmam que casos de LPA apresentam uma alta taxa de cura que pode chegar a cerca de 90% (JACOMO *et al.,* 2008). Além disso, esta taxa de óbitos foi maior em pacientes adolescentes(13-18 anos de idade) do que em crianças (≤12 anos de idade). Esses dados discordaram de um estudo europeu de Bally e colaboradores em 2012 que relatou uma sobrevida livre de eventos para os adolescentes com LPA maior que em crianças, com uma taxa de sobrevida livre de doença em 5 anos de 93%.

Já em relação à distribuição das anormalidades nas diferentes faixas etárias, foi possível observar que anormalidades envolvendo a região q23 do cromossomo 11 foram mais frequentes nos pacientes que apresentaram idades de 0 a 2 anos. Esses dados estão de acordo com a literatura que mostra uma maior frequência desta anormalidade cromossômica em lactentes de até 2 anos de idades (MANOLA, 2009). No entanto, foi observada uma frequência de anormalidades envolvendo o cromossomo 7 nesta mesma faixa etária. Esses dados ainda não tinham sido descritos na literatura, sendo necessário, então, um maior número de casos de LMA da infância para determinar a frequência deste subgrupo citogenético nesta faixa etária na população brasileira. A t(15;17) foi detectada em todas as faixas etárias, até mesmo em pacientes de 0 a 2 anos de idade. A presença da t(15;17) nesta faixa etária é rara (MANOLA, 2009), sendo necessários mais estudos para determinar a frequência desta t(15;17) em pacientes de 0 a 2 anos da população brasileira.

Os resultados citogenéticos deste trabalho confirmam e aprimoram a descrição da grande heterogeneidade genética da LMA da infância, mas não foram utéis para identificar novos grupos prognósticos (BUCHEN *et al.,* 2007). Isso possivelmente ocorreu devido a identificação de uma grande quantidade de anormalidades não recorrentes. Com isso, faz-se necessário a continuidade do uso

destas técnicas numa coorte maior de pacientes nesta faixa etária. Por outro lado, a identificação de alterações cromossômicas no diagnóstico da LMA da infância apesar de ser fundamental na definição do tratamento e do prognóstico, além de nos permitir entender que genes podem estar envolvidos na parada de maturação das células e a evolução clinica desta doença, ela não traz informações sobre os mecanismos que levaram à doença. Pois, já foi demonstrado que somente a presença destas fusões gênicas não poderia causar a doença, sendo necessários outros eventos para o aparecimento da leucemia. Recentemente, tem sido sugerido que as alterações epigenéticas possam estar envolvidas neste processo como um evento importante para o aparecimento da leucemia (SANDERS & VALK, 2013).

Para contribuir neste aspecto, nós estudamos em 52 pacientes a expressão de 4 genes dos complexos PcG para tentar entender possíveis mofificações epigenéticas. Sendo assim, foi possível observar que os genes PcG analisados neste estudo, de forma geral, apresentaram maiores níveis de mRNA do que o grupo dos doadores. Esses dados corroboram com os dados da literatura (MARTINEZ-PEREZ *et al,* 2010) que mostram que os genes PcG estariam mais expressos em diversos tipos de cânceres, incluindo as neoplasias mielóides em adultos (GRUBACH *et al*., 2008; XU *et al.,* 2011). Isso porque, vários trabalhos recentes demonstraram que essas alterações no panorama epigenético, como a expressão aumentada de genes responsáveis por essas modificações epigenéticas, como a modificação pós-tradução das histonas, podem contribuir para o processo da leucemogênese. Isso se justifica porque estas modificações podem provocar alterações no perfil de expressão gênica, o qual frequentemente pode levar a um aumento da auto-renovação das células malignas em detrimento do processo de diferenciação normal (RICE *et al.,* 2007).

A hematopoese é um processo dinâmico, no qual células-tronco hematopoéticas (CTH) dão origem a todas as linhagens do sangue, incluindo a linhagem linfóide e a mielóide. Esse processo envolve a coordenação de vias de transdução de sinal que são responsivas a estímulos extracelulares e a uma rede de fatores de transcrição e modificadores da cromatina que afetam a expressão gênica, de tal modo que, o destino final das CTH está ligado às necessidades de cada organismo (RICE *et al.*, 2007). Sendo assim, quando os níveis de expressão dos genes PcG foram estudados nos diferentes subtipos morfológicos, que foram estabelecidos de acordo com o grau de diferenciação da CTH acometida pela leucemia, foi possível verificar uma heterogeneidade nos níveis de mRNA nos

diferentes subtipos morfológicos. Porém, no subtipo M3 foi observado um perfil de mRNA aumentado em todos os genes PcG selecionados para o estudo, principalmente do gene *EZH2 (*Anexo 8.4)*.*

A LMA-M3 ou leucemia promielocítica aguda (LPA) é caracterizada pela presença da t(15;17) em 95% dos casos. A fusão gênica gerada produz uma proteína quimérica que tem sido sugerida, por muitos estudos, como tendo um papel central na transformação oncogênica. Isso porque a fusão *PML/RARA* pode causar perturbações no panorama epigenético normal durante a hematopoese, já que esta fusão gênica leva a transformação das CTHs através do silenciamento dos genes-alvo de PML e RARA, como por exemplo, os genes *HOX*, levando a um acúmulo de promielócitos anormais na medula óssea. Essa repressão transcricional aberrante pode ser mediada pelo recrutamento de cofatores que se liguem ao DNA como o RXRα e, de uma forma mais destacada, pela associação com complexos co-repressores, como o NCoR/HDAC, DNMT3A e o complexo PRC2(CHENG & SO *et al*, 2011). Tem sido proposto que modificações de histona pós-tradução, como a H3K27me3 e H3K9me3, são positivamente correlacionadas com ligação da fusão proteína PML/RARA, enquanto que a acetilação da histona H3 foi associada à perda da ligação do PML/RARA ao DNA (MARTENS *et al.,* 2010). A produção da H3K27me3 é promovida pelo complexo PRC2 e, acredita-se que o complexo PRC1 possa reconhecer esta modificação na histona H3 e promover a manutenção do silenciamento de genes importantes para os processos de diferenciação, apoptose e auto-renovação celular (SAEED *et al,* 2011).

O gene *EZH2* é um dos componentes do PRC2 com função de adicionar os 3 grupamentos metil a cauda da histona 3 no resíduo de numero 27 (H3K27me3). Alterações genéticas neste gene já foram descritas em diversas neoplasias mielóides, principalmente aquelas mais frequentes em adultos, como é o caso da SMD e das doenças mieloproliferativas (*SHIH et* al., 2012). Este gene foi mais expresso no subtipo morfológico M3 do que nos outros subtipos. A super-expressão deste gene já foi descrita em diversos tipos de tumores sólidos (SIMON & LANGE, 2008), assim como, em neoplasias hematológicas e em linfomas (RADULOVIC *et al*., 2013), porém ainda não havia sido descrita na LPA, principalmente em uma população pediátrica. Este gene contribui para a regulação das decisões do destino da célula, controlando o balanço entre a auto-renovação e a diferenciação, mas também tem demonstrado estabilizar a estrutura da cromatina e manter o potencial de auto-renovação das CTHs através do desligamento dos genes pro-diferenciação

e por promover a mudança em direção a diferenciação por aumentar a expressão de genes que facilitam a progressão através do ciclo celular (LUND *et al.,* 2014).

Com a evidência do papel do gene *EZH2* no aumento do potencial de auto-renovação de alguns canceres, incluindo as neoplasias hematológicas, terapias que levem a inibição deste gene podem levar a exaustão da população de células-tronco do câncer. Em 2009, foi feito um estudo utilizando inibidores de *EZH2* e foi possível demonstrar que as células da LMA foram induzidas ao processo de apoptose. Porém, isto não ocorreu para as células progenitoras da medula óssea CD34+ (FISKUS *et al,* 2009). Pacientes com LPA também podem se beneficiar dessa terapia direta ao complexo PRC2. Na LPA, o PRC2 colabora com a fusão oncogênica *PML/RARA* para reprimir genes envolvidos na diferenciação e na promoção do desenvolvimento do tumor (VILLA *et al,* 2007). Esses pacientes são tipicamente tratados com acido retinoico, mas a depleção de SUZ12 nos pacientes com LPA consegue reverter as modificações epigenéticas induzidas pela proteína quimérica PML/RARA, sugerindo que terapias-alvo para PRC2 podem também ser usadas para tratar esse tipo de leucemia.

A heterogeneidade na expressão dos genes PcG entre os pacientes pode refletir a diversidade presente na LMA com relação ao seu *background* genético. Como a subclassificação cariotípica tem sido usada como o mais potente indicador para a estratificação de risco, os níveis de expressão dos genes PcG também foram avaliados para 6 grupos citogenéticos diferentes. Todos os genes PcG foram mais expressos no grupo das leucemias com a fusão gênica *PML/RARA* , nas LMAs com rearranjos *CBF* e nas leucemias com anormalidades de 7 e 5. Estes dados corroboram com os pouco dados da literatura que afirmam que as leucemias com rearranjo da subunidade CBF apresentam altos níveis de expressão dos genes *BMI1, YY1 e EZH2 (*GRUBACH *et al.,* 2008). Porém, altos níveis de expressão de *SUZ12* para este grupo ainda não havia sido descrito, nem mesmo em uma coorte de pacientes adultos. Foi a primeira vez que este dado foi relatado na literatura. Essa alta expressão dos gene PcG tem sido correlacionada com a baixa expressão do gene *MEIS* e de alguns genes *HOX,* como o *HOXA4* e *HOXA9.* Outros estudos conseguiram demonstrar que a alta expressão dos genes *MEIS* e *HOXA9* resultava em uma LMA mais agressiva com um período menor entre a transformação da CTH primária em uma célula-tronco leucêmica, já que as proteínas codificadas por estes dois genes levavam a não-sensibilização da célula aos indutores de apoptoses utilizados(GOYAMA & MULLOY, 2011).

Várias evidências têm sugerido que exista uma relação entre a regulação epigenética e a desregulação da expressão de genes importantes nas leucemias CBF. As translocações frequentemente observadas nestas leucemias geram fusões gênicas, como a *RUNX1/RUNX1T1 e a CBFβ-MYH11* que recrutam proteínas co-repressoras, assim como, modificadores de histonas, como as histonas deacetilases, que vão levar a um silenciamento aberrante de genes importantes para a hematopoese normal, como o próprio *RUNX1*. Além disso, estudos de larga escala determinaram que alterações epigenéticas, como a metilação do DNA, estariam presente nas leucemias CBF conferindo um perfil de metilação do DNA diferente das células CD34+ normais. Porém, somente esta alteração epigenética na presença das fusões genicas descritas não seriam suficientes para o estabelecimento da leucemia. Isso porque células CD34+ normais que foram induzidas a expressar as fusões gênicas *RUNX1/RUNX1T1* e a *CBFβ-MYH11* não demonstraram o mesmo perfil de metilação das amostras das leucemias CBF (GOYAMA & MULLOY, 2011). Neste contexto, a expressão aumentada dos genes PcG poderiam levar a um silenciamento dos genes *MEIS* e *HOXA4 e HOXA9* que poderiam conferir a estas células características importantes, como a não-sensibilização aos sinais apoptose, que levaria estas células a um fenótipo maligno.

As leucemias que apresentam translocações envolvendo o gene *MLL* apresentam desfechos clínicos e biológicos característicos. Rearranjos com o gene *MLL* já foram descritos para mais de 60 parceiros gênicos que, na maioria das vezes, são proteínas nucleares que compõem o complexo de elongamento da transcrição. O gene *MLL* codifica uma histona metiltransferase que é responsável pela metilação, dimetilação e trimetilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4me, me2, me3). Esta modificação de histona está associada com uma transcrição gênica ativa nos locais onde elas estão presentes(FULLGRABE *et al.,* 2011). A proteína MLL tem um papel crítico na proliferação e na determinação da linhagem nos progenitores hematopoéticos durante o desenvolvimento embrionário, pois mantem a expressão dos genes *HOX*, como por exemplo, o *HOXA7 e HOXA9.* Pois, na presença das fusões gênicas, o domínio SET responsável pela atividade de metiltranferase é perdido, permitindo o recrutamento da DOT1L, uma metiltranferase responsável pela adição de grupamentos metil a lisina 79 da histona 3 (H3K79me). Esse recrutamento de DOT1L pela presença da fusão com o gene *MLL* leva a uma expressão aberrante dos genes do complexo HOXA, já que os seus promotores recebem alterações epigenéticas nas histonsa presentes neste locais (KRIVTSOV & ARMSTRONG,

2007). Como a expressão dos genes PcG foi muito baixa nos pacientes com rearranjos do gene *MLL*, isso pode realmente sugerir que a expressão dos genes *HOX* possa estar aumentada garantindo a agressividade e as características de um fenótipo de célula-tronco.

Os níveis de expressão dos genes PcG selecionados também foram avaliados em dois grupos diferentes de idade tanto para a LMA como para a LPA. Essa avaliação diferiu bastante entre a LMA e a LPA. Na LMA, o gene com maiores níveis de expressão no grupo das crianças menores de 10 anos foi o *BMI1*. Enquanto que todos os outros genes foram mais expressos no grupo das crianças e adolescentes maiores do que 10 anos. Já na LPA todos os genes PcG selecionados foram mais expressos no grupo das crianças até 8 anos de idade, demonstrando que estes genes podem ter um papel na LPA desta faixa etária. Modificações nas histonas em relação à idade é uma correlação que ainda não foi descrita na literatura, necessitando de estudos que possam estabelecer se existe ou não alguma relação.

A leucometria no sangue periférico no momento do diagnóstico também caracteriza um importante indicador de resposta ao tratamento que o paciente receberá. Isso porque, em termos clínicos, a presença de grande quantidade de leucócitos no sangue periférico pode ser um indicativo da gravidade da doença e consequentemente, do prognóstico da mesma (CREUTZIG *et al.*, 2012). Quando foram avaliados os perfis de expressão destes genes PcG em relação a leucometria nos pacientes com LMA e na LPA, não foi possível verificar uma correlação destes genes com a contagem leucocitária. Isso pode estar acontecendo porque estes genes apesar de poderem trabalhar em conjunto nos complexos PRCs, eles também apresentam funções que podem ser analisadas em separado(RUBNITZ *et al.,*2007; SCHWARTZ & PIRROTA, 2013).

As plaquetas são os menores componentes do sangue e são produzidas por células especializadas da medula óssea denominadas megacariócitos. As plaquetas podem estar envolvidas em diferentes condições patológicas, incluindo a trombose, a metástase tumoral, a inflamação e a resposta imune (QIAN & WEN-JUN, 2013). A leucemia aguda frequentemente pode causar sangramento e, consequentemente, pode levar a morte. O mecanismo de sangramento causado pela leucemia é complexo e envolve a infiltração de células leucêmicas na parede dos vasos sanguíneos, redução da produção de plaquetas e uma disfunção no processo de coagulação/anticoagulação Com relação ao número de plaquetas na LMA, os genes

do complexo PRC1 apresentaram altos níveis de mRNA no grupo de pacientes com plaquetas <50.000/uL, porém, nos genes do complexo PRC2 não foi possível observar nenhuma correlação dos níveis de expressão destes genes com algum dos dois grupos de plaquetas propostos. Enquanto os níveis de mRNA foram maiores nos pacientes com mais 50.000 plaquetas/uL, os níveis de *EZH2* foram maiores nos pacientes com menos de 50.000 plaquetas/L. Sendo assim, estes dados sugerem que os genes do PRC1 podem participar do processo de produção das plaquetas, já que novos estudos tem sugerido que alterações epigenéticas podem resultar na disfunção das plaquetas (FREZON *et al.*, 2012). Já na LPA, todos os níveis de mRNAs dos genes estudados foram maiores nos casos que apresentaram baixa contagem de plaquetas, menos os do gene *YY1*. Esses altos níveis de mRNA desses genes neste grupo de pacientes podem conferir um mau prognóstico, pois pacientes com número baixo de plaquetas na LPA apresentam uma alta tendência a hemorragias, principalmente no sistema nervoso, podendo levar a Doença Intravascular Disseminada (DIC) (STEIN *et al*., 2009).

Sendo assim, níveis aumentados dos genes do complexo PcG na LMA da infância, principalmente na LPA, podem resultar em uma instabilidade aumentada nesta faixa etária, com uma maior frequência de alterações citogenéticas em crianças menores de 10 anos de idade quando comparada a LMA do adulto.

6.Conclusões

- A frequência de anormalidades cromossômicas na LMA da infância brasileira foi de 89%, diferente da alta taxa de cariótipos normais encontrada em pacientes adultos.
- O subtipo morfológico mais encontrado neste trabalho foi o subtipo FAB M3 com uma frequência de 34,5%.
- Foram observadas todas as translocações recorrentes na LMA, tais como: t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q21;q12), inv(16)(p13;q22) e anormalidades envolvendo a 11q23. Porém, a t(15;17)(q21;q12), atingiu uma alta frequência (36,5%). Esta frequência ainda não tinha sido observada na população da LMA da infância.
- A combinação das técnicas convencionais, tais como bandeamento G e de técnicas moleculares, tais como M-FISH e MCB, mostrou que houve uma aumentada complexidade no perfil cromossômico, sugerindo que técnicas de citogenética molecular devam ser incorporadas a outros estudos da LMA da infância, principalmente, a estudos citogenéticos da criança brasileira.
- Os genes PcG estudados podem estar mais expressos na LMA e na LPA do que em doadores saudáveis.
- Com relação aos subtipos FAB, o subtipo M3 foi o que apresentou níveis aumentados de todos os genes PcG estudados.
- Com relação aos subgrupos citogenéticos, as leucemias *PML/RARA* positivas apresentaram níveis aumentados de todos os genes PcG estudados, principalmente em crianças menores que 8 anos de idade. Enquanto que as leucemias com rearranjo do gene MLL apresentaram baixos níveis de todos estes genes PcG.
- Níveis aumentados de mRNA dos genes PcG estudados que compõem os dois complexos PRC foram maiores em pacientes que apresentaram uma contagem leucocitária maior que 40.000 leucócitos/L na LMA.
- Níveis aumentados de mRNA dos genes PcG estudados que compõem os complexos PRC foram inversamente correlacionados com o número de plaquetas na LPA.

7. Referências Bibliográficas

-ABDEL-WANAB O *et al.* Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignances. **Blood**, v.114: 144-47, 2009.

- ALVAREZ S *et al*. DNA methylation profiles and their relationship with cytogenetics status in adult acute myeloid leukemia. **PLoS ONE**, v. 5, p. e12197, 2010.

-BACHER, U.; KERN, W.; SCHNITTGER, S.; HIDDEMANN, W.; SCHOCH, C.; HAFERLACH, T. Further correlations of morphology according to FAB and WHO classification to cytogenetics in de novo acute myeloid leukemia: a study on 2,235 patients**. Ann. Hematol**. , v.84, p. 785-791,2005.

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

-BAYLIN SB, OHM JE. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nature Rev. Cancer**, v.6, p.107-16, 2006.

-BAYLIN SB & JONES PA. A decade of exploring the cancer epigenome- Biological and translational implications**. Nature Reviews Cancer**, v.11, p.726-34, 2011.

-BENNETT, J.M *et al*. Proposals for the classification of the acute leukaemias.**Br. J. Hematol.**, v. 33, p. 451-458, 1976.

-BENNETT JM *et al.* Proposed revised criteria for the classification of acute myeloide leukemia. A reporte of the French-American-British Cooperative Group.**Ann Intern Med**, v.103, p.620-625a, 1985.

-BENNETT JM *et al.* Proposed revised criteria for the classification of acute myeloide leukemia. **Ann Intern Med**, v.103, p.626-629b, 1985.

-CHENG n & SO CWE. Transcriptional and epigenetic networks in haematological malignancy. **FEBS letters,** v.585, p.2100-11, 2011.

-CHOU WC *et al*. The prognostic impact and stability of *Isocitrate dehydrogenase* 2 mutation in adult patiens with acute myeloid leukemia.**Leukemia**, v.25, p.246-53, 2011.

-CLARKE CA AND GLASER SL. Acute myeloid leukaemia. **N Eng J Med**, v. 342, p.358-361, 2000.

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

-CUCUIANU A. Dominant and opportunistic leukemic clones: Proposal for a pathogenesis-oriented classification in acute myeloid leukemia. **Med Hypotheses**, v.65:p.107-113, 2005

-CUNEO, A *et al*. Incidence and significance of cryptic chromosome aberrations detected by fluorescence in situ hybridization in acute myeloid leukemia with normal karyotype. **Leukemia**, v. 16, p. 1745-1751, 2002.

-DANG L, JIN S, SU SM. *IDH* mutations in glioma and acute myeloid leukemia. **Trends Mol. Medicine**, v.16, p.387-97, 2010.

-DAS K, TAN P. Molecular cytogenetics: recent developments and applications in cancer. **Clin Genet**., v.84(4):315-25, 2013.

-DASH A, GILLIAND DG. Molecular Genetics of acute myeloid leukemia. Best Pract. Res. **Clin. Haematol.**, v.14:, p.9-64,2001.

- DE FIGUEIREDO AF *et al.* A new cryptic ins(11;1)(q23;q21q31) detected in a t(1;8;11)(q21;p21;q23) in a baby with acute myeloid leukemia FAB AML-M5. Blood Cells Mol Dis., v.15;45(3):197-8, 2010.

- DE FIGUEIREDO AF *et al.* A rare cryptic and complex rearrangement leading to MLL-MLLT10 gene fusion masked by del(10)(p12) in a child with acute monoblastic leukemia (AML-M5). **Leuk Res**., v. 36(4):e74-7, 2012.

-DENEBERG S *et al.* Prognostic DNA methiçation patterns in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are predefined by stem cell chromatin marks. **Blood**, v.118, p.5573-82, 2011.

-DEWALD, G.; KETTERLING, R.P.; WYATT, W.A.; STUPCA, P. Cytogenetics studies in neoplastic hematologic disorders. In McClatchey K (ed): Clinical Laboratory Medicine, 2nd ed. Baltimore, Williams & Wilkins, p. 658-685, 2002.

-DING L *et al*. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing .**Nature.**, v 481(7382), p.506-10,2012.

-EMANUEL BS & SAITTA SC. From microscopes to microarrays: dissecting recurrent chromosomal rearrangements. **Nature Review Genetic, v.**8, p. 869-83, 2007.

-FEINBERG AP. An epigenetic approach to cancer etiology. **Cancer J**., v.13(1):70-4, 2007.

-FIGUEROA ME *et al.* DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. **Cancer Cell**, v.17 (1), p. 13-27, 2010.

-FISKUS W *et al.* Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. **Blood,** v. 114, p.2733-43, 2009.

-FULGRABE J, KAVANAGH E, JOSEPH B. HIstone onco-modifications. **Oncogene,** v.30; 3391-403, 2011.

-FRESON K, IZZI B, VAN GEET C. From genetics to epigenetics in platelet research. **Thromb Res.**, v.129(3):325-9, 2012.

-GAMERDINGER, U *et al.*. Cryptic chromosomal aberrations leading to an AML1/ETO rearrangement are frequently caused by small insertions. **Genes Chromosome Cancer**, v. 36, p. 261-272, 2003.

-GILLILAND DG, JORDAN CT, FELIX CA. The molecular basis of leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program., p.80-97. 2004.

-GOYAMA S, MULLOY JC .Molecular pathogenesis of core binding factor leukemia:current knowledge and future prospects **Int J Hematol** ., v. 94:126–133, 2011.

-GREGORY J, FEUSNER J. Acute promyelocytic leukemia in childhood. **Curr Oncol Rep.**, v.11(6):439-45, 2009.

-GREISMAN HA, HOFFMAN NG, HI HS. Rapid High-Resolution Mapping of Balanced Chromosomal Rearrangements on Tiling CGH Arrays. **JMD**, v.13(6): 621-33, 2011.

-GRIMWADE D.The clinical significance of cytogenetic anormalities in acute myeloid leukeamia**. Best Pract Res Clin Haematol**. ,v.14,p.497-529, 2001.

-GRUBACH L *et al.* Gene expression profiling of Polycomb, Hox and Meis genes in patients with acute myeloid leukaemia. **Eur J Haematol**., v.81(2):112-22, 2008.

-HE H, HUA X, YAN J. Epigenetic regulations in hematopoietic HOX code. **Oncogene,** v.30, p. 379-88, 2011.

-HEAD, D.R. Classification and Differentiation of the Acute Leukemias. In:Wintrobe's Clinical Hematology. Greer, J.P.; Foerster, J.; Lukens, J.N.; Rodgers, G.M.; Paraskevas, F.; Glader, B., 11nd, Bippincott Williams & Wilkins, p. 2063-2076, 2004a.

-HEAD, DR. Acute Myelogenous Leukemia in Children. In:Wintrobe's Clinical Hematology. Greer, J.P.; Foerster, J.; Lukens, J.N.; Rodgers, G.M.; Paraskevas, F.; Glader, B., 11nd, Bippincott Williams & Wilkins, p. 2169-90, 2004b.

-HEIM, S.; MITELMAN, F**.** Cancer Cytogenetics, copyright 1995. Alan R. Liss, Inc.

-HOWARD, S.C *et al*. Establishment of a Pediatric Oncology Program and Outcomes of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Resource-Poor Area. **Jama**, v.291, p. 2471-2475, 2004.

