



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde

ESTEFÂNIA RODRIGUES BIOJONE

**“Perfil epidemiológico e caracterização molecular de Leucemias Linfoblásticas
Agudas de células B pediátricas e seus impactos nos desfechos clínicos de
pacientes tratados em hospital público terciário brasileiro”**

**Brasília
2024**



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ESTEFÂNIA RODRIGUES BIOJONE

“Perfil epidemiológico e caracterização molecular de Leucemias Linfoblásticas Agudas de células B pediátricas e seus impactos nos desfechos clínicos de pacientes tratados em hospital público terciário brasileiro”

Tese apresentada com vistas à defesa pública de doutorado em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Orientador: Diego Madureira
Co-orientador: Ricardo Camargo

BRASÍLIA

2024



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Estefânia Rodrigues Biojone

“Perfil epidemiológico e caracterização molecular de Leucemias Linfoblásticas Agudas de células B pediátricas e seus impactos nos desfechos clínicos de pacientes tratados em hospital público terciário brasileiro”

Tese apresentada com vistas à defesa pública de doutorado em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Aprovado em _____ de novembro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira – (presidente)
Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Dr. José Andrés Yunes
Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr Domingos A Boldrini

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo
Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília



Dedico esse trabalho

A DEUS, a quem devo tudo e porque "Tudo o que fizerem, façam de todo o coração, como para o Senhor, não para os homens", (Colossenses 3:23-24);

Ao Carlos, colega de faculdade e profissão, amigo e companheiro, meu esposo e protetor, ao lado de quem pretendo continuar trilhando e construindo uma bela história, na alegria e na tristeza, na saúde e na doença, por todos os dias da minha vida;

Aos meus filhos, Tiago, Felipe e Isabela, meus maiores e mais desafiadores projetos e a grande razão para que eu procure aperfeiçoamento contínuo a fim de ser um bom exemplo de vida e honrar a nobre e grandiosa missão de educar e formar boas pessoas;

Aos meus pais, por terem me dado a vida e por terem me ensinado, através do exemplo, o valor dos estudos e do trabalho e como fonte de dignidade humana. A eles devo o privilégio de trabalhar sempre com amor e afinco,

A cada um dos pacientes e seus familiares. Oferecer um melhor cuidado para as suas vidas foi a principal motivação para o desenvolvimento desse trabalho.



AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Diego, pela paciência e maestria com que soube me conduzir, me orientar e direcionar o desenvolvimento desse projeto. Obrigada por ter sido um verdadeiro mestre, ensinando, cobrando e corrigindo de maneira objetiva, precisa e serena. Admiração pela humildade e pela grandeza demonstradas ao me convencer que o trabalho e a escrita deveriam ter “a minha cara”;

Ao Ricardo, meu coorientador, principal idealizador do trabalho. Obrigada pelo voto de confiança e por me desafiar e me instigar continuamente, me fazendo sair do meu “ambiente natural” (beira leito) e me levando para dentro do laboratório, para explorar e descobrir esse universo tão difícil de letras, primers, drivers, quinases e rearranjos. Obrigada pelos ensinamentos, pela cumplicidade, parceria e amizade verdadeira;

À toda equipe do laboratório de pesquisa translacional, pela acolhida e por terem me “carregado” e me socorrido tantas vezes durante o desenvolvimento do projeto. Muita gratidão aos pesquisadores que estiveram diretamente relacionados com o trabalho: Larissa (biomol); Bruna (biomol); João Lucas (citogenética); Robéria (DRM); aos demais pesquisadores do laboratório: Marina; Agenor; Breno; Stefane; Miro *“in memoriam”*; à enfermeira Carol (Caroliny); ao Fábio (ex administrativo do HCB). Obrigada por me permitirem ser incluída (“intrometida”) nesse time tão afinado. Finalizo o trabalho com a certeza de que cada um faz parte tanto do projeto como da “quase” pesquisadora que estou me tornando. Trago com muita alegria boas lembranças dos momentos e aprendizados divididos não apenas com conhecimento técnico, mas com nossas experiências de vida, alguns aperreios e muitas risadas.

À equipe de pesquisa do HCB, pelo suporte em todos os processos relacionados ao desenvolvimento da pesquisa. Gratidão especial à Hevelin pela orientação desde a preparação do terreno (RedCap e Plataforma Brasil); À Vaninha e à velha amiga e companheira de outros projetos Cris Meneses (data manager) pelo apoio com dados do registro hospitalar de câncer e pela torcida, incentivo e apoio.



AGRADECIMENTOS

À Dra. Isis Magalhães, pelo exemplo e por uma vida de sacrifícios e dedicação em prol da melhoria do atendimento dos pacientes, pensando na melhoria das condições estruturais, mas priorizando a excelência técnica e científica;

Aos colegas da equipe de oncologia e hematologia do HCB pelo privilégio de trabalhar em equipe por uma grande causa: a criança com câncer. Obrigada aos que lutaram desde o início para a construção de um serviço de Oncologia e Hematologia de referência em Brasília e que me acolheram com tanto carinho em sua equipe: Edvaldo, José Carlos, Paula, Lucélia e Raquel. Ao Felipe, por ter me incentivado a desenvolver esse trabalho (há 5 anos atrás). Gratidão aos médicos mais novos por manterem viva a esperança de continuarmos esse lindo projeto sem permitir que a essência maior se perca.

Ao Hospital da Criança de Brasília, uma instituição de excelência e de referência que nos possibilita trabalhar com recursos adequados e prosperar cientificamente. Agradeço sobretudo às pessoas que fazem dessa estrutura um “Hospital com Alma” e que me permitem continuar acreditando que a rotina de trabalho diário pode ser transformada em missão de vida.

À Universidade de Brasília

À CAPES

À FAP DF e à FEPECS, agências de fomento e incentivadores de projeto de pesquisa.

E sempre, a DEUS.



*“Tantas vidas conhecemos,
Tantas histórias passam por nós,
Participamos de tantos destinos...
E seguimos no ritmo acelerado, às vezes quase frenético,
exercendo nossas funções.
Peço a Deus a capacidade
De reconhecer a grandeza de cada momento,
De compreender que cada "caso" é uma história,
Que cada "ficha atendida" é um ser humano,
Que cada "amostra analisada" pode carregar uma dor ou expressar um sorriso.
Peço a Deus a capacidade de enfrentar as regras e as lógicas do mundo
Para continuar cuidando das vidas e das almas.
Cada uma com o valor infinito que lhe cabe,
E a cada uma o amor infinito que merece”*

Estefania R. Biojone

“E minha vida é um único ato de amor!”

Santa Terezinha do Menino Jesus





RESUMO

INTRODUÇÃO: A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é o câncer mais comum na infância, correspondendo a 30% das neoplasias pediátricas. O pico de incidência ocorre entre 2 e 5 anos e as taxas de sobrevivência ultrapassam 90% nos países desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento, as taxas de sobrevivência são inferiores, o que é atribuído à limitação de acesso à assistência e à maior mortalidade por toxicidade. Mesmo sob condições ideais, existem subgrupos de pacientes com LLA-B que não respondem ao tratamento ou apresentam recidiva. A caracterização biológica possibilitou a identificação de novos subtipos de LLA-B e o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas. No Brasil, a avaliação das leucemias através de biologia molecular e sequenciamento genético é restrita a alguns centros de pesquisa. Nesse contexto, surge a necessidade da determinação dos subtipos biológicos de LLA B e da sua evolução em um centro de referência brasileiro.

OBJETIVOS: Identificação dos subtipos biológicos de LLA B, descrição da frequência desses subtipos e correlação dos subtipos com a evolução clínica.

METODOLOGIA: Foram avaliados pacientes com idade entre 1 e 18 anos, admitidos no HCB com diagnóstico de LLA-B entre julho de 2018 e setembro de 2023. Os pacientes receberam tratamento segundo dois protocolos: BFM-ALLIC2009 modificado (122 pacientes) e GBTLI2021 (34 pacientes). Para caracterização biológica, amostras de MO foram avaliadas por citogenética convencional, RT-PCR (*ETV6::RUNX1*; *TCF3::PBX1*, *BCR::ABL1*, *rKMT2A*, *P2RY8::CRLF2*), MLPA (*IKZF1*, *PAX5*, *ERG*, *iAMP21*), RFLP e análise de fragmento capilar (mutações no *FLT3*) e sequenciamento de Nova Geração (NGS). Foi estudada a correlação entre os subtipos biológicos da LLA B e os valores de Doença Residual Mínima (DRM), ocorrência de recaída e taxas de sobrevivência global (SG) e sobrevivência livre de evento (SLE).

RESULTADOS: Foram avaliadas 156 pacientes. As taxas de SG foram iguais a 100%, 86% e 59% em pacientes tratados pelo protocolo BFM-ALLIC2009 adaptado e classificados como baixo, intermediário e alto risco respectivamente. A principal causa de óbito foi infecção associada a neutropenia. Foram considerados 14 subtipos de LLA B, nos quais foram incluídos 86% dos pacientes. LLA *ETV6::RUNX1* (26%) e alta hiperdiploidia (19%) foram os subtipos mais comuns. Pacientes com *IKZF1*^{plus} apresentaram menor SG (48%, $p=0,04$, Teste Log-rank Mantel Cox), alterações no *PAX5* foram associadas a maiores valores de DRM no D33 ($p=0,03$, teste Mann Whitney), maior chance de recidiva (teste exato de Fisher, $p=0,04$) e menor sobrevivência (SG 33%, $p=0,005$ e SLE 55,5% $p=0,01$,) e mutação TKD no *FLT3* foi associada com recidiva (Teste exato de Fisher, $p=0,04$). Pacientes com *P2RY8::CRLF2* não apresentaram evolução desfavorável.

CONCLUSÃO: As taxas de sobrevivência estão aquém do encontrado nos centros internacionais e podem ser incrementadas através da redução da mortalidade associada ao tratamento. A evolução divergente do esperado em alguns subtipos de LLA B reforça para a importância da caracterização da biologia e evolução das LLA B no Brasil. Identificamos a necessidade de ampliar o número amostral e de avaliar novos marcadores, incluindo fatores genéticos associados à maior susceptibilidade aos efeitos tóxicos da quimioterapia e que justifiquem a maior mortalidade relacionada ao tratamento.

Palavras-Chave: Leucemia-Linfoma Linfoblástico de Células Precursoras B; Medicina de Precisão; Biologia Molecular; Biomarcadores Tumoriais.



ABSTRACT

INTRODUCTION: Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common cancer in childhood, accounting for 30% of pediatric neoplasms. The peak incidence occurs between 2 and 5 years of age, with survival rates exceeding 90% in developed countries. In developing countries, survival rates are lower, attributed to limited access to healthcare and higher mortality from treatment-related toxicity. Even under optimal conditions, certain subgroups of B-ALL patients do not respond to treatment or experience relapse. Biological characterization has enabled the identification of new B-ALL subtypes and the development of novel therapeutic tools. In Brazil, leukemia assessment through molecular biology and genetic sequencing is restricted to a few research centers. Thus, there is a need to determine the biological subtypes of B-ALL and their clinical course at a Brazilian reference center. **OBJECTIVES:** To identify the biological subtypes of B-ALL, describe the frequency of these subtypes, and correlate them with clinical outcomes. **METHODOLOGY:** Patients aged 1 to 18 years, admitted to the HCB with a diagnosis of B-ALL between July 2018 and September 2023, were evaluated. Patients received treatment according to two protocols: modified BFM-ALLIC2009 (122 patients) and GBTLI2021 (34 patients). For biological characterization, bone marrow samples were evaluated by conventional cytogenetics, RT-PCR (*ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1*, *BCR::ABL1*, *rKMT2A*, *P2RY8::CRLF2*), MLPA (*IKZF1*, *PAX5*, *ERG*, *iAMP21*), RFLP, capillary fragment analysis (*FLT3* mutations), and Next-Generation Sequencing (NGS). The correlation between B-ALL biological subtypes and minimal residual disease (MRD) values, relapse occurrence, overall survival (OS), and event-free survival (EFS) rates was analyzed. **RESULTS:** A total of 156 patients were evaluated. OS rates were 100%, 86%, and 59% in patients treated with the adapted BFM-ALLIC2009 protocol and classified as low, intermediate, and high risk, respectively. The leading cause of death was infection associated with neutropenia. Fourteen B ALL subtypes were identified, encompassing 86% of patients. *ETV6::RUNX1* ALL (26%) and high hyperdiploidy (19%) were the most common subtypes. Patients with *IKZF1*^{plus} had lower OS (48%, $p=0.04$, Log-rank Mantel Cox Test), *PAX5* alterations were associated with higher MRD levels on D33 ($p=0.03$, Mann-Whitney Test), higher relapse risk (Fisher's Exact Test, $p=0.04$), and lower survival (OS 33%, $p=0.005$, EFS 55.5%, $p=0.01$). *FLT3* TKD mutation was associated with relapse (Fisher's Exact Test, $p=0.04$). Patients with *P2RY8::CRLF2* did not show unfavorable outcomes. **CONCLUSION:** Survival rates are below those observed in international centers and could be improved by reducing treatment-related mortality. The divergent clinical outcomes in certain B-ALL subtypes underscore the importance of characterizing the biology and progression of B-ALL in Brazil. We identified the need to increase sample size and assess new markers, including genetic factors associated with greater susceptibility to chemotherapy-related toxicity, which may explain the higher treatment-related mortality.

Keywords: Precursor B-Cell Lymphoblastic Leukemia-Lymphoma; Precision Medicine; Molecular Biology; Tumor Biomarkers.



LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sobrevida Global de crianças com LLA incluídas nos estudos clínicos do Children's Cancer Group (CCG) e Children's Oncology Group (COG), 1968-2009. .26	26
Figura 2 - Distribuição de Sobrevida Global em 5 anos (%) para crianças (0 a 14 anos) diagnosticadas com leucemia linfoblástica aguda: continentes e países.28	28
Figura 3 – Frequência dos principais subgrupos de LLA B em crianças.44	44
Figura 4 - Detecção da translocação cromossômica t(9; 22) (q34; q11).48	48
Figura 5 - Alterações de quinases e vias de sinalização desreguladas na LLA Ph like.50	50
Figura 6 - Alterações no gene IKZF1 em LLA55	55
Figura 7 - Imunoterapia na LLA.....68	68
Figura 8 - Gel confirmatório do rearranjo ETV6::RUNX1.82	82
Figura 9 - Imagem de avaliação de MLPA.84	84
Figura 10 – Pesquisa de mutação no <i>FLT3</i>85	85
Figura 11 - RTq PCR para avaliação de expressão de <i>FLT3</i>86	86
Figura 12 - Distribuição dos pacientes em relação à idade.96	96
Figura 13 - Distribuição dos pacientes em relação ao local de procedência.97	97
Figura 14 - Distribuição dos pacientes em relação à contagem de glóbulos brancos ao diagnóstico.97	97
Figura 15 - Classificação de risco dos 122 pacientes tratados pelo protocolo ALL IC BFM 2009 adaptado.....98	98
Figura 16 - Classificação de risco dos pacientes tratados pelo protocolo GBTLI 2021 (n=34).....100	100
Figura 17 - Desfecho no fim da indução (D78) dos pacientes tratados pelo protocolo baseado no BFM.101	101
Figura 18 - Desfecho no fim da indução (D49) dos pacientes tratados pelo protocolo GBTLI.....102	102



Figura 19 - Sobrevida Global e Sobrevida Livre de Evento de todos os pacientes (n=156).....	106
Figura 20 - Curvas de Sobrevida Global (SG) dos pacientes tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 considerando estratificação de risco dos pacientes.....	107
Figura 21 - Curvas de Sobrevida Global dos pacientes de acordo com o valor da DRM em diferentes momentos.	109
Figura 22 - Subtipos biológicos de LLA B.	111
Figura 23 - Classificação de risco ao fim da indução	114
Figura 24 - Distribuição dos pacientes de acordo com a avaliação citogenética (n: 126 pacientes).....	115
Figura 25 - Avaliação de parâmetros clínicos e de resposta a tratamento (DRM) considerando grupos baseados na presença de alteração citogenética.	120
Figura 26 - Curvas de Sobrevida dos pacientes considerando alterações citogenéticas.	121
Figura 27 - Representação dos 6 casos de iAMP21 em relação a alterações associadas.	122
Figura 28 - Distribuição dos pacientes de acordo com a presença de translocações recorrentes.	123
Figura 29 - Avaliação de parâmetros clínicos e de resposta a tratamento (DRM) considerando grupos baseados na presença de translocações recorrentes em LLA B.	125
Figura 30 - Curvas de Sobrevida Global (SG) e Sobrevida Livre de Evento (SLE) dos pacientes com diferentes rearranjos recorrentes em LLA B.....	126
Figura 31 - Avaliação de parâmetros clínicos e de resposta a tratamento (DRM) considerando grupos baseados na presença do rearranjo <i>P2RY8::CRLF2</i>	129
Figura 32 - Curvas de Sobrevida dos pacientes classificados de acordo com a presença de do rearranjo <i>P2RY8::CRLF2</i>	130
Figura 33 - MLPA com deleção no PAX5 (hetero), del no CDKN2A e CDKN2B (homo) e possível deleção subclonal do IKZF1.....	131



Figura 34 - Distribuição dos pacientes de acordo com o tipo de deleção no gene <i>IKZF1</i>	132
Figura 35 - Classificação de risco dos grupos de pacientes de acordo com a presença de deleção no gene <i>IKZF1</i>	133
Figura 36 - Avaliação de parâmetros clínicos e de resposta a tratamento (DRM) considerando grupos baseados na presença de deleção no <i>IKZF1</i>	136
Figura 37 - Associação entre <i>IKZF1</i> ^{plus} e ocorrência de recidiva.....	137
Figura 38 - Curvas de Sobrevida dos pacientes classificados de acordo com a presença de deleção no gene <i>IKZF1</i>	138
Figura 39 - Classificação de risco dos grupos de pacientes de acordo com a presença de alteração no gene <i>PAX5</i>	140
Figura 40 - Avaliação de parâmetros clínicos e de resposta a tratamento (DRM) considerando grupos baseados na presença de deleção no <i>PAX5</i> (independente de deleções no <i>IKZF1</i> , <i>CDKN2A/B</i> ou <i>ERG</i> associadas).....	141
Figura 41 - Avaliação de parâmetros clínicos e de resposta a tratamento (DRM) considerando três grupos de pacientes: deleção no <i>PAX5</i> (não <i>IKZF1</i> ^{plus}); deleção no <i>PAX5</i> (<i>IKZF1</i> ^{plus}) e ausência de deleção no <i>PAX5</i>	142
Figura 42 - Correlação entre mutação no <i>PAX5</i> e ocorrência de recidiva.....	143
Figura 43 - Curvas de sobrevida dos pacientes com alteração no <i>PAX5</i> (independente de outras deleções associadas) e dos pacientes sem deleção no <i>PAX5</i> (WT).....	144
Figura 44 - Curvas de sobrevida dos pacientes com alteração no <i>PAX5</i> “não <i>IKZF1</i> ^{plus} ”, alteração no <i>PAX5</i> “ <i>IKZF1</i> ^{plus} ” e sem alteração no <i>PAX5</i> (WT).....	145
Figura 45 - Classificação de risco dos grupos de pacientes de acordo com a presença de alteração no gene <i>ERG</i>	146
Figura 46 - Avaliação de parâmetros clínicos e de resposta a tratamento (DRM) considerando os pacientes de acordo com alterações no gene <i>ERG</i> (MLPA).....	148
Figura 47 - Curvas de Sobrevida dos pacientes de acordo com a presença de alteração no gene <i>ERG</i>	149



Figura 48 - Descrição das mutações no gene <i>FLT3</i> em 8 pacientes com LLA B (9 mutações).....	150
Figura 49 - Classificação de risco dos grupos de pacientes de acordo com a presença de mutação no gene <i>FLT3</i>	151
Figura 50 - Avaliação de parâmetros clínicos e de resposta a tratamento (DRM) considerando os pacientes de acordo com mutação no gene <i>FLT3</i>	152
Figura 51 - Correlação entre mutação e recidiva	153
Figura 52 - Curvas de Sobrevida dos pacientes de acordo com a presença de mutação no gene <i>FLT3</i>	154
Figura 53 - Níveis de expressão de <i>FLT3</i> de acordo com subtipos biológicos de LLA B.....	155
Figura 54 - Análise de expressão em amostra de crianças com LLA B.	156
Figura 55 - Correlação entre a presença de infiltração do SNC ao diagnóstico e ocorrência de recidiva.	158
Figura 56 - Classificação de Risco no primeiro tratamento (BFM ALLIC 2009 adaptado) dos pacientes que recidivaram (n=11)	162
Figura 57 - Distribuição em diferentes subtipos de LLA B (todos / recidivas)	163
Figura 58 - Classificação de risco dos pacientes que foram a óbito em remissão ..	164
Figura 59 - Distribuição em diferentes subtipos de LLA B (todos / óbitos por toxicidade)	164
Figura 60 - Associação entre alterações biológicas em 156 pacientes com LLA B.	165
Figura 61 - Representação esquemática da população de pacientes estudados e alterações biológicas identificadas.	166
Figura 62 - Valores de DRM dos 42 pacientes com alta hiperdiploidia isoladamente (em verde) ou associado com outros marcadores biológicos.....	167
Figura 63 - Valores de DRM dos 38 pacientes com <i>ETV6::RUNX1</i> isoladamente (em laranja) ou associado com outros marcadores biológicos.	168
Figura 64 (continua) - Características clínicas, evolução e marcadores biológicos de 156 pacientes com LLA B.....	169



Figura 65 - Algoritmo para diagnóstico de LLA B desenvolvido pelo grupo de pesquisa do LPT / HCB. IFT: imunofenotipagem. ALL-*IKZF1*: kit probemix P335-B2 ALL-*IKZF1*; iAmp-*ERG*: Kit SALSA MLPA probemix P327 iAMP21-*ERG*.172



LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolos de tratamento de leucemia linfóide aguda no Brasil	70
Tabela 2 - Classificação de Risco Inicial e após indução baseado na resposta biológica (pacientes tratados pelo protocolo BFM adaptado)	99
Tabela 3 - Classificação de Risco Inicial e após indução (pacientes tratados pelo GBTLI 2021)	100
Tabela 4 - Classificação e evolução dos 12 pacientes que apresentaram recidiva.	103
Tabela 5 - Características e Evolução dos pacientes	105
Tabela 6 - Frequência de Marcadores Biológicos na LLA B	110
Tabela 7 - Características dos pacientes com diferentes alterações biológicas na LLA B	112
Tabela 8 - Protocolo de tratamento e classificação final de risco dos pacientes com aneuploidias (alta hiperdiploidia, baixa hiperdiploidia e hipodiploidia)	116
Tabela 9 - Características dos 08 pacientes com hipodiploidia	118
Tabela 10 - Protocolo de tratamento e classificação final de risco dos pacientes com rearranjos recorrentes.	124
Tabela 11 - Características dos pacientes com subtipo com deleção no <i>IKZF1</i> (n=10)	134
Tabela 12 - Características dos pacientes com subtipo <i>IKZF1</i> ^{plus} (n=11)	135
Tabela 13 - Alterações no gene <i>PAX5</i> e associações	139
Tabela 14 - Descrição de alterações no gene <i>ERG</i>	146
Tabela 15 - Características dos pacientes com mutação no gene <i>FLT3</i>	157
Tabela 16 - Características dos pacientes com hiper expressão de <i>FLT3</i> (RQ>10)	157
Tabela 17 - Características e Evolução dos pacientes segundo evolução	159
Tabela 18 - Características dos pacientes que apresentaram recidiva (n=12)	160



Tabela 19 - Características dos pacientes que foram a óbito por toxicidade (n=17)	161
Tabela 20 - Descrição das alterações encontradas em 59 pacientes que realizaram NGS.	173
Tabela 21 - Características clínicas, laboratoriais e evolução de pacientes com alterações identificadas pelo sequenciamento	174



LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - História do tratamento da LLA.....	29
Quadro 2 - Manifestações Clínicas da LLA	34
Quadro 3 - Classificação de Leucemias/linfomas Linfoblástico de Células B.	35
Quadro 4 - Classificação Morfológica da Leucemia Linfoide Aguda (FAB)	36
Quadro 5 - Classificação de Leucemia Linfoide Aguda B	37
Quadro 6 - Classificação dos pacientes com LLA em relação ao cariótipo	38
Quadro 7 - Definição de “status” do SNC em pacientes com LLA.....	39
Quadro 8 - Fatores Prognósticos de LLA B.....	40
Quadro 9 - Protocolos de tratamento para LLA na infância e momentos de coleta de DRM	43
Quadro 10 - Alterações coexistentes com alta hiperdiploidia	45
Quadro 11 - Alterações genéticas em pacientes com LLA Ph like	51
Quadro 12 - Alterações no gene <i>IKZF1</i> em pacientes com LLA	56
Quadro 13 - Critérios para definição de recidiva medular em LLA pediátrica (DRM avaliável).	61
Quadro 14 - Critérios para definição de recidiva medular em LLA pediátrica (DRM não avaliável)	62
Quadro 15 - Critérios para definição de recidiva no SNC em LLA pediátrica.	62
Quadro 16 - Tratamento de LLA na Infância	64
Quadro 17 - Protocolos de tratamento para LLA na infância (medicamentos e taxas de sobrevida).....	65
Quadro 18 - Painel de anticorpos para triagem de leucemias agudas (08 marcadores)	79
Quadro 19 - Painel de anticorpos para o diagnóstico de LLA B (25 marcadores).....	79
Quadro 20 - Painel de anticorpos para a detecção de DRM em pacientes com LLA B (18 marcadores)	79



Quadro 21 – Número de sondas por gene	83
Quadro 22 - Exames complementares para identificação de biomarcadores em LLA B	86
Quadro 23 - Classificação de risco, critérios para classificação e tratamento de indução dos protocolos ALLIC BFM 2009 adaptado e GBTLI 2021	90
Quadro 24 - Classificação e de risco pós indução e tratamento de Consolidação dos protocolos ALLIC BFM 2009 adaptado e GBTLI 2021	91
Quadro 25 - Dados Coletados dos Pacientes	93



LISTA DE ABEVIATRURAS E SIGLAS

ALLIC	Acute Lymphoblastic Leukemia Inter Continental Protocol
APL	Acidente de Punção Lombar
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster Protocol
BFM ALLIC	Protocolo de tratamento BFM intercontinental para LLA
D15	Décimo quinto dia de tratamento
D19	Décimo nono dia de tratamento
D49	Quadragésimo nono dia de tratamento
D78	Septuagésimo oitavo dia de tratamento
D “n”	“Enésimo” dia de tratamento
DRM	Doença Residual Mínima
GB	Glóbulos Brancos
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemias na Infância
HCB	Hospital da Criança de Brasília
IFT	Imunofenotipagem
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA B	Leucemia Linfoblástica Aguda de células B
LLA T	Leucemia Linfoblástica Aguda de células T
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LPT	Laboratório de Pesquisa Translacional
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Amplification
MO	Medula Óssea
MTX	Metotrexato
NGS	Next Generation Sequencing
OL	Óbito por Leucemia
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Óbito em Remissão
PLT	Punção Lombar Traumática



LISTA DE ABEVIATRURAS E SIGLAS

QT	Quimioterapia
RC	Remissão Completa
RET	Remissão em tratamento
RFT	Remissão fora de tratamento
SG	Sobrevida Global
SLE	Sobrevida Livre de Evento
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TKI	Tyrosine Kinase Inhibitor
TMO	Transplante de Medula Óssea



SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
1.1	Epidemiologia	27
1.2	História: da identificação ao tratamento bem-sucedido	28
1.3	Etiologia	30
1.4	Fisiopatologia	32
1.5	Manifestações clínicas.....	33
1.6	Diagnóstico de LLA	34
1.6.1	Morfologia.....	35
1.6.2	Imunofenotipagem	36
1.6.3	Avaliação Genética.....	37
1.6.4	Infiltração de SNC	38
1.6.5	Infiltração testicular.....	39
1.7	Fatores prognósticos	40
1.8	Avaliação de resposta ao tratamento: doença residual mínima (DRM), um divisor de águas	41
1.9	A biologia os subtipos de LLA	44
1.9.1	Hiperdiploidia.....	45
1.9.2	Hipodiploidia	46
1.9.3	Amplificação Intracromossômica do Cromossomo 21 (iAMP21)	47
1.9.4	Fusão <i>BCR::ABL1</i> – t (9;22)	47
1.9.5	LLA Ph “ <i>like</i> ”	49
1.9.6	Rearranjos no <i>KMT2A</i>	52
1.9.7	Rearranjo <i>ETV6::RUNX1</i>	52
1.9.8	Rearranjo <i>TCF3::PBX1</i> – t (1;19)	53
1.9.9	LLA <i>ETV6::RUNX1</i> “ <i>like</i> ”	53
1.9.10	Rearranjo <i>IGH/IL3</i> – t(5;14)	54
1.9.11	Outras alterações na LLA B.....	54
1.10	Definições em LLA	60
1.11	Tratamento da LLA	63
1.11.1	Perspectivas: Terapia Alvo e Imunoterapia	67
1.12	Tratamento da LLA no BRASIL	69



1.13	Complicações relacionadas ao tratamento	70
1.14	Justificativa.....	71
2	OBJETIVOS	73
3	METODOLOGIA	75
3.1	Critérios de inclusão	75
3.2	Critérios de exclusão	76
3.3	Tamanho amostral.....	76
3.4	Diagnóstico da LLA B	77
3.4.1	Coleta de material, isolamento de mononucleares e extração de ácidos nucleicos.....	77
3.4.2	Isolamento de mononucleares e extração de ácidos nucleicos.....	78
3.4.3	Análise morfológica de MO.....	78
3.4.4	Imunofenotipagem.....	78
3.4.5	Avaliação de infiltração no SNC	80
3.4.6	Avaliação do cariótipo.....	80
3.4.7	Pesquisa de rearranjos recorrentes em LLA	81
3.5	Caracterização biológica da LLA	82
3.5.1	Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA).....	82
3.5.2	Exames complementares/confirmatórios.....	84
3.5.3	Sequenciamento de Nova Geração (NGS).....	87
3.6	Cálculo de frequência de marcadores biológicos e classificação em subtipos biológicos.....	88
3.7	Estratificação de risco e tratamento de LLA B	88
3.8	Avaliação de resposta ao tratamento	92
3.9	Coleta de dados clínicos e laboratoriais	92
3.10	Definição de desfechos.....	93
3.11	Análise de dados	94
4	RESULTADOS.....	96
4.1	Descrição da amostra	96
4.1.1	Características epidemiológicas	96
4.1.2	Leucometria ao diagnóstico	97
4.1.3	Classificação de risco	98
4.1.4	Evolução e desfecho	101



4.2	Avaliação de sobrevida.....	106
4.2.1	Curvas de sobrevida de acordo com classificação de risco	106
4.2.2	Curvas de sobrevida de acordo com os valores de DRM.....	108
4.3	Caracterização biológica da LLA B e avaliação de frequência de alterações biológicas	110
4.4	Marcadores biológicos na LLA B: impacto sobre prognóstico e evolução	111
4.4.1	Aneuploidias	115
4.4.2	Rearranjos recorrentes detectados por RT-PCR.....	123
4.4.3	LLA Ph like <i>P2RY8::CRLF2</i>	128
4.4.4	Alterações no <i>IKZF1</i>	130
4.4.5	Alterações no <i>PAX5</i>	139
4.4.6	Alterações no <i>ERG</i>	145
4.4.7	Alterações no <i>FLT3</i>	150
4.5	Perfil de marcadores biológicos apresentados pelos pacientes com evoluções clínicas distintas	158
4.6	Sobreposição de diferentes alterações genéticas e moleculares.....	165
4.7	Fluxograma para caracterização biológica de LLA B	171
5	DISCUSSÃO	175
5.1	Descrição da Amostra.....	175
5.1.1	Características Epidemiológicas.....	175
5.1.2	Leucometria ao diagnóstico.....	175
5.1.3	Classificação de risco	176
5.1.4	Evolução e desfecho	177
5.2	AVALIAÇÃO DE SOBREVIDA	182
5.2.1	Curvas de Sobrevida de Acordo com Classificação de Risco	184
5.2.2	Curvas de Sobrevida de Acordo com os valores de DRM.....	185
5.3	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DA LLA B E AVALIAÇÃO DE FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES BIOLÓGICAS.....	185
5.4	MARCADORES BIOLÓGICOS NA LLA B: IMPACTO SOBRE PROGNÓSTICO E EVOLUÇÃO	186
5.4.1	Aneuploidias	186
5.4.2	Rearranjos recorrentes em LLA.....	189



5.4.3	LLA Ph like <i>P2RY8::CRLF2</i>	193
5.4.4	Alterações no <i>IKZF1</i>	194
5.4.5	Alterações no <i>PAX5</i>	195
5.4.6	Alterações no <i>ERG</i>	196
5.4.7	Alterações no <i>FLT3</i>	196
5.5	Perfil de marcadores biológicos apresentados pelos pacientes com evoluções clínicas distintas	198
5.6	Sobreposição de diferentes alterações genéticas e moleculares.....	199
5.7	Fluxograma para caracterização biológica da LLA B	202
6	CONCLUSÕES	203
7	LIMITAÇÕES	205
8	PERSPECTIVAS.....	206
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	208



APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE A – BIOMARCADORES EM LLA B (QUADRO SUPLEMENTAR).....	256
APÊNDICE B – COMPARAÇÃO DOS DADOS ENTRE DIFERENTES ESTUDOS COM LLA B.....	259
ANEXO 1- DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	260
ANEXO 2- CÓPIA DE ARTIGO CIENTÍFICO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO.....	266
ANEXO 3 – TRABALHO PARA APRESENTAÇÃO EM CONGRESSO (POSTER).....	281
ANEXO 4 – TRABALHO PARA APRESENTAÇÃO EM CONGRESSO (POSTER).....	282
ANEXO 5 - IMUNOFENOTIPAGEM PARA DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS AGUDAS POR CITOMETRIA DE FLUXO NO HCB.....	283
ANEXO 6 - TÉCNICA DE CITOGENÉTICA POR BANDAMENTO G.....	288
ANEXO 7 - PESQUISA DE REARRANJOS GÊNICOS EM LEUCEMIAS INFANTIS POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE APÓS TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR).....	289
ANEXO 8 - PESQUISA DE <i>P2RY8::CRLF2</i>	292
ANEXO 9 - AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DO <i>FLT3</i> POR PCR EM TEMPO REAL.....	294
ANEXO 10 – CRITÉRIOS DA ASSOCIAÇÃO DE PATOLOGIA MOLECULAR (AMP) PARA CATEGORIZAÇÃO DE VARIANTES BESEADA EM EVIDÊNCIAS.....	295

1 INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma neoplasia secundária à transformação de células progenitoras de linfócitos (B ou T) na medula óssea, acarretando proliferação celular desordenada e prejuízo da diferenciação dos linfoblastos. As células neoplásicas (linfoblastos) infiltram a medula óssea e impedem a hematopoiese (Pizzo; Poplack, 2015; Kaplan, 2019; Malard, Mohty, 2020).

As LLAs são a causa mais comum de câncer na faixa etária pediátrica, correspondendo a aproximadamente 30% das neoplasias malignas em pacientes até 18 anos de idade. (Zhang; Habebbu; Li, 2022; National Cancer Institute, 2021). Na maioria dos casos (85%), as LLA decorrem de progenitores de células B (LLA-B) e em 15% das LLA são originárias de células T (LLA-T). Podem ocorrer em qualquer faixa etária, mas cerca de 60% dos casos são diagnosticados em crianças e adolescentes até 20 anos de idade (Inaba; Pui, 2021).

Em países desenvolvidos, as taxas de sobrevida global de crianças com LLA (incluindo B e T) superam 90% (Inaba; Pui, 2021). (Figura 1)

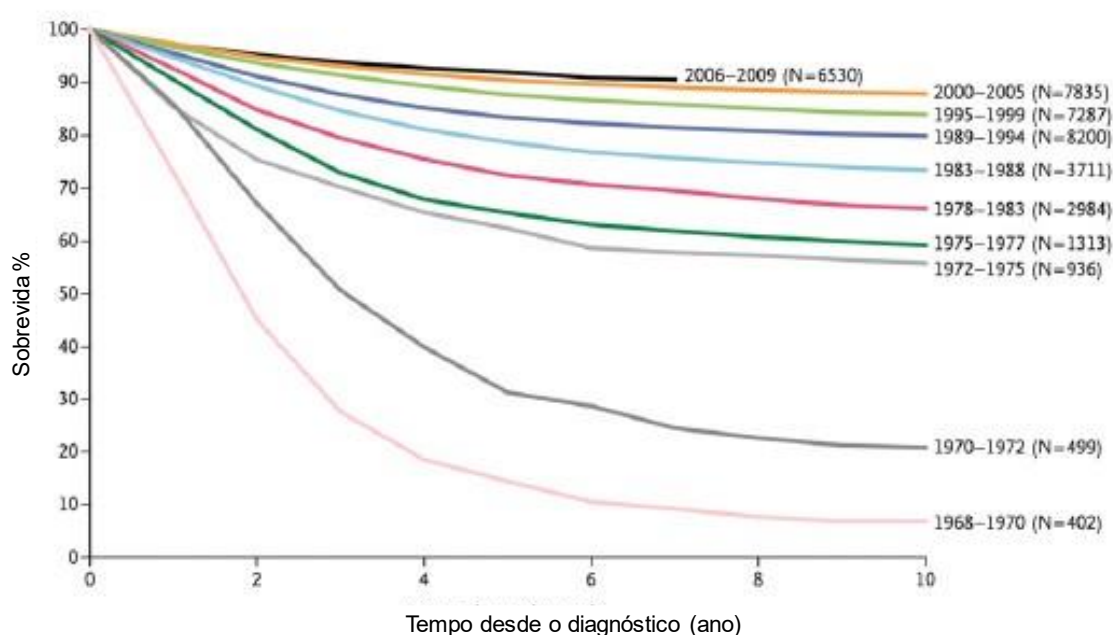


Figura 1 - Sobrevida Global de crianças com LLA incluídas nos estudos clínicos do Children's Cancer Group (CCG) e Children's Oncology Group (COG), 1968-2009.

Fonte: Hunger; Mullighan, 2015.



1.1 Epidemiologia

São descritas taxas de 36,2 casos de LLA (incluído LLA B e LLA T) por milhão de pessoas nos EUA, com variação entre as populações de etnia hispânica (40,9 por milhão), branca (35,6 por milhão) e negra (14,8 por milhão) (Steliarova-Foucher *et al.*, 2017).

Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o triênio 2020-2022, foram esperados 10810 casos novos de leucemia na infância por ano no Brasil, sendo 5920 casos em meninos e 4890 em meninas (INCA, 2020). Em 2009, de Carmargo avaliou dados de 14 registros de base populacional de câncer (RBPC) e encontrou taxas de incidências de leucemia que variaram de 21 casos por milhão em Salvador a 67,5 casos por milhão em Goiânia (De Carmargo *et al.*, 2010). As diferenças nas taxas de incidência de LLA podem ser atribuídas a fatores como dificuldade de diagnóstico, falhas nos sistemas de notificação e até mesmo diferenças reais na incidência da doença decorrentes de fatores genéticos e ambientais (Feliciano; Santos; Pombo-De-Oliveira, 2018).

A LLA é diagnosticada mais frequentemente em pacientes do sexo masculino, com uma razão de aproximadamente 1,2:1 a 1,3:1. O pico de incidência de LLA ocorre entre os 2 e 5 anos de idade. O aumento do aparecimento das leucemias nessa faixa etária parece estar relacionada ao período de hiperplasia do tecido linfóide (Howlader *et al.*, 2017; Kratzer *et al.*, 2023; Greaves, 2018; Inaba; Pui, 2021).