-JÁCOMO RH *et al.* Clinical features and outcomes of 134 Brazilians with acute promyelocytic leukemia who received ATRA and anthracyclines. **Hematologica**, v. 92, p.1431-32, 2007.

-JÁCOMO RH, DE FIGUEIREDO-PONTES LL , REGO EM. Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. **Rev Assoc Med Bras**, v. 54(1), p. 82-9, 2008.

-JAFFE ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, p.523-31, 2009.

-JAN M, MAJETI R. C lonal evolution of acute leukemia genomes. **Oncogene,** v. 32(2):135-40, 2013.

-KEARNEY L. Molecular Cytogenetics. **Best Pract & Res Clin Haematol**, v.14, p.645-668, 2001.

-KIM JK, SMARANAYAKE M, PRADHAN S. Epigenetics mechanism in mammals. **Cell Mol life Sci**, v.66(4), p. 596-612, 2009.

-KLAUS, M *et al.* Cytogenetic profile in de novo acute myeloid leukemia with FAB subtypes M0, M1 and M2: a study based on 652 cases fluorescence in situ hybridization.**Cancer Genet Cytogenet**, v. 155, p. 47-56, 2004.

-KLAUS M *et al.*. Cytogenetics, fluorescence in situ hybridization, and reverse transcriptase polymerase chain reaction are necessary to clarify the various mechanism leading to an MLL-AF10 fusion in acute myelocytic leukemia with 10;11 rearrangement. **Cancer Genet.Cytogenet.**, v. 144, p. 36-43, 2003.

-KRIVTSOV A, ARMSTRONG SA.MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. **Nat. Rev. Cancer,** v. 7; p.823-33, 2007.

-KUNDU, M & LIU, PP. Function of inv(16) fusion gene CBFB-MYH11. **Cur.Opin.Hematol**., v.8: 201-205, 2001.

-LANGEMEIJER SMC *et al .* TET2 mutations in childhood leucemia**.Leukemia**, v. 25, p.189-92, 2011.

-LEY TJ *et al*. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. **Nature,** v.456(7218):66-72, 2008.

-LEY TJ *et al*. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. **N Engl J Med.**, v.363(25):2424-33, 2010.

-LIANG DC *et al*. Cooperating gene mutations in childhood acute myeloid leukemia with special reference on mutations of ASXL1, TET2, IDH1, IDH2, and DNMT3A. **Blood**, v.121(15):2988-95, 2013.

-LIEHR T, CLAUSSEN U. Multicolor FISH approaches for the characterization of human chromosomes in clinical genetics and tumor cytogenetics. **Curr Genomics**; 3: 213-35, 2002a.

-LIEHR, T *et al.* Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. **Int. J Mol. Med**., 9:335-339, 2002b.

-LIU J *et al*. Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. **Nature**, v.;459(7245):387-92, 2009.

-LIVAK KJ & SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods*,*** v.25, p.402-8, 2001.

-LÜDECKE, HJ; SENGER, G, CLAUSSEN, U; HORSTHEMKE, B.Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzimatic amplification. **Nature**, v. 338,p. 348-350,1989.

-LUND K, ADAMS PD, COPLAND M.EZH2 in normal and malignant hematopoiesis. **Leukemia**, v.28(1):44-9, 2014

-MAGEE JA, PISKOUNOVA E, MORRISON SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. **Cancer Cell**, v.21(3):283-96, 2012.

-MANOLA KN. Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia. **Eur J Heamatol.**v., p., 2009.

-MARDIS ER, WILSON RKCancer genome sequencing: a review. **Hum Mol Genet**., v. 18(R2):R163-8, 2009.

-MARQUES-SALLES TJ *et al.* A new chromosomal three-way rearrangement involving MLL masked by a t(9;19)(p11;p13) in an infant with acute myeloid leukemia. **Cancer Genet.Cytogenet.** , v.189,p.59-62, 2009.

MARTENS, JHA *et al*. PML-RARα/RXR alters the epigenetic landscape in acute promyelocytic leukemia. **Cancer Cell** 17, p.173-85, 2010.

-MARTIN-PEREZ D, PIRIS MA, SANCHEZ-BEATO M. Polycomb proteins in hematologic malignancies. **Blood** 116: 5465-5475, 2010

-MILLER BG, STAMATOYANNOPOULOS JA. Integrative meta-analysis of diferential gene expression in acute myeloid leukemia.**PLoS ONE**, v.5(3), p.1-13, 2010.

-MROZEK, K.; HEINONEN, K.; BLOOMFIELD, C.D. Prognostic value of Cytogenetics findings in adults with acute myeloid leukemia. **Int. J. Hematol.** , v. 72, p. 261-271, 2000.

-MROZEK, K; HEINONEN, K; THEIL, KS; BLOOMFIELD CD. Spectral karyotyping in patients with acute myeloid leukemia and a complex karyotype shows hidden aberrations, including recurrent overrepresentation of 21q, 11q and 22q. **Genes Chromosomes Cancer,** v.34,p. 137-153, 2002.

-MRÓZEK K, HEEREMA NA, BLOOMFIELD CD. Cytogenetics in acute leukemia. **Blood Rev.,** v. 8(2):115-36, 2004.

-NOWELL, P.C.; HUNGERFORD, D.A. A minute chromosome in human granulocytic leukemia.**Science**, v. 132, p. 1497, 1960.

-NTZIACHRISTOS P, MULLENDERS J, TRIMARCHI T, AIFANTIS I. Mechanisms of epigenetic regulation of leukemia onset and progression. **Adv Immunol**., v.117, p.1-38,2013.

-NGUYEN LV, VANNER R, DIRKS P, EAVES CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. **Nat Rev Cancer.,** v.12(2):133-43, 2012.

-OGURO H, *et al.* Differential impact of Ink4a and Arf on hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment in Bmi1-deficient mice. **J Exp Med**., v.203(10):2247-53, 2006.

- PAUL TA, BIES J, SMALL D, WOLFF L. Signatures of polycomb repression and reduced H3K4 trimethylation are associated with *p15INK4b* DNAmethylation inAML. **Blood** , v.115, p.3098-108, 2010.

-PEZZI A, *et al.* DNMT3A Mutations in Patients with Acute Myeloid Leukemia in South Brazil. **Advances in Hematology**, v 2012, p.1-8, 2012.

-PIZZATTI L *et al*. SUZ12 is a candidate target of the non-canonical WNT pathway in the progression of chronic myeloid leucemia. **Genes Chromosomes Cancer**., v.49(2), p.107-18, 2010.

-PLASS C, OAKES C, BLUM W, MARCUCCI G. Epigenetics in acute myeloid leukemia. **Semin Oncol** , v.35(4), p. 378-87, 2008.

-POMBO-DE-OLIVEIRA MS *et al.*. Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia**.Blood Cells Mol. Dis**., v.42, p.121-5, 2009.

-PUI CH, CARROLL WL, MESHINCHI S, ARCECI RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update**. J Clin Oncol**., v.;29(5):551-65, 2011.

-PUUMALA SE, ROSS JA, APLENC R, SPECTOR LG. Epidemiology of childhood acute myeloid leukemia. **Pediatr Blood Cancer.,** v.60(5):728-33, 2013.

-QIAN X, WEN-JUN L. Platelet changes in acute leukemia. **Cell Biochem Biophys.**, v. 67(3):1473-9, 2013.

- RADHI M, MESHINCHI M & GAMIS A. Prognostic Factors in Pediatric Acute Myeloid Leukemia **Curr Hematol Malig Rep**, v 5:200–206, 2010.

-RADTKE I *et al*. Genomics analysis reveals few genetic alterations in pediatric acute myeloid leukemia. **PNAS, v.**106 (31), p. 12944-49, 2009.

-RADULOVIC V, DE HAAN G, KLAUKE K.Polycomb-group proteins in hematopoietic stem cell regulation and hematopoietic neoplasms. **Leukemia**, v.27(3):523-33, 2013.

-RAIMONDI, S.C.; CHANG, M.N.; RAVINDRANATH, Y. et al. Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative Pediatric Oncology Group Study – POG 8821. **Blood**, v.94, p. 3707-3716, 1999.

-RENNEVILLE A, ROUMIER C, BIGGIO V, NIBOUREL O, BOISSEL N, FENAUX P, PREUDHOMME C. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukaemia: review of the literature. **Leukemia**, v. 22, v.915-931, 2008.

- RICE KL, HORMAECHE I AND LICHT JD. Epigenetic regulation of normal and malignant hematopoiesis. **Oncogene,** v.26: 6697–6714, 2007.

-ROCKOVA V *et al.* Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers. **Blood,** v.118(4):1069-76, 2011.

-ROWE, D *et al.* Cytogenetically cryptic AML1-ETO and CBF beta- MYH11 gene rearrangements: incidence in 412 cases of acute myeloid leukaemia. **Br. J. Haematol.** , v. 111, p. 1051-1056, 2000.

-ROWLEY, J.D. The critical role of chromosome translocations in human leukemias.**Ann. Ver. Genet, v.**32,p. 495-519,**1**998.

- RUBNITZ JE *et al.* Prognostic Factors and Outcome of Recurrence in Childhood Acute Myeloid Leukemia. **Cancer,** v. 109(1); p157-63, 2007.

-SAEED S, LOGIE C, STUNNENBERG HG, MARTENS JHA. Genome-wide functions of PML-RARα in acute promyelocytic leukaemia. **Brit. J Cancer**, 104, p.554-8, 2011.

-SAIED MH *et al*. Genome wide analysis of acute myeloid leukemia reveal leukemia specific methylome and subtype specific hypomethylation of repeats. **PLoS One**., v.7(3):e33213, 2012.

-SÁNCHEZ-BEATO M *et al.* Variability in the expression of Polycomb proteins in different normal and tumoral tissues.A pilot study using tissue microarrays.**Modern Pathol**., v.19, p.684-94, 2006.

-SANDERS MA, VALK PJ. The evolving molecular genetic landscape in acute myeloid leukaemia. **Curr Opin Hematol.** V. 20(2):79-85, 2013

-SCHRÖCK E *et al.*. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. **Science**, v. 273,p. 494-497, 1996.

-SANZ MA *et al.* Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. Blood, v.15;96(4):1247-53, 2000.

-SCHUETTENGRUBER B, MARTNEZ AM, LOVINO N, CVALLI G. Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. **Mol. Cell Biol**., v. 12, p. 799-813, 2011.

-SECA H, ALMEIDA GM, GUIMARÃES JE, VASCONCELOS MH. miR signatures and the role of miRs in acute myeloid leukemia**. Eur J Cancer**, v.46, p.1520-27, 2010.

-SENGER, G; LÜDECKE, HJ; HORSTHEMKE, B ; CLAUSSEN, U. Microdissection of banded human chromosomes. **Hum Genet,** v.84, p. 507-11,1990.

-SCHWARTZ YB & PIRROTA V. A new world of Polycombs: unexpected partnerships and emerging functions. **Nat Rev Genetics**, v. 14, p.853-64, 2013.

-SHAFFER LG, McGOWAN-JORDAN j, SCHMID M. ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: Karger; 2013.

-SHAN MY, LICHT JD. *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia.**Nature Genetics**, v. 43(4), p. 289-290, 2011.

-SHIH AH, ABDEL-WAHAB O, PATEL JP, LEVINE RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. **Nat Rev Cancer.,** v.12(9):599-612, 2012.

-SILVA MLM *et al*. Banding and molecular cytogenetic studies detcted a CBFB-MYH11 fusion gene that appeared as abnormal chromosomes 1 and 16 in a baby with acute myeloid leukemia FAB M4-Eo. **Cancer Genet.Cytogenet**. , v. , p.182, 56-60, 2008.

-SIMON JA, LANGE CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. **Mutat Res.**, v.647(1-2):21-9, 2008.

-SPEICHER, M.R.; BALLARD, St; WARD, D.C. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multicolor FISH. **Nat Genet** , v.2, p. 368-375, 1996.

-SPEICHER MR & CARTER NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. **Nature Reviews Genetics**, v.6, p. 782-92, 2005.

-STEIN E *et al.* The coagulopathy of acute promyelocytic leukaemia revisited .**Best Pract Res Clin Haematol**., v.22(1):153-63, 2009.

-TAKAHASHI S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid Vasconcelos MH. miR signatures and the role of miRs in acute myeloid leukemia. **European J. Cancer**, v.46, p. 1520-27, 2011.

-TELENIUS, H *et al*. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. **Genomics**, v.13, p.718-25,1992.

-URIBESALGO I, DI CROCE L. Dynamics of epigenetic modifications in leukemia**. Brief Funct Genomics, v.** 10(1), p.18-29, 2011.

-VAN PROOIJEN-KNEGT AC *et al*. In situ hybridization of DNA sequences in human metaphase chromosomes visualized by indirect fluorescent immunocytochemical procedure. **Exp. Cell Res.**, v.141,p. 397-407, 1982.

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

-VILLA R *et al.* Role of the Polycomb repressive copmplex 2 in acute promyelocytic leukemia. **Cancer Cell**, v.11, p.513-25, 2007.

-WEISE, A *et al.* Molecular Definition of high-resolution Multicolor Banding Probes: First within the human DNA sequence anchored fISH banding probe set. **J Hist & Cytoch, v.**56, p 487-93, 2008.

-WOUTERS BJ, LÖWENBERG B, DELWEL R. A decade of genome-wide gene expression profiling in acute myeloid leukemia: flashback and prospects. **Blood, v.** 113, p.291-98, 2009.

-XU F, LI X *et al.* Overexpression of the EZH2, RING1 and BMI1 genes is common in myelodysplastic syndromes: relation to adverse epigenetic alteration and poor prognostic scoring. **Ann Hematol.,** v.90(6):643-53, 2011.

-YAMAMOTO, Y *et al.* Activing mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. **Blood**, v. 97, p. 2434-2439, 2001.

-YAMASHITA Y *et al.* Array-based genomic resequencing of human leukemia**.Oncogene,** v.29 (25), p.3723-31, 2010.

-YAN, XJ *et al.* Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. **Nat Genet.,** v.13;43(4):309-15, 2011.

-ZECH, L. Investigation of metaphase chromosomes with DNA-binding. **Exp Cell Res**, v. 58, p. 463, 1969.

8.Anexos

8.1. Publicação em 2010

Contents lists available at ScienceDirect

Blood Cells, Molecules, and Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybcmd

Letter to the Editor

A new cryptic ins(11;1)(q23;q21q31) detected in a t(1;8;11)(q21;p21;q23) in a baby with acute myeloid leukemia FAB AML-M5

Dear Editor:

Infants diagnosed with acute myeloid leukemia (AML) are likely to present with hyperleucocytosis and leukemia cells harboring a rearrangement of the *MLL* gene due to one of several possible 11q23 chromosomal abnormalities [1]. Among these, the t(1;11) is an important recurrent translocation observed in acute leukemia, where two breakpoints of the chromosome 1 have been described: t(1;11)(p23;q23) and t(1;11)(q21;q23). The latter occurs frequently in AML leading to the fusion gene *AFq1/MLL*. Until recently this abnormality was associated with a very poor outcome. Recently, 756 cases of pediatric AML patients were studied including 25 patients with t(1;11); 76% of the latter were younger than 2 years old [2]. This group presented a favorable outcome independent of other clinical risk factors. Therefore, from a clinical point of view, clarifying complex karyotypes in patients with 11q23 abnormalities could provide important prognostic information. Here, we describe another case belonging to this rare subgroup, an early infancy AML harboring what appeared to be a complex translocation t(1;8;11)(q21;p21;q23).

A 22-month-old-boy was admitted to National Cancer Institute-Rio de Janeiro with a history of persistent gastroenteritis, anemia and fever. Physical examination revealed hepatomegaly (the liver was 2 cm below the costal margin). Hemoglobin was 6.8 d/l, white blood cell count was 53.8×10^9/l with 35% blast cells and the platelet count was 27×10^9. Morphology evaluation showed a hypercellular bone marrow with 60% blast cells having basophilic cytoplasm and multiple nucleoli with myeloid features compatible with a diagnosis of AML. Flow cytometry revealed blasts that expressed HLA-DR, CD33, CD13, CD15, CD64 and CD4. The infant was treated according to AML-BFM98 protocol, and complete remission was achieved on day 33 of chemotherapy; the patient continues without evidence of disease (4 months). Cytogenetic G-banding studies at the time of AML diagnosis revealed the karyotype 46,XY,t(1;8;11)(q21;p21;q23) in 25 of the 30 metaphases analyzed (Fig. 1A). An *AFq1/MLL* fusion transcript was detected by semi-quantitative RT-PCR, using the primer ***MLL*** Fw, 5'-AGGTCCAGAGCA-GAGCAAACAGAA-3'/ Rev, 5'-TAAGCCTCCCATCTCCCACACATT-3'; ***MLL/AFq1*** Fw,5'-AGGTCCAGAGCAGAGCAAACAGAA-3'/Rev, 5'-TTCCAGCTCCGACAGATCCAGTT-3'; ***β-ACTIN*** Fw, 5'-ACCTGAGAACTC-CACTACCCT-3'/Rev, 5'-GGTCCCACCCATGTTCCAG-3' (Fig. 1B). The dual color break-apart MLL probe (Abbott/Vysis) showed the expected red-green signal on the normal 11 and a split signal with intervening chromosomal material on the long arm of the derivative chromosome 11 (Fig. 1C). Before these results, we conducted a more detailed study by using multicolor banding (MCB) that showed a cryptic ins(11;1)(q23;q21q31) (Fig. 1D). The karyotype of the baby was recharacterized as: 46, XY,der(1)t(1;8)(q21;p21),der(8)t(1;8)(q31;p21),der(11)ins(11;1)(q23;q21q31), showing three distinct abnormalities (Fig. 1D). These results corrected an earlier interpretation of this rearrangement.

Abnormalities involving the region 11q23 are seen in approximately 40% of the AML cases among children aged 13 to 24 months, but a t(1;11)(q21;q23) is relatively rare [3]. Insertion of chromosomal material from chromosome 1 into the *MLL* gene has not been described yet, however the reverse mechanism was described once in a complex t(1;11;22) [4].

This case as well as previous reports [5,6] showed that the use of MCB is very important to refine the detection of chromosomic abnormalities with impact of prognostic in infants, especially in new and complex karyotypic abnormalities involving the *MLL* gene.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Contribution authors

EMSV provided clinical history of the baby. MLMS, AFdF, MTdS, RRCP did the cytogenetic work up and analysis of the probes and the karyotype interpretation. SB and TL did the FISH and further MCB-analysis. RB and EA did the semi-quantitative RT-PCR. All coauthors have been involved in drafting the manuscript. EA, TL, MLMS and RCR revised it critically for important intellectual content.

Acknowledgments

This work was supported by Monika Kutzner Stiftung (Germany), CAPES (project no. 301/08), FAPERJ, Pró-Vita and German Academic Exchange Service (DAAD) (BRA 07/039).

References

[1] C.H. Pui, S.C. Raimondi, D.K. Srivastava, X. Tong, F.G. Behm, B. Razzouk, J.E. Rubnitz, W.E. Evans, R. Ribeiro, Prognostic factors in infants with acute myeloid leukemia, Leukemia 14 (4) (2000) 684–687.
[2] B.V. Balgobind, S.C. Raimondi, J. Harbott, M. Zimmermann, T.A. Alonzo, A. Auvrignon, H.B. Beverloo, M. Chang, U. Creutzig, M.N. Dworzak, E. Forestier, B. Gibson, H. Hasle, C.J. Harrison, N.A. Heerema, G.J. Kaspers, A. Leszl, N. Litvinko, L.L. Nigro, A. Morimoto, C. Perot, R. Pieters, D. Reinhardt, J.E. Rubnitz, F.O. Smith, J. Stary, I. Stasevich, S. Strehl, T. Taga, D. Tomizawa, D. Webb, Z. Zemanova, C.M. Zwaan, M.M. van den Heuvel-Eibrink, Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study, Blood 114 (12) (2009) 2489–2496.
[3] K. Mrózec, K. Heinonen, C.D. Bloomfield, Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia, Best Pract. Res. Clin. Haematol. 14 (3) (2001) 19–47.
[4] L. Lafay-cousin, V. Soenen, F. Mazingue, C. Preudhomme, J.L. Lai, J. Andrieux, Chromosomal insertion involving *MLL* in childhood acute myeloblastic leukemia (M4), Cancer Genet. Cytogenet. 150 (2) (2004) 153–155.
[5] M.L.M. Silva, S.C. Raimondi, E. Abdelhay, M. Gross, H. Mkrtchyan, A.F. de Figueiredo, R.C. Ribeiro, T.J. Marques-Salles, E.S. Sobral, M.P.G. Land, T. LIEHR, Banding and molecular cytogenetic studies detected a CBFB–MYH11 fusion gene that appeared as abnormal chromosomes 1 and 16 in a baby with acute myeloid leukemia FAB M4-Eo, Cancer Genet. Cytogenet. 182 (1) (2008) 56–60.
[6] T.J. Marques-Salles, T. Liehr, H. Mkrtchyan, S.C. Raimondi, M.T. de Souza, A.F. de Figueiredo, S. Rouxinol, F.C. Jordy, N. Santos, E. Abdelhay, M.L.M. Silva, A new chromosomal three-way rearrangement involving MLL masked by a t(9;19)(p11;p13) in an infant with acute myeloid leukemia, Cancer Genet. Cytogenet. 189 (1) (2009) 59–62.

1079-9796/$ – see front matter © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bcmd.2010.07.001

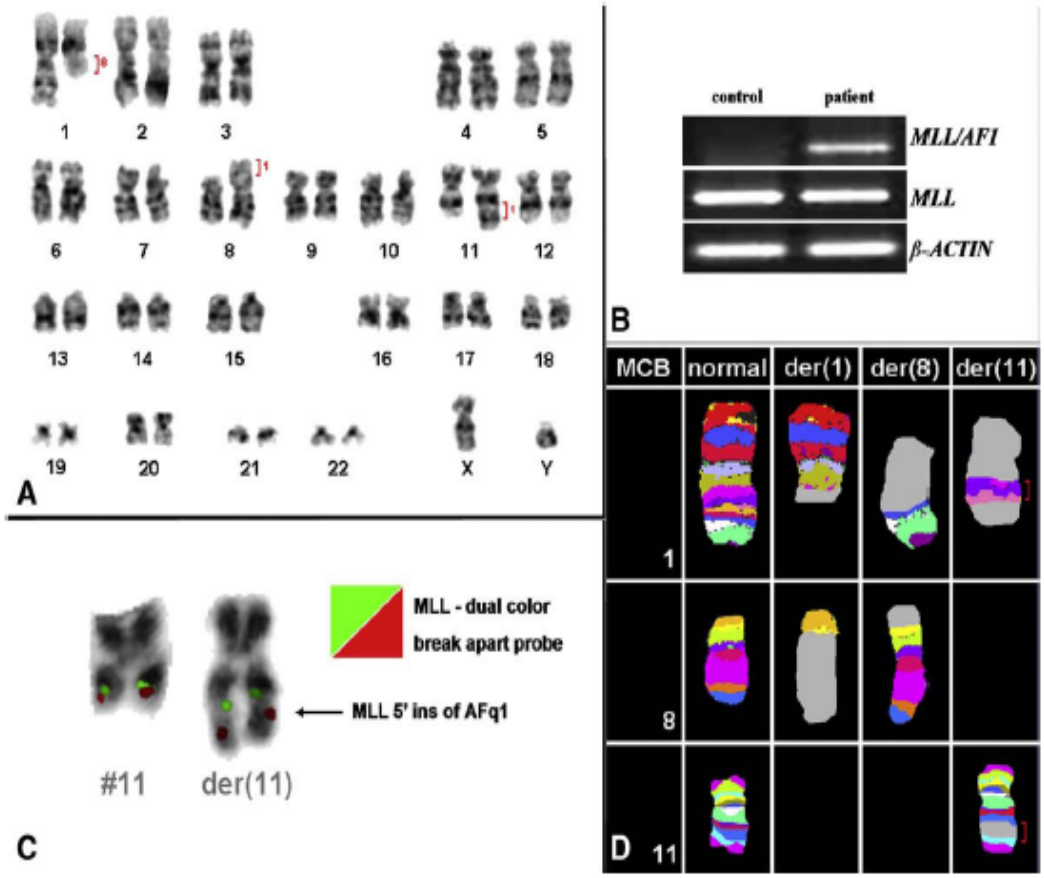


Fig. 1. (A) GTG-banding result showed a karyotype of 46,XY, t(1;8;11)(q21;p21;q23). The origin of the rearranged segments is indicated by the red brackets. (B) Semi quantitative RT-PCR analysis of *MLL/AF1* expression. The *MLL/AF1* fusion gene was present in the patient not in a control. *β-ACTIN* and *MLL* were used as controls. (C) Partial karyotypes of FISH analysis showing the *MLL* gene separated by other chromosomal material in the long arm of the derivative chromosome 11. (D) Multicolor banding probes for chromosomes 1, 8 and 11 characterized the observed rearrangement in detail. Breakpoints involved in derivative chromosomes 1, 8 and 11, (der(1), der(8) and der(11)) were identified as described in the text.