Nos países com excelentes condições de tratamento, as taxas de sobrevida global (SG) de LLA na infância superam 90%, entretanto, há uma grande disparidade entre diferentes locais e países do mundo, com variação de taxas de sobrevida de 50% aos 90% (Bonaventure *et al.*, 2017). No Brasil, Chile, Colômbia, Peru e Tailândia a sobrevida global em 5 anos ainda é inferior a 70%, mesmo após a correção para as taxas de mortalidade infantil. Na China, Equador e México as taxas de sobrevida global são inferiores a 60% (Figura 2) (Allemani *et al.*, 2018).

O Hospital da Criança de Brasília (HCB) é um hospital público pediátrico terciário e de alta complexidade. Sua construção foi idealizada na década de 80 por uma associação de apoio a familiares de crianças com câncer criada por pais de pacientes oncológicos. Foi inaugurado em 2011 e desde então, é centro de referência para atendimento de crianças com doenças complexas do Distrito Federal e entorno, e recebe pacientes provenientes das diferentes regiões do Brasil.

É a única instituição pública no Distrito Federal habilitada para tratamento de crianças com câncer e recebe anualmente cerca de 180 casos novos de crianças com câncer, sendo 25 a 30 casos de LLA B. Em análise dos casos tratados entre 1999 e 2018, foi observada uma taxa de SG de aproximadamente 70% (dados de registro interno, não publicados).

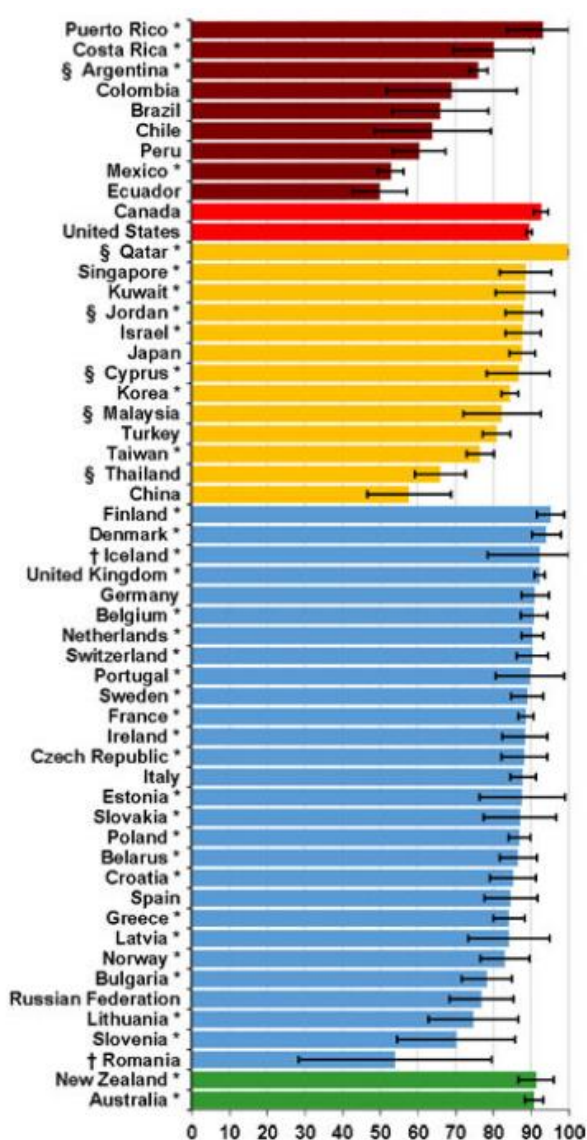


Figura 2 - Distribuição de Sobrevida Global em 5 anos (%) para crianças (0 a 14 anos) diagnosticadas com leucemia linfoblástica aguda: continentes e países.

Vermelho: países da América do Sul; laranja: países da América Central; amarelo: países da Ásia; azul: países da Europa e verde países da Oceania. *Dados com 100% de cobertura da população nacional. †Estimativa nacional não padronizada por idade. §Estimativa nacional marcada como menos confiável porque as únicas estimativas disponíveis são provenientes de um ou mais registros nesta categoria. Fonte: ALLEMANI *et al.*, 2018.

1.2 História: da identificação ao tratamento bem-sucedido

O primeiro registro de tratamento medicamentoso levando a remissão da



Leucemia Aguda, foi publicado em 1948, quando foi descrito que o uso da aminopterina, um antagonista do ácido fólico em 16 crianças com leucemia aguda, acarretou melhora clínica em 10 casos e remissão hematológica em 5 desses casos (Farber; Diamond, 1948).

Desde então, diversos avanços aconteceram até que chegássemos à realidade atual, em que a LLA é um verdadeiro modelo de sucesso do tratamento oncológico (Quadro 1).

Quadro 1 - História do tratamento da LLA

Período	Marco	Referência
Décadas de 60 e 70: descrição e início do tratamento		
1961	Primeira descrição da associação de metotrexato e 6-mercaptopurina.	Frei <i>et al.</i> , 1961
1962	(St Jude Childrens Hospital) - abordagem terapêutica para a LLA baseada em diferentes componentes: Indução de remissão, tratamento direcionado para o SNC (com irradiação craniana e metotrexato intra-tecal), terapia de intensificação (consolidação) e tratamento de continuação.	Pinkel, 1971
1967-1968	(St Jude Childrens Hospital): Cura de cerca da metade dos 35 pacientes envolvidos no Total Therapy Study V.	Aur <i>et al.</i> , 1971
Década de 80: elevação das taxas de cura para 70%		
1981	(Grupo BFM Berlim-Frankfurt-Muster) (BFM) – Uso da consolidação II	Henze <i>et al.</i> , 1981
1983	(Dana- Faber Cancer Center) – Incorporação da L-asparaginase	Sallan <i>et al.</i> , 1983
	Terapia tripla intra-tecal e maiores doses de metotrexato para prevenir recidiva no SNC	Freeman <i>et al.</i> , 1983; Pui <i>et al.</i> , 2009
1987	Eliminação da irradiação craniana como componente do tratamento da LLA.	Henze <i>et al.</i> , 1987
Década de 90: taxas de cura 80%		
1986 a 1995	Doses de quimioterapia (metotrexato e 6-mercaptopurina) individualizadas e adequadas à sensibilidade dos pacientes aos efeitos da droga.	Evans <i>et al.</i> , 1986; Krynetski <i>et al.</i> , 1995
1995	(“Ponte di Legno Childhood ALL Working Group”): investigar a biologia, heterogeneidade e o tratamento ideal para os subgrupos de LLA de alto risco.	Pui <i>et al.</i> , 2004
Século XXI: taxas de cura 90%		
Início do século XXI	A incorporação do Imatinib, inibidor de tirosina quinase, como tratamento de primeira linha para crianças com LLA B Ph+	Schultz <i>et al.</i> , 2009; Aricò <i>et al.</i> , 2010; Bleckmann; Schrappe, 2016
2005	Uso de DRM para avaliação de resposta ao tratamento	Borowitz <i>et al.</i> , 2008 ; Gökbuget <i>et al.</i> , 2012
2014	Descrição de subtipo LLA Ph like	Boer <i>et al.</i> , 2017; Harvey, Tasian, 2020; Arber, <i>et al.</i> , 2016

Para a continuidade da “história do tratamento da Leucemia”, os esforços estão atualmente voltados para identificação de pequenos grupos de pacientes com LLA de alto risco e com prognóstico inferior, para os quais são necessárias e estão justificadas maiores mudanças na abordagem terapêutica.



1.3 Etiologia

A LLA decorre de uma transformação maligna de uma célula progenitora hematopoiética que adquire a capacidade de expandir e de auto renovação indefinida (Pizzo; Poplack, 2015). Os eventos que levam a essa transformação maligna são multifatoriais e complexos.

Genética

A observação de alterações genéticas nas células leucêmicas, a associação de alterações cromossômicas constitucionais com LLA, a descrição de casos de leucemia familiar, uma maior incidência de leucemia entre irmãos gêmeos (concordância de 10 a 15%), são evidências de que o processo de leucemogênese está fortemente associado à ocorrência de alterações genéticas somáticas (Blaney *et al.*, 2020).

As alterações genéticas observadas na LLA incluem aneuploidias (hiperdiploidia ou hipodiploidia), rearranjos cromossômicos que desregulam a expressão gênica ou resultam na expressão de proteínas de fusão, deleções e ganhos de DNA e mutações de sequências de DNA (Harrison, 2009).

As bases genéticas associadas à LLA parecem ser poligênicas. Os genes associados à LLA estão diretamente envolvidos com os processos de proliferação e diferenciação de células sanguíneas, sugerindo que uma variante genética herdada contribui para uma vulnerabilidade das células hematopoiéticas, desencadeando o processo inicial da tumorigênese no período intra-utero ou pós natal (Xu *et al.*, 2013; Malard; Mohty, 2020). Entretanto, por si só, muitas das alterações genéticas associadas com a LLA não são determinantes causais suficientes para o desenvolvimento da doença e existe uma interação entre fatores ambientais, infecciosos e imunológicos (Malard; Mohty, 2020).

A grande maioria das crianças portadores de variantes genéticas associadas à LLA não desenvolverá a doença, e portanto, não existe recomendação para rastreio (“screening”) de susceptibilidade genética para LLA (Malard; Mohty, 2020).

Fatores ambientais

A elevada incidência de leucemia em sobreviventes dos ataques nucleares no Japão durante a segunda guerra mundial, foi a principal evidência para a associação entre a exposição à radiação ionizante e o surgimento de leucemia. O risco de



leucemia está relacionado à dose de radiação à qual o paciente é exposto e o tipo de leucemia desenvolvido está associado com a idade. Crianças desenvolvem mais comumente LLA e adultos desenvolvem Leucemias Mielóides Agudas (LMA) (Pizzo; Poplack, 2015)

Ao longo das últimas décadas, vários estudos foram desenvolvidos com o intuito de identificar a associação entre a exposição a fatores ambientais com a leucemogênese. Entre os fatores estudados estão a exposição a herbicida e pesticidas, uso de álcool na gravidez, uso de contraceptivos esteroidais, contaminação da água do solo, tabagismo paterno pré concepção e durante a infância, moradia próximo a estação de petróleo, exposição a baixas doses de radiação ionizante, exposição a campos eletromagnéticos. (Stiller, 2004; Greaves, 2006; Belson; Kingsley; Holmes, 2007). Os resultados dos diferentes estudos são conflitantes e os achados pouco consistentes (Buffler *et al*, 2005).

Infecção Viral

Por mais de 100 anos, houve um grande interesse em se avaliar a associação entre a ocorrência de LLA e infecções virais, mas nenhuma relação significativa foi encontrada e as tentativas de identificação de vírus com potencial leucemogênico foram frustradas (Greaves, 1988, 2006).

Ao contrário, foi observado que uma maior incidência de hepatite A estava relacionada a menores taxas de incidência de LLA (Greaves, 2006).

Baseados nesses achados, foi sugerido que a maior ocorrência de LLA em países desenvolvidos, quando comparados a países mais pobres, pode estar relacionada a uma menor exposição a agentes infecciosos nos primeiros meses de vida. Uma resposta imune anormal e exacerbada durante uma exposição tardia a agentes infecciosos comuns, seria uma explicação plausível para o surgimento de clones pre leucêmicos (“Hipótese da infecção tardia”) (Greaves, 2006).

Hipótese da Infecção Tardia

Essa hipótese foi proposta por Mil Greaves em 1988 para explicar a origem da LLA B e é fundamentada em duas proposições: uma resposta aberrante do sistema imunológico diante de infecções comuns na infância e a necessidade de dois eventos críticos (um “iniciador” e um “provocador”) para o “acionamento” da LLA B (Greaves, 1988, 2018).



Segundo Greaves, a exposição “natural” a microorganismos durante o período perinatal e o primeiro ano de vida influenciam a função e integridade de sistema imunológico, através da estimulação de células T e sinalização das vias regulatórias. Prejuízos nessa “experiência microbiana natural”, em decorrência dos hábitos de vida da sociedade moderna, resultam em alterações na modulação ou desordens no sistema imunológico, que passa a reagir de forma desregulada diante de infecções comuns na infância favorecendo o desenvolvimento da LLA B.

Essa resposta imunológica anormal às infecções comuns na infância, seria o evento provocador necessário para o desenvolvimento de LLA B em crianças portadores de mutações “iniciadoras” ocorridas no período intra-útero. (Greaves, 2018)

Imunodeficiência

Imunodeficiências congênicas e secundárias ao uso de imunossupressores estão associados a um maior risco de desenvolver neoplasias de células linfoides, entretanto, normalmente tratam-se de linfomas de células B madura, sendo muito rara a ocorrência de LLA nessas circunstâncias. (Pizzo; Poplack, 2015)

1.4 Fisiopatologia

Os mecanismos relacionados à gênese da leucemia são similares entre crianças e adultos e incluem expressão aberrante de proto-oncogenes, translocações cromossômicas que originam genes de fusão que codificam proteínas com atividade de quinase e fatores de transcrição modificados e hiperdiploidia envolvendo mais de 50 cromossomos (Pui *et al.*, 2004).

Hiperdiploidia, *BCR::ABL1* t(9;22)(q34.1;q11.2), *ETV6::RUNX1* t(12;21)(p13;q22), *TCF3::PBX1* t(1;19)(q23;p13), *KMT2A::AFF1* t(4;11)(q21;q23), e outras translocações envolvendo o gene *KMT2A* são alterações típicas e recorrentes associadas ao desenvolvimento da LLA. Mutações germinativas nos genes *ETV6*, *RUNX1*, *PAX5* e *IKZF1*, estão comprovadamente associadas a uma predisposição aumentada ao desenvolvimento de LLA (Lejman *et al*, 2022).

Os eventos oncogênicos iniciais induzidos por rearranjos cromossômicos e mutações germinativas são insuficientes para causarem, por si só, o surgimento da leucemia. Essas alterações genéticas provavelmente favorecem uma segunda



classe de mutações que afetam os processos de proliferação e sobrevivência de progenitores hematopoiéticos. (Speck; Gilliland, 2002).

Os eventos genômicos secundários que contribuem para a leucemogênese incluem alterações do número de cópias (envolvendo fatores de transcrição linfoides) e mutações de sequência genética (Malard; Mohty, 2020). Entre as mutações que contribuem como um segundo evento para o “start” da leucemogênese, estão alterações nas vias de proteínas com atividade de proteína quinase (como a *FLT3*, um tirosina quinase importante para o desenvolvimento e diferenciação de células precursoras hematopoiéticas), (Armstrong *et al.*, 2004) e alterações em genes supressores tumorais (como gene *Rb* e *TP53*).

Algumas mutações secundárias específicas, particularmente em reguladores epigenéticos, (*TBL1XR1* em *ETV6::RUNX1* e *SETD2* em LLA hiperdiploide) podem aumentar a estratificação de risco dos paciente (Brady *et al.*, 2022).

Não existe uma sequência única e linear de eventos genéticos e ativação de cascatas intra-celulares responsável pelo desenvolvimento de LLA na infância. As vias associados com os processos de proliferação, diferenciação celular, sinalização e apoptose estão interligadas. Mais de 300 genes indutores de leucemogênese (“drivers”) têm sido propostos (Brady *et al.*, 2022).

A identificação de combinações gênicas características tem revelado a ampla diversidade dos mecanismos associados com a LLA e com os seus diferentes subtipos, e ao mesmo tempo pode orientar o desenvolvimento de modelos experimentais que reproduzam a doença.

1.5 Manifestações clínicas

As principais manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com LLA B estão relacionadas ao:

- a) Prejuízo da hematopoiese decorrente da infiltração da medula óssea por células neoplásicas,
- b) Infiltração leucêmica nos órgãos do sistema linfohematopoiético (adenomegalia, hepatomegalia e esplenomegalia),
- c) Infiltração leucêmica em outros órgãos (sistema nervoso central, testículos, rins, etc)

Astenia, anorexia, perda de peso, febre, dor óssea e artrite são outros

sintomas comuns relacionados ao processo inflamatório sistêmico (Quadro 2) (Kaplan, 2019).

Quadro 2 - Manifestações Clínicas da LLA

	Alteração laboratorial/ órgão acometido	Sintoma
INFILTRAÇÃO DA MO (prejuízo da hematopoiese)	Anemia	Palidez cutânea, frouteira, dispnéia aos esforços
	Plaquetopenia	Petéquias, equimoses, sangramento gengival, epistaxe
	Neutropenia	Susceptibilidade a infecções
INFILTRAÇÃO EM ÓRGÃOS DO SISTEMA LINFO- HEMATOPOIÉTICO	Linfonodos	Adenomegalia
	Fígado	Hepatomegalia
	Baço	Espleneomegalia
INFILTRAÇÃO EM OUTROS ÓRGÃOS	Ossos	Dor óssea, dor articular, artrite
	Testículos	Aumento indolor e uniforme do volume testicular. Consistência endurecida
	SNC	Cefaléia, paralisia facial, alterações visuais, crises convulsivas
	Rins	Aumento das dimensões e alterações da ecotextura do parênquima renal
PROCESSO INFLAMATÓRIO SISTÊMICO	Febre, astenia, anorexia, perda de peso, dores articulares, artrite	

(Pizzo; Poplack, 2015; Kaplan, 2019)

1.6 Diagnóstico de LLA

O diagnóstico da LLA, baseado nas diretrizes da Organização Mundial de Saúde (Classificação OMS), integra a caracterização da célula neoplásica através da avaliação da morfologia, definição do imunofenótipo, caracterização genética e citogenética (Quadro 3).



Quadro 3 - Classificação de Leucemias/linfomas Linfoblástico de Células B.
5ª edição de Classificação de Tumores Hematológicos OMS.

Classificação OMS - 5ª edição	Classificação OMS - 4ª edição revisada
Leucemia/linfoma linfoblástico B não especificado	Leucemia/linfoma linfoblástico B não especificado
Leucemia/linfoma linfoblástico B com alta hiperdiploidia	Leucemia/linfoma linfoblástico B com hiperdiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástico B com hipodiploidia	Leucemia/linfoma linfoblástico B com hipodiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástico B com iAMP21	Leucemia/linfoma linfoblástico B com iAMP21
Leucemia/linfoma linfoblástico B com fusão <i>BCR::ABL1</i>	Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR::ABL1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com características semelhantes a <i>BCR::ABL1</i> (Ph Like)	Leucemia/linfoma linfoblástico B <i>BCR::ABL1</i> Ph Like
Leucemia/linfoma linfoblástico B com rearranjo do <i>KMT2A</i>	Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> -rearranjado
Leucemia/linfoma linfoblástico B com fusão <i>ETV6::RUNX1</i>	Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6::RUNX1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com características semelhantes a <i>ETV6::RUNX1</i>	Não incluído previamente
Leucemia/linfoma linfoblástico B com fusão <i>TCF3::BPX1</i>	Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3::BPX1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com fusão <i>IGH::IL3</i>	Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(5;14)(q31.1;q32.1); <i>IGH/IL3</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com <i>TCF3::HLF</i>	Não incluído previamente
Leucemia/linfoma linfoblástico B com outra anormalidade genética definida	Leucemia/linfoma linfoblástico B com outra anormalidade genética definida

1.6.1 Morfologia

De acordo com a classificação FAB (French-American-British), primeiro sistema de classificação proposto para as leucemias agudas, o diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda é definido pela presença de 25% ou mais de células precursoras de linfócitos na medula óssea. O sistema descreve características morfológicas nas células neoplásicas que possibilitam diferenciar as leucemias



linfoides agudas das leucemias mieloides agudas. Ainda segundo a classificação FAB, a LLA pode ser classificada do ponto de vista morfológico em 3 subtipos: L1, L2 e L3. (Quadro 4) (Bennett *et al.*, 1976, 1981).