Amanda Faria de Figueiredo
Cytogenetics Department, Bone Marrow Unit, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Thomas Liehr
Samarth Bath
Jena University Hospital, Institute of Human Genetics and Anthropology, Jena, Germany

Renata Binato
Stem Cell Department, Bone Marrow Unit, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Eliane Maria Soares Ventura
Pediatric Oncohematology Center, Hospital Oswaldo Cruz, Pernambuco University, Recife, PE, Brazil

Mariana Tavares de Souza
Roberto Rodrigues Capela de Matos
Cytogenetics Department, Bone Marrow Unit, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Raul Correa Ribeiro
Department of Oncology and International Outreach Program, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA

Eliana Abdelhay
Stem Cell Department, Bone Marrow Unit, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Maria Luiza Macedo Silva
Cytogenetics Department, Bone Marrow Unit, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Corresponding author. Instituto Nacional de Câncer, Praça da Cruz Vermelha, 23, 6º andar, Laboratório de Citogenética, Divisão de laboratórios do Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO), Centro, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20230-130, Brazil.
Tel.: +5521 25066701; Fax: +55 21 25092121.
E-mail address: luizamacedo@inca.gov.br.

14 June 2010
Available online xxxx

8.2. Publicação em 2011

Leukemia & Lymphoma, August 2011; 52(8): 1593–1596

informa
healthcare

LETTER TO THE EDITOR

A complex karyotype masked a cryptic variant t(8;21)(q22;q22) in a child with acute myeloid leukemia

AMANDA FARIA DE FIGUEIREDO[1], THOMAS LIEHR[2], SAMARTH BHATT[2], RENATA BINATO[3], MARIANA TAVARES DE SOUZA[1], ROBERTO RODRIGUES CAPELA DE MATOS[1], TEREZINHA DE JESUS MARQUES SALLES[4], FERNANDA C. JORDY[5], RAUL C. RIBEIRO[6], ELIANA ABDELHAY[3], & MARIA LUIZA MACEDO SILVA[1]

[1]*Cytogenetics Department, Bone Marrow Unit, The National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil,* [2]*Jena University Hospital, Institute of Human Genetics, Jena, Germany,* [3]*Stem Cell Department, Bone Marrow Unit, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil,* [4]*Pediatric Oncohematology Center, Oswaldo Cruz University Hospital, Recife, PE, Brazil,* [5]*Service of Pediatric Oncohematology, Lagoa's Hospital, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, and* [6]*Department of Oncology and International Outreach Program, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA*

(Received 10 February 2011; revised 14 March 2011; accepted 24 March 2011)

The balanced t(8;21)(q22;q22) is among the most frequent recurrent abnormalities in acute myeloid leukemia (MAL), occurring in 14% of children and 7–8% of adults. The t(8;21) juxtaposes the *MAL1* (*RUNX1*) gene to *ETO* (*RUNX1T1*) on the derivative chromosome 8, generating a chimeric gene *RUNX1–RUNX1T1*, which inhibits transcriptional activation by wild-type *RUNX1*. Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) probes are the methods of choice to detect *RUNX1–RUNX1T1*-positive cases [1]. The revised World Health Organization (WHO) classification of hematolymphoid neoplasm designates MAL associated with the t(8;21) as a distinct MAL subtype associated with a favorable prognosis [2]. Clinically, approximately 90% of adults and children with MAL with the t(8;21) achieve complete remission. Among them, 50% of adults and 80% of children are expected to remain free of disease [3,4]. Variant or complex t(8;21)(q22;q22) rearrangements resulting in the *RUNX1–RUNX1T1* fusion gene have been reported in 3–4% of patients with MAL with t(8;21)(q22;q22) and in 0.05–1.1% of children with MAL positive for *RUNX1–RUNX1T1* [5,6]. Because of its rarity, the prognostic impact of the *RUNX1–RUNX1T1* fusion gene occurring from variant or complex rearrangements remains unknown [4,7]. Here, we report a case of a child with MAL harboring a three-way cryptic variant t(8;21)(q22;q22) in a complex karyotype that was clarified by molecular cytogenetics.

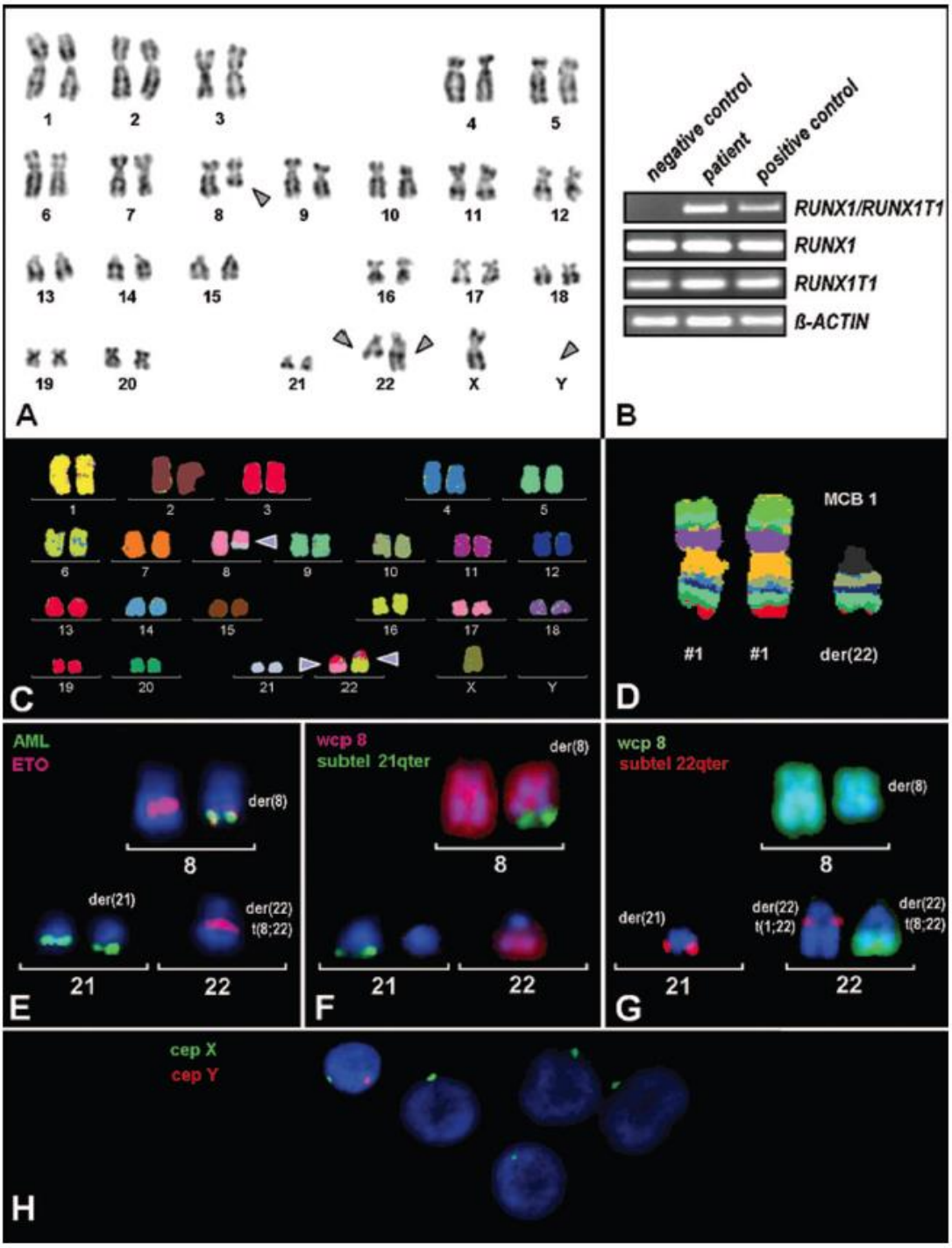
A 6-year-old boy from the Brazilian Paratimirim tribe was admitted to The National Cancer Institute, Rio de Janeiro, with a history of severe anemia, pallor, and petechiae on his face. Physical examination revealed no hepatosplenomegaly or adenopathy. The cerebral spinal fluid was negative for leukemic cells. Hemoglobin was 8.1 g/dL; the white blood cell count was 18×10^9/L, with 46% blast cells; and the platelet count was 26.0×10^9/dL. Morphologic examination of the bone marrow showed a hypercellular content with 80% blast cells. The blasts showed slender Auer rods, and basophilic cytoplasm and multiple nucleoli. Flow cytometry analysis revealed blasts that expressed human leukocyte antigen (HLA)-DR, CD13, CD33, CD14, CD117, CD34, MPO+, CD13cy, CD64, and CD58. The boy was treated according to a modified Acute Myeloid Leukemia – Berlin Frankfurt Münster 2004 (MAL-BFM-2004) protocol [8]. The patient achieved remission after two courses of chemotherapy and is undergoing post-remission therapy.

Correspondence: Dr. Maria Luiza Macedo Silva, Cytogenetics Department of the Bone Marrow Unit (CEMO), The National Cancer Institute (INCA), Praca da Cruz Vermelha, 23 – Centro, 20230-130, Rio de Janeiro, Brazil. Tel: 55-21-2506-6701. E-mail: luizamacedo@inca.gov.br

ISSN 1042-8194 print/ISSN 1029-2403 online © 2011 Informa UK, Ltd.
DOI: 10.3109/10428194.2011.576286

Copyright © Informa Healthcare 2011
Not to be distributed
Authorized users may download, display, copy and print a single copy for personal use.
RIGHTSLINK

Bone marrow cells obtained at diagnosis were cultured for 24 h without mitogenic stimulation and processed by standard procedures. GTG-banding was done and 25 metaphases were analyzed in accordance with the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 2009 [9]. Molecular cytogenetics was performed by FISH, using commercially available probes LSI MAL1/ETO, LSI MLL break-apart, subtelomeric probes for 8qter, 21qter, and 22qter, and cepX and cepY, according to the manufacturer's instructions (Abbott Molecular, Inc., Wiesbaden-Delkenheim, Germany).



RIGHTSLINK

Multiplex-FISH (M-FISH), multicolor banding (MCB), and FISH using whole chromosome painting (WCP)-probe labeling were performed as previously described [10].

RUNX1–RUNX1T1, *RUNX1*, and *RUNX1T1* transcripts were detected by RT-PCR analysis. RT-PCR was performed using 1 μg mRNA, treated with DNase amplification grade I (Invitrogen) and reverse transcribed with SuperScript II Reverse Transcriptase® (Invitrogen). Each reaction was carried out with Taq DNA polymerase (Invitrogen). PCR amplification was performed at 94°C for 2 min, 50 cycles at 94°C for 20 s, and 60°C for 1 min. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel, with β-actin as control. The following primers were used: *RUNX1*: Fw, 5′-ATTCGTGCGTGGG CTTCTTTCT-3′/Rev, 5′-TGCCTTGCTCTCC TGTGCTATCT-3′; *RUNX1T1*: Fw, 5′-CGGAG-GACGCACTGGCAG-3′/Rev, 5′-GGTTTCACTC GCTTTACGGCC-3′; *RUNX1–RUNX1T1*: Fw, 5′-ATGACCTCAGGTTTGTC GG TCG-3′/Rev, 5′-TGAACTGGTTCTTGGAGCTCCT-3′; β-actin: Fw, 5′-ACCTGAGAACTCCACTACCCT-3′/Rev, 5′-GGTCCCACCCATGTTCCAG-3′. The Ethical Committee of The National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, approved this study (#088/07).

GTG-banding studies at the time of MAL diagnosis revealed the complex karyotype 45,X, −Y, del(8)(q22),add(22)(q22),add(22)(q22) in 22 metaphases analyzed [Figure 1(A)]. *RUNX1–RUNX1T1*, *RUNX1*, and *RUNX1T1* transcripts were detected by semi-quantitative RT-PCR [Figure 1(B)]. M-FISH helped establish the origin of each abnormal chromosome, and confirmed that rearrangements occurred among chromosomes 1, 8, 21, and 22 [Figure 1(C)]. FISH further confirmed that the Y chromosome was lost in leukemic cells [Figure 1(H)]. Interphase cytogenetics showed that in 159 of 200 (79.5%) cells, the interphase nuclei were missing a cepY signal, whereas in 41 of the 200 cells, signals for X and Y were present. By using the MCB 1 probe set [Figure 1(D)] and several locus-specific and WCP probes for chromosomes 8, 21, and 22 [Figures 1(E)–1(G)], the final karyotype was determined to be 45,X, −Y,t(8;22;21)(q22;q13.3;q22.12),der(22)t(1;22)(q23;q13.3).

The t(8;21)(q22;q22), first described in 1973 [11], is one of the most common balanced rearrangements in MAL. Approximately 30% of the children in a genome-wide study of pediatric MAL showed that multiple genetic changes associated with t(8;21) do not frequently occur [12]. Several studies in adults and children with MAL suggest that this translocation is associated with a favorable prognosis; hence, patients with this abnormality who achieve complete remission are not considered for hematopoietic stem cell transplant when in first remission [13]. However, a relatively higher proportion of adult patients relapse, suggesting that other biologic factors may be of potential prognostic significance. Mutations in the *KIT* oncogene have been found to be associated with poor prognosis in some studies but not others [14].

The relevance of variant t(8;21) MAL to outcome has not yet been characterized, and its clinical significance remains uknown. Recently, in a study on the clinical correlates of karyotype in children with MAL, Harrison *et al.* [4] confirmed a favorable prognosis for children with t(8;21)(q22;q22) MAL, including five (0.5%) cases of the t(8;21) variant. Because MAL cases with t(8;21) variants are rare, it has been difficult to examine their prognostic implication. On the other hand, it has been suggested that patients in the former group have an adverse prognosis [7]. Therefore, patients with MAL variant t(8;21) appear to constitute a heterogeneous group, and their treatment response or outcome may depend on the type of additional genetic changes present. Molecular cytogenetic techniques such as FISH, M-FISH, and MCB are excellent tools to detect cryptic abnormalities that may affect the

Figure 1. Karyotype analysis by GTG-banding and RT-PCR: (A) GTG-banding revealed a 45, X, −Y, del(8)(q22), add(22)(q22), add(22)(q22) karyotype (arrowheads). (B) Semiquantitative RT-PCR analysis to detect *RUNX1–RUNX1T1*, *RUNX1*, and *RUNX1T1* expression. *RUNX1* and *RUNX1T1* were expressed in a healthy donor (negative control), our patient, and in a patient with t(8;21) (positive control). The translocation *RUNX1–RUNX1T1* was not expressed in the healthy donor but was expressed in patients with a t(8;21). β-actin was used as control. Molecular cytogenetic analysis by M-FISH and MCB using whole chromosome painting (WCP) probes: (C) M-FISH analysis showed that chromosomes 1, 8, 21, and 22 were involved in the complex rearrangement (arrowheads). The Y chromosome was absent in abnormal metaphases. (D) The MCB probe set for chromosome 1 confirmed involvement of chromosome 1 in this complex karyotype and showed that the breakpoint for chromosome 1 was 1q23, which resulted in the unbalanced t(1;22). (E) Regions *RUNX1* (*MAL1*) on chromosome 21 (green) and *RUNX1T1* (*ETO*) on chromosome 8 (red) were fused on the derivative chromosome 8. Strong signals were present on normal chromosomes 8 and 21, whereas slightly weaker signals were found in derivatives (der) of chromosomes 22 and 21. The involvement of three chromosomes in the translocation was shown. (E–G) To further delineate the three-way translocation, a WCP probe for chromosome 8 and asubtelomeric probes for chromosomes 21qter (F) and 22qter (G) were used. (H) Four interphase nuclei without and one with a Y chromosome-specific centromeric signal are depicted. One signal for the X chromosome-specific centromeric region is present in all five cells.

RIGHTSLINK

prognosis of patients with inv(16) or translocations involving the 11q23 region [15,16].

In the present case, the use of MCB approaches allowed detection of a new cryptic variant three-way translocation t(8;22;21)(q22;q13.3;q22.12), chromosome 22 being involved as the third chromosome for the first time, as well as an unbalanced cytogenetic der(22)t(1;22)(q23;q13.3) [17]. Interestingly, the breakpoint 22q13 was involved in both translocations identified in this case. The *MAL* gene was mapped in this same region, but whether this gene resulted in the new chimeric fusion gene remains to be determined. In summary, the combination of FISH, M-FISH, and MCB can potentially reveal genetic changes that might collaborate with type II mutations in leukemogenesis in order to determine prognostic implications. Therefore, these techniques should complement karyotypic analysis for the screening of patients with MAL.

Acknowledgements

This work was supported by Stefan Morsch Stiftung (Germany); Monika Kutzner Stiftung (Germany); the German Academic Exchange Service (DAAD) (BRA 07/039); CAPES (project no. 301/08); CNPq and FAPERJ (project no. E-26/110:899/2009); the International Outreach Program and the American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC), St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN); and a Center of Excellence Grant, State of Tennessee.

Potential conflict of interest: Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at www.informahealthcare.com/lal.

References

1. Pui CH, Carroll WL, Meshinche S, Arceci RJ. Biology risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemia: an update. J Clin Oncol 2011;29:551–565.
2. Swerdlow SH, Harris NL, Jaffe ES, et al., editors. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics: tumours of hematopoietic tissues. Lyon: IARC Press; 2008.
3. Schlenk RF, Benner A, Krauter J, et al. Individual patient data-based meta-analysis of patients aged 16 to 60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: a survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. J Clin Oncol 2004;22:3741–3750.
4. Harrison CJ, Hills RK, Moorman AV, et al. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials MAL 10 and 12. J Clin Oncol 2010;28:2674–2681.
5. Kim H, Moon HW, Hur M, et al. Acute myeloid leukemia with a RUNX1-RUNX1T1 t(1;21;8)(q21;q22;q22) novel variant: a case report and review of the literature. Acta Hematol 2011;125: 237–241.
6. Huang L, Abruzzo LV, Valbuena JR, et al. Acute myeloid leucemia associated with variant t(8;21) detected by conventional cytogenetic and molecular studies. Am J Clin Pathol 2006;125:267–272.
7. Bae SY, Kim JS, Ryeu BJ, et al. Acute myeloid leukemia (AML-M2) associated with variant t(8;21): report of three cases. Cancer Genet Cytogenet 2010;199:31–37.
8. Available from: http://www.cancer.gov/clinicaltrials/UCHM-AML-BFM-2004.
9. Shaffer LG Slovak ML, Campbell LJ, editors. ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: Karger; 2009.
10. Liehr T, Heller A, Starke H, et al. Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. Int J Mol Med 2002;9:335–339.
11. Rowley JD. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. Ann Genet 1973;16:109–112.
12. Radtke I, Mullighan CG, Ishii M, et al. Genomic analysis reveals few genetic alterations in pediatric acute myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106:12944–12949.
13. Byrd JC, Dodge RK, Carroll A, et al. Patients with t(8;21)(q22;q22) and acute myeloid leukemia have superior failure-free and overall survival when repetitive cycles of high-dose cytarabine are administered. J Clin Oncol 1999;17:3767–3775.
14. Cairoli R, Beghini A, Grillo G, et al. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. Blood 2006;107:3463–3468.
15. Silva MLM, Raimondi SC, Abdelhay E, et al. Banding and molecular cytogenetics studies detected a CBFB-MYH11 fusion gene that appeared as abnormal chromosomes 1 and 16 in a baby with acute myeloid leukemia M4Eo. Cancer Genet Cytogenet 2008;182:56–60.
16. Figueiredo AF, Liehr T, Bahtt S, et al. A new cryptic ins(11;1)(q23;q21q31) detected in a t(1;8;11)(q21;p21;q23) in a baby with acute myeloid leukemia FAB AML M5. Blood Cells Mol Disease 2010;45:197–198.
17. Udayakumar AM, Alkindi S, Pathare AV, et al. Complex t(8;13;21)(q22;q14;q22)–a novel variant of t(8;21) in a patient with acute myeloid leukemia (AML-M2). Arch Med Res 2008;39:252–256.

RIGHTSLINK

8.3. Publicação em 2012

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Leukemia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/leukres

Letter to the Editor

A rare cryptic and complex rearrangement leading to *MLL-MLLT10* gene fusion masked by del(10)(p12) in a child with acute monoblastic leukemia (AML-M5)

1. Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) in young children, defined as those younger than 24 months of age, occurs in 3–5% of all pediatric leukemias. Rearrangements involving the *MLL* gene, located on the 11q23 region, are between the most common cytogenetic aberrations found in M4 or M5 AML subtypes. *MLL* rearrangement is highly heterogeneous with more than 60 different fusion partners described to date. An association between the type of MLL rearrangement and prognosis has been reported [1].

Most of the *MLL* rearrangements result from simple reciprocal translocations. However, rearrangements between *MLL* and *MLLT10* gene (also *AF10*) on chromosome 10p12 frequently result from complex chromosomal rearrangement. Several types of chromosomal rearrangements involving three or more chromosomal breaks, such as inversions and insertions, have been reported. The latter occurs because *MLL* is transcribed from centromere to telomere and *MLLT10* from telomere to centromere [2].

In some instances the accurate recognition of the t(10;11) via banding cytogenetics methods is difficult. Thus, more sophisticated molecular approaches such as multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH), specific RT-PCR, and/or genomic PCR methods are required to uncover these *MLL* rearrangements, especially unusual, complex, and/or cryptic rearrangements [3,4]. Here, we describe a rare case of cryptic insertion of chromosome 10 material in a derivative chromosome 11 in which the combination of several molecular approaches was decisive to reveal the nature of a complex and cryptic rearrangement leading to the *MLL-MLLT10* gene fusion in a child with AML-M5.

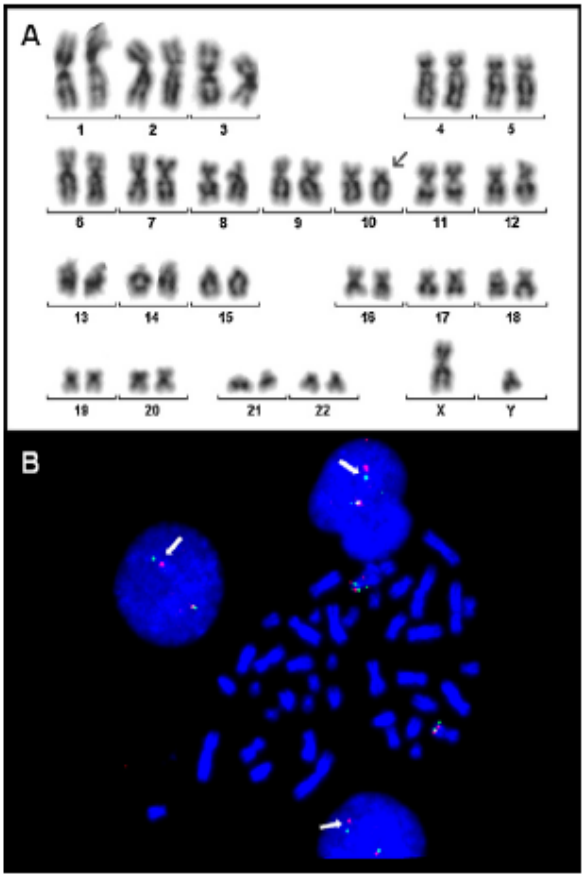


Fig. 1. (A) G-banding karyotype showing a deletion in 10p12 (arrow) and apparently normal chromosomes 11. (B) FISH with an MLL break apart probe showing normal result in metaphase and slightly split signals for *MLL* 5′ (green) and 3′ (red) parts in interphase nuclei.

2. Methods

2.1. Patient

Bone marrow specimen of a 20-month-old boy with a history of weight loss, difficulty walking, nasal congestion and cough, was referred for cytogenetics and molecular studies at the National Cancer Research Institute. Physical examination revealed bilateral exophthalmos, bilateral swelling of the frontal-temporal region, hepatosplenomegaly (the liver was palpable 3.5 cm below the right costal margin and spleen 1 cm below the left costal margin) and no lymphadenomegaly. Hemoglobin level was 11.2 g/dL, white blood cell count was $6.9 \times 10^9\ L^{-1}$ with 69% blast cells, and the platelet count was $20.8 \times 10^9\ L^{-1}$. The morphologic evaluation showed a hypercellular bone marrow with 60% blast cells having basophilic cytoplasm and multiple nucleoli with myeloid features compatible with a diagnosis of AML-M5a. Flow cytometry revealed blasts that expressed CD4, CD15, CD33, CD38, CD45, CD56, CD64, CD71, CD117, CD123, and HLA-DR. The infant was treated according to a published protocol [5], and complete remission was achieved on day 33 of chemotherapy; to date the patient is in complete remission (for 4 months).