Quadro 4 - Classificação Morfológica da Leucemia Linfóide Aguda (FAB)

Característica Citológica	L1	L2	L3
Tamanho celular	Predominantemente pequeno e homogêneo	Grande, com variação no tamanho	Grande, com tamanho homogêneo
Cromatina	Homogênea	Variável, heterogênea	Finamente pontilhada e homogênea
Forma nuclear	Regular, pode apresentar fenda ou indentação	Irregular, podendo apresentar fenda ou indentação	Regular, ovalado ou redondo
Núcleo	Indistintos, não visualizados	Um ou mais por células, grandes, proeminentes	Um ou mais por célula, proeminentes
Quantidade de citoplasma	Escassa	Moderadamente abundante	Moderadamente abundante
Basofilia do citoplasma	Discreta	Discreta	Intensa
Vacuolização citoplasmática	Variável	Variável	Intensa

A avaliação morfológica é uma metodologia de diagnóstico subjetiva e dependente da experiência do examinador e atualmente é suplantada por técnicas mais precisas e refinadas para o diagnóstico de LLA (imunofenotipagem e caracterização genética).

1.6.2 Imunofenotipagem

A imunofenotipagem, realizada pela citometria de fluxo, consiste na caracterização imunológica da leucemia através identificação de antígenos específicos expressos pelas células neoplásicas. Atualmente, a imunofenotipagem é o padrão ouro para o diagnóstico de LLA.

Essa caracterização baseada na detecção de antígenos expressos pelas diferentes linhagens das células hematopoéticas e nos diferentes estágios de maturação, foi proposta em 1995 pelo EGIL (European Group for the Immunological



Characterization of Leukemias - EGIL) com o objetivo de superar as limitações da avaliação morfológica para o diagnóstico das leucemias (semelhança morfológica entre diferentes subtipos, susceptibilidade à experiência do examinador) (Quadro 5) (Bene *et al*, 1995).

A partir de 2008, a diretriz da Organização Mundial de Saúde (WHO Classification of 2008) passou a incorporar a avaliação de imunofenótipo para a definição e diagnóstico das Leucemias Agudas (Campo *et al*, 2008; Vardiman *et al*, 2009; Béné *et al*., 2011).

Quadro 5 - Classificação de Leucemia Linfóide Aguda B
(European Group for the Immunological Characterization of Leukemias - EGIL)

Subtipo LLA B	Marcadores de células B (cCD79, CD19, CD22...)	CD10	Cadeias Intracitoplasmáticas (IgM)	Imunoglobulinas de superfície ou cadeias leves
B-I (proB)	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
B-II (B Comum)	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
B-III (pre-B)	Positivo	Positivo/negativo	Positivo	Negativo
B-IV (B maduro)	Positivo	Positivo/negativo	Positivo/negativo	Positivo

(BÉNÉ *et al*, 1995)

A imunofenotipagem é essencial não apenas para a confirmação do diagnóstico de LLA, mas também para a determinação da linhagem celular (diferenciação entre célula T e B), para classificação em diferentes subtipos e para a identificação de marcadores importantes para a aferição da Doença Residual Mínima (DRM) (Pizzo; Poplack, 2015; Kaplan, 2019; Malard; Mohty, 2020).

1.6.3 Avaliação Genética

A avaliação genética dos pacientes com diagnóstico de LLA é realizada através de citogenética convencional e complementada pelas técnicas de hibridização por fluorescência in-situ (FISH- fluorescence in situ hybridisation) e RT-PCR.

De acordo com as alterações no número de cromossomos identificados pela citogenética convencional, as células leucêmicas podem ser classificadas como hiperdiplóides (baixa ou alta hiperdiploidia) ou hipodiplóides (alta ou baixa hipodiploidia) (Lejman *et al*, 2022). Alterações estruturais (inserções, deleções e translocações) podem ser identificadas por citogenética convencional, mas algumas alterações genômicas (translocações específicas) são detectadas apenas através de



FISH e RT-PCR (Quadro 6).

Avanços recentes em sequenciamento de nova geração (NGS- Next generation sequencing) têm possibilitado o sequenciamento genômico de células leucêmicas e acredita-se que futuramente, quando essa metodologia se tornar factível e sustentável rotineiramente, as técnicas atualmente adotadas para o diagnóstico e caracterização das LLA poderão ser substituídas (Malard; Mohty, 2020).

Quadro 6 - Classificação dos pacientes com LLA em relação ao cariótipo

Classificação Cariótipo	Definição		Técnica de detecção
Cariótipo Normal	46 XX 46, XY		Bandamento G
Hiperdiploidia	>46 cromossomos	Baixa hiperdiploidia (47 a 50 cromossomos)	Bandamento G
		Alta hiperdiploidia (>50 cromossomos)	
Hipodiploidia	<46 cromossomos	Baixa hipodiploidia (<40 cromossomos)	Bandamento G
		Alta Hipodiploidia (40 a 44 cromossomos)	
Alterações estruturais	Inserções, deleções, rearranjos		Bandamento G RT-PCR FISH

1.6.4 Infiltração de SNC

Define-se infiltração de SNC em pacientes com LLA, a identificação de mais que 5 leucócitos/mm³, com presença de células blásticas, na amostra de líquido cefalo-raquidiano (LCR). A infiltração de SNC está presente em 3 a 5% dos pacientes pediátricos com LLA B no momento do diagnóstico e em 30 a 40% dos pacientes que recidivam (Pui; Howard, 2008; Frishman-Levy; Izraeli, 2017).

No momento do diagnóstico é imprescindível a identificação da infiltração leucêmica do SNC para direcionar o tratamento a ser instituído (intensidade e frequência de QT intra-tecal e dose de medicamentos intravenosos) (Quadro 7) (Capria *et al*, 2020).

Existem fatores de risco para envolvimento do SNC pela leucemia, entre eles, alterações genéticas como a presença da *TCF3::PBX1* e a ocorrência de punção lombar traumática (ou acidente de punção lombar - APL) (Gajjar *et al*, 2000). Os protocolos de tratamento recomendam a realização de doses adicionais de



quimioterapia intra-tecal tripla para pacientes com essas condições (Burger *et al*, 2003; Dutch Childhood Oncology Group *et al*, 2006)

Quadro 7 - Definição de “status” do SNC em pacientes com LLA

“Status” do SNC	Leucócitos/mm ³	Hemácias/mm ³	Blastos Leucêmicos
SNC 1	≤ 5	< 10	Ausente
SNC 2	≤ 5	< 10	Presente
SNC 3	>5	< 10	Presente
APL +	Não se aplica	≥ 10	Presente
APL -	Não se aplica	≥10	Ausente

SNC (sistema nervoso central); APL (acidente de punção lombar)

Assim como ocorreu em relação à avaliação das amostras de MO, atualmente existe uma necessidade de padronização técnicas mais precisas e mais sensíveis (como RT-PCR, imunofenotipagem por citometria de fluxo, FISH) para detecção de linfoblastos em amostras de LCR e diversos estudos estão direcionados com esse objetivo (Biojone *et al*, 2012; Karapetyan *et al*, 2023; Rocha *et al*, 2023)

1.6.5 Infiltração testicular

O envolvimento dos testículos pela LLA B, é raro em adultos, mas pode ser observado em 1,1 a 2,4% dos meninos no momento do diagnóstico. (Gajjar *et al*, 1996; Hijiya *et al*, 2005). Clinicamente, a infiltração testicular se manifesta pelo aumento do tamanho e da consistência dos testículos sem dor associada. (Nguyen *et al*, 2021).

Com o uso de quimioterapia intensiva, especialmente altas doses de metotrexato (MTX), a infiltração testicular passou a ser erradicada e atualmente é pouco observada. Além disso, a utilização de altas doses de MTX, possibilitou a eliminação do tratamento local com radioterapia ou orquiectomia no diagnóstico e reduziu o risco de recidiva testicular (Nguyen *et al*, 2021).



1.7 Fatores prognósticos

Desde o desenvolvimento dos primeiros protocolos de tratamento para LLA na infância (anos 80-90), surgiu a necessidade de identificar características associadas à pior evolução da doença com a intenção de ajustar os esquemas quimioterápicos de acordo com o potencial de gravidade (risco de recidiva) (Hammond *et al*, 1986; Smith *et al*, 1996; Alexander, 2014).

Os primeiros fatores de mau prognóstico identificados em crianças com LLA B foram idade do paciente inferior a 1 ano ou superior a 10 anos e a leucometria inicial superior a 50000 leucócitos/mm³ Smith *et al*, 1996 (Conter *et al*, 2010). Em seguida, foi evidenciado que as crianças com rápida resposta após a introdução de corticóide, caracterizada por leucometria no oitavo dia de tratamento inferior a 5000/mm³ e ausência de blastos no sangue periférico, apresentavam evolução muito favorável quando comparada aos outros pacientes (Riehm *et al*, 1987). A infiltração do sistema nervoso central (SNC), definida pela presença de células leucêmicas no líquido, também foi associada a uma evolução desfavorável (Reiter *et al*, 1994 ; Schrappe; Reiter ; Riehm, 1998; Pui *et al*, 2000 ; Alexander, 2014)

Atualmente, com a melhoria das técnicas do diagnóstico, diversos marcadores moleculares encontrados de forma recorrente em crianças com LLA são utilizados como fatores determinantes de prognóstico. As LLA com hiperdiploidia, *ETV6::RUNX1*, estão relacionadas e melhor evolução. Por outro lado, rearranjos no *KMT2A* e *BCR::ABL1*, influenciam negativamente a LLA (Pui; Evans, 2013; Kaplan, 2019; Pui, 2020; Lejman *et al*, 2022 ; Zhang; Habeebu, 2022).

Com o refinamento do tratamento, muitos fatores que anteriormente exerciam influência negativa sobre a evolução dos pacientes passaram a ser suplantados (pelo tratamento adequado ou pela identificação de outros fatores de maior impacto prognóstico) e perderam o seu significado clínico. Um exemplo é o rearranjo *TCF3::PBX1*, tradicionalmente relacionado a mau prognóstico, mas que tem mostrado prognóstico favorável com a adoção de protocolos de tratamento mais intensivos e direcionados à doença no SNC (Felice *et al*, 2011; Pang *et al*, 2015).

No quadro 8 apresentamos um resumo de fatores prognósticos na LLA B.

Quadro 8 - Fatores Prognósticos de LLA B

	Variável	Bom prognóstico	Mau prognóstico
Clínicos	Idade	Entre 1 e 10 anos	< 1 ano e > 10 anos

	Infiltração no SNC	Ausência de infiltração	> 5 leuc/mm ³ com blastos no liquor
Biológicos	Leucometria inicial	< 50000/mm ³	>50000/mm ³
	Citogenética	Alta Hiperdiploidia	Baixa Hiperdiploidia Hipodiploidia
	Molecular	<i>ETV6::RUNX1</i>	<i>BCR::ABL1</i> Rearranjo <i>KMT2A</i>
		Rearranjo no <i>DUX4</i> Deleção <i>ERG</i> Rearranjo <i>NUTM1</i>	Deleção ou mutação no <i>IKZF1</i> , Del <i>KMT2A</i> LLA B Ph Like Rearranjo <i>MEFD2</i>
Resposta ao tratamento	Resposta ao corticóide (GB no D8)	< 5000/mm ³ (sem blastos)	> 5000/mm ³
	DRM	DRM indetectável no fim da indução	DRM positiva no fim da indução

(Lejman *et al*, 2022).

1.8 Avaliação de resposta ao tratamento: doença residual mínima (DRM), um divisor de águas

À identificação, através de técnicas laboratoriais mais sensíveis (PCR e citometria de fluxo), de células leucêmicas remanescentes na medula óssea de pacientes com critérios morfológicos de remissão (< 5% de células blásticas) após o tratamento quimioterápico, dá-se o nome de Doença Residual Mínima (DRM). A sensibilidade de detecção de DRM varia entre as diferentes técnicas utilizadas entre 10⁻⁴ a 10⁻⁵ (Radu *et al*, 2020).

A DRM pode ser pesquisada tanto em amostras de medula óssea como de sangue periférico, entretanto, os níveis de DRM no sangue periférico são 1log abaixo dos níveis observados na MO em pacientes com LLA T e até 3 log abaixo em pacientes com LLA B. Desta maneira, recomenda-se a utilização de amostras de MO como método de escolha para aferição de DRM (Brisco *et al.*, 1997; Coustan-Smith *et al*, 2002; Van der Velden *et al.*, 2002).

A detecção de DRM em amostras de MO coletadas após as fases indução e consolidação, bem como os valores de DRM identificados são importantes preditores de prognóstico na LLA tanto em crianças como em adultos (Bassan *et al.*, 2009;



Conter *et al.*, 2010; Schrappe *et al.*, 2011; Beldjord *et al.*, 2014 ; Ribera *et al.*, 2014; Kruse *et al.*, 2020 ; Contreras Yametti *et al.*, 2021).

Nas últimas décadas, a DRM se consolidou como importante variável de valor prognóstico independente (Kruse *et al.*, 2020) e é utilizada para o monitoramento da eficácia terapêutica e estratificação dos pacientes em diferentes grupos de risco (Quadro 9) (Borowitz *et al.*, 2008 ; Gökbüget *et al.*, 2012 ; Vora *et al.*, 2014 ; Van Dongen *et al.*, 2012; Pui *et al.*, 2015 ; Pieters *et al.*, 2016).



Quadro 9 - Protocolos de tratamento para LLA na infância e momentos de coleta de DRM

Estudo	Momentos de avaliação	Ref
Total XVII (St Jude)	DRM SP no D8 D15 D22 Apó indução (6 semanas – D42)	https://clinicaltrials.gov/study/NCT03117751#study-plan (Omar <i>et al.</i> , 2022)
AIEOP-BFM ALL 2009	D15 D33 D78	(Conter <i>et al.</i> , 2010)
IC-BFM 2009	D15 D33 D78	(Campbell <i>et al.</i> , 2023)
DFCI ALL Consortium Protocol 05- 001	D32 (fim da indução)	(Vrooman <i>et al.</i> , 2018)
French protocol (CAALL-F01)	Pós Indução (D35-D42) Pós consolidação BR: D65-75 MR: D95-105 HR/VHR: 95-105	https://clinicaltrials.gov/study/NCT02716233
GBTLI 2021	D19, D49 Após consolidação (alto risco)	Protocolo de Tratamento da Leucemia Aguda da Criança e do Adolescente GBTLI LLA – Estudo 2021

(Omar *et al.*, 2022; Vrooman *et al.*, 2018)

O primeiro protocolo de estudo proposto pelo Grupo Cooperativo Brasileiro de Tratamento de Leucemias na Infância (GBTLI) que adotou o uso de DRM como ferramenta para avaliação de resposta terapêutica e classificação de risco foi o GBTLI 2009, aberto em dezembro de 2009. O protocolo preconizava a realização de DRM através de técnica simplificada de RT-PCR (Scrideli *et al.*, 2009) ou por citometria de fluxo no 15º dia (D15) e 35º dia (D35) de tratamento.

O atual protocolo proposto pelo GBTLI (GBTLI 2021) preconiza que a avaliação da DRM seja realizada através de citometria de fluxo no décimo nono (D19), no quadragésimo nono (D49) dias de tratamento e, para os pacientes em que o resultado do D49 ainda esteja positivo, após a consolidação.

1.9 A biologia os subtipos de LLA

Inicialmente descrita como uma única doença acometendo linfócitos B, atualmente o que se denomina “Leucemia Linfoblástica Aguda” na verdade engloba múltiplas condições distintas em relação às características clínicas, alterações genéticas e susceptibilidade ao tratamento quimioterápico.

Baseada na identificação de diferentes marcadores biológicos nas células leucêmicas, a quinta edição de classificação da OMS de tumores linfomatomatopoiéticos (2022), classifica a LLA B em 13 subtipos distintos (Alaggio *et al.*, 2022). O avanço de tecnologias como NGS, com sequenciamento de exoma ou de genoma completos, sequenciamento de transcriptoma (RNA-seq) e análises de duplicação e deleções, têm possibilitado a identificação de mais subtipos de LLA B, que atualmente pode ser subdividida em mais de 30 subgrupos caracterizados por “assinaturas genéticas” típicas (Figura 3) (Hunger; Mullighan, 2015, 2015; Inaba; Pui, 2021).

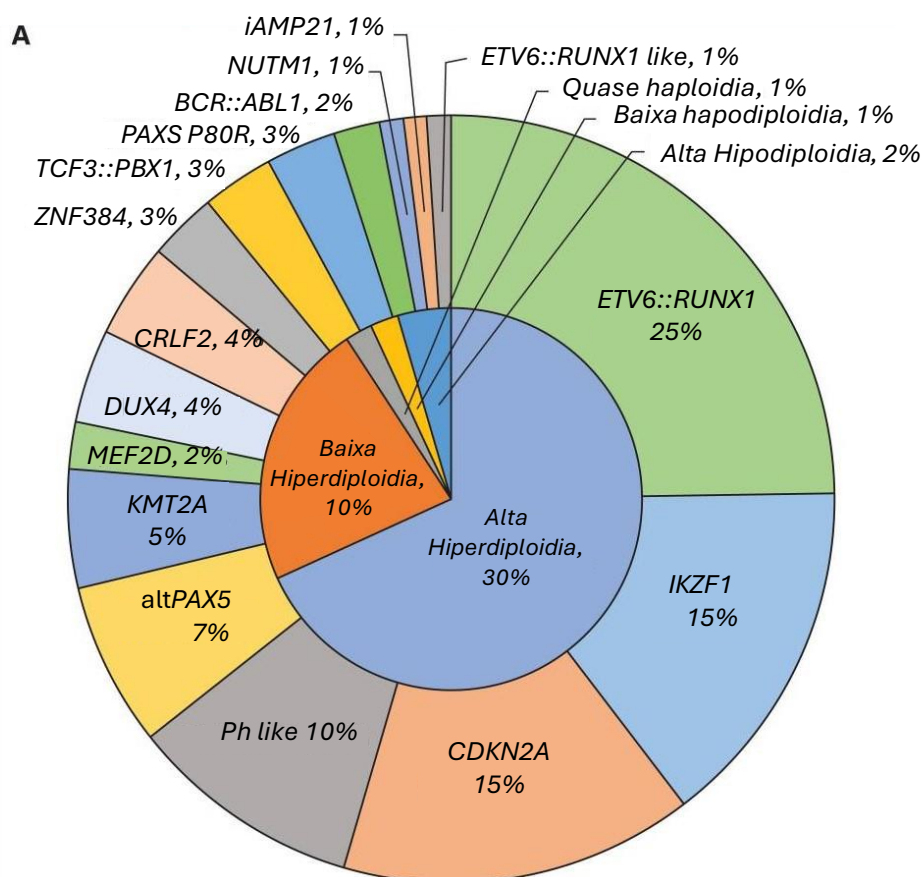


Figura 3 – Frequência dos principais subgrupos de LLA B em crianças.
Fonte: ZHANG L, HABEEBU SSM, Li W, 2022



1.9.1 Hiperdiploidia

A hiperdiploidia, caracterizada pela presença de mais que 46 cromossomos, pode ser subdividida em duas categorias com prognósticos distintos: alta hiperdiploidia (51-67 cromossomos ou índice de DNA $>1,16$) associada a bom prognóstico e baixa hiperdiploidia (47 a 50 cromossomos e índice de DNA entre 1.0 e 1.16), relacionada a uma evolução desfavorável (Williams *et al.*, 1982; Lejman *et al.*, 2022).

Alta hiperdiploidia

Presente 25-30% dos casos de LLA B na infância e 10% de LLA B nos adultos, é a alteração genética mais comum em crianças com LLA B e geralmente está associada a DRM negativa no final da indução e elevadas taxas de sobrevida.

Embora a hiperdiploidia seja associada com bom prognóstico, há aproximadamente 20% dos pacientes com LLA B hiperdiploide que recidivam. Alterações genéticas secundárias coexistentes, como *i(17q)* e ganho de 1q, podem ter impacto no prognóstico (Quadro 10) (Pui; Raimondi; Williams, 1988).