2.2. Methods

Cytogenetic analysis was performed on bone marrow cells according to standard protocols, and the karyotype was described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature [6]. FISH experiments were performed on metaphase spreads and interphase cells, using the LSI MLL dual-color break apart probe (Cytocell/Aquarius®) according to the manufacturer's instructions, whole chromosome painting (WCP) probes for chromosomes 10 and 11, partial chromosome painting (PCP) probes for 10q, 10p, and 10pter to 10p12.33, subtelomeric probes for 10p and 11q, and bacterial artificial chromosome probes (BACs) for the chromosomal region 11q23.3 (RP11-356E17, RP11-35P15, CTD-3245B9 and RP11-142I2). The WCP and PCP probes were produced and labelled in the Molecular Cytogenetics Laboratory of the Institute of Human Genetics, Jena, Germany. The procedures were performed as previously described [7]. Multicolor chromosome banding (MCB) was done for chromosome 10, as previously reported [8]. RT-PCR analysis was performed with a combination of 5′ *MLL* and 3′ *MLLT10* primers. All RT-PCR analyses were performed with one microgram of mRNA, treated with

0145-2126/$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.leukres.2011.12.009

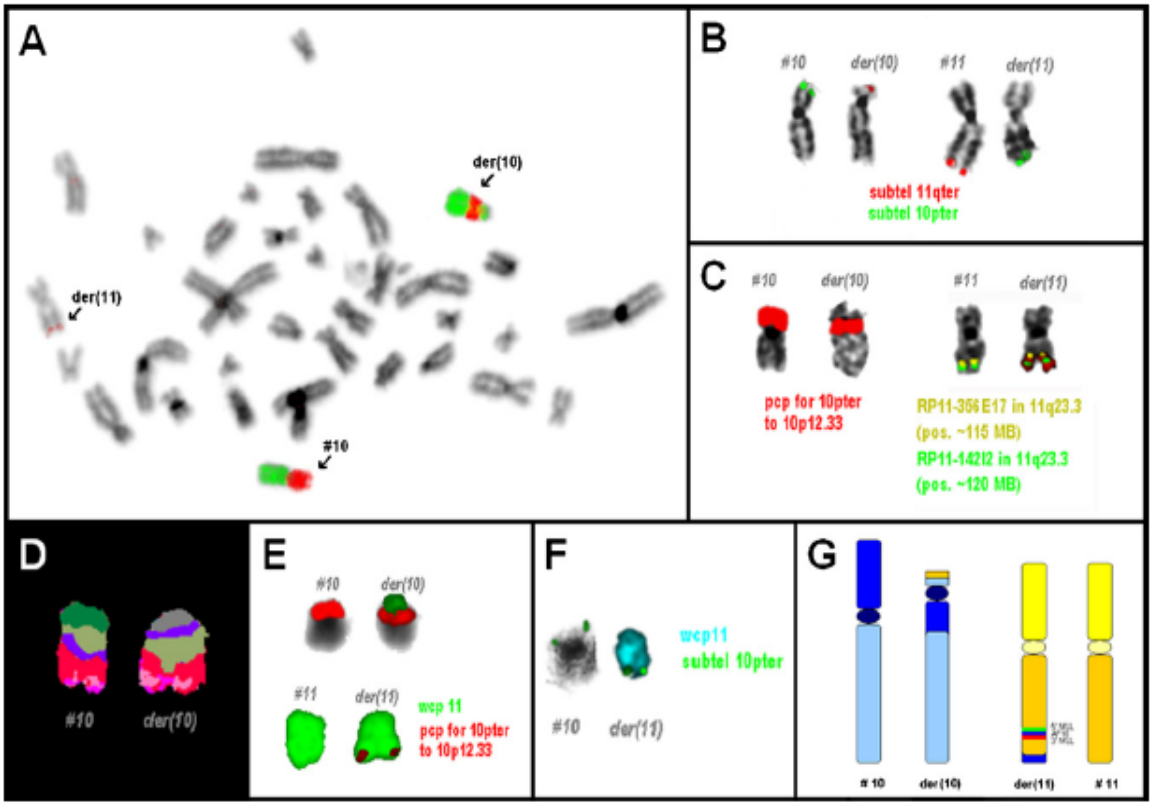


Fig. 2. (A) FISH with partial chromosome paints (PCP) for chromosome 10p (red) and 10q (green) shows a pericentric inversion in derivative chromosome 10 and a small insertion of 10p material in 11q23 (R-DAPI image). (B) Application of subtelomeric probes for 10p (green) and 11q (red) reveal a t(10;11). (C) A PCP probe for 10pter-10p12.33 (red) and BAC probes mapped to 11q23.3 (yellow and green) prove the presence of an insertion in 11q23.3. (D) MCB for chromosome 10 shows a pericentric inversion. (E) FISH with whole chromosome paint (WCP) probe for chromosome 11 (green) and PCP for 10pter-10p12.33 (red) proves an insertion of 10p material in 11q and addition of material from 11q on 10p. (F) Subtelomeric probe for 10p (green) and WCP probe for chromosome 11 (blue) detects an insertion of 10p material in 11q. (G) Schematic illustrations of the configuration figure of the cryptic rearrangement.

DNAse Amplification Grade I (Invitrogen) and reverse transcribed with Superscript II Reverse transcriptase® (Invitrogen). Each reaction was carried out with Taq DNA Polymerase (Invitrogen). The reactions were performed using the following program: 94 °C for 2 min and 45 cycles at 94 °C for 20 s and 62 °C for 1 min. *β-Actin* was used as control and healthy donor was negative control. The following primers were used: *MLL/MLLT10* – Fw, 5′-AAGAAGGGAATGTCTCGGCC-3′/Rev, 5′-ACCAGGCTTTCTTCCCCTT-3′; *β-Actin* Fw, 5′-ACCTGAGAACTCCACTACCCT-3′/Rev, 5′-GGTCCCACCCATGTTCCAG-3′. PCR products were subjected to direct sequencing, using the BigDye® Terminator kit (Applied Biosystems™) and the 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems™).

3. Results

G-banding studies revealed a karyotype 46,XY,del(10)(p12) in 18 of 20 metaphases analyzed (Fig. 1A). Using the *MLL* break apart probe, we did not find a split signal pattern for *MLL* in 20 metaphases analyzed, but the analysis of interphase nuclei revealed slightly split signals for the *MLL* 5′ and 3′ parts in 56 of 100 analyzed cells (Fig. 1B), a finding compatible with a small insertion of unknown chromosomal material in the *MLL* gene. Further FISH analyses revealed an insertion of 10p material in the 11q23.3 region (Fig. 2A, C and E). Additionally, we found in derivative chromosome 10 a pericentric inversion (Fig. 2A and D) and a t(10;11)(p17;q23) (Fig. 2B and F). The final karyotype was characterized as 46,XY,der(10)(11qter->11q23.3::10q11.2->10p12::10q11.2->10qter),der(11)(11pter->11q23.3::10p12->10p12::11q23.3->11q23.3::10p12->10pter).

The RT-PCR for *MLL/MLLT10* fusion revealed two PCR products (Fig. 3A), one with 700 bp and another with 640 bp in length. By sequencing the PCR products it was possible to determine that both had the same fusion points, indicating that *MLL* was fused to *MLLT10* sequence (Fig. 3B). The difference between them was a deletion of exon 8 from one of the *MLL* transcripts.

4. Discussion

The *MLL-MLLT10* gene fusion as a result of a rearrangement of 10p12 and 11q23 is frequently found in childhood AML and generally is associated with a dismal prognosis. A large study including 98 patients with t(10;11)(p12;q23) revealed that this translocation is an independent predictor of poor prognosis, so these patients should be allocated to high-risk arm of pediatric AML treatment protocols [1]. Previous studies have described the complexity of chromosomal rearrangements leading to this gene fusion and the 11q breakpoint heterogeneity as being the inversions involving the 11q13 region and insertions of 11q23.3 material into the 10p12, the most common types of rearrangements [2,9,10]. However, Shibuya et al. [11] and Klaus et al. [10] described two rare cases where the rearrangement involved an insertion from 10p12 into 11q23, including the involvement of large chromosome segments.

In this work, we detected an *MLL-MLLT10* gene fusion originated via a subtle and cryptic chromosomal anomaly. Using a combination of several FISH probes, MCB, and RT-PCR, we could characterize a *MLL-MLLT10* fusion due to a complex and cryptic 10p/11q rearrangement masked in a banding karyotype with a del(10)(p12) as the sole chromosome abnormality. The mechanism of rearrangement in the case presented here is similar to that described by Van Limbergen et al. [2], where the gene fusion was originated by an insertion of the 3′ part from *MLLT10* gene into the *MLL* gene on 11q23, resulting in a fusion of the 5′ part of *MLL* with the 3′

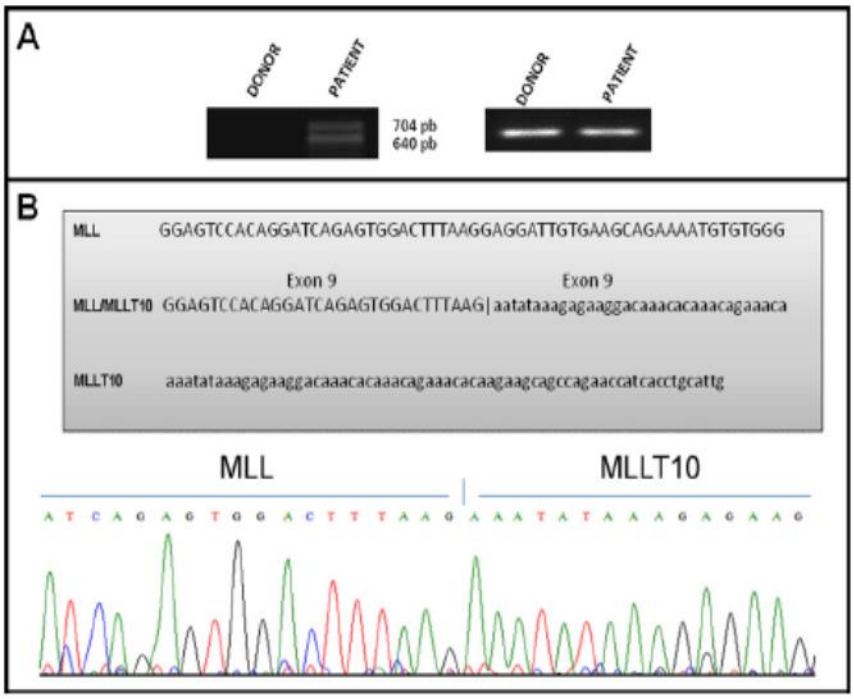


Fig. 3. (A) Electrophoresis of the RT-PCR result showing the gene-fusion of *MLL-MLLT10* (left). *β-Actin* amplification was used as control (right). (B) Sequence analysis showing the MLL-*MLLT10* fusion.

part of *MLLT10*. In our case, however, besides the insertion we detected a translocation between 10p and 11q (Fig. 2B), showing a more complex mechanism of formation for this gene fusion. To our knowledge, this *MLL* rearrangement has not been previously described.

Interestingly, two PCR products were found, but the sequencing of these showed the presence of the same breakpoint between *MLL-MLLT10* (Fig. 2B and C). This result could be explained by an alternative splicing of the *MLL* gene; however, whether it is relevant for the disease process remains to be determined.

In conclusion, our data corroborate that the combination of standard banding cytogenetics and molecular analysis, including FISH and molecular approaches is very important to the identification of chromosomic abnormalities with impact of prognostic in children, especially in complex rearrangements involving 11q23 regions and *MLL* gene.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank Daniela Ney Garcia for editing the figures. This work was supported by Stefan Morsch Stiftung (Germany); Monika Kutzner Stiftung (Germany); the German Academic Exchange Service (DAAD) (BRA 07/039); CAPES (project no. 301/08); Pro-Vita non-profit organization; CNPq and FAPERJ (project no. E-26/110:899/2009); the International Outreach Program and the American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC), St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN); and a Center of Excellence Grant, State of Tennessee.

Contributions. EC and RCR provided data and revision of the clinical history of the child; AFF and MLMS conducted the cytogenetic analysis; TPV, SB, MLMS, MTS, TJMS, and TL conducted FISH and MCB analysis. EA and RB conducted the RT-PCR and genomic analysis. AFF, TPV, MTS, TL, RCR, EA, and MLMS revised the manuscript critically for important intellectual content, and the authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

[1] Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. Blood 2009;114(12):2489–96.

[2] Van Limbergen H, Poppe B, Janssens A, De Bock R, De Paepe A, Noens L, et al. Molecular cytogenetic analysis of 10;11 rearrangements in acute myeloid leukemia. Leukemia 2002;16(3):344–51.

[3] De Braekeleer E, Meyer C, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Berthou C, et al. Complex and cryptic chromosomal rearrangements involving the MLL gene in acute leukemia: a study of 7 patients and review of the literature. Blood Cells Mol Dis 2010;44(4):268–74.

[4] de Figueiredo AF, Liehr T, Bath S, Binato R, Ventura EM, de Souza MT, et al. A new cryptic ins(11;1)(q23;q21q31) detected in a t(1;8;11)(q21;p21;q23) in a baby with acute myeloid leukemia FAB AML-M5. Blood Cells Mol Dis 2010;45(3):197–8.

[5] Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, Ribeiro RC, Bowman WP, Taub J, et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukemia: results of the AML02 multicenter trial. Lancet Oncol 2010;11(6):543–52.

[6] Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. ISCN 2009: an international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: Karger; 2009.

[7] Starke H, Nietzel A, Weise A, Heller A, Mrasek K, Belitz B, et al. Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype–phenotype correlation and classification. Hum Genet 2003;114:51–67.

[8] Weise A, Mrasek K, Fickelscher I, Claussen U, Cheung SW, Cai WW, et al. Molecular definition of high-resolution multicolor banding probes: first within the human DNA sequence anchored FISH banding probe set. J Histochem Cytochem 2008;56(5):487–93.

[9] Stasevich I, Utskevich R, Kustanovich A, Litvinko N, Savitskaya T, Chernyavskaya S, et al. Translocation (10;11)(p12;q23) in childhood acute myeloid leukemia: incidence and complex mechanism. Cancer Genet Cytogenet 2006;169(2):114–20.

[10] Klaus M, Schnittger S, Haferlach T, Dreyling M, Hiddemann W, Schoch C. Cytogenetics, fluorescence in situ hybridization, and reverse transcriptase polymerase chain reaction are necessary to clarify the various mechanisms leading to an MLL-AF10 fusion in acute myelocytic leukemia with 10;11 rearrangement. Cancer Genet Cytogenet 2003;144(1):36–43.

[11] Shibuya N, Taki T, Mugishima H, Chin M, Tsuchida M, Sako M, et al. t(10;11)-acute leukemias with MLL-AF10 and MLL-ABI1 chimeric transcripts: specific expression patterns of ABI1 gene in leukemia and solid tumor cell lines. Genes Chromosomes Cancer 2001;32(1):1–10.

Amanda Faria de Figueiredo
Tarsis Paiva Vieira
Cytogenetics Laboratory, Bone Marrow Unit, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Thomas Liehr
Samarth Bhatt
Jena University Hospital, Institute of Human Genetics, Jena, Germany

Mariana Tavares de Souza
Cytogenetics Laboratory, Bone Marrow Unit, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Renata Binato
Stem Cell Laboratory, Bone Marrow Unit, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Terezinha de Jesus Marques-Salles
Pediatric Oncohematology Center, Hospital Oswaldo Cruz, University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Edna Carboni
Department of Hematology, Pequeno Principe Hospital, Curitiba, SC, Brazil

Raul C. Ribeiro
Department of Oncology and International Outreach Program, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA

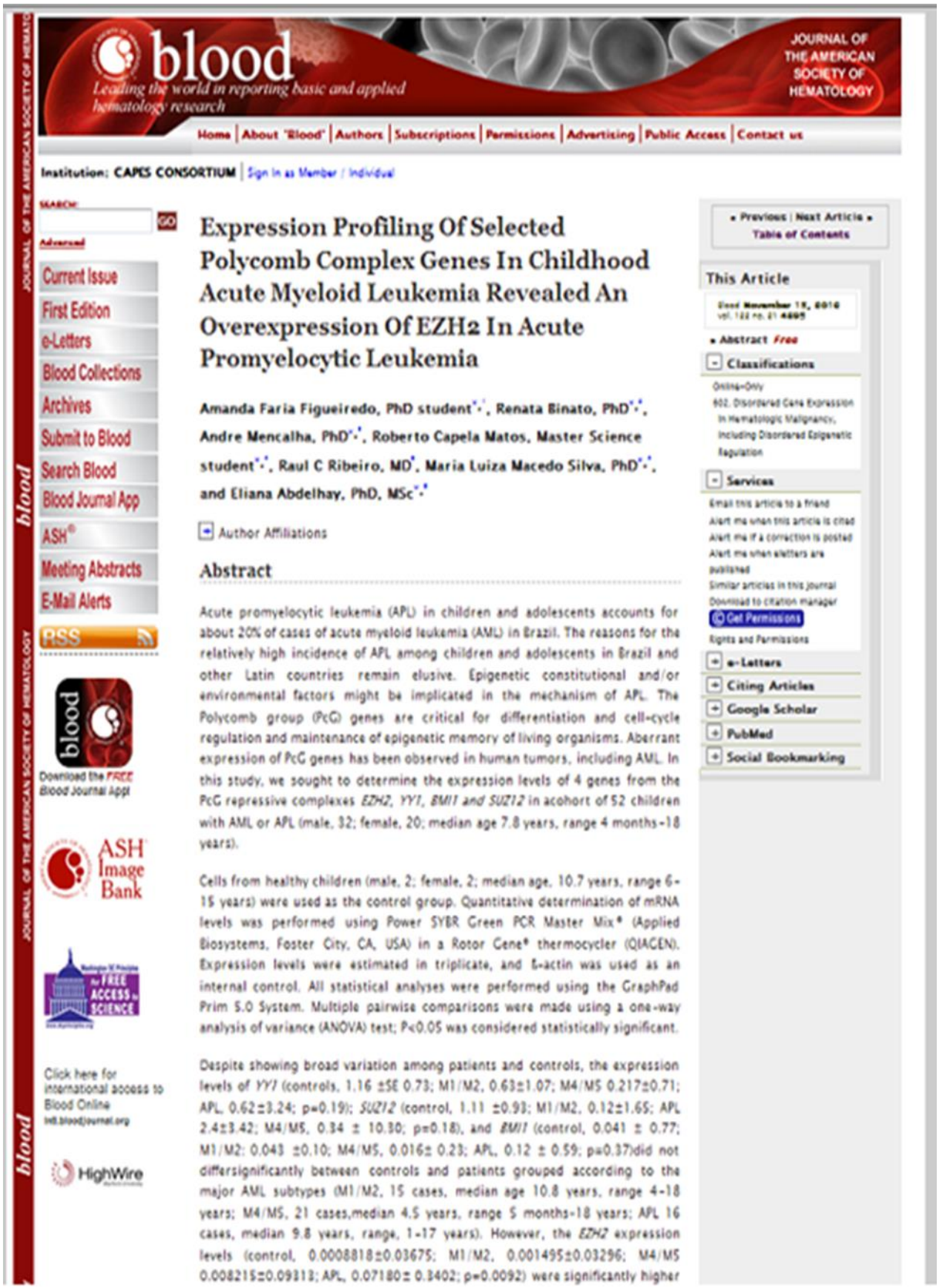
Maria Luiza Macedo Silva
Cytogenetics Laboratory, Bone Marrow Unit, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Eliana Abdelhay*
Stem Cell Laboratory, Bone Marrow Unit, National Cancer Institute, Praca da Cruz Vermelha, 23 – 6 Fl, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 21 3521 1304; fax: +55 21 5321 1865.
E-mail address: eabdelhay@inca.gov.br (E. Abdelhay)

27 October 2011
Available online xxx

8.4. Publicações em 2013



blood
Leading the world in reporting basic and applied hematology research
JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY

Home | About "Blood" | Authors | Subscriptions | Permissions | Advertising | Public Access | Contact us

Institution: CAPES CONSORTIUM | Sign In as Member / Individual

SEARCH: GO
Advanced

Current Issue
First Edition
e-Letters
Blood Collections
Archives
Submit to Blood
Search Blood
Blood Journal App
ASH®
Meeting Abstracts
E-Mail Alerts
RSS

Download the FREE Blood Journal Appt

ASH Image Bank

Click here for international access to Blood Online
int8.bloodjournal.org

HighWire

Expression Profiling Of Selected Polycomb Complex Genes In Childhood Acute Myeloid Leukemia Revealed An Overexpression Of EZH2 In Acute Promyelocytic Leukemia

Amanda Faria Figueiredo, PhD student[*,*], Renata Binato, PhD[*,*], Andre Mencalha, PhD[*,*], Roberto Capela Matos, Master Science student[*,*], Raul C Ribeiro, MD[*], Maria Luiza Macedo Silva, PhD[*,*], and Eliana Abdelhay, PhD, MSc[*,*]

Author Affiliations

Abstract

Acute promyelocytic leukemia (APL) in children and adolescents accounts for about 20% of cases of acute myeloid leukemia (AML) in Brazil. The reasons for the relatively high incidence of APL among children and adolescents in Brazil and other Latin countries remain elusive. Epigenetic constitutional and/or environmental factors might be implicated in the mechanism of APL. The Polycomb group (PcG) genes are critical for differentiation and cell-cycle regulation and maintenance of epigenetic memory of living organisms. Aberrant expression of PcG genes has been observed in human tumors, including AML. In this study, we sought to determine the expression levels of 4 genes from the PcG repressive complexes *EZH2, YY1, BMI1 and SUZ12* in acohort of 52 children with AML or APL (male, 32; female, 20; median age 7.8 years, range 4 months-18 years).

Cells from healthy children (male, 2; female, 2; median age, 10.7 years, range 6-15 years) were used as the control group. Quantitative determination of mRNA levels was performed using Power SYBR Green PCR Master Mix® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a Rotor Gene® thermocycler (QIAGEN). Expression levels were estimated in triplicate, and ß-actin was used as an internal control. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prim 5.0 System. Multiple pairwise comparisons were made using a one-way analysis of variance (ANOVA) test; P<0.05 was considered statistically significant.

Despite showing broad variation among patients and controls, the expression levels of *YY1* (controls, 1.16 ±SE 0.73; M1/M2, 0.63±1.07; M4/M5 0.217±0.71; APL, 0.62±3.24; p=0.19); *SUZ12* (control, 1.11 ±0.93; M1/M2, 0.12±1.65; APL 2.4±3.42; M4/M5, 0.34 ± 10.30; p=0.18), and *BMI1* (control, 0.041 ± 0.77; M1/M2: 0.043 ±0.10; M4/M5, 0.016± 0.23; APL, 0.12 ± 0.59; p=0.37)did not differsignificantly between controls and patients grouped according to the major AML subtypes (M1/M2, 15 cases, median age 10.8 years, range 4-18 years; M4/M5, 21 cases,median 4.5 years, range 5 months-18 years; APL 16 cases, median 9.8 years, range, 1-17 years). However, the *EZH2* expression levels (control, 0.0008818±0.03675; M1/M2, 0.001495±0.03296; M4/M5 0.008215±0.09313; APL, 0.07180± 0.3402; p=0.0092) were significantly higher

• Previous | Next Article •
Table of Contents

This Article
Blood November 15, 2010 vol. 122 no. 21 4895
• Abstract Free
Classifications
Online-Only
602. Disordered Gene Expression In Hematologic Malignancy, Including Disordered Epigenetic Regulation
Services
Email this article to a friend
Alert me when this article is cited
Alert me if a correction is posted
Alert me when eletters are published
Similar articles in this journal
Download to citation manager
Get Permissions
Rights and Permissions
e-Letters
Citing Articles
Google Scholar
PubMed
Social Bookmarking

8.5 Publicações em colaboração durante os 4 anos do projeto de tese
8.5.1.Publicações em 2012

Case Report

Acta Haematologica

Acta Haematol
DOI: 10.1159/000345828

Received: August 20, 2012
Accepted after revision: October 24, 2012
Published online: ■■■

© S. Karger AG, Basel
PROOF Copy for personal use only
ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

An Unusual Cytogenetic Rearrangement Originating from Two Different Abnormalities in Chromosome 6 in a Child with Acute Promyelocytic Leukemia

R.R.C. Matos[a, b] H. Mkrchyan[f] B.A. Amaral[c, d] T. Liehr[f] M.T. de Souza[a, b] D.R. Ney-Garcia[a, b] N. Santos[c] T.J. Marques-Salles[e] R.C. Ribeiro[g] A.F. Figueiredo[a, b] M.L.M. Silva[a, b]

[a]Bone Marrow Unit, Cytogenetics Department and [b]Post-Graduation Program in Oncology, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, and [c]Department of Genetics and [d]Post-Graduation Program in Genetics, Department of Genetics, Federal University of Pernambuco and [e]Laboratory of Human Cytogenetics, Pediatric Oncohematology Center, University Hospital Oswaldo Cruz, Recife, Brazil; [f]Institute of Human Genetics, Jena University Hospital, Jena, Germany; [g]Department of Oncology and International Outreach Program, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tenn., USA

Key Words
Childhood acute promyelocytic leukemia · Cryptic cytogenetic abnormality · *PML-RARa* · Secondary chromosome changes

Abstract
Acute promyelocytic leukemia (APL) is usually associated with a favorable outcome, but about 10% of patients tend to relapse. The genetic hallmark of APL is a balanced translocation involving chromosomes 15 and 17, and the *PML-RARa* gene fusion is found in more than 90% of these cases. Other chromosomal abnormalities are commonly found in APL, but their clinical significance has yet to be determined. Here we report a case of childhood APL that was studied by conventional cytogenetics along with molecular cytogenetic techniques. The patient showed a complex karyotype with an unusual cytogenetic rearrangement originating from two different abnormalities in a single chromosome 6. Our case is an exceptional example of a cryptic cytogenetic anomaly in APL and underscores the importance of detailed genetic characterization.

Copyright © 2013 S. Karger AG, Basel

Introduction

Acute promyelocytic leukemia (APL) is characterized by the accumulation of promyelocytes in the bone marrow and peripheral blood and is often accompanied by disseminated intravascular coagulation [1, 2]. Distinct from other acute myeloid leukemia subtypes, APL is usually associated with a favorable outcome with long-term disease-free survival approaching 80%. For the 20% of patients whose outcome is not favorable, early complications cause mortality in 10%, and disease relapse or drug resistance affects the other 10%. Prompt diagnosis and early initiation of treatment are critical to lowering the risk of early mortality [3]. Factors associated with specific therapeutic failure are not well established.

The genetic hallmark of APL is a balanced translocation involving chromosomes 15 and 17, t(15;17)(q22;q21), which results in the fusion of the promyelocytic leukemia *(PML)* gene with the retinoic acid receptor *(RARa)* gene [2]. The *PML-RARa* gene fusion is found in more than 90% of the cases of APL [2]. Other translocations involving the *RARa* gene account for the remaining APL cases.

KARGER
Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2013 S. Karger AG, Basel
0001–5792/13/0000–0000$38.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/aha

Marta Lutza Macedo Silva
Praça da Cruz Vermelha, 23, 6th floor
Rio de Janeiro, RJ 20.230-130 (Brazil)
E-Mail lutzamacedo@inca.gov.br

Additional chromosomal abnormalities are commonly found in APL cases with t(15;17), but their clinical significance remains elusive. In leukemias and myelodysplasia in general, deletions or translocations involving a breakpoint at the 6p region have been associated with a dismal prognosis [4]. In APL, 6p abnormalities have been described in only two cases [4].

Here we report a case of childhood APL that showed an unusual cytogenetic rearrangement originating from two different abnormalities in a single chromosome 6. The response to therapy of this patient and others reported with a similar abnormality does not support the idea that 6p and 6q abnormalities have adverse implications in APL.

Material and Methods and Case Report

From May 2006 to March 2012 we received samples from 67 children with acute myeloid leukemia. Twenty-six (38.8%) of these patients had APL with the characteristic t(15;17)(q22;q21). Among these APL cases, 5 (19.2%) showed secondary chromosomal anomalies including 1 with cryptic abnormalities in a single chromosome 6.

Case Report

A 10-year-old boy was admitted to the Service of Pediatric Oncohematology of Lagoa's Hospital with a history of intense bleeding after dental extraction and pancytopenia. Physical examination revealed petechiae and widespread hematomas. His white blood cell count was 2.93×10^9/l and his platelet count was 11×10^9/l. Morphological examination of his bone marrow showed a hypercellular content with 95% blast cells, 84% of these with classical promyelocytic morphological characteristics including abundant Auer rods. Staining of the leukemia cells was intensive with both myeloperoxidase and Sudan black B stains. Flow cytometry analysis revealed that the blasts were positive for CD13, CD33, CD38, and CD117 markers, but negative for CD15, CD34, and HLA-DR markers. The patient's coagulation profile test confirmed normal clotting function. His prothrombin time was14.5 s; international normalized ratio was 1.02, and activated partial thromboplastin time was 29.9 s. His fibrinogen level was not available at diagnosis. There was no clinical evidence of disseminated intravascular coagulation. The patient was treated according to the AML-BFM-2004 protocol. He achieved complete remission and has remained in remission for 15 months.

Conventional Cytogenetics

Cytogenetic analysis was performed at presentation on bone marrow cells according to standard protocols, and the karyotype was described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature [5].

Molecular Cytogenetics

We performed fluorescence in situ hybridization (FISH) experiments on metaphase spreads, using the LSI *PML/RARa* probe (Abbott™), according to the manufacturer's instructions, whole chromosome painting probes for chromosome 6, partial chromosome painting probes for 6qter and 6pter, and probes obtained from bacterial artificial chromosomes for the chromosomal regions 6p23-6p22.3, 6p24.1, 6p21.3, and 6q16.3 (RP1-232K4, RP11-97A19, RP11-174N13, and RP11-1145D19). The whole chromosome painting and partial chromosome painting probes were produced and labeled in the Molecular Cytogenetics Laboratory of the Institute of Human Genetics, Jena, Germany. The procedures were performed as previously described [6]. Multicolor chromosome banding was done for chromosome 6 as previously reported [7].

Results

The G-banding cytogenetic analysis defined the karyotype as 46,XY,-6, t(15;17)(q22;q21),+mar in 21 of the 23 metaphases analyzed (fig. 1a). FISH analyses confirmed the *PML-RARa* gene fusion (fig. 1b). The application of multicolor chromosome banding and FISH with specific bacterial artificial chromosome probes for chromosome 6 showed that the marker chromosome was a derivative chromosome 6 and presented two different chromosomal aberration types (fig. 1c–e). Thus the final karyotype was redefined as 46,XY, t(15;17)(q22;q21),inv(6)(p24;q15)[10]/46,XY, t(15;17)(q22;q21),der(6)(6p21.3 >6q16.1)[4].

Discussion

Current treatment of APL with all-*trans* retinoic acid in combination with an anthracycline is very effective in inducing remission and eradicating APL. More than 90% of patients newly diagnosed with APL achieve remission. However, about 10% of the patients in remission eventually relapse. Prognostic factors associated with treatment failure have included biological features such as persistent disease after consolidation, high WBC count at diagnosis, FLT3 ITD mutations, and bcr3 transcripts.

Although secondary cytogenetic abnormalities occur in about 30% of cases of APL, their prognostic importance has not been determined, and these additional cytogenetic abnormalities are often complex [8, 9]. The techniques of molecular cytogenetics make possible a better clarification of complex karyotypes, such as the one we present here, providing critical information along with a more accurate diagnosis and prognostic markers [10]. According to published data, 6p rearrangements occur preferentially with other chromosomal events. Only a few cases with chromosome 6 abnormalities have been confirmed to have cryptic t(15;17) rearrangements,

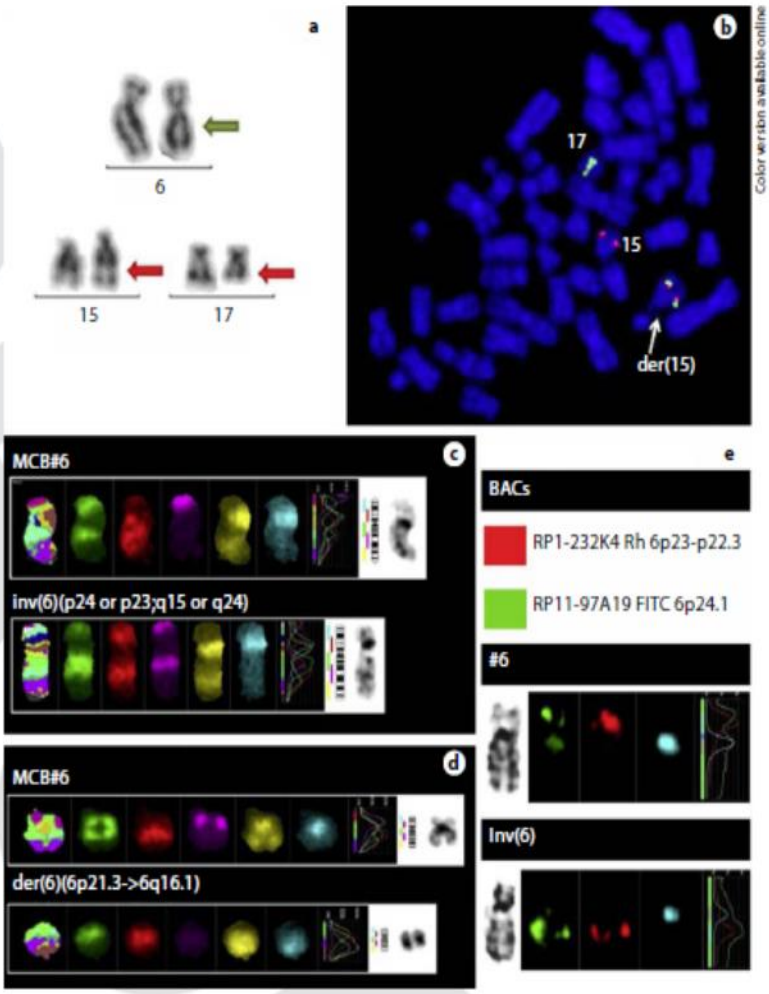


Fig. 1. a Translocation (15;17)(q22;q21) and marker chromosome (G-banding). **b** Application of LSI *PML/RARa* probe revealed fusion. Inv(6)(p24 or p23;q15 or q24) (**c**) and der(6)(6p21.3->6q16.1) (**d**) were described using multicolor chromosome banding probe for chromosome 6. **e** Bacterial artificial chromosomes for the chromosomal regions: 6p23-6p22.3 in red (rhodamine), 6p24.1 in green (FITC), and centromeric region in turquoise (DEAC).

and only 2 previously reported cases involved the 6p region [4].

We present an interesting observation in which conventional cytogenetics showed only two chromosomal changes, including the t(15;17) and a marker chromosome. However, molecular approaches showed that one of these two chromosomes 6 presented an inversion and a deletion. Our case is an exceptional example of a cryptic cytogenetic anomaly in APL and underscores the importance of detailed cytogenetic characterization of APL cases. It is possible that when many patients are systematically tested and uniformly treated, prognostic markers might be identified. Outcome data from our patient and those [4] reported with a similar abnormality do not suggest that secondary abnormalities in chromosome 6 are associated with adverse prognosis.

Acknowledgments

The authors acknowledge with gratitude the help of Tarsis Paiva Vieira and Dr. Eliana Abdelhay. This work was supported by the Stefan Morsch Stiftung (Germany); the Monika Kutzner Stiftung (Germany); the German Academic Exchange Service (DAAD) (BRA 07/039); CAPES (project No. 301/08); Pro-Vita nonprofit organization; CNPq and FAPERJ (project No.E-26/110:899/2009); the International Outreach Program and the American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC), St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, Tenn., USA), and a Center of Excellence Grant, State of Tennessee.

References

1 Zhang T, Westervelt P, Hess JL: Pathologic, cytogenetic and molecular assessment of acute promyelocytic leukemia patients treated with arsenic trioxide (As2O3). Mod Pathol 2000;13:954–961.

2 Zimonjic DB, Pollock JL, Westervelt P, Popescu NC, Ley JT: Acquired, nonrandom chromosomal abnormalities associated with the development of acute promyelocytic leukemia in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:13306–13311.

3 Lo-Coco F, Sanz M: Whole-genome sequencing and acute promyelocytic leukemia. JAMA 2011;306:610–611.

4 Nakase K, Wakita Y, Minamikawa K, Yamaguchi T, Shiku H: Acute promyelocytic leukemia with del(6)(p23). Leuk Res 2000;24:79–81.

5 Shaffer L, Slovak ML, Campbell LJ: ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, Karger, 2009.

6 Wetse A, Mrasek K, Fickelscher I, Claussen U, Cheung SW, Cai WW, Liehr T, Kosyakova N: Molecular definition of high-resolution multicolor banding probes: first within the human DNA sequence anchored FISH banding probe set. J Histochem Cytochem 2008;56:487–493.

7 Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U: Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. Int J Mol Med 2002;9:335–339.

8 Mitelman F, Heim S: Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberration of Tumor Cells, ed 3. Hoboken, Wiley-Blackwell, 2009.

9 Zhang L, Zhu X: Epidemiology, diagnosis and treatment of acute promyelocytic leukemia in children: the experience in China. Mediterr J Hematol Infect Dis 2012;4:e2012012.

10 De Figueiredo AF, Vieira TP, Liehr T, Bhatt S, de Souza MT, Binato R, Marques-Salles TJ, Carboni E, Ribeiro RC, Silva MLM, Abdelhay E: A rare cryptic and complex rearrangement leading to MLL/MLLT10 gene fusion masked by del(10)(p12) in a child with acute monoblastic leukemia (AML-M5). Leuk Res 2012;36:e74–e77.

ARTICLE IN PRESS

YBCMD-01657; No. of pages: 3; 4C:

Blood Cells, Molecules, and Diseases xxx (2012) xxx–xxx

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Blood Cells, Molecules, and Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bcmd

Letter to the Editor

A case of childhood T cell acute lymphoblastic leukemia with a complex t(9;9) and homozygous deletion of *CDKN2A* gene associated with a Philadelphia-positive minor subclone

Dear Editor:

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) accounts for 15% and 25% of ALL in children and adults, respectively. T-ALL is characterized by male predominance, high-risk features including high white blood cell count (WBC), mediastinal enlargement, generalized lymphadenopathy, central nervous system (CNS) involvement, and poor outcome. An abnormal karyotype is found in 50%–60% of T-ALL cases [1,2]. The most frequent chromosomal abnormalities in T-cell leukemia are those involving the rearrangement of T-cell receptor genes and deletion of the 9p21 region [3,2]. Other genomic events involving the band 9p21 also occur in T-ALL. This band harbors at least two tumor suppressor genes, *CDKN2A* and *CDKN2B*, which encode $p16^{INK4a}$/$p14^{ARF}$ and $p15^{INK4b}$, respectively. Both $p16^{INK4a}$ and $p15^{INK4b}$ inhibit cyclin/CDK-4/6 complexes, blocking cell division during the G1/S phase of the cell cycle [4]. *CDKN2A* and *CDKN2B* loss of activity may result from heterozygous deletion with inactivation of the normal allele or homozygous deletions. These deletions occur in about 70% of T-ALL cases [3,4]. The *CDKN2A* deletion has also been found in the t(9;22)(q34;q11.2)/*BCR/ABL1* fusion gene positive B-ALL [4]. Cases of *BCR/ABL1*-positive T-ALL are rare, being found in about 9% of *BRC/ABL1*-positive cases, indicating an overall frequency of less than 0.3% in ALL [2]. In addition, Prebet and coworkers (2009) described two T-ALL cases presenting a *BCR/ABL1*-positive minor population detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and molecular studies, but not by conventional cytogenetic analysis. One of these two patients achieved complete remission only after addition of tyrosine kinase inhibitors to the treatment protocol [5].

Here, we describe a child with T-ALL with a complex karyotype that includes the 9q11-q32 chromosome deletion and the t(9;22)(q34;q11.2) translocation. Molecular analysis showed a homozygous deletion of the *CDKN2A* gene.

A 6-year-old Caucasian boy who presented a history of mediastinal mass, bronchospasm, and ecchymosis was referred for cytogenetics and molecular studies at the National Cancer Institute, Brazil. Physical examination revealed diffused enlarged lymph nodes, distended abdomen, and hepatosplenomegaly. Hemoglobin level was 11.2 g/dl, WBC count 51.5×10^9/l with 87% blast cells in the peripheral blood, platelet count 21×10^9/l, and lactate dehydrogenase >1200 U/l. The morphologic evaluation showed a hypercellular bone marrow with approximately 100% blast cells presenting lymphoid features. Flow cytometry revealed blasts that expressed CD7, CD8, CD4, cCD3, TdT, CD5, CD2, sCD3, and CD1a, consistent with a T-ALL diagnosis. The patient is being treated according to the BFM-2002 protocol combined with Imatinib. He continues in complete remission 6 months after diagnosis.

Cytogenetics using G-banding analysis was performed on bone marrow cells and revealed a clone presenting two derivative chromosomes 9, resulting from t(9;9)(p?12;q?12) in 29 of 30 metaphases. In one metaphase, the presence of a t(9;22)(q34;q11.2) was suspected. No normal metaphases were observed (Fig. 1A). FISH analysis with CDKN2A and BCR/ABL1 probes revealed a homozygous deletion of *CDKN2A* in 92% of the cells (Fig. 1E), and the *BCR/ABL1* fusion gene in 25% of the abnormal cells with t(9;9) and *CDKN2A* homozygous deletion (Fig. 1G). Additionally, FISH with partial chromosome painting probes for 9p and 9q confirmed the translocation between the two arms of chromosome 9 (Fig. 1B). Further, multicolor chromosome banding (MCB) for chromosome 9 and FISH with chromosome 9 centromeric probe (CEP9) and proximal regions of p and q arms of chromosome 9 probes (RP11-128P23-9p12, RP11-430C15-9q13), used to clarify the breakpoints of this complex rearrangement, revealed an isochromosome 9p and a pseudo isochromosome 9q harboring a 9q11-q32 deletion (Figs. 1C and D). Hence, the karyotype was redefined as: 46,XY, der(9)(pter->q11.1::q11.1->pter),der(9)(qter->p11.1::q32->qter)[29]/46,XY,der(9)(pter->q11.1::q11.1->pter),der(9)(qter->p11.1::q32->qter),t(9;22)(q34;q11.2) [1]. Semiquantitative RT-PCR detected a *BCR/ABL1* fusion transcript with the typical p210 transcript (b2a2-abl3).

This study underscores the importance of detailed molecular cytogenetic investigations to characterize all cases of acute leukemias [6]. Molecular cytogenetics including MCB detected a masked deletion in the derivative chromosome 9q, del(9)(q11q32), which has not before been described in T-cell ALL. Two cases of a Philadelphia-positive (Ph+) minor subclone have been described in adult T-ALL, although none of them had chromosome 9 abnormalities. The chemotherapy protocol was adapted by adding tyrosine kinase inhibitors as a treatment [5]. The detection of the *BCR/ABL1* fusion as a subclone, in the present case, allowed an optimization of therapy by including tyrosine kinase inhibitors in the treatment plan. To our knowledge, this is only the third case of a Ph+ minor subclone [5] and the first to be described in childhood T-cell ALL. In addition, we found a homozygous deletion of *CDKN2A*, which is frequently seen in childhood T-ALL [4].

In summary, we present a rare karyotype showing a masked deletion of 9q11.1 to 9q32 region in a complex rearrangement, with a homozygous deletion of the *CDKN2A* gene, and the acquisition of a Ph+ minor subclone as a sequential event. Because of the remarkable rarity of *BCR/ABL1* frequency in T-ALL and the description of Ph+ as a subclone associated with other abnormalities, the presence of the Ph+ clone in T-ALL, might be underestimated when only conventional karyotyping is performed. Moreover, the possibility that these patients may benefit from treatment with tyrosine kinase inhibitors makes it reasonable to recommend screening for *BCR/ABL1* fusion by RT-PCR or FISH in all patients with T-ALL.

Declaration of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Contribution authors

RCR provided the data and revision of the clinical history of the child; DRNG, TPV, TL, SB, MTS and MLMS conducted the cytogenetics,

1079-9796/$ – see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2012.09.005

Please cite this article as: D.R. Ney-Garcia, et al., Blood Cells Mol. Diseases (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2012.09.005

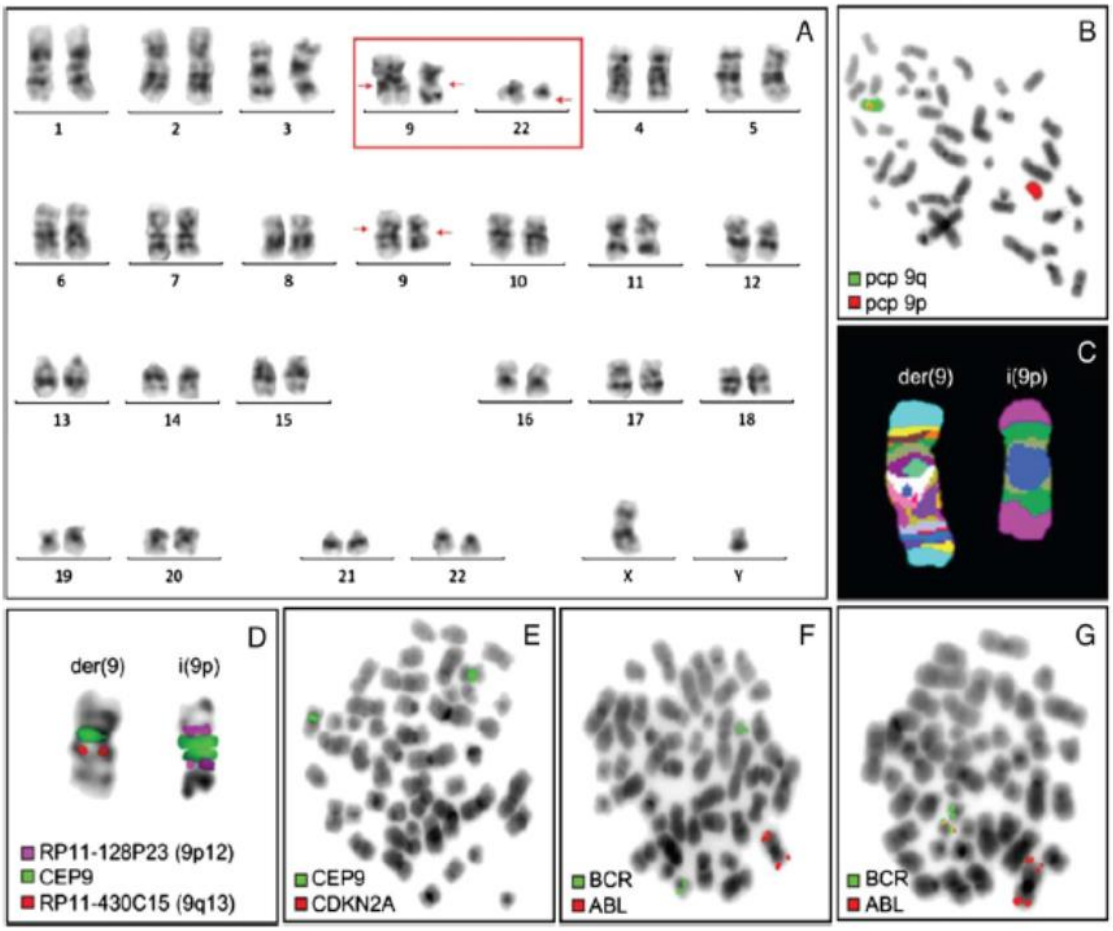


Fig. 1. A) Karyotype after G-banding showing t(9;9)(p?12;q?12) and, in the red square, a partial karyotype of the subclone characterized by the presence of t(9;9)(p?12;q?12) and t(9;22)(q34;q11.2); B) FISH analysis using partial chromosome painting (pcp) probes for 9p and 9q confirmed the translocation between the two arms of chromosome 9; C–D) MCB and application of centromere-near probes for chromosome 9 was applied to clarify the breakpoints. These analyses concluded that the derivatives were as follows: der(9)(qter->p11.1::q32->qter) and der(9)(pter->q11.1::q11.1->pter); E–G) FISH analyses with CDKN2A and BCR/ABL1 probes, respectively, revealed a homozygous deletion of CDKN2A and a subpopulation with a BCR/ABL1 gene fusion. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

FISH and MCB analyses. AFF conducted the RT-PCR analysis. DRNG, TL, MTS, MLMS and RCR revised the manuscript critically for important intellectual content, and the authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgments

The authors acknowledge with gratitude the help of Dra. Jane Dobbin, Roberto Rodrigues Capela de Matos and Dra Eliana Abdelhay. This work was supported by Stefan Morsch Stiftung (Germany); Monika Kutzner Stiftung (Germany); the German Academic Exchange Service (DAAD) (BRA 07/039); CAPES (project no. 301/08); Pro-Vita non-profit organization; CNPq (project no. 473878/2011-9) and FAPERJ (project no. E-26/110:899/2009); the International Outreach Program and the American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC), St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN); and Center of Excellence Grant, State of Tennessee.

References

[1] C. Graux, J. Cools, L. Michaux, P. Vandenberghe, A. Hagemeijer, Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast, Leukemia 20 (2006) 1496–1510.
[2] A. Hagemeijer, C. Graux, ABL1 rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia, Genes Chromosom. Cancer 49 (2010) 299–308.
[3] R. Bertin, C. Acquaviva, D. Mirebeau, C. Guidal-Giroux, E. Vilmer, H. Cavé, CDKN2A, CDKN2B and MTAP gene dosage permits precise characterization of mono- and bi-allelic 9p21 deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia, Genes Chromosom. Cancer 37 (2003) 44–57.
[4] S. Sulong, A.V. Moorman, J.A. Irving, J.C. Strefford, Z.J. Konn, M.C. Case, L. Minto, K.E. Barber, H. Parker, S.L. Wright, A.R. Stewart, S. Bailey, N.P. Bown, A.G. Hall, C.J. Harrison, A comprehensive analysis of the CDKN2A gene in childhood acute lymphoblastic leukemia reveals genomic deletion, copy number neutral loss of heterozygosity, and association with specific cytogenetic subgroups, Blood 113 (2009) 100–107.
[5] T. Prebet, M.J. Mozziconacci, D. Sainty, C. Arnoulet, M. Lafage, N. Dastugue, A. Charbonnier, C. Coso, J.A. Gastaut, D. Blaise, N. Vey, Presence of a minor Philadelphia-positive clone in young adults with de novo T-cell ALL, Leuk. Lymphoma 50 (2009) 485–487.
[6] A.F. de Figueiredo, T.P. Vieira, T. Liehr, S. Bhatt, M.T. de Souza, R. Binato, T.J. Marques-Salles, E. Carboni, R.C. Ribeiro, M.L.M. Silva, E. Abdelhay, A rare cryptic complex rearrangement leading to MLL-MLLT10 gene fusion masked by del(10)(p12) in a child with acute monoblastic leukemia (AML-M5), Leuk. Res. 36 (2012) 74–77.

Please cite this article as: D.R. Ney-Garcia, et al., Blood Cells Mol. Diseases (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2012.09.005

Daniela Ribeiro Ney-Garcia
Társis Paiva Vieira
Laboratório de Citogenética, Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO), Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Thomas Liehr
Samarth Bhatt
Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Institute of Human Genetics, Kollegiengasse 10, D-07743 Jena, Germany

Mariana Tavares de Souza
Amanda Faria de Figueiredo
Laboratório de Citogenética, Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO), Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Raul Correa Ribeiro
Department of Oncology and International Outreach Program, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA

Maria Luiza Macedo Silva
Laboratório de Citogenética, Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO), Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Corresponding author at: Laboratório de Citogenética, Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO), Instituto Nacional de Câncer (INCA), Praça Cruz Vermelha, 23, Centro, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 20230-130, Brazil.
E-mail address: luizamacedo@inca.gov.br.