As translocações recorrentes podem ocorrer em 1 a 4% dos pacientes com hiperdiploidia, e acredita-se que o impacto das translocações se sobrepõe ao efeito da alta hiperdiploidia (Quadro 10) (Paulsson; Johansson, 2009). Entretanto, há indícios que pacientes com *BCR::ABL1* associados com hiperdiploidia, evoluem de forma mais satisfatória quando comparados aos pacientes com *BCR::ABL1* e cariótipo diploide (Asbry *et al.*, 2021).

Quadro 10 - Alterações coexistentes com alta hiperdiploidia

	Alteração Associada	Impacto	Referência
Hiperdiploidia	<i>i(17q)</i>	Pior prognóstico	(Pui; Raimondi; Williams, 1988)
	Ganho 1q	Pior prognóstico	
	Duplicação de 1q	Pior prognóstico	
	<i>BCR::ABL1</i>	Pior prognóstico	(Paulsson; Johansson, 2009)
	<i>ETV6::RUNX1</i>	Bom prognóstico	
	<i>TCF3::PBX1</i>	Pior prognóstico	
	<i>MLL::AF4</i>	Pior prognóstico	



Baixa hiperdiploidia

Está presente em 10 a 11% dos pacientes com LLA e relaciona-se com piores taxas de sobrevida global, um tempo médio para primeira recidiva menor e uma menor chance de segunda remissão após a recidiva, quando comparados com pacientes com cariótipo normal e outras alterações estruturais (Groeneveld-Krentz *et al.*, 2019).

1.9.2 Hipodiploidia

A hipodiploidia na LLA B é definida pela presença de ≤ 44 cromossomos.

Ela pode ser classificada como alta hipodiploidia (40-44 cromossomos), baixa hipodiploidia (30-39 cromossomos) e quase haploidia (24-29 cromossomos). Em crianças com LLA B, quase haploidia e baixa hipodiploidia apresentam evolução clínica significativamente inferior quando comparados com alta hipodiploidia (Harrison *et al.*, 2004; Pui *et al.*, 2019; Lejman *et al.*, 2022).

LLA B com quase haploidia (Near-haploidia B-ALL)

Descrita apenas em pacientes pediátricos, está presente em 2 a 5% das LLA B na infância. (Holmfeldt *et al.*, 2013)

O perfil de expressão gênica de comutação (por exemplo, as vias de sinalização *CREBBP* e *RAS*) são semelhantes aos observados na LLA com alta hiperdiploidia, sugerindo uma potencial origem comum nesses tipos de leucemia (Iacobucci; Kimura; Mullighan, 2021)

LLA B de baixa hipodiploidia

Essa alteração é observada em apenas 0,5% dos pacientes pediátricos com LLA e sua frequência aumenta com a idade, sendo encontrada em 4 a 10% dos casos da LLA de adultos. (Comeaux; Mullighan, 2016).

Em 40% dos casos, estão associadas com alterações germinativas no *TP53* (Li-Fraumeni).

Apesar da associação com prognóstico desfavorável, diversos estudos demonstram que o efeito da hipodiploidia tem sido mitigado pela adaptação do tratamento baseado nos níveis de DRM (Mullighan *et al.*, 2015).



1.9.3 Amplificação Intracromossômica do Cromossomo 21 (iAMP21)

A iAMP21, identificada como um subgrupo distinto de LLA B em 2003, é definida pela amplificação da região 5.1-Mb contendo mapeamento de genes para a Região Crítica da Síndrome de Down (DSCR). Ela foi detectada durante rastreamento de rotina para a presença da fusão *ETV6-RUNX*, através do FISH, em que foram encontradas cópias adicionais dos sinais específicos para o gene *RUNX1*, em pacientes que não apresentavam o gene de fusão *ETV6-RUNX* (Odero *et al.*, 2001). Foram observadas duplicações em *tandem* ao longo do comprimento de um cromossomo 21 extremamente anormal (Harewood *et al.*, 2003).

Em 9% dos casos de LLA B com iAMP21, o diagnóstico não pode ser realizado através do FISH, mas a amplificação pode ser confirmada através do “microarray”, indicando a importância da incorporação do microarray no fluxo de diagnóstico das leucemias (Koleilat *et al.*, 2022).

A iAMP21 é rara em adultos, e encontrada em aproximadamente 1% a 2% das LLA B em crianças que não apresentam a fusão *ETV6::RUNX1*, sendo mais comum em crianças mais velhas e adolescentes e geralmente se manifestam com baixa leucometria ao diagnóstico (Heerema *et al.*, 2013; Harrison *et al.*, 2014).

A presença de iAMP21 foi associada com pior prognóstico entre pacientes tratados pelos regimes de risco “Standart” do Instituto Nacional do Câncer (NIH), nos EUA, (Heerema *et al.*, 2013; Moorman, 2016; Lejman *et al.*, 2022). A intensificação do tratamento, melhorou a evolução dos pacientes com esse subtipo de leucemia, que atualmente é considerado como um subtipo com prognóstico intermediário, com taxas de SLE próximas a 70%. A LLA com iAMP21 é considerada um potencial candidato para a introdução de novas terapias (Moorman *et al.*, 2013; Inaba; Pui, 2021; Jeha *et al.*, 2021; He *et al.*, 2024).

1.9.4 Fusão *BCR::ABL1* – t (9;22)

Em 1960, Nowell e Hungerford descreveram na Philadelphia um cromossomo diferente encontrado em células de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica (Nowell; Hungerford, 1960). Após uma década, foi observado que o Cromossomo Philadelphia era resultado de uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 (Figura 4).

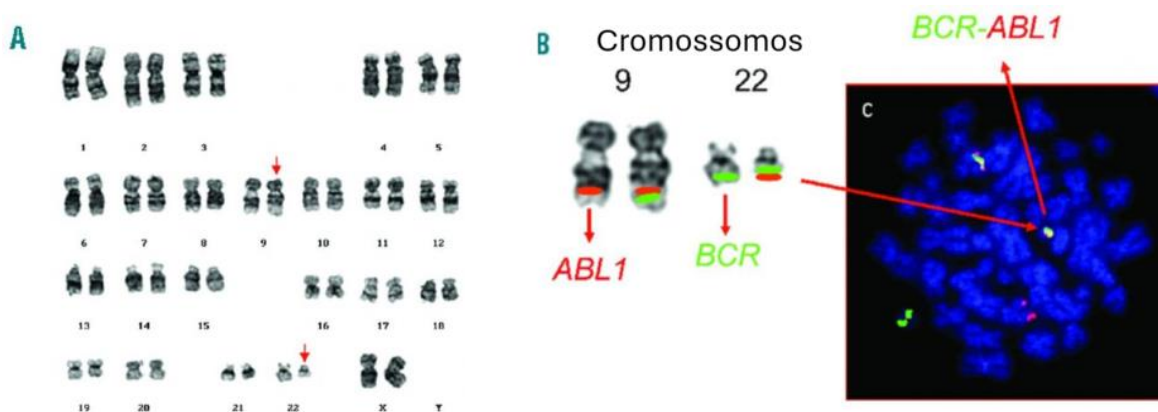


Figura 4 - Detecção da translocação cromossômica t(9; 22) (q34; q11).

a) Cariótipo de um paciente com leucemia mieloide crônica representando a translocação, t (9; 22) (q34; q11) (cromossomos anormais com setas). b) Um cariótipo parcial dos mesmos cromossomos.

Fonte: Rowley, 1973.

A consequência da t(9;22) é a junção do gene da tirosina quinase *ABL1* (localizada no cromossomo 9) à região do cluster de ponto de interrupção (*BCR::* “breakpoint cluster region”) no cromossomo 22; dando origem à proteína de fusão *BCR::ABL1*. Dependendo do ponto de quebra no gene *BCR*, a proteína resultante da translocação pode ter um maior (p210 *BCR::ABL1*, com peso molecular de 210kDa) ou menor tamanho (p190 *BCR::ABL1*, com 190 kDa).

O rearranjo *BCR::ABL1* é associado com duas distintas neoplasias malignas hematológicas: A Leucemia Mieloide Crônica, associada à *BCR::ABL1* p210 e a Leucemia Linfoblástica Aguda, relacionada à p190. Embora exista essa forte associação entre o peso molecular e o subtipo de leucemia resultante, em alguns casos de LLA B podem ser encontradas proteínas *BCR::ABL1* p210 (Bernt; Hunger, 2014).

A LLA B associada com rearranjo *BCR::ABL1* é um subtipo chamado LLA B Ph+, que corresponde a 3 a 5% das LLA B na infância e que se torna mais frequente com o aumento da idade. Em adultos, a LLA B Ph+ é encontrada em 25% dos casos de LLA B (Kurzrock *et al.*, 2003).

Clinicamente, a LLA Ph+ manifesta-se de forma semelhante aos subtipos de LLA com outras alterações citogenéticas. O diagnóstico é feito através da identificação da t(9;22) por citogenética convencional ou FISH ou pela identificação do transcrito da fusão *BCR::ABL1* através de técnicas de RT-PCR.

Antes da utilização de medicamentos inibidores de tirosina quinase (TKI – tyrosine kinase inhibitor), o prognóstico da LLA Ph+ era extremamente desfavorável



(Bleckmann; Scharppe, 2016) e o tratamento proposto para os pacientes com LLA B Ph+ em primeira remissão era o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). Nos anos 90, as taxas de sobrevida livre de evento (SLE) em 7 anos eram inferiores a 40% (Aricò *et al.*, 2000, 2010; Gaynon *et al.*, 2000).

A partir da primeira década do século XXI, a utilização de inibidores de tirosina quinase (TKI) no tratamento de primeira linha para pacientes com LLA B Ph+ possibilitou uma melhora nas taxas de resposta e sobrevida dos pacientes (Bleckmann; Schrappe, 2016; Hunger *et al.*, 2023), mas elas ainda são piores quando comparadas aos outros subgrupos de LLA B (70% a 80%) (Schultz *et al.*, 2009, 2014; Biondi *et al.*, 2012, 2018; Hunger; Carroll; Camitta, 2014; Ghazavi *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2020; Malczewska *et al.*, 2022).

1.9.5 LLA Ph “like”

A LLA Ph like, é um subgrupo de leucemia que se caracteriza por apresentar um perfil de expressão gênica e características fenotípicas semelhantes às apresentadas pelos pacientes com LLA Ph+, apesar de não possuírem a fusão *BCR::ABL1* ou outra alteração molecular específica (Arber *et al.*, 2016). Foi reconhecida como subgrupo de LLA B na Classificação de Leucemias da OMS de 2016.

A LLA Ph like é mais comum em adolescentes e adultos. Sua prevalência na faixa etária pediátrica é de cerca de 12% e aumenta com a idade. Está associada com maior contagem de leucócitos no momento do diagnóstico, falha terapêutica, positividade de DRM no fim da indução e taxas de SLE em 5 anos inferiores a 60% (Den Boer *et al.*, 2009 ; Loh *et al.*, 2013 ; Herold *et al.*, 2017).

Devido à diversidade de alterações genéticas relacionadas à LLA Ph like, há uma tentativa de subclassificar esse subtipo de leucemia de acordo com as vias de sinalização envolvidas, mas ainda não existe um sistema de classificação uniforme para pacientes com LLA Ph like (Figura 5).

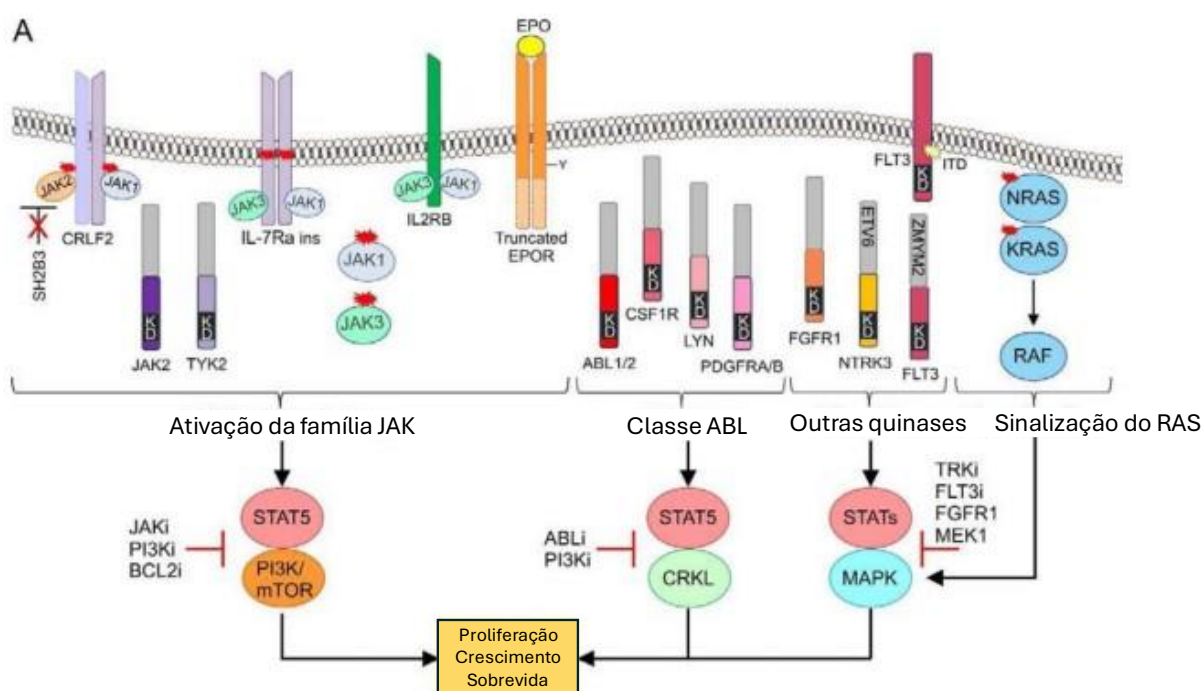


Figura 5 - Alterações de quinases e vias de sinalização desreguladas na LLA Ph like.

A maioria das alterações de quinases e de receptores de citocinas convERGem para duas vias que ativam membros da via JAK de sinalização ou de sinalização ABL. As alterações que ativam a via JAK-STATE podem ser atingidas com inibidores de JAK e PI3K. As alterações da classe *ABL* podem ser corrigidas com inibidores da classe *ABL*, como o Dasatinib. Outras alterações de quinase que ativam a via de sinalização RAS podem ser coibidas com inibidores de TRK, FLT3, FGFR1 e MEK da via MAPK. Fonte: Mullighan, 2019.

Podem ser considerados quatro principais grupos de alterações encontradas na LLA Ph like: Mutações que ativam as vias de sinalização *JAK-STAT*; fusões da classe *ABL*; alterações nas vias de sinalização do *RAS* e alterações menos comuns que envolvem outras quinases (



Quadro 11) (Roberts *et al.*, 2012, 2014; Tasian; Low; Hunger, 2017).

Quadro 11 - Alterações genéticas em pacientes com LLA Ph like

Vias ativadas	Alterações	Frequência
Via <i>JAK-STAT</i>	Rearranjo do CRLF (<i>P2RY8::CRLF2</i> ou <i>IGH::CRLF2</i>) Mutações <i>CRLF2</i> (<i>CRLF2 F232C</i>)	50% dos casos de LLA Ph like
	Fusões do <i>JAK2</i> Rearranjos <i>EPOR</i> transmembrana)	10 a 15% dos casos de LLA Ph like
	<i>IL7R</i> (inserções ou deleções no domínio transmembrana) Deleção ou mutação no <i>SH2B3</i> <i>IL2RB</i> , ou <i>TYK2</i> , presente em menor quantidade de casos.	5-10%
Rearranjo na classe <i>ABL</i>	<i>ABL1</i> <i>ABL2</i> <i>CSF1R</i> <i>PDGFRA</i> e <i>PDGFRB</i>	15% a 20%
Alterações nas vias de sinalização do <i>RAS</i>	<i>NRAS</i> <i>KRAS</i> <i>PTPN11</i>	
Outras alterações de quinase	<i>FLT3</i> <i>NTKR3</i> <i>FGFR1</i>	

(Tran; Tasian, 2022) (Roberts *et al.*, 2014) (Maese; Tasian; Raetz, 2017) (Mullighan, 2019)

Uma característica importante nas LLA Ph like é a elevada frequência de alterações nos genes *IKZF1* (70 a 80% dos casos) e *PAX5* (30%) (Roberts *et al.*, 2014, 2018). Frequentemente, essas alterações ocorrem concomitantemente (Ou *et al.*, 2016).

O amplo espectro de alterações de ativação de quinases, a natureza críptica dessas aberrações genéticas na citogenética convencional, e a complexidade dos exames utilizados atualmente para a identificação desse subtipo de leucemia, fazem do diagnóstico da LLA Ph like um grande desafio. Assim como ocorre em relação à classificação, ainda não foi desenvolvido um protocolo universal para diagnóstico de LLA Ph like (Tran; Tasian, 2022).



A evolução clínica dos pacientes com LLA Ph like tratados com quimioterapia convencional é insatisfatória. A identificação de ativação de proteínas quinase específicas, possíveis alvos terapêuticos, o exemplo de sucesso observado em pacientes com LLA Ph + e a demonstração de atividade anti-leucêmica de inibidores da via *JAK* ou da classe *ABL* têm motivado a realização de estudos com a utilização de diferentes inibidores de tirosina quinase no tratamento de pacientes com LLA Ph like (Harvey; Tasian, 2020; Moorman *et al.*, 2020).

1.9.6 Rearranjos no *KMT2A*

Rearranjos no gene *KMT2A*, localizado no cromossomo 11q23 podem ser vistos tanto em leucemias linfoides, como mieloides. A LLA B com rearranjo no *KMT2A* se caracteriza por apresentar fenótipo de células pró B CD10 negativas, com coexpressão de marcadores mieloides (Emerenciano *et al.*, 2013).

O rearranjo no gene *KMT2A*, está fortemente relacionado à leucemia aguda em crianças com menos de 1 ano de idade (LLA “infant”), sendo encontrado em 75 a 80% das leucemias nessa faixa etária e confere um comportamento agressivo à doença, com taxas de sobrevida livre de evento em 5 anos de 30 a 40% (Brown; Pieters; Biondi, 2019; Inaba; Pui, 2021).

Em crianças com mais de ano, a presença de rearranjos no *KMT2A* é menos comum e o prognóstico dos pacientes é melhor quando comparado aos lactentes. Em alguns casos, o pior prognóstico está associado à presença concomitante das mutações em *FLT3*, *NF1* e *KRAS* (Andersson *et al.*, 2015; Inaba; Pui, 2021).

1.9.7 Rearranjo *ETV6::RUNX1*

É uma das alterações genéticas indutoras de leucemogênese mais comuns em LLA B. O rearranjo *ETV6::RUNX1* está presente em 25 a 30% das LLA B em crianças e é relacionado com excelente prognóstico e taxas de sobrevida global em 5 anos superiores a 95% (Jeha *et al.*, 2021; 2022).

Apesar da alta prevalência da fusão *ETV6::RUNX1* na LLA B pediátrica, a fusão é encontrada em cerca de 5% do recém-nascidos (Schäfer *et al.*, 2018) e, por si só, não é responsável por causar a leucemia, sendo necessário um segundo evento pós-natal para completar a transformação leucêmica de células B (Alpar *et al.*, 2015; Rodríguez-Hernández *et al.*, 2017).



Estudos recentes demonstraram que o bom prognóstico associado com a fusão *ETV6::RUNX1* permanece mesmo quando associado com outras alterações genéticas (Enshaei *et al.*, 2013; Moorman, 2016).

1.9.8 Rearranjo *TCF3::PBX1* – t(1;19)

O rearranjo *TCF3::PBX1* resultante da t(1;19)(q23;p13); é encontrada em 2% a 6% dos casos de LLA B na infância. O gene de fusão *TCF3::PBX1*, considerado uma alteração recorrente em LLA B está presente em aproximadamente 0,6% dos recém-nascidos sadios (Hein *et al.*, 2019).

A partir de sua identificação em pacientes com LLA B, o rearranjo *TCF3::PBX1* foi associado a uma maior probabilidade de recidiva no SNC (Pui *et al.*, 2009). Com a otimização do tratamento direcionado ao SNC (quimioterapia intra-tecal precoce e mais frequente no protocolo total XVI) e com a intensificação dos tratamentos quimioterápicos (metotrexato e citarabina em altas doses), a incidência de recidiva no SNC nesse subgrupo de pacientes foi reduzida (Jeha *et al.*, 2019). Atualmente, pacientes com LLA B *TCF3::PBX1* apresentam um prognóstico intermediário com taxas de SLE de 84% (Ghazavi *et al.*, 2015). No Japão, foi demonstrado que pacientes com *TCF3::PBX1* apresentaram excelente evolução após 1 ano de tratamento intensivo, com taxa de sobrevida livre de doença em 10 anos igual a 90,9% (Kato *et al.*, 2017).

1.9.9 LLA *ETV6::RUNX1* “like”

Nesse subgrupo de LLA, observado em 2 a 3% das LLA B da infância, as células blásticas apresentam imunofenótipo (CD27 +, CD44 baixo ou negativo) e padrão de expressão gênica semelhante à LLA B com fusão *ETV6::RUNX1*, apesar de não apresentarem a fusão gênica. A maioria dos casos acontece em crianças e adolescentes e se apresenta com idade média semelhante à observada no subgrupo de LLA *ETV6::RUNX1*, de 3 a 5 anos de idade (Lilljebjörn *et al.*, 2016; Zaliova *et al.*, 2017).

Apesar de apresentarem um perfil de expressão gênica semelhante ao dos pacientes com a fusão *ETV6::RUNX1*, os pacientes incluídos no grupo *ETV6::RUNX* like apresentam evolução desfavorável, estando entre os grupos com maiores índices



de recidiva (Jeha *et al.*, 2021) e com taxas de SLE em 5 anos de 66,7%. Para esse subgrupo, deve-se considerar tratamento de maior intensidade (Alghandour; Sakr; Shaaban, 2023).

1.9.10 Rearranjo *IGH::IL3* – t(5;14)

A LLA B associada ao rearranjo *IGH::IL3*, resultante da t(5;14)(q31.1;q32.3), foi reconhecida pela classificação da OMS em 2017. Nesses casos, ocorre hiper expressão do gene *IL3* devido sua justaposição com o gene *IGH* (potencializador), ocasionando produção aumentada da interleucina 3 e subsequente eosinofilia. Esse tipo de leucemia é raro, sendo mais comum em adolescentes e adultos jovens e observada em menos de 1% dos casos da LLA B pediátrica. Acomete com maior frequência pacientes do sexo masculino e manifesta-se com hipereosinofilia e reduzida contagem ou ausência de blastos no sangue periférico, o que pode dificultar o diagnóstico. A LLA B com *IGH::IL3* está associada a uma maior incidência de deleção no *IKZF1* (40%) e taxas de sobrevida extremamente reduzidas (6/14 pacientes, correspondente a 27-30%) (Fournier *et al.*, 2019; McClure *et al.*, 2020).

1.9.11 Outras alterações na LLA B

Com o advento de novas tecnologias de metodologias de diagnóstico, cada vez mais alterações genéticas e moleculares estão sendo descritas em pacientes com LLA B (Quadro Suplementar 1).

São escritas alterações nos genes: *IKZF1*, *DUX4*, *ERG*, *MEF2D*, *NUTM1*, *PAX5*, *ZNF384*, *CDKN2A*.

Alterações no *IKZF1*

O *IKZF1* é um gene localizado no cromossomo 7 (7p12,2) que codifica o fator de transcrição IKAROS que está envolvido com os processos de hematopoiese, diferenciação e proliferação celular de todas as linhagens linfoides, especialmente na ativação de desenvolvimento de células B (Stanulla; Cave; Moorman, 2020).

As alterações no *IKZF1* são encontradas em 15% dos pacientes pediátricos e em 40 a 50% dos pacientes adultos com LLA B e são altamente prevalentes nos subgrupos de pacientes com LLA Ph+ (85%) e LLA Ph like (70%) (Schwab *et al.*, 2013).

Aberrações envolvendo o gene *IKZF1* em pacientes com LLA B, estão associadas a valores elevados de doença residual mínima (DRM), elevadas taxas de recidiva, resistência à terapêutica com medicamentos inibidores de tirosina quinase e menores taxas de sobrevida. (Figura 6) (Marke; Van Leeuwen; Scheijen, 2018; Moreira *et al.*, 2019; Stanulla; Cave; Moorman, 2020).

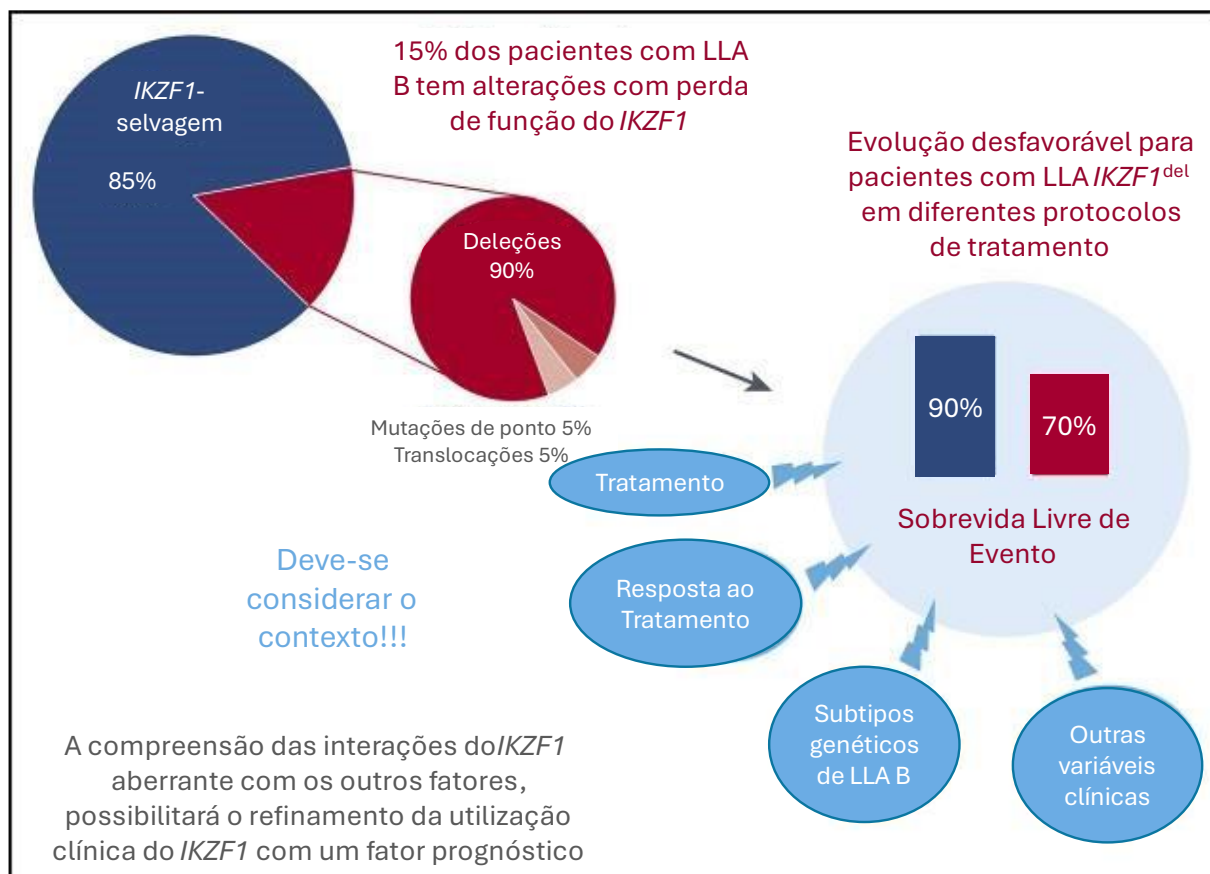


Figura 6 - Alterações no gene *IKZF1* em LLA
Fonte: Stanulla; Cavé; Moorman, 2020.

Entre as alterações envolvendo o gene *IKZF1*, a deleção é a alteração mais comum, observada em 90% dos casos. As deleções completas constituem mais que 55% das deleções do *IKZF1*. A deleção focal dos exons 4-7 é observada em 33% dos casos de deleção do *IKZF1*. (Agarwal; Seth; Chatterjee, 2021). Pacientes com deleção focal dos exons 4-7 apresentam um fenótipo de LLA B mais agressivo que o observado nos pacientes com haploinsuficiência, e isso decorre de um efeito dominante sobre o alelo não mutado, resultando na perda de sua função de supressão tumoral (Quadro 12) (Zaliova *et al.*, 2019).

Quadro 12 - Alterações no gene *IKZF1* em pacientes com LLA

Alteração	Frequência	Subtipos	Referência
Deleções	90%	33 a 55% del 1-8 29% del 4-7 4% del 2-4 7% del 2-3 10% del 4-8 6% del 2-8 5% del 1	Mullighan <i>et al.</i> , 2009 Zaliova <i>et al.</i> , 2019 Agarwal; Seth; Chatterjee., 2021
Mutação de ponto	5% • 10% nas LLA Ph+ • 1% nas LLA Ph-		Mullighan <i>et al.</i> , 2009
Translocações	5%	<i>IKZF1::PRDM16</i> , <i>IKZF1::NUMT1</i> <i>IKZF1::ETV6</i> , <i>IKZF1::CDK2</i> , <i>IKZF1::ZEB2</i> , <i>IKZF1::SETD5</i> , <i>IKZF1::STIM2</i>	Gu <i>et al.</i> , 2019

Em 10% dos casos de LLA Ph+ e em aproximadamente 1% dos casos de LLA não Ph + que apresentam alterações no *IKZF1*, são observadas mutações de ponto, que causam anulação de função do *IKZF1*. Essas alterações exercem o mesmo efeito negativo sobre o prognóstico que o apresentado pelas deleções (Quadro 12).

A coexistência de deleções do *IKZF1* com deleções dos genes *CDKN2A*, *CDKN2B* ou *PAX5* ou com a deleção da região PAR1 na ausência de deleção do *ERG* dá origem a subgrupo com prognóstico desfavorável nos pacientes com LLA B e que apresentam maior frequência de positividade de DRM após o tratamento de indução. A esse subgrupo é dado o nome de *IKZF1*^{plus} (Ikaros plus). (Stanulla *et al.*, 2018). A intensificação do tratamento pode reduzir o efeito adverso provocado pela associação da deleção de *IKZF1* com alteração de *PAX5* (Yeoh *et al.*, 2018).



Nem sempre a deleção de *IKZF1* implica em prognóstico desfavorável e justifica intensificação do tratamento. A presença de alterações genéticas de bom prognóstico, como hiperdiploidia e *ETV6::RUNX1*, atenuam o impacto negativo da deleção do *IKZF1* (Zaliova *et al.*, 2014; Yeoh *et al.*, 2018).

Alterações PAX5

PAX5 é gene um membro da família PAX, que engloba fatores de transcrição envolvidos com o controle de diversos processos do desenvolvimento celular. O *PAX5* é predominantemente expresso em precursores de células B e codifica uma proteína ativadora específica que controla a identidade dos linfócitos B durante o desenvolvimento das células B desde o estágio pro-B até a célula B madura, atuando nos processos de comprometimento da linhagem celular, diferenciação e manutenção das células.

Os estudos genômicos apontam o *PAX5* como um dos genes mais comumente afetados na LLA B, com alterações no gene sendo identificadas em aproximadamente um terço dos pacientes pediátricos ou adultos (Mullighan *et al.*, 2007) (Familiades *et al.*, 2009 ; Gu *et al.*, 2019 ; Crepinšek *et al.*, 2024).

São descritas diversas alterações genéticas envolvendo o *PAX5*, incluindo rearranjos gênicos, deleções, amplificações focais intragênicas, translocações, mutações pontuais e sequências variantes. Evidências recentes sugerem que as alterações no *PAX5* podem representar eventos indutores da leucemogênese (drivers) e não somente simples eventos secundários (Gu *et al.*, 2019; Jung *et al.*, 2020).

Atualmente, distinguem-se dois subgrupos de LLA B de acordo com as alterações no gene *PAX5*: um primeiro denominado *PAX5* alterado, caracterizado por diversos rearranjos, mutações de sequência ou amplificação intragênica, mais prevalente em crianças e adultos jovens (10% contra 7% em adultos). Um segundo grupo, *PAX5P80R*, caracterizado pela presença de uma mutação inativadora e deleção do outro alelo, indicando a perda de função em ambos os alelos. Esse subtipo de LLA B acomete cerca de 5% dos adultos com LLA B e está associada com prognóstico intermediário a favorável (Passet *et al.*, 2019; Mullighan, 2019), embora apresentem taxas de sobrevida global inferiores quando comparados aos pacientes sem a mutação *PAX5P80R* (Jung *et al.*, 2020).

Pacientes com alteração no *PAX5* (B-other) apresentam evolução intermediária (Jung *et al.*, 2020). Entre os pacientes com LLA B hiperdiplóide, a presença de



duplicação no *PAX5* foi associada a maiores valores de DRM no fim da indução e a piores taxas de SLE (Crepinšek *et al*, 2024).

Alterações no *ERG*

O gene *ERG* exerce uma função na diferenciação hematopoiética, megacariopoiese e leucemia megacarioblástica associada com a Síndrome de Down.

Deleções do *ERG* estão presentes em 3 a 7% das LLA B e ocorrem quase exclusivamente no subgrupo de LLA B classificado como “B-others”, definido pela ausência de alterações genéticas rotineiramente testadas. A deleção do *ERG* está associada com maior idade (idade média de 7 anos) expressão aberrante de CD2 e maior frequência de deleção do *IKZF1* Δ 4-7 (Clappier *et al.*, 2014). A *delERG* exerce impacto positivo sobre a evolução da LLA B e, quando associada com a *delIKZF1* Δ4-7, a *delERG* anula o impacto negativo sobre o prognóstico da deleção do *IKZF1*, sendo por esse motivo considerada um marcador de exclusão para a classificação do subtipo *IKZF1*^{plus}.

Os primeiros estudos de perfil de expressão gênica da LLA (leucemia linfoblástica aguda) mostraram que pacientes com *delERG* apresentam um perfil de expressão gênica típico, provavelmente representando um novo subtipo biológico de LLA B. Este novo subtipo de LLA foi confirmado e caracterizado por vários estudos recentes, que também revelaram seu fundo genético comum, ou seja, rearranjos do gene *DUX4* (*DUX4r*). O gene *ERG* foi identificado entre os alvos diretos do *DUX4* na LLA-*DUX4r*. O *DUX4* desregula a transcrição do gene *ERG* de maneira complexa e o torna mais propenso a deleções por induzir mudanças na conformação da cromatina (efeito epigenético) (Zaliova *et al.*, 2019).

O comportamento biológico da LLA B em pacientes que apresentam alterações e desregulações na transcrição do *ERG* (que podem ser induzidas por diferentes alterações genômicas), independente da presença da mutação, é semelhante ao observado nos casos de *delERG*, e tem sido sugerido que esse subtipo de leucemia seja caracterizado pela desregulação de transcrição do *ERG*, independente da presença de deleção (Siddique *et al*, 1996; Zhang *et al.*, 2016).

LLA B com alterações no *DUX4/ERG* é associada com evolução favorável independente da presença de outras alterações genéticas associadas, como descrito em relação à deleção no *IKZF1* (Zhang *et al.*, 2016).



Mutações no *FLT3*

O *FLT3* (FMS like tirosina quinase 3) é um gene que codifica um receptor de tirosina quinase expresso na medula óssea, especialmente em células precursoras hematopoiéticas (Annesley; Brown, 2014). Ele está associado aos processos de proliferação, diferenciação e sobrevivência de células precursoras hematopoiéticas, cuja ativação tem potencial oncogênico bem estabelecido (Rosnet; Birnbaum, 1993).

Mutações do *FLT3* são descritas em diversas neoplasias hematológicas, (Griffith *et al.*, 2016; SPITZER *et al.*, 2021; VU *et al.*, 2006) especialmente nas Leucemias Mieloides Agudas (LMA), onde estão presentes em 20 a 30% dos pacientes e estão associadas a evolução desfavorável. O desenvolvimento de medicamentos inibidores de *FLT3* e a incorporação desses medicamentos aos protocolos de tratamento para pacientes com LMA proporcionaram melhora nas taxas de sobrevida livre de doença e de sobrevida livre de recidiva (Kottaridis *et al.*, 2001 ; Thied *et al.*, 2002 ; Meshinchi *et al.*, 2006; Pollard *et al.*, 2022 ; Federov *et al.*, 2023).

Existem quatro principais tipos de mutação ativadoras no gene *FLT3* associados às leucemias: Duplicações in tandem no domínio justa-membrana (*FLT3*-ITD / internal tandem duplication), inserções ou deleções no domínio justa-membrana (*FLT3* JM-INDEL), mutações de ponto do domínio justa-membrana (*FLT3* JM-PM) e mutações no domínio de tirosina quinase (*FLT3*-TKD / tyrosine kinase domains) (Zhang *et al.*, 2020)

Em pacientes com LLA B, as mutações no *FLT3* são menos frequentes (0,2 a 12,5%) e o impacto prognóstico dessas mutações não é bem estabelecido. (Taketani *et al.*, 2003 ; Armstrong *et al.*, 2004 ; Eyamany *et al.*, 2014 ; Gutierrez-Camino *et al.*, 2023). Elevados níveis de expressão de *FLT3* são descritos em pacientes com LLA B, especialmente nos subtipos com rearranjo de *KMT2A* e hiperdiploidia e alguns estudos sugerem associação entre os níveis de expressão de *FLT3* e o prognóstico dos pacientes (Armstrong *et al.*, 2001; Stam *et al.*, 2007 ; Garza-Veloz *et al.*, 2015; Reshmi *et al.*, 2017; Poubel *et al.*, 2019 ; Gutierrez-Camino *et al.*, 2024).

O *FLT3* é considerado um possível gene associado com a origem da LLA Ph like (Mullighan, 2019).

Rearranjo no *ZNF384*



O rearranjo *ZNF384* (*ZNF384-r*) foi recentemente descrito como uma anormalidade genômica recorrente em LLA, com características biológicas e clínicas distintas. O gene *ZNF384* codifica uma proteína do tipo C2H2 com potencial atividade de fator de transcrição. Pacientes com rearranjos no gene *ZNF384* podem apresentar diferentes fenótipos de leucemias, incluindo LLA B (com ou sem expressão de marcadores mieloides aberrantes) e leucemias de de fenótipo misto (B/mieloide). São descritos rearranjos no *ZNF384* em aproximadamente 2% a 5% das LLA B em crianças, 5,7% a 20,1% dos casos de LLA B em adultos e em 48% dos casos de leucemias agudas de fenótipo misto (Liu *et al.*, 2016 ; Alexander, 2014; Zaliova *et al.*, 2019 ; Hirabayashi *et al.*, 2021).

Na LLA B o *ZNF384* pode ser fundido com 22 diferentes genes parceiros, incluindo *EP300*, *TCF3*, *TAF15* e *CREBBP*, mas independente do gene associado, as fusões dão origem a este subtipo de leucemia, definido por uma assinatura de expressão genética comum. Entretanto, existem evidências que sugerem que o gene parceiro possa estar associado a características demográficas e que podem influenciar a evolução clínica, especialmente no caso do rearranjo *EP300::ZNF384*, relacionado a menor risco de recidiva.

Embora cerca de 30% dos pacientes com *rZNF384* sejam classificados como grupo de alto risco (Hirabayashi *et al.*, 2021) a sobrevida global em 5 anos desse subgrupo de pacientes é relativamente alta para e a maioria dos estudos reconhece essa alteração como fator de bom prognóstico (McClure *et al.*, 2018 ; Hirabayashi *et al.*, 2021; Qin *et al.*, 2021 ; Wang *et al.*, 2022).