4 September 2012
Available online xxxx

8.5.2.Publicações em 2013

Cancer Letters 338 (2013) 249–254

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Cancer Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/canlet

Analyzing acute leukemia patients with complex *MLL* rearrangements by a sequential LDI-PCR approach

Renata Binato [a,d,*,1], Claus Meyer [b,1], Maria Luiza Macedo-Silva [c,d,1], Daniela Garcia [c,d], Amanda Figueiredo [c,d], Julia Hofmann [b], Tarsis Paiva Vieira [c,d], Eliana Abdelhay [a,d,1], Rolf Marschalek [b,1]

[a] Stem Cell Laboratory, Bone Marrow Transplantation Unit, National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil
[b] Institute of Pharmaceutical Biology, Diagnostic Center of Acute Leukemia (DCAL), Goethe-University of Frankfurt, Frankfurt/Main, Germany
[c] Cytogenetic Laboratory, Bone Marrow Transplantation Unit, National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil
[d] National Institute for Cancer Control (INCT), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 January 2013
Received in revised form 22 March 2013
Accepted 26 March 2013

Keywords:
MLL rearrangements
Complex karyotypes
Molecular cytogenetic
Acute leukemia

ABSTRACT

Translocations involving *MLL* gene are common among children with acute leukemias. Most importantly, the presence of a given *MLL* fusion partner dictates the outcome of patients. Patients with complex *MLL* rearrangements, e.g. three-way translocations could be related to a poor clinical outcome. For this purpose, we characterize 5 childhood patients with three-way translocations involving *MLL* gene. By LDI-PCR we identified 15 out of 17 fusion alleles and determined the localization of these breakpoints. In all cases at least one functional *MLL* fusion allele was present. In addition, patients displayed a remaining 3′-*MLL* allele that allow in principle the expression of the MLL* protein variant.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Acute leukemia is the most common cancer in children, representing 31% of all cancers [1]. The phenotype of leukemia is separated into lymphoid and myeloid malignancies, with about 80% of leukemias being lymphocytic. Apart from response to treatment, the most important prognostic factor is the kind of cytogenetic aberration. One of the genetic abnormalities that is highly predictive for survival is the involvement of the *Mixed-Lineage leukemia* (*MLL*) gene [2]. The *MLL gene* is frequently rearranged in both acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoid leukemia (ALL) with highest incidence in infant leukemias, occurring in 60% of AML and 80% of ALL patients [3]. Translocations involving the *MLL* gene at 11q23 are associated with de novo acute leukemia as well as therapy-related acute leukemia [4]. Actually, more than 100 different *MLL* rearrangements with more than 70 different translocations partner genes have been characterized on the molecular level [5].

Genetic rearrangements with the *MLL* gene occur in the breakpoint cluster region (BCR), which is located between *MLL* exons 8 and 14 [6]. In case of balanced translocations both disrupted regions of the *MLL* gene, *MLL* exons 1-9/10/11 and *MLL* exons 10/11/12-37, are usually recombined in-frame with an appropriate translocation partner gene ($n > 70$). However, about 30% of leukemia cases display complex rearrangements that have been investigated also at the molecular level, however, mostly as single case studies [7–10]. Complex rearrangements in leukemia cases need – apart from their conventional cytogenetic analysis – high resolution techniques to unravel the complexity of genetic changes and the involved fusion genes. This can be done by multi-colour banding, SKY, PCR technologies or next generation sequencing (NGS). Larger and systematic studies focussing on this group of complex rearranged leukemia patients with *MLL* translocations have been published recently [11,12,6].

At present, *MLL* rearrangements are an unfavourable prognostic factor in various types of leukemia [13]. Moreover, the same study demonstrated convincingly that *MLL* fusion partners have a strong prognostic impact, ranging from 10–90% OS (overall survival) depending on which *MLL* fusion partner was identified in these patients. Therefore, it is of great importance to analyze also complex karyotypes and to connect these molecular data with clinical outcome.

Although complex *MLL* rearrangements involving three or more chromosomes have been described [6–12], it was sometimes quite difficult to accurately define complex translocations via conventional cytogenetic methods. Therefore, molecular cytogenetic techniques such as fluorescence *in situ* hybridization (FISH), especially the split signal FISH technique, or Long Distance Inverse (LDI)-PCR are excellent tools to detect cryptic abnormalities that may affect

* Corresponding author. Address: Praça da Cruz Vermelha 23, 6°andar ALA C, Divisão de Laboratórios do CEMO, INCA, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20.230-130, Brazil. Tel.: +55 21 2506 6691; fax: +55 21 2509 2121.
E-mail address: rbgomes@inca.gov.br (R. Binato).
[1] These authors contributed equally to this work.

0304-3835/$ - see front matter © 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.03.029

Table 1
Clinical data of 5 patients with complex *MLL* rearrangements.

Patient	Sex	Age	Type of disorder	Previous disease	Survival (months)
P1	F	15 months	Pre B ALL	De novo	9
P2	M	13 months	B ALL	De novo	16
P3	M	4 months	ALL	De novo	17
P4	M	3 months	ALL	De novo	8
P5	M	22 months	AML	De novo	30

the prognosis of patients with translocations involving the 11q23 region [14,15]. While FISH analyses suffer from certain limitations, LDI-PCR provides in principal the possibility to identify unknown translocation partners and to map the chromosomal breakpoints down to the nucleotide level. Therefore, we decided to analyze our patients with LDI-PCR to unravel their genetic rearrangements.

2. Materials and methods

2.1. Patients

The clinical data of the 5 patients included in this study are present in Table 1. They were 1 female and 4 male. All of them were children where 4 of them had ALL while one had AML. The diagnosis of leukemia was established based on clinical manifestations, immunophenotyping and cytogenetic analysis.

2.2. Bone marrow samples

All bone marrow samples were obtained from AML and ALL patients referred for cytogenetic and molecular test at the Brazilian National Cancer Institute. This work was performed with the approval of the National Cancer Institute Ethics Committee Board, in accordance with the guidelines of the local ethics committee and the Helsinki Declaration. The diagnostic of each patient was based on hematologic, cytogenetic and immunophenotypic assays. Bone marrow aspirates were collected in heparinized tubes and processed on the day they were collected. Bone marrow mononuclear cells were isolated from 2 to 5 mL of aspirate in a Ficoll-Hypaque density gradient (Ficoll 1.077 g/mL; GE) according to the manufacturer's protocol. Cells were washed three times in PBS and subsequently used for DNA extraction.

2.3. DNA extraction

The DNA from bone marrow mononuclear cells was isolated using DNAzol reagent (Invitrogen, USA). The extraction was performed following the manufacturer's protocol.

2.4. Cytogenetic analysis

Cytogenetic analysis at the time of diagnosis, was performed on bone marrow cells according to standard protocols using GTG-banding and chromosomes were identified and analyzed according to the International System of Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2009) [16].

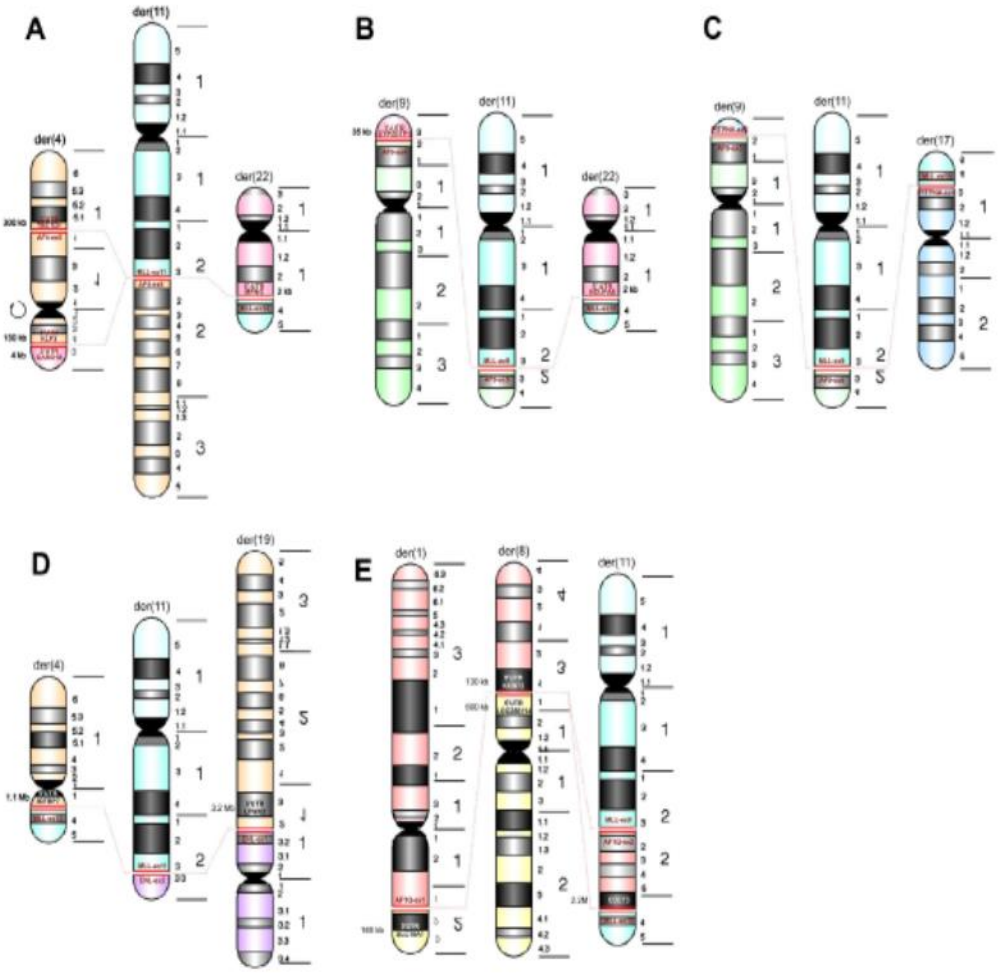


Fig. 1. A schematic representation of all investigated three-way translocations with involvement of the *MLL* gene. (A) Patient P1; (B) Patient P2; (C) Patient P3; (D) Patient P4; (E) Patient P5. All chromosomes were colour-coded to make the actual recombination better visible. Chromosome banding and nomenclature indicated.

2.5. Molecular cytogenetic

Molecular cytogenetics was performed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). FISH experiments were performed on metaphase spreads and interphase cells, using the commercially available LSI MLL break apart probe (Abbott Molecular, Inc., Wiesbaden-Delkenheim, Germany), according to the manufacturer's instruction. At least 20 metaphases and/or 200 interphase cells were scored.

2.6. Long Distance Inverse Polymerase Chain Reaction (LDI-PCR)

One microgram of genomic DNA was digested with restriction enzymes and self-ligated to form circular DNA molecules. Amplification was performed with specific primers of fusion sequences on der(11) and the corresponding reciprocal derivative chromosome. LDI-PCR reactions were performed as described and according to the manufacture's recommendation (PCR extender system, 5Prime). Amplified products were analyzed in 1% agarose gel [14]. PCR amplimers were isolated from the gel and subjected to DNA sequence analysis to obtain the patient-specific fusion sequences. After sequencing, unknown sequences were characterized by blasting the human genome data base (Genomic BLAST, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

3. Results

The five patients related in this study were referred to the cytogenetic laboratory of Bone Marrow Transplantation Unit from Brazilian National Cancer Institute. Based on cytogenetic and FISH analyses, all five patients were diagnosed to bear a chromosomal translocations involving the *MLL* gene. In addition, conventional cytogenetic analysis displayed complex rearrangements in all patients. In order to analyze these 5 patients in more detail, a series of subsequent LDI-PCR experiments was used to clone all specific breakpoints of the 5 leukemia patients. In all cases we first analyzed the genetic fusions of the N- and C-terminal gene portion of *MLL* gene. Having these fusion alleles in hand, we then designed additional oligonucleotides to perform subsequent LDI-PCR experiments. Applying this approach all alleles were identified in a consecutive fashion. The results for all 5 leukemia patients are described as follows:

3.1. Patient 1

Patient P1 (female) was diagnosed with pre B ALL at the age of 15 months. Conventional cytogenetic analysis revealed the karyotype 46,XX,t(4;11)(q21;q23),der(5)t(5;7)(q?;q?),der(7)t(5;7)(q?;q?)[18]/46,XX[2]. Additional FISH experiments displayed a break in the *MLL* gene (11q23 region). Genomic DNA of this patient was used to apply the above described LDI-PCR approach. The results obtained by LDI-PCR showed that the complex rearrangements detected by conventional cytogenetic was a rearrangement within four fusion sequences involving the loci 4p14, 4q21, 11q23 and 22q13 (Fig. 1A). The resulting derivative chromosomes, der(4), der(11) and der(22), displayed the following situation: (a) der(4) is characterized by an inversion of the centromeric portion (4p14-4q21); the piece of 4p14-16 was fused to 4q21, while the telomeric piece of 22q23-ter was fused to 4p14. The 4q21::4p14 junction displays *AF4* exon 1-5 and – about 300 kb further downstream – the 3′-UTR of the *TBC1D1* gene (orientated in opposite direction). Unfortunately, the 4p14::22q13 junction could not been cloned; (b) der(11) represents a typical der(11) chromosome that carries at the breakpoint junction a fusion between *MLL* exons 1-11 and *AF4* exons 5-20; (c) der(22) was broken at 22q13 and fused to *MLL* exons 12-37. At the 22q13 fusion site we found the *MFNG* gene about 2 kb upstream, however, orientated in opposite direction relative to the *MLL* gene remnant. All cloned fusion sequences surrounding the breakpoint junctions are depicted in Fig. 2A. Thus, this patient carries only a functional *MLL-AF4* allele, and in addition, an *MLL* remnant consisting of *MLL* exons 12-37 which can be transcribed by the recently identified gene internal promoter of the *MLL* gene (Scharf, 2007). The promoter resides shortly upstream of *MLL* exon 12 and leads to a transcript that can be translated from a *bona fide* AUG start codon within *MLL* exon 18. The resulting MLL* protein has a molecular weight of about 230 KDa, is processed by Taspase1 and is expressed as protein displaying the following domain structure: a BD-, PHD4-, FYRN-domain, CREBBP-binding site, MOF-binding site, FYRC- and SET-domain. The molecular analysis revealed one additional derivative chromosome, der(22), that was not priory identified by conventional cytogenetic analysis.

3.2. Patient 2

Patient P2 (male) was diagnosed with B ALL at the age of 13 months. Conventional cytogenetic analysis revealed the karyotype 46,XY,del(10)(p12),t(11;22)(q23;q?)[17]/46,XY[3]. FISH analysis confirmed a break in the *MLL* gene.

Sequence analysis following LDI-PCR showed that the complex rearrangements detected by conventional cytogenetic was a rearrangement within three fusion sequences involving the loci 9p22, 11q23 and 22q13.3 (Fig. 1B). The resulting derivative chromosomes, der(9), der(11) and der(22), displayed the following situation: (a) der(9) is characterized by a 9p22::22q13.3-ter junction that encodes *AF9* exon 1-4 fused with the 3′-UTR of the *CYP2DP1* gene (located about 35 kb downstream and orientated in opposite direction); (b) der(11) represents a typical der(11) chromosome that carries at the breakpoint junction a fusion between *MLL* exons 1-9 and *AF9* exons 5-20; (c) der(22) was again truncated at 22q13.3 and fused to *MLL* exons 10-37. At the 22q13.3 fusion site we found the *NDUFA6* gene about 2 kb upstream, however, orientated in opposite direction relative to the *MLL* gene remnant. All cloned fusion sequences surrounding the breakpoint junctions are depicted in Fig. 2B. Again, this patient carries only a functional *MLL-AF9* allele, and in addition, an *MLL* gene remnant able to produce the 230 KDa MLL* protein. The molecular analysis revealed one additional derivative chromosome, der(9), that was not identified by conventional cytogenetic analysis.

3.3. Patient 3

Patient P3 (male) was diagnosed with ALL at the age of 4 months. Conventional cytogenetic analysis revealed the karyotype 47,XY,+X,t(9;11;17)(p22;q23;p?)[21]/46,XY[2]. FISH analysis confirmed a break in the *MLL* gene. The results obtained by LDI-PCR characterized the complex rearrangements as a rearrangement within three fusion sequences involving the loci 9p22, 11q23 and 17p13.3 (Fig. 1C). The resulting derivative chromosomes, der(9), der(11) and der(17), displayed the following situation: (a) der(9) is characterized by a 9p22::17p13.3-ter junction that encodes *AF9* exons 1-5 that are fused out-of-frame with *PITPNA* exon 5 (phosphatidylinositol transfer protein, alpha); (b) der(11) represents a typical der(11) chromosome that carries at the breakpoint junction a fusion between *MLL* exons 1-9 and *AF9* exons 6-20; and (c) der(17) carries the fusion between at *PITPNA* exon 1-4 and *MLL* exons 10-37. This fusion is *per se* out-of-frame, however, if splicing would occur between *PITPNA* exon 3 and *MLL* exon 10, then a functional fusion protein could be translated. Unfortunately, we had no RNA of this patient to validate the splicing over this gene junction. Nevertheless, even if no functional gene fusion exists, still the remnant *MLL* gene will be able to produce the MLL* protein. All cloned fusion sequences surrounding the breakpoint junctions are depicted in Fig. 2C.

3.4. Patient 4

Patient P4 (male) was diagnosed with ALL at the age of 3 months. Conventional cytogenetic analysis revealed the karyo-

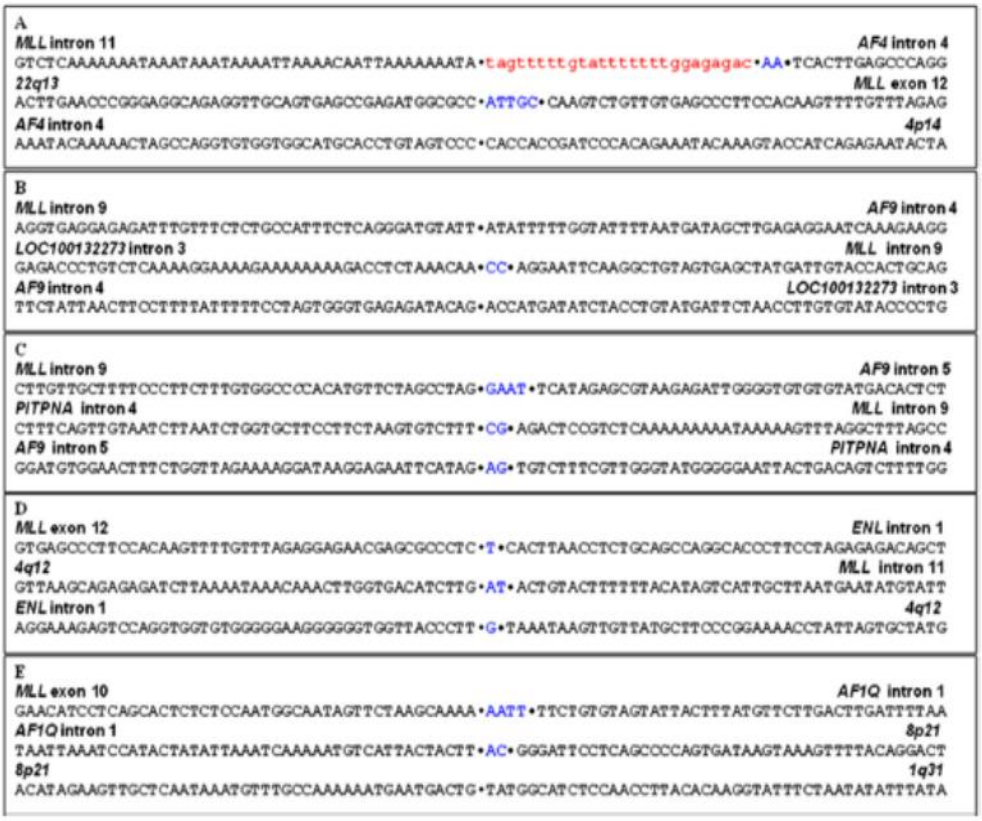


Fig. 2. Genomic breakpoint analysis of the complex *MLL* rearrangement. A. LDI-PCR analysis of patient P1. The sequences of the *MLL-AF4*, *22q13-MLL* and *AF4–4p14* fusion breakpoints, respectively. B. LDI-PCR analysis of patient P2. The sequences of *MLL-AF9*, *LOC100132273-MLL* and *AF9-LOC100132273* fusion breakpoints, respectively. C. LDI-PCR analysis of patient P3. The sequences of *MLL-AF9*, *PITPNA-MLL* and *AF9-PITPNA* fusion breakpoints, respectively. D. LDI-PCR analysis of patient P4. The sequences of *MLL-ENL*, *4p12-MLL* and *ENL-4p12* fusion breakpoints, respectively. E. LDI-PCR analysis of patient P5. The sequences of *MLL-AF1Q*, *AF1Q-8p21* and *8p21–1q31* fusion breakpoints, respectively. All fusions are separated by small dots. Letters in blue represent so-called "mini direct repeats" (MDR) that may be generated by the NHEJ-mediated DNA repair mechanism; letters in red represent a short inversion of a small DNA fragment. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

type 47,XY,-4,del(11)(q23),+2mar[18]/46,XY[2]. FISH analysis confirmed a break in the *MLL* gene. Sequence analysis following LDI-PCR showed that the complex rearrangements detected by conventional cytogenetic was a rearrangement within three fusion sequences involving the loci 4q12, 11q23 and 19p13.3 (Fig. 1D). The resulting derivative chromosomes, der(4), der(11) and der(19), displayed the following situation: (a) der(4) is characterized by a 4q12::11q23-ter junction that encodes only an *MLL* gene remnant (*MLL* exons 12-37). The next gene upstream is the *IGFBP7* gene, located about 1.1 Mb to the centromer in the opposite orientation. Thus, only the MLL" protein can be encoded by this der(4) chromosome; (b) der(11) represents a typical der(11) chromosome that carries at the breakpoint junction a fusion between *MLL* exons 1-11 and *ENL* exons 2-12; and (c) der(19) is characterized by a 4q12::19p13.3 junction that encodes *ENL* exon 1. The next gene located in the fused chromosome 4 sequence is the *LPHN3* gene that is localized at a distance of about 3.2 Mb. All cloned fusion sequences surrounding the breakpoint junctions are depicted in Fig. 2D.

3.5. Patient 5

Patient P5 (male) was diagnosed with AML at the age of 22 months. Conventional cytogenetic analysis revealed the karyotype 46,XY,t(1;8;11)(q21;p21;q23)[25]/46,XY[5]. Using a multicolour-banding (MCB) approach the karyotype was revalidated and changed into 46,XY,der(1)t(1;8)(q21;p21),der(8)t(1;8)(q31;p21),der(11)ins(11;1) (q23;q21q31) [17]. To get more detail and get the exact breakpoint LDI-PCR analyses was performed and complex translocation involving the loci 1q21, 1q31, 8p21 and 11q23 (Fig. 1E) was detected. The resulting derivative chromosomes, der(1), der(8) and der(11), displayed the following situation: (a) der(1) is characterized by a 1q21::8p21-ter junction that encodes only *AF1Q* exon 1 fused to the *SLC18A1* gene that is located 160 kb further downstream; (b) der(8) was truncated at 8p21 and displays only two intact genes that are orientated in opposite directions: *KCNT2* within the fused chromosome 1 fragment and *LOC286114* as a *bona fide* chromosome 8p21 gene; and (c) the der(11) represents a non-typical der(11) chromosome as it bears an insertion of chromosome 1q21-1q31 into the *MLL* gene. Thus, two breakpoint junctions are encoded by this der(11) chromosome. The first junction encodes a fusion between *MLL* exons 1-9 and *AF1Q* exons 2, while the second junction should encodes again a remnant *MLL* gene (*MLL* exons 11-37). Unfortunately, we were not able to clone the second junction of der(11) in this patient. All cloned fusion sequences surrounding the breakpoint junctions are depicted in Fig. 2F.

4. Discussion

In the present study we have characterized 5 childhood leukemia patients with complex rearrangements involving the *MLL* gene (Tables 1 and 2). The three-way translocation events re-

Table 2
Cytogenetic and molecular results of 5 patients with complex *MLL* rearrangements.

Patient	Cytogenetic banding	MCB	Identified breakpoints by LDI-PCR
P1	46,XX,t(4;11)(q21;q23),der(5)t(5;7)(q?;q?),der(7)t(5;7)(q?;q?)[18]/46,XX[2]	–	*MLL-AF4* *22q13-MLL* *AF4-4p14* *4p14-22q13*
P2	46,XY,del(10)(p12),t(11;22)(q23;q?)[17]/46,XY[3]	–	*MLL-AF9* *22q13-MLL* *AF9-22q13*
P3	47,XY,+X,t(9;11;17)(p22;q23;p?)[21]/46,XY[2]	–	*MLL-AF9* *PTPNA-MLL* *AF9-PTPNA*
P4	47,XY,-4,del(11)(q23),+2mar[18]/46,XY[2]	–	*MLL-ENL* *4q12-MLL* *ENL-4q12*
P5	46,XY,t(1;8;11)(q21;p21;q23)[25]/46,XY[5]	46,XY, der(1) (1;8) (q21;p21), der(8) t(1;8) (q31;p21), der(11) ins(11;1) (q23;q21q31)	*MLL-AF1Q* *AF1Q-8p21* *8p21-1q31* *1q31-MLL*

sulted in three or four different fusion sites that represent mostly non-functional fusion alleles. Out of 17 break junctions within the 5 investigated patients, 15 have been successfully cloned by applying the LDI-PCR technique established for the *MLL* gene [14]. The common denominator in all cases was the 5′-*MLL* gene (exons 1-9/10/11) fused in-frame to *AF4*, *AF9* (2x), *ENL* or *AF1Q*. In addition, 4 out of 5 patients should be *per se* able to express the MLL* protein that has been recently identified [18]. Briefly, a gene-internal promoter is located upstream of *MLL* exon 12, allowing to produce a transcript that displays a few nucleotides of *MLL* intron 11 and exhibits all coding sequences deriving from *MLL* exon 12-37. A *bona fide* start codon within *MLL* exon 18 is then used to produce the MLL* protein (230 KDa) which is processed by Taspase1 [19] into a p97 and p180 protein fragment and able to heterodimerize via the FYRN and FYRC domain [20].

That the remnant *MLL* gene is really conserved is best explainable by patient P4. This patient displayed a breakpoint within the *MLL* gene that was located at nucleotide 67 of *MLL* exon 12 on the der(11) chromosome. Thus, this recombination site uncoupled the gene internal promoter from the remaining *MLL* exons 12-37. However, the analysis of the corresponding der(4) chromosome displayed a duplication of 226 bp, resulting in a fusion of chromosome 4q12 sequences to *MLL* intron 11 sequences and a perfectly intact *MLL* exon 12. Thus, the cryptic gene-internal promoter of *MLL*, located shortly upstream of *MLL* exon 12, and *MLL* exon 12 were restored by the small duplication. This allows the production of the gene-internal *MLL* transcript and the expression of the MLL* protein.

The second important result of our study is the fact that the LDI-PCR experiments were able to rapidly unravel most of the gene fusions located on the derivative chromosomes that were not necessarily detected by conventional cytogenetic. As a matter of fact, small insertions or inversions – as observed for patients P1 and P5 – are sometimes very hard to identify by chromosome banding techniques. Thus, LDI-PCR seems to be a cost-effective, timely and complementary method to refine diagnostic data obtained by conventional cytogenetic analyses.

In summary, the precise identification of *MLL* rearrangements in patients with 11q23 abnormalities provides important molecular knowledge for basic research but also prognostic information for clinicians. Recent studies have shown that the prognosis of 11q23/*MLL* leukemia patients depends on the *MLL* fusion partner and the prognosis of acute leukemia with *MLL* rearrangements according to the fusion partner is different between adults and children [13,21,22]. Depending on the translocation partner the outcome of the patients varied significantly. Furthermore, patients with *MLL* rearrangements and displaying additional chromosomal abnormalities, including three-way translocations, could have a poor outcome compared to patients that do not have additional chromosomal abnormalities [23].

Therefore, the need for screening the specific translocation partner becomes extremely important to allow appropriate treatment stratification. For this type of diagnosis, cytogenetic has become a key element in cancer research. Common gene fusions resulting from chromosomal rearrangements are easily identified with conventional cytogenetic techniques. However, some alterations were too small to be seen by conventional techniques and became difficult to be diagnosed (see above). This is mainly true if small chromosome fragments are inserted into other chromosomes.

In conclusion, combining different available technologies is presumably important to refine the detection of all chromosomal abnormalities in a given patient. Using a combination of cytogenetic techniques and molecular methods, such as LDI-PCR and sequencing analysis, we were able to identify all *MLL*-associated rearrangements in the biopsy material of acute leukemia patient. This impacts not only the diagnostic situation of these patients but may also influence their prognosis. Finally, all the established fusion sequences can be used for prospective MRD studies. Fusion sequences – in contrast to IgH or TCR rearranged alleles – are stable markers that should not be lost during therapy because they encode the driving oncoproteins. To this end, the analysis of fusion sites is of great value – for the scientists and, finally, for the patients.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was financial supported by CNPq, FINEP, CAPES/DAAD, Pró-Vita and FAPERJ. This work was also supported by a Grant from the German Pediatric Cancer Foundation (DKS-2011.09) to RM.

References

[1] J. Wiemels, Perspectives on the causes of childhood leukemia, Chem. Biol. Interact. 196 (2012) 59–67.

[2] D. Grimwade, H. Walker, F. Oliver, K. Wheatley, C. Harrison, G. Harrison, J. Rees, I. Hann, R. Stevens, A. Burnett, A. Goldstone, The importance of diagnostic cytogenetic on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial, The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties, Blood 92 (1998) 2322–2333.
[3] M.W. Jansen, L. Corral, V.H. van der Velden, R. Panzer-Grümayer, M. Schrappe, A. Schrauder, R. Marschalek, C. Meyer, M.L. den Boer, W.J. Hop, M.G. Valsecchi, G. Basso, A. Biondi, R. Pieters, J.J. van Dongen, Immunobiological diversity in infant acute lymphoblastic leukemia is related to the occurrence and type of MLL gene rearrangement, Leukemia 21 (2007) 633–641.
[4] H.J. Super, N.R. McCabe, M.J. Thirman, R.A. Larson, M.M. Le Beau, J. Pedersen-Bjergaard, P. Philip, M.O. Diaz, J.D. Rowley, Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II, Blood 82 (1993) 3705–3711.
[5] C. Meyer, E. Kowarz, J. Hofmann, A. Renneville, J. Zuna, J. Trka, R. Ben Abdelali, E. Macintyre, E. De Braekeleer, M. De Braekeleer, E. Delabesse, M.P. de Oliveira, H. Cavé, E. Clappier, J.J. van Dongen, B.V. Balgobind, M.M. van den Heuvel-Eibrink, H.B. Beverloo, R. Panzer-Grümayer, A. Teigler-Schlegel, J. Harbott, E. Kjeldsen, S. Schnittger, U. Koehl, B. Gruhn, O. Heidenreich, L.C. Chan, S.F. Yip, M. Krzywinski, C. Eckert, A. Möricke, M. Schrappe, C.N. Alonso, B.W. Schäfer, J. Krauter, D.A. Lee, U. Zur Stadt, G. Te Kronnie, R. Sutton, S. Izraeli, L. Trakhtenbrot, L. Lo Nigro, G. Tsaur, L. Fechina, T. Szczepanski, S. Strehl, D. Ilencikova, M. Molkentin, T. Burmeister, T. Dingermann, T. Klingebiel, R. Marschalek, New insights to the MLL recombinome of acute leukemias, Leukemia 23 (2009) 1490–1499.
[6] I. Nilson, K. Löchner, G. Siegler, J. Greil, J.D. Beck, G.H. Fey, R. Marschalek, The exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukemias, Brit. J. Haemotol. 93 (1996) 966–972.
[7] B.V. Balgobind, C.M. Zwaan, C. Meyer, R. Marschalek, R. Pieters, H.B. Beverloo, M.M. Van den Heuvel-Eibrink, NRIP3: a novel translocation partner of MLL detected in a pediatric acute myeloid leukemia with complex chromosome 11 rearrangements, Haematologica 94 (2009) 1033.
[8] S.Y. Cho, T.S. Park, S.H. Oh, E.H. Cho, D. Oh, J.Y. Huh, R. Marschalek, C. Meyer, Genomic analysis of a four-way t(4;11;22;10) associated with MLL-AF4 in an adult acute lymphoblastic leukemia, Ann. Hematol. 91 (2012) 977–979.
[9] S.G. Lee, T.S. Park, S.C. Won, J. Song, K.A. Lee, J.R. Choi, R. Marschalek, C. Meyer, Three-way translocation involving MLL, MLLT1, and a novel third partner, NRXN1, in a patient with acute lymphoblastic leukemia and t(2;19;11)(p12;p13.3;q23), Cancer Genet. Cytogen. 197 (2010) 32–38.
[10] C. Meyer, E. Kowarz, S.F. Yip, T.S. Wan, T.K. Chan, T. Dingermann, L.C. Chan, R. Marschalek, A complex MLL rearrangement identified 5 years after initial MDS diagnosis results in out-of-frame fusions without progression to acute leukemia, Cancer Genet. 204 (2011) 557–562.
[11] E. De Braekeleer, C. Meyer, N. Douet-Guilbert, F. Morel, M.J. Le Bris, C. Berthou, B. Arnaud, R. Marschalek, C. Férec, M. De Braekeleer, Complex and cryptic chromosomal rearrangements involving the MLL gene in acute leukemia: a study of 7 patients and review of the literature, Blood Cells Mol Dis, 44 (2010) 268–274. Review.
[12] E. Kowarz, T. Burmeister, L. Lo Nigro, M.W. Jansen, E. Delabesse, T. Klingebiel, T. Dingermann, C. Meyer, R. Marschalek, Complex MLL rearrangements in t(4;11) leukemia patients with absent AF4.MLL fusion allele, Leukemia 21 (2007) 1232–1238.
[13] B.V. Balgobind, S.C. Raimondi, J. Harbott, M. Zimmermann, T.A. Alonzo, A. Auvrignon, H.B. Beverloo, M. Chang, U. Creutzig, M.N. Dworzak, E. Forestier, B. Gibson, H. Hasle, C.J. Harrison, N.A. Heerema, G.J. Kaspers, A. Leszl, N. Litvinko, L.L. Nigro, A. Morimoto, C. Perot, R. Pieters, D. Reinhardt, J.E. Rubnitz, F.O. Smith, J. Stary, I. Stasevich, S. Strehl, T. Taga, D. Tomizawa, D. Webb, Z. Zemanova, C.M. Zwaan, M.M. van den Heuvel-Eibrink, Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study, Blood 114 (2009) 2489–2496.
[14] C. Meyer, B. Schneider, M. Reichel, S. Angermueller, S. Strehl, S. Schnittger, C. Schoch, M.W. Jansen, J.J. van Dongen, R. Pieters, O.A. Haas, T. Dingermann, T. Klingebiel, R. Marschalek, Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 449–454.
[15] M. van der Burg, H.B. Beverloo, A.W. Langerak, J. Wijsman, E. van Drunen, R. Slater, J.J. van Dongen, Rapid and sensitive detection of all types of MLL gene translocations with a single FISH probe set, Leukemia 13 (1999) 2107–2113.
[16] A.R. Brothman, D.L. Persons, L.G. Shaffer, Nomenclature evolution: changes in the ISCN from the 2005 to the 2009 edition, Cytogenet. Genome Res. 127 (2009) (2005) 1–4.
[17] A.F. de Figueiredo, T. Liehr, S. Bath, R. Binato, E.M. Ventura, M.T. de Souza, R.R. de Matos, R.C. Ribeiro, E. Abdelhay, M.L. Silva, A new cryptic ins(11;1)(q23;q21q31) detected in a t(1;8;11)(q21;p21;q23) in a baby with acute myeloid leukemia FAB AML-M5, Blood Cells Mol. Dis. 45 (2010) 197–198.
[18] S. Scharf, J. Zech, A. Bursen, D. Schraets, P.L. Oliver, S. Kliem, E. Pfitzner, E. Gillert, T. Dingermann, R. Marschalek, Transcription links to recombination: a gene-internal promoter coincides with the recombination hotspot II of the human MLL gene, Oncogene 26 (2007) 1361–1371.
[19] J.J. Hsieh, E.H. Cheng, S.J. Korsmeyer, Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression, Cell 115 (2003) 293–303.
[20] B. Pless, C. Oehm, S. Knauer, R.H. Stauber, T. Dingermann, R. Marschalek, The heterodimerization domains of MLL-FYRN and FYRC–are potential target structures in t(4;11) leukemia, Leukemia 25 (2011) 663–670.
[21] H. Tamai, K. Inokuchi, 11q23/MLL acute leukemia : update of clinical aspects, J Clin Exp Hematop, 50 (2010) 91–98. Review.
[22] E.A. Coenen, S.C. Raimondi, J. Harbott, M. Zimmermann, T.A. Alonzo, A. Auvrignon, H.B. Beverloo, M. Chang, U. Creutzig, M.N. Dworzak, E. Forestier, B. Gibson, H. Hasle, C.J. Harrison, N.A. Heerema, G.J. Kaspers, A. Leszl, N. Litvinko, L. Lo Nigro, A. Morimoto, C. Perot, D. Reinhardt, J.E. Rubnitz, F.O. Smith, J. Stary, I. Stasevich, S. Strehl, T. Taga, D. Tomizawa, D. Webb, Z. Zemanova, R. Pieters, C.M. Zwaan, M.M. van den Heuvel-Eibrink, Prognostic significance of additional cytogenetic aberrations in 733 de novo pediatric 11q23/MLL-rearranged AML patients: results of an international study, Blood 117 (2011) 7102–7111.
[23] H. Tauchi, D. Tomizawa, M. Eguchi, M. Eguchi-Ishimae, K. Koh, M. Hirayama, N. Miyamura, N. Kinukawa, Y. Hayashi, K. Horibe, E. Ishii, Clinical features and outcome of MLL gene rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants with additional chromosomal abnormalities other than 11q23 translocation, Leukemia Res. 32 (2008) 1523–1529.

Case Report

Overexpression of the *MLL* Gene Combined With 11q Trisomy in a Child With Acute Lymphoblastic Leukemia

Daniela Ribeiro Ney Garcia,[1,2] Amanda Faria de Figueiredo,[2,3] André Luiz Mencalha,[4] Roberto Rodrigues Capela de Matos,[2,3] Fábia Neves,[5] Raul Correa Ribeiro,[6] Marcelo Gerardin Poirot Land,[1,7] Maria Luiza Macedo Silva[1,2,3]

Clinical Practice Points

- Leukemias bearing translocations involving the mixed-lineage leukemia (*MLL*) gene are of particular interest because of their unique clinical and biological characteristics. *MLL* has more than 70 fusion partner genes.
- However, translocations are not the only mechanisms by which *MLL* participates in leukemogenesis. *MLL* overexpression has been implicated in approximately 1% of adult cases of acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and is associated with poor prognosis.
- Although *MLL* translocations have been extensively studied, little is known about *MLL* overexpression in pediatric acute lymphoblastic leukemia.
- In the presented case, the overexpression of *MLL*, resulting from an unbalanced 11q translocation, corroborates to the concept that *MLL* gain-of-function might contribute to leukemic transformation of childhood B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia.

Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia, Vol. ■, No. ■, ■-■ © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.
Keywords: Childhood acute lymphoblastic leukemia, FISH, *MLL* gene, Molecular cytogenetics, RT-PCR

Introduction

Leukemias bearing translocations involving chromosome region 11q23 are of particular interest because of their unique clinical and biological characteristics.[1] This recurrent chromosomal translocation group is found in childhood acute myeloid (18%) and lymphoid (8%) leukemias.[2,3] The translocation juxtaposes the *MLL*, which encodes a large multidomain protein ubiquitously expressed in hematopoietic cells including stem cell and progenitor populations[3] with several genes resulting in overexpression of MLL.

Chromosomal translocations, however, are not the only mechanisms by which *MLL* induces leukemic transformation. Other chromosomal changes could result in MLL overexpression, such as amplification and extra copies of *MLL*. Although *MLL*-associated translocations have been extensively characterized, little is known about the implication of *MLL* extra copies (11q trisomy) in childhood leukemias.[1,4] This abnormality has been described in approximately 1% of adult cases of acute myeloid leukemia (AML)/myelodysplastic syndrome (MDS), but is rarely observed in pediatric AML. It is associated with an internal tandem duplication of the *MLL* gene (or amplification of the genomic region encompassing *MLL*, and it is also highly associated with a poor prognosis, similar to cases with *MLL* rearrangement).[5-7]

Here, we present a case of de novo B-cell progenitor (BCP) childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) with an 11q extra copy that originated from an unbalanced translocation resulting in an overexpression of the *MLL* gene.

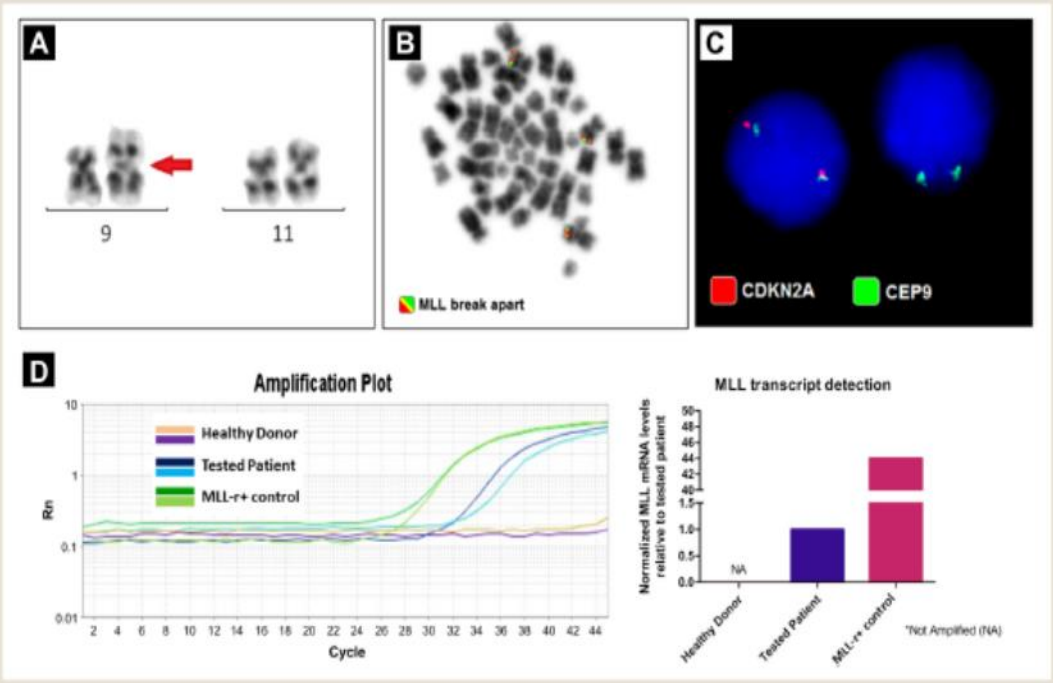
[1]Clinical Medicine Post Graduation's Program – Medicine College, Rio de Janeiro's Federal University (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil
[2]Cytogenetics Department, Bone Marrow Transplantation Unit (CEMO), National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil
[3]Post Graduation's Oncology Program – National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil
[4]Biophysics and Biometry Department, Roberto Alcântara Gomes Biology Institute, Rio de Janeiro's State University (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil
[5]Oncology Service, Santa Casa de Misericórdia de Itabuna, Bahia, Brazil
[6]Department of Oncology and International Outreach Program, St Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN
[7]Martagão Gesteira Institute of Pediatrics and Child Development, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Submitted: Jul 16, 2013; Revised: Oct 18, 2013; Accepted: Oct 21, 2013

Address for correspondence: Maria Luiza Macedo Silva, PhD, Praça da Cruz Vermelha 23, 6th floor, Rio de Janeiro, 20230-130, Brazil
E-mail contact: luizamacedo@inca.gov.br

2152-2650/$ - see frontmatter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.clml.2013.10.008

Figure 1 Patient's Cytogenetics and Molecular Results: (A) G-Banding of Partial Karyotype Showing der(9;11)(p11;q11). (B) FISH Analysis Showing 3 Copies of the *MLL* Gene, Using an MLL Break-Apart Probe. (C) Interphase FISH Showing Homozygous Deletion of the *CDKN2A* Gene, Using a *CDKN2A*/CEP9 Probe. (D) Amplification Plot Data (left) and Relative Expression Quantification (right) of MLL Transcript Levels From a Healthy Donor, the Tested Patient, and the MLL-r+ Control (a Patient Known to Have the *MLL* Gene Translocation). Images Were Acquired Using an ABI 7500 Real-Time Polymerase Chain Reaction System and Software and GraphPad Prism v.5



Abbreviation: FISH = fluorescence in situ hybridization.

Case Report

A 13-year-old girl presented to the local hospital with a week-long history of generalized pain, fever, ecchymosis, and difficulty breathing. Physical examination revealed hepatosplenomegaly (liver was palpable 8 cm from the right costal margin and spleen at 12 cm from the left costal margin). The complete blood count showed a hemoglobin level of 6 g/dL and a white blood cell count of 43 × 10^9/L with 85% abnormal lymphoid cells. The platelet count was 9 × 10^9/L, and lactate dehydrogenate was 3269 U/L. Flow cytometry analysis of the peripheral blood revealed lymphoblasts that expressed CD19, CD10, CD20, CD22, CD34, CD38, CD79a, cIgM (cytoplamatic Imunoglobulin heavy chain M), TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase), and HLA-DR (human leukocyte antigen class II), findings compatible with pre-BCP–ALL. The patient was treated according to the high-risk arm of the Brazilian ALL 99 protocol.[8] She achieved complete remission on day 28 of treatment and has been in continuous complete remission for 10 months.

G-banding studies revealed the karyotype 46,XX, der(9;11)(p11;q11) in 10 of 20 metaphases analyzed (Fig. 1A). Further, fluorescence in situ hybridization (FISH) analyses using the *MLL* break-apart probe did not find a split signal pattern for *MLL*, but the analyses revealed 3 signals of the *MLL* gene, at the 2 normal 11 chromosomes and 1 signal at the der(9;11) in 60% of 210 analyzed cells (Fig. 1B), a finding compatible with a trisomy of the *MLL*. To confirm the presence of der(9;11)(p11;q11) we performed FISH analyses using cyclin dependent kinase 2a gene (*CDKN2A*)/chromosome 9 centromeric region (CEP9). These analyses revealed that 60% of cells had a homozygous deletion of the *CDKN2A* gene; also, the presence of 2 CEP9 signals showed that the centromeric region was not involved (Fig. 1C). The FISH analyses for breakpoint cluster region (*BCR*)/v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 (*ABL1*) and ETS variant gene 6 (*ETV6*)/runt-related transcription factor 1 (*RUNX1*) fusions and *E2A* (immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47) rearrangement were negative. The *MLL* gene transcript was expressed 45-fold in the *MLL-r+* control (a patient known to have the *MLL* gene translocation) compared with the tested patient, and was not detected in a healthy donor (Fig. 1D).

Discussion

Although 11q23-related rearrangements have been extensively studied, the prognostic implication of *MLL* extra copies and trisomy 11 in pediatric leukemia is less understood, because of its rarity.[1,4] The overexpression of *MLL* in both of these cytogenetic abnormalities seems to play an important role in the development of

hematological malignancies as a gain-of-function mutation.[7] Moreover, this overexpression seems to have a bad prognostic meaning in AML and MDS.[5,9]

In addition to the *MLL* trisomy, our patient showed a homozygous deletion of the *CDKN2A* gene. This very common abnormality is found in more than 60% of pediatric T-cell lineage ALL cases and 20% to 30% of pediatric BCP-ALL cases, but its prognostic significance remains unclear.[10]

Conclusion

To our knowledge, this is the first pediatric BCP-ALL case with MLL overexpression caused by 11q trisomy to be described. Additional cases with this molecular and cytogenetic profile are required to determine the prognostic implication of this gain-of-function mutation in pediatric ALL.

Acknowledgments

The authors acknowledge with gratitude Dr Eliana Saul Furkin Abdelhay, and Dr Tarsis Paiva Vieira. This work was supported by the Pro-Vita nonprofit organization, CNPq (project no. 473878/2011-9), and FAPERJ (project no. E26/110.868/2013), the International Outreach Program, the American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC), St Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN), and a Center of Excellence Grant, from the state of Tennessee.

Disclosure

The authors have stated that they have no conflicts of interest.

References

1. Daser A, Rabbitts TH. Extending the repertoire of the mixed-lineage leukemia gene MLL in leukemogenesis. *Genes Dev* 2004; 18(suppl 9):965-74.
2. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011; 29(suppl 5): 551-65.
3. Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(suppl 11):823-33.
4. Bernt KM, Armstrong SA. Targeting epigenetic programs in MLL-rearranged leukemias. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011:354-60.
5. Jadhav M, Cushing B, Ondemir O, Mohamed A, Ravindranath Y, Savasan S. Clonal trisomy 11 in a child with acute leukemia: G banding vs. FISH. *Med Pediatr Oncol* 2001; 37(suppl 5):475-6.
6. Alseraye FM, Zuo Z, Bueso-Ramos C, et al. Trisomy 11 as an isolated abnormality in acute myeloid leukemia is associated with unfavorable prognosis but not with an NPM1 or KIT mutation. *Int J Clin Exp Pathol* 2011; 4(suppl 4):371-7.
7. Radke F, Cole C, Walker A, et al. Therapy-related pro-B cell acute lymphoblastic leukemia: report of two patients with MLL amplification. *Cancer Genet* 2012; 205(suppl 12):653-6.
8. Perondi BM, Gualano B, Artioli GG, et al. Effects of a combined aerobic and strength training program in youth patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Sports Sci Med* 2012; 11:387-92.
9. Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, et al. Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia* 2000; 14(suppl 5):796-804.
10. Szczepański T, Harrison CJ, van Dongen JJ. Genetic aberrations in paediatric acute leukaemias and implications for management of patients. *Lancet Oncol* 2010; 11(suppl 9):880-9.