Rearranjos no *TCF3*

Em menos de 1% das LLA B de crianças, observa-se a t(17;19)(q22;p13.3), que dá origem ao gene de fusão *TCF3::HLF* e está associada a um prognóstico pior. Alterações no *PAX5*, *VPREB1* e aberrações nos genes da via *RAS*, podem estar associadas com a fusão *TCF3::HLF*. (Ghazavi *et al.*, 2015; Inaba; Pui, 2021)

1.10 Definições em LLA

Algumas definições são importantes para o seguimento dos pacientes com LLA e para nortear as decisões em relação à intensidade do tratamento, à sua continuidade e, nos casos de recidiva, à retomada de nova linha de tratamento:

Remissão completa (RC): é definida como a situação na qual não há evidência



de células blásticas no sangue periférico, medula óssea e sítios extramedulares. Segundo o consenso Ponte di Legno de 2022, a Remissão Completa é definida por avaliação morfológica M1 ($< 5\%$ de blastos em na MO), DRM $< 1\%$, SNC 1 e normalização do exame clínico, em caso de doença extramedular (Buchmann *et al.*, 2022).

Falha indutória (FI): situação em que não há remissão completa após a indução (avaliação morfológica com $> 5\%$ de blastos ou DRM $> 1\%$)

Remissão com persistência de DRM: Nesses casos, os pacientes preenchem critérios de remissão completa segundo o consenso Ponte di Legno, mas são identificadas células blásticas remanescentes através da avaliação da DRM. Geralmente, nessas situações os pacientes são direcionados para intensificação do tratamento.

Falha terapêutica ocorre quando não se consegue atingir remissão completa. O consenso Pont di Legno sugere que a falha terapêutica seja definida após a consolidação para que se possa permitir ao paciente que não atingiu RC após a indução seja tratado com medicamentos não administrados durante a indução com o intuito de superar a resistência das células blásticas e dar ao paciente uma “chance” para atingir a remissão completa antes que seja feita uma drástica mudança na intensidade do tratamento (Buchmann *et al.*, 2022).

Recidiva é caracterizada pela identificação de células blásticas no sangue periférico, medula óssea ou sítios extramedulares de pacientes que haviam atingido previamente a RC. De acordo com o sítio de acometimento leucêmico, a recidiva pode ser classificada como isolada medular (envolvimento exclusivo de MO); isolada extramedular (SNC, testicular, outros sítios extramedulares) ou combinada (acometimento de MO e extramedular). Segundo o consenso Ponte di Legno, a recidiva deve ser definida através de técnica validada de aferição de DRM, com clara evidência de $\geq 1\%$ de blastos leucêmicos na MO (Quadro 13, Quadro 14 e Quadro 15).

Quadro 13 - Critérios para definição de recidiva medular em LLA pediátrica (DRM avaliável). Consenso Ponte di Legno (2022).

1ª amostra de MO		2ª amostra de MO*
DRM	Outro**	DRM
$\geq 25\%$	Não necessário para definição de recidiva	Não necessário para definição de recidiva
5 a $<25\%$	Um outro teste com $\geq 1\%$ de blastos	Não necessário para definição de recidiva



5 a <25%	Nenhum	Dois testes com $\geq 1\%$ de blastos
1 a < 5%	Dois outros testes com $\geq 1\%$ de blastos	Não necessário para definição de recidiva
1 a < 5%	Nenhum ou 1 outro teste com $\geq 1\%$ de blastos	Dois testes com $\geq 1\%$ de blastos

*Segunda amostra de MO deve ser realizada com uma ou mais semanas de intervalo

**FISH, cariótipo, PCR demonstrando marcados leucêmico específico ou morfologia M2/M3.
(Buchmann *et al.*, 2022)

Quadro 14 - Critérios para definição de recidiva medular em LLA pediátrica (DRM não avaliável)
Consenso Ponte di Legno (2022)

1ª amostra de MO		2ª amostra de MO*
Citomorfolgia	Outro**	DRM
M3 ($\geq 25\%$)	Não necessário para definição de recidiva	Não necessário para definição de recidiva
M2 (5 a <25%)	Um outro teste com $\geq 1\%$ de blastos	Não necessário para definição de recidiva
M2 (5 a <25%)	Nenhum	M2
M1	Dois outros testes com $\geq 1\%$ de blastos	Não necessário para definição de recidiva

*Segunda amostra de MO deve ser realizada com uma ou mais semanas de intervalo

**FISH, cariótipo, PCR demonstrando marcador leucêmico específico.
(Buchmann *et al.*, 2022)

Quadro 15 - Critérios para definição de recidiva no SNC em LLA pediátrica.
Consenso Ponte di Legno (2022)

CSF 1	CSF 2	
Citomorfolgia	Citomorfolgia	Outros
SNC 3	Não necessário para definição de recidiva	Não necessário para definição de recidiva
SNC 2	SNC 2	Outro teste positivo

*Segunda amostra de LCR deve ser realizada com uma ou mais semanas de intervalo

**Citomorfolgia, imagem ou biópsia.
(Buchmann *et al.*, 2022)



1.11 Tratamento da LLA

Apesar da diferença entre os protocolos utilizados, em geral, o tratamento da LLA B é baseado na quimioterapia convencional e pode ser dividido em diferentes fases: indução de remissão, consolidação (que pode incluir fases de intensificação, re-indução ou intensificação tardia) e manutenção. O tempo de duração do tratamento que varia de 2 a 3 anos (Capria *et al.*, 2020; Malard; Mohty, 2020; Jedraszek *et al.*, 2022).

Além da poliquimioterapia intensiva, a terapia direcionada à profilaxia e tratamento (em casos de infiltração documentada) da leucemia no SNC é um importante componente do tratamento. O uso de radioterapia craniana e de coluna (atualmente abolido em diversos protocolos de tratamento), a administração de quimioterápicos pela via intra tecal e o uso de metotrexato e citarabina em altas doses são as ferramentas adotadas para a prevenção e tratamento da infiltração do SNC pelas células leucêmicas (Capria *et al.*, 2020).

Um fundamento no manejo de crianças com LLA é a estratificação dos pacientes em diferentes grupos de risco (baseados no risco de recidiva da doença) e a adequação da intensidade do tratamento de acordo com a gravidade da doença. Para a estratificação de risco, são considerados fatores prognósticos (clínicos e laboratoriais) e a avaliação de resposta ao tratamento, pela identificação de DRM em momentos específicos do tratamento.

A indução é a fase inicial do tratamento e tem por objetivo atingir a remissão completa (RC), que é definida pela eliminação de células blásticas do sangue periférico, medula óssea e sítios extramedulares. Tem uma duração que varia de 4 a 6 semanas entre os diferentes protocolos de tratamento. Com a combinação de vincristina, antracíclico (daunorrubicina), corticosteróide e asparaginase, 95% pacientes atingem remissão. A falha indutória, ocorre em 2 a 3% dos pacientes com LLA na infância e é um dos mais importantes fatores de mau prognóstico da doença (Schrappe *et al.*, 2012; Malczewska *et al.*, 2022).

Após a remissão, o tratamento inclui 4 a 6 meses de quimioterapia intensiva que tem por objetivo consolidar a remissão e prevenir a ocorrência de recidiva de SNC. O uso de metotrexato em altas doses é um dos pilares dessa fase do tratamento (Abromowitch *et al.*, 1988; Malczewska *et al.*, 2022).

Após 6 a 8 meses de tratamento com quimioterapia intensiva os pacientes



recebem tratamento de manutenção baseado no uso de antimetabólitos em baixas doses com duração de 18 a 30 meses (Hunger; Mullighan, 2015).

Para o tratamento dos pacientes com LLA Ph+, inibidores de tirosina quinase de uso oral e contínuo são associados à quimioterapia sistêmica convencional.

O quadro abaixo (Quadro 16) apresenta um sumário do tratamento da LLA na infância e no Quadro 17 são apresentados esquemas propostos por diferentes protocolos de tratamento.

Quadro 16 - Tratamento de LLA na Infância

Fase	Medicamentos	Objetivo
<i>Indução</i> (4 a 8 semanas)	Corticóide Daunorrubicina Vincristina Asparaginase QT intra tecal	Erradicar a leucemia Restaurar hematopoiese Atingir remissão completa
<i>Consolidação</i> (2 a 4 meses)	Metotrexato em altas doses Corticóide Citarabina em baixas doses Asparaginase QT Intratecal	Manutenção de remissão Erradicação de doença remanescente Prevenção da infiltração no SNC
<i>Intensificação</i> (4 a 6 semanas)	Corticóide Daunorrubicina Vincristina Asparaginase QT intra tecal	Manutenção de remissão
<i>Manutenção</i> (18 a 24 meses)	Metotrexato baixas doses 6-Mercaptopurina Corticóide Vincristina	Manter remissão Prevenir proliferação de novo clone Prevenir recidiva
Obs: Em pacientes com t(9;22) associação de inibidores de tirosina quinase durante todas as fases do tratamento		

Quadro 17 - Protocolos de tratamento para LLA na infância (medicamentos e taxas de sobrevida)
(continua)

PROTOCOLO	Alterações Genéticas Características de alto risco	Drogas utilizadas na indução	Drogas utilizadas na consolidação	Drogas utilizadas na intensificação	Drogas utilizadas na manutenção e duração	RTX	Cura (%)	Referência
AIEOP BFM ALL 2017	KMT2A::AFF1 TCF3::HLF hipodiploidia sem ETV6::RUNX1 + Rearranjo de KMT2A	Prednisona VCR DNR PEG asp MTX it	Dexametasona Citarabina VCR PEG asp Ciclofosfamida 6-MP MTX i.t.	Dexametasona VCR Doxorrubicina PEG asp Ciclofosfamida TG MTX i.t.	MTX VO 6-MP MTX i.t (cada 6 sem para AR) 74 sem. ♀ e ♂	SNC3 > 4 anos	95%	Schieck <i>et al.</i> , 2020
UK ALL 2011	iAMP21 t(17;19) q(22;p13)/ TCF3::HLF Rearranjo KMT2A Quase haploidia Hipodiploidia	Dexametasona VCR PEG asp. 6-MP MTX it	6-MP MTX i.t. Ciclofosfamida Citarabina VCR PEG asp	Dexametasona VCR Doxorrubicina PEG asp MTX i.t. Ciclofosfamida Citarabina 6-MP	4 Regimes de acordo com risco: dexametasona VCR 6-MP MTX VO MTX i.t. 2 anos ♀ 3 anos ♂	SNC3	91,5%	Jolliffe, 2013
CCG-ALL-2015	t (1;19), t (9;22), Rearranjo KMT2A Hipodiploidia iAMP21 Fusão BCR::ABL1 Fusão E2A-PBX1	Dexa (d1–4) Predn. (d5–28) VCR DNR PEG asp Ciclofosfamida Citarabina 6-MP Tripla IT	HD-MTX 6-MP	Dexametasona VCR DNR Citarabina PEG asp Tripla IT	6-MP MTX VO Tripla IT cada 4- 7sem dexametasona VCR Ciclofosfamida Citarabina 76 sem. ♀ e ♂	SNC3 > 3 anos	90%	Shen, <i>et al.</i> , 2020 Hunger, Mullighan, 2015

AIEOP BFM ALL-2017: International collaborative treatment protocol for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia; UK ALL 2011—United Kingdom National Randomised Trial For Children and Young Adults with Acute Lymphoblastic Leukaemia and Lymphoma 2011; CCG-ALL-2015—Chinese Children Cancer Group Study; JACLS—Japan Association of Childhood Leukemia Study; COG-AALL—Children Oncology Group Protocol
Predin: prednisone; Dexa: dexametasona; VCR: Vincristine; DNR: daunorrubicina; PEG asp: PEG asparaginase; DOXO: doxorrubicina; MTX—Metotrexato; ARA-C: citarabina; it: intra-tecal; CMP—Cyclophosphamide, TG—Tioguanina, 6-MP—6-Mercaptopurine, H-C—Hydrocortisone, CNS—Central Nervous System p.o.—per os, i.t.—intrathecal; VO: via oral
(JEDRASZEK *et al*, 2022)

Quadro 17 - Protocolos de tratamento para LLA na infância (medicamentos e taxas de cura)
(conclusão)

PROTOCOLO	Alterações Genéticas Características de alto risco	Drogas utilizadas na indução	Drogas utilizadas na consolidação	Drogas utilizadas na intensificação	Drogas utilizadas na manutenção e duração	RTX	Cura (%)	Referência
JACLS	t(4;11) ou t(1;19) <i>KMT2A/AFF1</i> Hipodiploidia <i>TCF3::PBX1</i>	Dexa(d8–14) Predn (d15–28) VCR Ciclofosfamida Doxorrubicina PEG asp. MTX D1 Tripla IT	Ciclofosfamida Citarabina Doxorrubicina 6-MP Tripla IT	Prednisone VCR Doxorrubicina CMP Oncaspar Triple IT	98 semanas; 4 fases 1A: MTX VO, 6-MP, Tripla IT 1B: MTX VO; 6-MP Tripla IT; RTX 2: Pred; VCR Ciclofosfamida; PEG asp 3: MTX VO; 6-MP Tripla IT 4: Prednisona; VCR Doxorrubicina; PEG asp	SNC + manut. 1B	96,4%	Hayakawa <i>et al.</i> , 2014
COG-AALL	Fusão <i>BCR::ABL1</i> t(9;22)(q34;q11) Hipodiploidia Rearranjo <i>KMT2A</i>	Dexa VCR PEG asp MTX i.t. ARA-C i.t. DNR	Dexametasona VCR 6-MP MTX VO MTX i.t.	Dexametasona VCR Doxorrubicina Ciclofosfamida Citarabina PEG asp Tioguanina MTX i.t.	Dexametasona 6-MP MTX VO VCR MTX i.t. D1 2 anos ♀ 3 anos ♂	SNC3	95%	Maloney, <i>et al</i> 2020

AIEOP BFM ALL-2017: International collaborative treatment protocol for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia,
UK ALL 2011—United Kingdom National Randomised Trial For Children and Young Adults with Acute Lymphoblastic Leukaemia and Lymphoma 2011,
CCG-ALL-2015—Chinese Children Cancer Group Study,
JACLS—Japan Association of Childhood Leukemia Study,
COG-AALL—Children Oncology Group Protocol
Predin: prednisone; Dexa: dexametasona; VCR: Vincristine; DNR: daunorrubicina; PEG asp: PEG asparaginase; DOXO: doxorrubicina; MTX—Metotrexato; ARA-C: citarabina; it: intra-tecal; CMP—Cyclophosphamide, TG—Tioguanina, 6-MP—6-Mercaptopurine, H-C—Hydrocortisone, CNS—Central Nervous System p.o.—per os, i.t.—intrathecal; VO: via oral
(Jedraszek *et al.*, 2022)



1.11.1 Perspectivas: Terapia Alvo e Imunoterapia

Terapia Alvo

Além dos Inibidores de Tirosina Quinase, outros medicamentos direcionados para alterações moleculares específicas em crianças com LLA B estão sendo estudados.

A via *JAK-STAT* está hiper ativada na maioria dos pacientes com LLA Ph like, especialmente nos casos em que há rearranjos do *CRLF2*. Ruxolitinibe é um inibidor *JAK1/2* que tem sido testado em pacientes com LLA B Ph like.

No estudo total XVII, que se encontra em andamento, os pacientes que apresentam hiperativação da via *JAK-STAT*, recebem Ruxolitinibe na fase de indução (Malczewska *et al.*, 2022).

Baseados na experiência positiva de inibidores de *FLT3* em pacientes com LMA, esses medicamentos podem ser considerados como alternativa terapêutica para casos de LLA B que apresentem mutações ou hiper-expressão do *FLT3* (Elyamany *et al.*, 2014; Sean *et al.*, 2023).

Imunoterapia

Por expressarem marcadores de superfície específicos e que não são expressos em outros tecidos ou células hematopoiéticas (CD19, CD20 e CD22), as células blásticas de linfócitos B são um excelente alvo para a imunoterapia (Inaba; Pui, 2021).

Existem 3 principais categorias de imunoterapia atualmente utilizadas para o tratamento de LLA B na infância: 1. Anticorpos biespecíficos (blinatumumab), 2. Células T quiméricas com receptores antígeno específicos (CAR T cells) e 3. Anticorpos conjugados com drogas (inotuzumab) (Figura 7).

- *Blinatumumabe* é um medicamento com anticorpos modificados que contêm fragmentos que reconhecem os antígenos CD19 (expressos na superfície dos linfócitos B) e CD3 (que está presente nas células T). O blinatumumab serve como uma “ponte”, através da qual as células T citotóxicas são colocadas em contato com células de LLA B, induzindo a morte das células leucêmicas. (Topp *et al.*, 2015; Hogan *et al.*, 2023). Inicialmente indicado para o tratamento de LLA B recidivada, atualmente o uso blinatumumabe tem sido recomendado como componente do tratamento de

primeira linha para pacientes com intolerância ou resistência à quimioterapia (Topp *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2023; Hodder *et al.*, 2023).

- *Terapia com células T quiméricas com receptores de antígeno (CAR T)*

Esse tratamento com células T geneticamente modificadas é atualmente a mais promissora modalidade terapêutica para o tratamento de LLA B refratária ou recidivada. Através de técnicas de engenharia genética, células T do paciente (autólogas) são modificadas com a transdução de anticorpos anti-CD19 ligado a um domínio intracelular de receptores de células T. As células T modificadas são infundidas no paciente e promovem o direcionamento de linfócitos T citotóxicos para reconhecerem e destruírem as células de LLA B (Maude *et al.*, 2014; Malczewska *et al.*, 2021; Boettcher *et al.*, 2022).

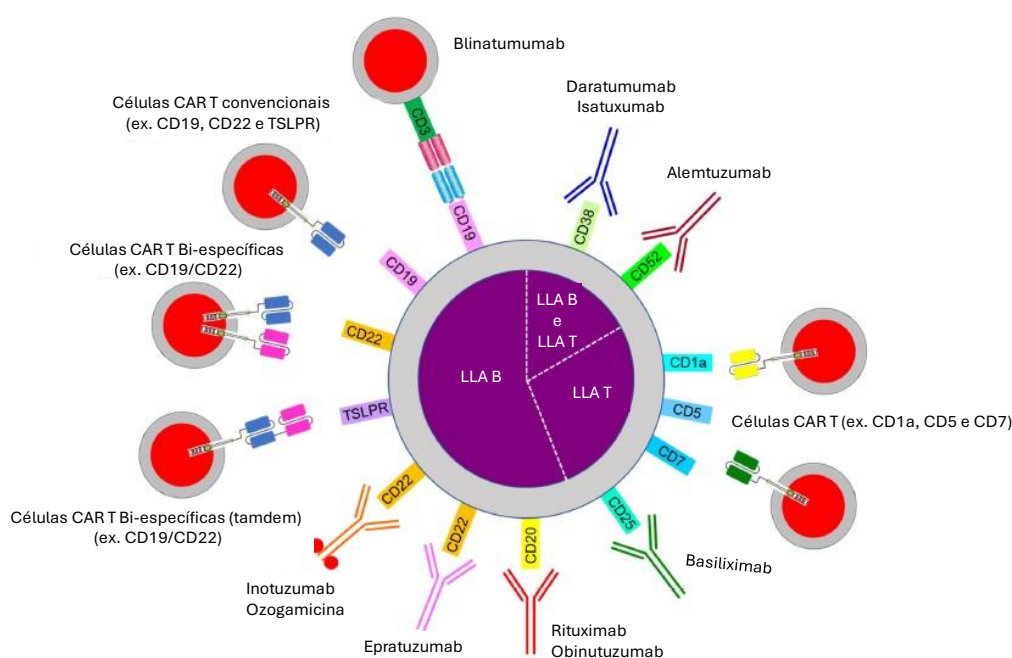


Figura 7 - Imunoterapia na LLA

CAR T: chimeric antigen receptor (receptor quimérico de antígeno); TSLPR: receptor de linfopoietina tímica estromal. Fonte: Inaba; Pui, 2021.

- *Inotuzumab ozogamicina* é um anticorpo anti-CD22 ligado à caliqueamicina, um antibiótico citotóxico antitumoral que causa quebra da dupla fita de DNA. Ele é atualmente aprovado pelo uso em adultos com LLA B refratária ou recidivada. Em estudo fase I com crianças com LLA B recidivada ou refratária, foi observado RC em 80% dos pacientes e 84% deles apresentavam DRM negativa (Brivio *et al.*, 2021).



1.12 Tratamento da LLA no BRASIL

O primeiro protocolo brasileiro multicêntrico para o tratamento de LLA na infância (GBTLI 1980) foi criado em 1980, a partir da criação do Grupo Cooperativo Brasileiro de Tratamento de Leucemia na Infância (GBTLI). (Brandalise *et al.*, 1993). Desde então, foram desenvolvidos 6 protocolos diferentes que proporcionaram diversos avanços incluindo melhora nos processos de diagnóstico, redução das taxas de mortalidade indutória e melhora das taxas de sobrevida livre de evento e de sobrevida global da LLA no Brasil. As taxas de sobrevida global foram de 34% no primeiro protocolo (GBTLI 1980) a 79,3% no protocolo GBTLI 2009 (tabela 1).

A partir do protocolo GBTLI 2009, a aferição da DRM através de técnica simplificada de RT-PCR (Scrideli *et al.*, 2009) ou por citometria de fluxo, foi introduzida como critério para classificação de risco e definição da intensidade do tratamento, caracterizando a velocidade de resposta ao tratamento como um importante fator determinante de prognóstico (PROTOCOLO GBTLI2021).

Em 2021, o GBTLI voltou a se reunir com a intenção de propor novo protocolo de tratamento de leucemias linfoblásticas agudas que pudesse ser adotado pelos centros de tratamento de oncologia pediátrica no Brasil (GBTLI 2021). Um dos pilares para o desenho do novo protocolo é a redução da toxicidade do tratamento, justificada pela observação de que a mortalidade relacionada ao tratamento é um importante fator que compromete as taxas de sobrevida e evolução de pacientes tratados em países com limitações de recursos (Ribeiro *et al.*, 2016).

Além da redução da intensidade do tratamento na fase de indução, o protocolo propõe períodos de redução da intensidade da quimioterapia (“manutenções”) entre os ciclos de quimioterapia intensiva, possibilitando ao paciente períodos de “folga” para melhor recuperação clínica e hematológica. A redução da intensidade no momento inicial do tratamento é compensada por períodos de QT com toxicidade intermediária em fases mais tardias.

A Tabela 1 descreve as taxas de mortalidade indutória e de sobrevida observadas nos diferentes protocolos do GBTLI.



Tabela 1 - Protocolos de tratamento de leucemia linfóide aguda no Brasil

	GBTLI 80 (1980-82)	GBTLI 82 (1982- 85)	GBTLI 85 (1985-88)	GBTLI 93	GBTLI 99	GBTLI 2009 (2009-2017)
Nº pacientes	203	360	431	853	1384	590
Mort.	8,2%		2,6%	3,2%	6,7%	6,2%*
Indutória						
RCC	88,6%		97,9%	95,7%	92,1%	93,4%*
Morte	16,5		5,6	7,5 %	4%	6,21%*
remissão						
SLE	24,8% ± 3 %	58% ± 4%	70% ± 4%	66,1%± 1,7%	67,9%±1,6%	71,5 % ± 2,9% e *
SG	34,1 ± 3,9%		75% ± 2,8%	70 %± 1,6%	71,5%	79,3 %± 2,1% *

* estudo interrompido por desabastecimento nacional da E.coli nativa MEDAC.
(Brandalise *et al.*, 1993, 2016 ; Zenatti *et al.*, 2018 ; Protocolo GTBLI 2021)

1.13 Complicações relacionadas ao tratamento

Apesar de ter modificado sensivelmente a evolução dos pacientes com LLA B, a adoção de protocolos de tratamento com quimioterapia intensiva foi acompanhada por diversas complicações e toxicidades relacionadas ao tratamento que, além de serem responsáveis por parte significativa dos óbitos de pacientes com LLA, comprometem a qualidade de vida dos pacientes (Howard *et al.*, 2004; Torres-Flores *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2022) e provocam a suspensão ou redução das doses dos medicamentos previstos pelos protocolos. Essas modificações do tratamento, podem comprometer a sua eficácia e aumentar a frequência de recidivas (Yildirim *et al.*, 2023).

Entre as complicações agudas durante o tratamento com quimioterapia intensiva, destacam-se quadros infecciosos (principalmente bacterianos, seguidos por infecções fúngicas), eventos hemorrágicos, trombose, toxicidade renal, hepática e endocrinológica. Prevenir, identificar e tratar precocemente essas complicações são parte importante no cuidado do paciente oncológico (Vora *et al.*, 2013; Conter *et al.*, 2014; Hough; Vora, 2017 ; Maloney *et al.*, 2020).

O impacto das complicações infecciosas sobre a evolução dos pacientes com LLA é observado de forma mais expressiva nos países com menores recursos, onde, ao contrário do observado nos países ricos, a intensificação do tratamento não foi acompanhada com incrementos significativos nas taxas de sobrevida (Ribeiro *et al.*, 2016; Pedrosa *et al.*, 2020; Malczewska *et al.*, 2022).



1.14 Justificativa

Os avanços na compreensão da biologia da LLA, a identificação de biomarcadores prognósticos e preditivos de evolução, a estratificação dos pacientes em diferentes grupos de risco e a adaptação do tratamento de acordo com o risco de recidiva, possibilitaram que a LLA se tornasse umas das neoplasias malignas da infância mais curáveis, com taxas de sobrevida global próximas a 90%.

Apesar da possibilidade de cura para a maioria dos casos de LLA, ainda há um subgrupo de pacientes que não respondem adequadamente ao tratamento ou que apresentam recidiva precoce, cujo prognóstico permanece sombrio. No mundo inteiro, os esforços estão direcionados para o refinamento de métodos de diagnóstico, a compreensão de fatores biológicos envolvidos com a leucemogênese e com os mecanismos de resistência às drogas, a identificação de possíveis alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento (imunoterapia e terapia alvo) que possam beneficiar os pacientes com prognóstico reservado (Hunger; Mullighan, 2015; Maese; Tasian; Raetz, 2017; Gotesman *et al.*, 2019; Stanulla; Cave; Moorman, 2020).

Os maiores desafios para o tratamento da LLA, são o manejo os casos de recidiva e a redução das taxas de morbimortalidade relacionadas ao tratamento, que continuam sendo a principal causa de morte relacionada ao câncer de crianças e adultos jovens. Para o desenvolvimento de estratégias de tratamento global da LLA na infância, é necessária uma melhor caracterização genética considerando diferenças étnicas e implementação de regimes adaptados (Pui *et al.*, 2018).

Infelizmente, diversas metodologias utilizadas para a identificação de marcadores biológicos de prognóstico (por exemplo, NGS - “Next-Generation Sequencing”) ainda são um privilégio dos países desenvolvidos e uma realidade muito distante para a países como o Brasil (Iacobucci; Kimura; Mullighan, 2021). O mesmo ocorre em relação ao acesso às novas modalidades de tratamento, como a imunoterapia e terapias alvo.

Tradicionalmente, as marcantes diferenças entre taxas de sobrevida de pacientes com diagnóstico de LLA tratados em países desenvolvidos e países em desenvolvimento, são atribuídas às dificuldades de acesso e pior qualidade da assistência (Ribeiro *et al.*, 2016) (Pedrosa *et al.*, 2020). Entretanto, é necessário melhor caracterização biológica da LLA em diferentes países, pois possíveis



diferenças na evolução, decorrentes de variações étnicas sobre a biologia da leucemia podem estar sendo equivocadamente atribuídas a fatores externos e socioeconômicos (Pui *et al.*, 2018).

Além de não serem acessíveis à grande maioria dos centros de tratamento de oncologia pediátrica do Brasil, muitos exames para caracterização biológica da LLA B não fazem parte do fluxo instituído para o diagnóstico de LLA no país e não são custeados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), responsável pelo financiamento do tratamento da maioria dos casos de câncer pediátrico no Brasil. Consequentemente, pouco se conhece atualmente em relação à prevalência dos diferentes subtipos biológicos de LLA na população brasileira.

Identificar os subtipos de leucemia e suas frequências e avaliar o impacto das diferentes alterações sobre a resposta terapêutica e evolução dos pacientes pode contribuir para um melhor mapeamento da LLA B em uma instituição de referência, de certa forma, representativa da população brasileira. Como consequência, surgem possibilidades para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico das LLA B acessíveis e aplicáveis para instituições do país e a elaboração de planos de tratamento individualizados direcionados às peculiaridades encontradas na população do Brasil.



2 OBJETIVOS

Objetivo Geral: Identificar a associação (correlação) de diferentes marcadores biológicos em pacientes pediátricos portadores de LLA B com as taxas de resposta ao tratamento quimioterápico de indução, definidas pelos valores de doença residual mínima (DRM).

Objetivos específicos:

1. Descrever características epidemiológicas e clínicas dos pacientes com diagnóstico de LLA B no período de julho de 2018 a setembro de 2023 e tratadas no HCB;
2. Determinar as taxas de Sobrevida Global e Sobrevida Livre de Evento (óbito ou recidiva) dos pacientes tratados para LLA B no HCB no período de julho de 2018 a setembro de 2023;
3. Caracterização biológica da LLA B em crianças tratadas no Hospital da Criança de Brasília através da identificação de diferentes subtipos biológicos e comparar as frequências de alterações genéticas e moleculares encontradas em pacientes com diagnóstico de LLA B em um centro de referência de tratamento oncológico do Distrito Federal com a frequência das mesmas alterações em outras localidades do mundo;
4. Correlacionar os subtipos biológicos de LLA B com marcadores de prognóstico, resposta ao tratamento e desfecho clínico;
5. Comparar o perfil de marcadores biológicos apresentados pelos pacientes com evoluções clínicas distintas a fim de identificar potenciais associações com prognóstico e resposta ao tratamento;
6. Identificar a presença de sobreposição de diferentes alterações genéticas e moleculares em um mesmo paciente e avaliar o impacto dessa associação sobre a evolução clínica, especialmente quando uma das alterações encontradas já tenha significado prognóstico documentado pela literatura.



7. Propor um fluxograma para diagnóstico e caracterização biológica de LLA B que possa ser acessível a instituições no Brasil;



3 METODOLOGIA

Estudo analítico, retrospectivo, na área de biologia molecular.

3.1 Critérios de inclusão

Crianças com idade até 18 anos atendidas pelo serviço de Oncologia e Hematologia do HCB e que tiveram diagnóstico estabelecido de LLA B no período de julho de 2018 a setembro de 2023. Autorização pelos responsáveis legais e pelos pacientes através de assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e termo de assentimento livre esclarecido, respectivamente (TALE).

Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do Hospital da Criança de Brasília em 04 de julho de 2021, CAAE 44796221.9.0000.0144 (anexo 1).

Consentimento informado:

A partir dos dados disponíveis no Registro Hospitalar de Câncer, os pacientes elegíveis foram recrutados durante visitas hospitalares para a realização de consultas médicas ou através de ligações telefônicas e atendimento remoto (video conferência). Para contato telefônico, foram utilizadas as informações cadastradas no prontuário eletrônico (telefone, e-mail, endereço, etc).

O termo de consentimento foi apresentado pessoalmente (de forma presencial ou por videochamada) por profissional capacitado para esclarecer os detalhes do estudo e foi aplicado de forma digital com a utilização do software RED Cap.

Foi solicitado dispensa dos TCLE e TALE para os participantes que foram a óbito, pois além de o vínculo dos familiares com a instituição ter sido encerrado, a aplicação da solicitação para a participação em pesquisa poderia gerar um dano emocional importante aos familiares.

Manutenção do sigilo:

Para garantia da preservação do sigilo de todas as informações pessoais, dados clínicos e achados laboratoriais, os pacientes foram identificados pelo número de registro no laboratório de pesquisa translacional e pelo número de identificação do paciente na ferramenta de coleta de dados (software RED Cap).



Os participantes do estudo foram esclarecidos em relação ao direito de buscar indenização em caso de quebra do sigilo médico e violação do direito de privacidade.

3.2 Critérios de exclusão

Pacientes atendidos pelo serviço de Oncologia e Hematologia do HCB com diagnóstico estabelecido de LLA B no período de julho de 2018 a julho de 2023 e com idade inferior a 1 ano de idade, pacientes com Síndrome de Down e pacientes com LLA L3 (Linfoma de Burkitt).

Foram excluídos também os pacientes cujas amostras de medula óssea foram insuficientes ou inadequadas para realização dos exames propostos, pacientes cujos responsáveis recusaram assinar o TCLE, pacientes admitidos com diagnóstico de recidiva ou que já haviam sido submetidos a tratamento prévio para LLA.

3.3 Tamanho amostral

Para caracterização da população de pacientes pediátricos diagnosticados com LLA-B no HCB no período de estudo (5 anos), foi tomado como referência o número de diagnósticos do período anterior ao estudo (2014 a 2018), que foi de 181 (registros da instituição), chegando-se a um número amostral de 63 utilizando-se a fórmula:

$$n = (z^2 \cdot p(1-p)/e^2)/(1+(z^2 \cdot p(1-p)/e^2N))$$

em que n é o número amostral, N é o tamanho da população (181), e é a margem de erro (0,1) e z indica o escore z (nesse caso 1,96, referente ao nível de confiança de 95%).

Dada a frequência histórica de atendimento registrada no HCB, e considerando uma taxa de adesão ao estudo de 60% no período de recrutamento, foi inicialmente estimado uma amostra mínima de 75 pacientes, suficiente, portanto, para descrição apropriada da população no período estudado, mas também para detectar um efeito significativo referente às principais correlações a serem testadas, considerando variâncias moderadas ou testes não paramétricos, com nível de significância de 0,05.



Dessa forma, se estabeleceu um piso amostral, uma vez que quanto maior o número de pacientes incluídos no estudo maior a possibilidade de caracterização de subgrupos específicos quanto aos marcadores moleculares, já que o cálculo amostral preciso não foi exequível nesses casos (principalmente para variáveis numéricas) devido à ausência de evidências prévias ou estudo piloto.

A amostragem do estudo foi realizada por conveniência, pois a incidência de LLA não permite uma ampla janela de recrutamento.

3.4 Diagnóstico da LLA B

O diagnóstico de LLA B foi realizado através da avaliação morfológica de MO e da realização de imunofenotipagem por citometria de fluxo. Para a caracterização inicial da leucemia, foram realizados cariótipo por citogenética convencional e pesquisa de rearranjos recorrentes através da técnica de RT-PCR.

A avaliação da disseminação extramedular foi realizada através da avaliação do líquido céfalo raquidiano (LCR) e do exame clínico dos testículos.

3.4.1 Coleta de material, isolamento de mononucleares e extração de ácidos nucleicos.

As amostras de medula óssea para confirmação do diagnóstico de LLA foram coletadas através de punção aspirativa com agulha específica. O procedimento foi realizado em ambiente de centro cirúrgico sob sedação, com agulha específica para aspirado de MO. Em casos excepcionais (gravidade do paciente) o procedimento foi realizado unidade de terapia intensiva, com sedação ou anestesia local. A punção aspirativa de MO foi realizada em crista ilíaca posterior (preferencialmente) ou anterior.

Imediatamente após a coleta, foram realizados esfregaços para avaliação morfológica e as amostras de aspirado de medula óssea (sangue periférico, em situações de elevada leucometria e gravidade do paciente) foram encaminhadas para o Laboratório de Pesquisa Translacional do HCB para a realização de imunofenotipagem por citometria de fluxo, citogenética (cultivo celular) e para a pesquisa de translocações recorrentes. Os remanescentes das amostras foram utilizados para as análises propostas neste projeto. Portanto, os pacientes não foram



submetidos a procedimentos de coletas adicionais aos previstos pela rotina preconizada para diagnóstico de tratamento.

3.4.2 Isolamento de mononucleares e extração de ácidos nucleicos.

As células mononucleares sanguíneas foram isoladas em gradiente de Ficoll (Ge Healthcare Life Sciences) lavadas em PBS 1X e aliquotadas em dois tubos: um para extração de RNA total pelo método do Trizol® (Invitrogen), destinado à pesquisa de translocações e análise de expressão gênica, e um segundo para extração de DNA, destinado às análises de sequenciamento e análises de fragmentos.

O DNA das amostras foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), conforme as instruções dos fabricantes. Após a extração, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e posteriormente acondicionadas a 4°C (amostras de DNA) e -80°C (RNAs) até a realização dos ensaios.

3.4.3 Análise morfológica de MO

Para avaliação morfológica, esfregaços de amostras de medula óssea de pacientes com suspeitas de leucemia aguda foram corados com hematoxilina eosina.

A avaliação morfológica através de microscopia óptica de amostras de medula óssea foi realizada por profissional médico hematologista. O diagnóstico de Leucemia Aguda foi estabelecido quando identificadas 25% ou mais células blásticas no aspirado de medula óssea (FABM3).

Embora as características morfológicas possam sugerir a origem do clone leucêmico, é preconizado que a definição de linhagem leucêmica seja realizada através de imunofenotipagem por citometria de fluxo.

3.4.4 Imunofenotipagem

A imunofenotipagem por citometria de fluxo foi realizada em amostras de MO ou de sangue periférico (em casos de alto leucometria e gravidade clínica) para a confirmação do diagnóstico de LLA e para a aferição de DRM conforme o preconizado pelo protocolo de tratamento (Anexo 4).

A imunofenotipagem foi realizada com citômetro de 8 cores. Os eventos celulares foram adquiridos através do citômetro FACS Canto II (BD) e a análise dos



dados foi realizada com a utilização dos softwares FACS Diva (BD) e Infinicyt (Cytognos versão 2.0) (Van Dogen *et al.*, 2012).

As amostras de MO ou SP de pacientes com suspeita de Leucemia Aguda foram analisadas inicialmente por um painel de triagem, que distingue a linhagem da célula neoplásica (mieloide, linfóide B ou linfóide T). De acordo com a linhagem identificada pelo painel inicial, a amostra foi submetida a análise subsequente, com painel ampliado e específico, para melhor caracterização do clone leucêmico (Quadro 18 e Quadro 19).

Quadro 18 - Painel de anticorpos para triagem de leucemias agudas (08 marcadores)

	FITC	PE	PERCP CY5.5	PE CY7	APC	A. FLUOR 750	PACIFIC BLUE	P. ORANGE
<i>Tubo 1</i>	CD3	MPO	CD34	CD117	CD79a	CD19	CD3	CD45

Quadro 19 - Painel de anticorpos para o diagnóstico de LLA B (25 marcadores)

	FITC	PE	PERCP CY5.5	PE CY7	APC	A. FLUOR 750	PACIFIC BLUE	P. ORANGE
<i>Tubo 1</i>	CD81	CD66c	CD34	CD19	CD10	CD38	CD20	CD45
<i>Tubo 2</i>	CD36	NG2	CD34	CD19	CRLF2	CD38	CD20	CD45
<i>Tubo 3</i>	IgM*	CD22	CD34	CD19	IgM	CD2	CD33 BV421	CD45

*Tubos com Ig utilizar sempre amostras (300ul) lavado 2x com PBS

Para a pesquisa de DRM, foi utilizado outro painel de anticorpos (Quadro 20) (Theunissen *et al.*, 2017).

Quadro 20 - Painel de anticorpos para a detecção de DRM em pacientes com LLA B (18 marcadores)

	FITC	PE	PERCP CY5.5	PE CY7	APC	A. FLUOR 750	PACIFIC BLUE	P. ORANGE
<i>Tubo 1</i>	CD81	CD66c+CD123	CD34	CD19	CD10	CD38	CD20	CD45
<i>Tubo 2</i>	CD81