8.5.3. Publicação em 2014

ARTICLE IN PRESS

YBCMD-01789; No. of pages: 3; 4C: 2

Blood Cells, Molecules and Diseases xxx (2014) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Blood Cells, Molecules and Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bcmd

Letter to the Editor

A yet unreported der(11)t(6;11)(p21;q21) included in a complex karyotype of a refractory anemia with ring sideroblasts and poor prognosis

Refractory anemia with ring sideroblasts (RARS) is a subtype of myelodysplastic syndrome (MDS) [1]. RARS is associated with a relatively good prognosis; cytopenias are generally slow progressing and only 15% of the cases progress to acute leukemia. Cytogenetically, RARS is characterized mainly by isolated chromosomal abnormalities, and complex karyotypes are rare [1,2]. Here, we describe a yet unreported der(11)t(6;11)(p21;q21) in a 64-year-old man showing a complex karyotype and presenting with RARS; this complex karyotype was associated with a poor prognosis. Physical examination showed normal cardiorespiratory function and the absence of adeno visceromegalies. A blood count revealed anemia (hemoglobin 9.1 g/dl), thrombocytopenia (platelets 21×10^9/l), white blood cells 8.9×10^9/l and 4% blast cells. Myelogram analysis showed an intense hypercellular pattern, hyperplasia, intense dyserythropoiesis and more than 90% ring sideroblasts. The diagnosis was MDS-RARS. The patient had a very poor outcome, evolving rapidly to acute myeloid leukemia (AML) followed by death one month later. Cytogenetic banding analysis showed a complex karyotype: 42,XY,-6,add(11)(q25),add(13)(p11),dic(15;21)(q10;q10), -17,-18,-21[7]/42,XY,del(3)(p21),-6, add(11)(q25),add(13)(p11), dic(15;21)(q10;q10),-17,-18,-21[2]/46,XY[2] (Fig. 1A). Fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed using whole chromosome painting (WCP) probes for chromosomes 3, 6, 11, 13, 15, 17, 18 and 21 and partial chromosome painting (PCP) probes for 6q, 6p, 3p and 3q. FISH was also performed to investigate alterations in the mixed lineage leukemia (*MLL*) gene and in the ataxia telangiectasia mutated (*ATM*) genes. Multicolor banding (MCB) was performed for chromosomes 6, 11, 13, 15, 17 and 21, as previously reported [3]. Overall, the molecular cytogenetic analysis characterized the complex chromosomal alterations as follows: add(11)(q25) is a der(11)t(6;11)(11pter →11q21::6p12→6p21.3::6q12–6qter), add(13)(p11) is a dic(13;17) (17pter→17q25::13p11→13qter), del(3)(p21) could be redefined as der(3)(:p25→p21::p11→q11::q25→qter) and a part of chromosome 3 was involved in a more complex rearrangement with chromosome 17 as dic(3;17)(17qter→17p11.2::3p25→3p21::3p11→3q11::3q25 →3qter) dic(15;21) could be redefined as dic(15;21)(p11.2;p11.2).

Patients with RARS represent 25% of all MDS cases in adult patients. The types of chromosomal abnormalities in RARS have been previously reported to be +8, −7, 20q- and −5 [1]. The patient in this study had a very complex karyotype that has not yet been described in MDS. We used the advanced Multicolor Banding (MCB) methodology to characterize the chromosomal abnormalities and the breakpoints of these rearrangements. It was possible to observe that chromosome 11 had lost a part of its long arm (11q22–25) and the additional band belonged to chromosome 6 (Fig. 1B). In this chromosomal rearrangement, almost all of chromosome 6 was translocated to 11q. Chromosome 6 was broken in region p21.3 to q12 and lost the 6p22–23 region. Interestingly, chromosome 6 lost its centromere, most likely during the translocation. However, the mechanism, which resulted in the lost centromere, needs to be studied more thoroughly in a future investigation. Subsequently, there was a junction of the two arms of chromosome 6, which was followed by the translocation to chromosome 11. Identification of this complex rearrangement was only possible by the use of the MCB methodology. This was the main chromosomal alteration in this case and was present in all cells during the karyotypic evolution.

Our case involved the short arm of chromosome 6. The region 6p22–23 contains the chromatin remodeling factor DEK [4]. DEK was originally discovered as the target of a chromosomal translocation event t(6;9)(p23;q34) in AML cases [5]. This chromosomal abnormality was associated with a poor prognosis. Khodadoust and colleagues demonstrated that DEK had effects on mRNA splicing, transcriptional control, DNA damage repair, differentiation, cell viability and cell-to-cell signaling [4]. In contrast to reports in the literature, our patient most likely lost this gene, resulting in the inability to control several important pathways that repress leukemic progression. FISH was used to investigate the chromosome 11 rearrangement. We analyzed the loss of the *MLL* and *ATM* genes that are located in 11q (Figs. 1C and D). The *MLL* gene encodes a protein that is involved in chromatin remodeling and positively regulates multiple homeobox transcription factors. The *MLL* locus is involved in more than 60 different rearrangements in human leukemias [6]. However, in our case, this gene was not rearranged, but rather it was lost during translocation. *ATM* is an important gene located on 11q22. It encodes a serine/threonine protein kinase that is a critical enzyme in the regulation of the stress response to DNA damage, especially double strand DNA breaks [7]. In our patient, the loss of this gene most likely contributed to defects in chromatin remodeling and DNA damage control. Additionally, the involvement of the short arm of chromosome 17 was important in this case. We observed two different alterations with this chromosome; the first was a dic(13;17)(p11;p11) (Fig. 1E), and during their karyotypic evolution, the cells acquired a second translocation involving chromosome 17, t(3;17)(p21;p11) (Fig. 1F). The *TP53* gene is considered a tumor suppressor gene that is located on 17p13. The p53 protein is involved in a cell cycle checkpoint and provides a very important check for DNA damage; it also directs defective cells into the apoptosis program. Our patient lost the two alleles of this gene, which further damaged cell cycle control and allowed these cells to escape the apoptosis process. In relation to the rearrangement involving chromosome 3, it is likely that a gene was lost during the progression of the disease that may be important in the control of tumorigenesis. The *FHIT* gene is located on chromosome 3p14, a region encompassing the most active common fragile site in the human genome, the FRA3B locus. The encoded protein, FHIT, is a member of the histidine triad protein (HIT) family. The restoration of FHIT expression in cancer cells that lack it has been shown to induce apoptosis and to suppress tumorigenesis. Based on these and other studies, FHIT has been hypothesized to be a tumor suppressor gene [8]. In summary, our study suggests that many important genes involved in the development of cancer were associated with this case; as expected, this case had a very poor outcome. MCB allowed the characterization of chromosomal regions with a high resolution and provided the ability to identify

1079-9796/$ – see front matter © 2013 Published by Elsevier Inc.
http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.12.006

Please cite this article as: D.C. de Souza, et al., Blood Cells Mol. Diseases (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.12.006

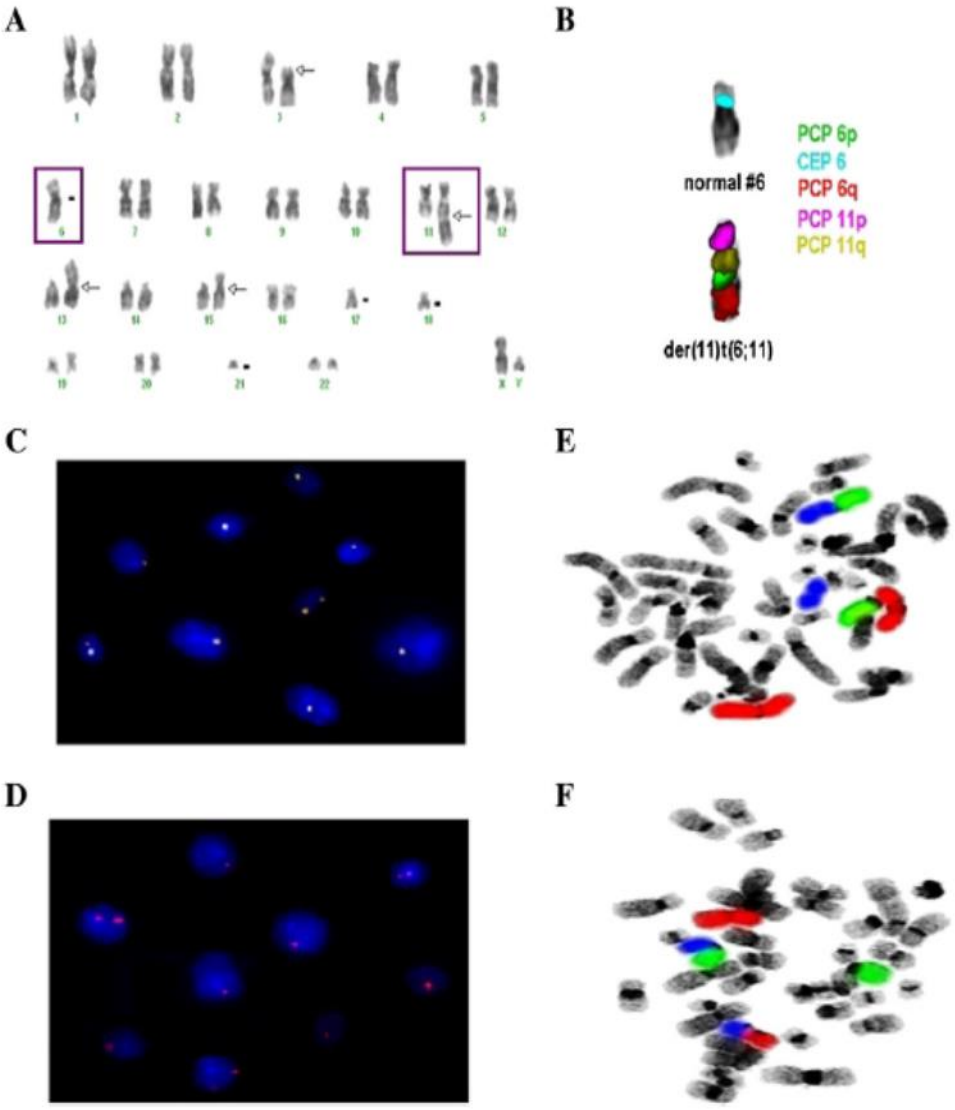


Fig. 1. A: GTG-banding showing a complex karyotype: 42,XY,del(3)(p21),-6,add(11)(q25),add(13)(p11),dic(15;21)(q10;q10),-17,-18,-21. B: FISH for chromosomes 6 and 11: partial chromosome painting (PCP) for 6p (green) and 6q (red) and CEP 6 (blue), PCP 11p (pink) and PCP 11q (yellow) showed that there was a normal chromosome 6 and a der(11)t(6;11). C: FISH analysis using LSI *MLL* Dual Color break apart rearrangement probe showing the loss of one of the alleles of the *MLL* gene. D: FISH using LSI *ATM* (11q22.3) probe showing the loss of one of the alleles of the *ATM* gene. E: FISH of the whole chromosome painting (WCP) probe for chromosome 3 (red), chromosome 13 (green) and chromosome 17 (blue) showing normal chromosome 3 and characterizing the translocation involving chromosome 13 and 17, giving rise to a dicentric chromosome. F: FISH with a whole chromosome painting (WCP) probe for the same chromosomes in E, but in metaphase, the karyotypic evolution could be seen because chromosome 3 acquired an alteration, which was translocated to chromosome 17.

candidate genes involved in the leukemogenic process in MDS-RARS.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian Ministry of Health (National Institute of Cancer/INCA, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro/FAPERJ, Brazil, CNPq, DAAD and Stefan Morsch Stiftung.

References

[1] R. Ohba, K. Furuyama, K. Yoshida, et al., Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS), Ann. Hematol. 92 (2013) 1–9.

[2] W. el-Rifai, T. Pettersson, M.L. Larramendy ML, et al., Lineage involvement and karyotype in a patient with myelodysplasia and blood basophilia, Eur. J. Haematol. 53 (1994) 288–292.

[3] T. Liehr, A. Heller, H. Starke, et al., Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes, Int. J. Mol. Med. 9 (2002) 335–339.

[4] M.S. Khodadoust, M. Verhaegen, F. Kappes, et al., Melanoma proliferation and chemoresistance controlled by the DEK oncogene, Cancer Res. 69 (2009) 6405–6413.

[5] M. von Lindern, S. van Baal, J. Wiegant, et al., Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3′ half to different genes: characterization of the set gene, Mol. Cell. Biol. 12 (1992) 3346–3355.

[6] N. Cerveira, S. Bizarro, M.R. Teixeira, *MLL*-SEPTIN gene fusions in hematological malignancies, Biol. Chem. 392 (2011) 713–724.

[7] N. Stern, A. Hochman, N. Zemach, et al., Accumulation of DNA damage and reduced levels of nicotine adenine dinucleotide in the brains of Atm-deficient mice, J. Biol. Chem. 277 (2002) 602–608.

[8] R.W. Stam, M.L. den Boer, M.M.C.J. Passier, et al., Silencing of the tumor suppressor gene FHIT is highly characteristic for MLL gene rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, Leukemia 20 (2006) 264–271.

Please cite this article as: D.C. de Souza, et al., Blood Cells Mol. Diseases (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.12.006

ARTICLE IN PRESS

Daiane Correa de Souza
Amanda Faria de Figueiredo
Cytogenetic Department, Bone Marrow Unit, National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil
Post Graduation Program in Oncology, National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

Hasmik Mkrtchyan
Moneeb A.K. Othman
Thomas Liehr
Jena University Hospital, Institute of Human Genetics, Jena, Germany

Jane Dobbin
Hematology Department, National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

Maria Luiza Macedo Silva
Eliana Abdelhay
Teresa de Souza Fernandez *
Cytogenetic Department, Bone Marrow Unit, National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil
Post Graduation Program in Oncology, National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil
* Corresponding author at: Instituto Nacional de Câncer (INCA), Centro de Transplante de Medula Óssea, Laboratório de Citogenética, Praça Cruz Vermelha n° 23, 6° Andar, Centro, Rio de Janeiro, RJ CEP: 20230-130, Brazil. Fax: +55 21 3207-1865.
E-mail address: teresafernandez@inca.gov.br(T. de Souza Fernandez).

6 September 2013
Available online xxxx

Tabela 8.1- Dados citogenéticos e clínicos do diagnóstico dos 52 pacientes analisados para o perfil de expressão dos genes PcG estudados

Paciente	Idade	Subtipo	Citogenética	Leucometria/uL	Plaquetas/uL
1	10 anos	LMA-M1	46, XY, del(9)(p21)	59.000	NA
2	8 anos	LMA-M5	46, XY, del(11)(q23)	32.000	NA
3	5 anos	LMA-M1	Sem mitose	48.000	NA
4	7 anos	LMA-M4	Sem mitose	65.000	NA
5	7 meses	LMA-M1	49, XY, +6, +9, +14	44.000	NA
6	12 anos	LMA-M5	46, XY, del(11)(q23)	30.000	NA
7	15 anos	LMA-M2	46, XY, del(20)(q12)	53.000	NA
18	6 anos	LMA-M5	46, XX [30]	200.000	73.000
27	7 meses	LMA-M5	46, XX, t(9;11)(p22;q23)	500.000	120.000
29	4 meses	LMA-M1	47, XY, del(5)(q), der(7)t(7;?), del(12)(p13), +19[5]/ 47, XY, der(7)t(7;?), del(12)(p12), +19 [13]/ 46, XY [1]	65.000	204.000
30	8 anos	LMA-M3	46, XX [30]	1.800	18.000
31	1 a e 2m	LMA-M4	45, XY, -7, del (12)(p)[5]/45, XY, -7[7]/46, XY[8]	140.000	137.000
34	4 anos	LMA-M3	46, XY	1.140	52.000
35	16 anos	LMA-M3	46, XX, t(15;17)(q22;q21)	100.000	51.000
36	8 anos	LMA-M2	46, XX	9.630	35.000

38	6 meses	LMA-M5	46, XY, t(9;11)(p22;q23)	45.500	67.000
39	1 ano	LMA-M5	47, XY MLL rearranjado	20.900	118.000
42	10 meses	LMA-M5	46, XY, der(1)t(1;8)(q21;p21), der(8)t(1;8)(q31;p21), der(11)ins(11;1)(q23;q21q31)	53.900	29.000
43	9 anos	LMA-M3	47, XY, t(15;17), +8	80.500	36.000
44	17 anos	LMA-M1	46, XX, del(12)(p12)	NA	NA
45	5 a e 4m	LMA-M5	46, XY, del(11)(q23)	NA	NA
46	16 anos	LMA-M3	47, XX, t(15;17), +8	1.700	13.000
47	6 anos	LMA-M4	45,X,-Y, t(8;22;21)(q21.3;q13.3;q22.12), der(22)t(1;22)(q23;q13.3)	69.000	20.800
49	16 anos	LMA-M3	46, XY, t(15;17)(q22;q21)	1.920	29.500
50	5 anos	LMA-M3	46, XX, t(15;17)(q22;q21)	21.000	13.000
53	10 anos	LMA-M2	46, XY, t(8;21)(q22;q22) [23]/ 46, XY [2]	140.000	19.000
54	4 anos	LMA-M2	45, X, -Y, t(8;21)(q22;q22) [16]/ 46, XY [4]	26.1000	20.000
55	11 anos	LMA-M2	46, XY, t(8;21)(q22;q22) [3]/ 46, XY [28]	NA	NA
56	8 anos	LMA-M5	46, XX, t(9;11)(p22;q23) [15]/ 46, XX [11]	139.000	84.000
57	3 anos	LMA-M3	46, XY, t(15;17) [13]/ 46, XY [5]	88.300	27.000
58	10 anos	LMA-M3	46, XY, t(15;17)(q21;q12), del(6)(6q)	40.200	24.000
59	1 a e 6m	LMA-M5	46, XY, inv(10)(pq),ins(11;10)(q23/p12p13)[13/ 46, XY[6]	8.900	208.000

61	17 anos	LMA-M3	Sem mitose – *PML/RARA*	2.100	21.000
62	4 anos	LMA-M1	46, XY, t(8;21)(q22;q22) [15]/ 46, XY [5]	NA	NA
64	9 anos	LMA-M1	46, XX, del(1)(q21q24?) [3]/ 46, XX [17]	114.600	NA
65	16 anos	LMA-M3	Sem mitose	1.600	NA
66	1 ano	LMA-M7	Sem mitose – positivo para o rearranjo do *gene MLL*	NA	NA
67	14 anos	LMA-M5	Sem mitose- *MLL* negativo	NA	NA
68	13 anos	LMA-M4	46, XY [20]	NA	NA
69	2 anos	LMA-M5	46, XY, t(1;11)(q21;q23)	NA	NA
70	15 anos	LMA-M5	46, XY [30]	53.400	23.000
72	9 anos	LMA-M3	46, XY, t(15;17)(q22;q21)	13.400	48.000
73	12 anos	LMA-M3	46, XY, t(15;17)(q22;q21)	140.000	37.000
74	6 anos	LMA-M3	46, XX[25]	306.480	16.000
75	1 anos	LMA-M3	Sem mitose – *PML/RARA*	11.000	10.000
77	8 anos	LMA-M4	46, XY, del(7)(q21)	68.200	147.000
78	1 ano	LMA-M5	46, XX, t(9;11)(p22;q23)	150.000	54.000
79	13 anos	LMA-M3	46, XY[25] – *PML/RARA*	24.700	33.000
80	9 anos	LMA-M1	46,XX,der(2)t(2;3)(q2?;?),t(3;13)(q13;p11),der(5)t(3;5)(?;q35), t(16;21)(p11;q22)	5.040	51.000

82	13 anos	LMA-M1	45, X, -X, t(8;13)(q22;q34) [18]/ 46, XX, t(8;13)(q22;q34) [1]	NA	NA
83	7 meses	LMA-M2	47, XX, +8, t(11;19)(q23;p13)	20.180	442.000
84	16 anos	LMA-M1	46, XX, t(6;11)(q27;q23)	NA	16.000

NA- Não avaliado

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo cromossômico consecutivo multicêntrico da Leucemia Mielóide Aguda da Infância

Nome do Voluntário:_____

Você, em breve, será submetido a um estudo citogenético. Por isso está sendo convidado a participar de uma pesquisa que envolve análise cromossômica de células de aspirado de medula óssea ou de sangue periférico.

Os estudos citogenéticos são coadjuvantes no diagnóstico morfológico e de um fator de risco de recaída da doença. Além disso, estes estudos são a base fundamental para detectar genes envolvidos na leucemogênese e contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde inclui o diagnóstico citogenético de pacientes com hemopatias malignas para classificar o diagnóstico clinica e o risco de recaída da doença.

Este estudo contribuirá como desenvolvimento clínico, diagnóstico e experimental dos pacientes com leucemia mielóide aguda da infância.

Para você decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DO ESTUDO

Descrever os grupos com alterações citogenéticas dos pacientes pediátricos com LMA, correlacionando-os
com os aspectos clínicos e prognósticos.

Detectar a porcentagem de anomalias cromossômicas da LMA na infância. Correlacionar as anomalias cromossômicas presentes no diagnóstico com a evolução da doença. Caracterizar anomalias variantes através de processos moleculares.

PROCEDIMENTO DO ESTUDO

Se você concordar em participar deste estudo citogenético será coletado 2 amostras do seu aspirado de medula óssea , pelo procedimento de punção de medula óssea ou sangue periférico numa quantidade variante de 5 a 10 mililitros (referente a uma colher de sopa) para serem submetidas a exame de citogenética. A

amostra de aspirado de medula óssea ou sangue periférico será encubado e será cultivada, a partir deste material, uma cultura celular, onde o objetivo é obter metáfases, as quais serão devidamente estudadas, por microscopia óptica, apontando as anomalias cromossômicas envolvidas na LMA da infância.

Para exames envolvidos neste estudo será utilizada uma parte do material (sangue) obtido para realização de exames rotineiros.

RISCOS

O seu tratamento será o mesmo caso você participe ou não deste estudo. A coleta de aspirado de medula óssea ou sangue periférico para o estudo coincidirá com a coleta de aspirado de medula óssea ou sangue periférico para os exames rotineiros de forma a não ser prevista punção de medula óssea ou venosa adicional. Essas punções para exames laboratoriais, que são parte de seu tratamento regular, podem resultar em dor no local da punção ou manchas rochas transitória chamadas de esquimoses. No entanto, essas coletas de material não oferecem maior risco à sua saúde, uma vez que, são realizadas por profissionais especializados.

BENEFÍCIOS

O estudo citogenético será de grande relevância para o seu tratamento pois permitirá o fornecimento de indicação diferencial de diagnóstico e escolha de tratamento apropriado para o risco da doença e possibilita a cura da doença.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital do Câncer I / INCA e equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utiliadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano recorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente pela sua participação no estudo.

BASES DA PARTICPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação este estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação o estudo a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras pra os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

O médico responsável por sua internação pode interromper sua participação no estudo sa qualquer momento, mesmo sem a sua autorização.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a Dra. Maria Luiza Macedo Silva no telefone (21) 22566701. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clinico, também pode com uma terceira pessoa imparcial, a Coordenadora do Comitê de Ética do Instituto Nacional do Câncer Dra. Adriana Scheliga – Rua André Cavalcanti, 37, telefone (21) 32331410.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo e poderei ser submetido a exames de sangue adicionais aos necessários a meu tratamento e não receberei compensação por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

_____ ___ / ___ / ___
(Assinatura do Paciente) dia mês ano

_____
(Nome do Paciente – letra de forma)

_____ ___ / ___ / ___
(Assinatura de testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

_____ ___ / ___ / ___
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

A(o): Dr(a) Maria Luiza Macedo Silva
Pesquisador(a) Principal

Rio de Janeiro, 19 de março 2008

Registro CEP nº 088/07 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)
Título do Projeto: "Estudo cromossômico consecutivo multicêntrico da Leucemia Mielóide Aguda da Infância"

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informamos abaixo a composição do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer que analisou e aprovou o estudo acima especificado.

Adriana Scheliga	Médica Oncologista Clínica HC I - Coordenadora
André Marcelo Machado Soares	Teólogo / Filósofo Extra INCA
Carlos Frederico de Freitas Lima	Médico Cirurgião Mastologista H CIII
Carlos Henrique D Silva	Médico HC IV – Coordenador Substituto
Célia Helena Fernandes Costa	Enfermeira – HC I
Cláudio Calazan do Carmo	Médico Oncologista – HC II
Ilce Ferreira da Silva	Enfermeira HC II
Ivan da Costa Marques	Matemático Extra INCA
José Bines	Médico Oncologista HC III
José Cláudio Casali	Médico Coordenador do Banco de Tumores
Marcelle Coelho de Rosario	Advogada Extra INCA
Maria Beatriz Kneipp Dias	Divisão de atenção oncológica/CONPREV
Maria de Fátima Batalha de Menezes	Enfermeira – HC II
Martin H Bonamino	Biólogo, do Laboratório de Medicina Experimental/CPQ
Miguel Ângelo Martins Moreira	Biólogo da Divisão de Genética/CPQ
Walter Esteves Piñeiro	Advogado Extra INCA
Wilza Barbosa Felippe	Enfermeira da Comissão de Infecção Hospitalar do HC III

Atenciosamente

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

A(o): Dra. Maria Luiza Macedo Silva
Pesquisador Principal

Rio de Janeiro, 26 de setembro de 2013.

Registro CEP n° 88/07 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
Título do estudo: Estudo cromossômico consecutivo multicêntrico da Leucemia Mielóide Aguda da Infância

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **analisou** e **aprovou** o **Relatório parcial datado de 22/8/13,** relacionado ao estudo acima**,** em sua reunião de 16 de setembro de 2013.

Atenciosamente,

Dr. Carlos Henrique D. Silva
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA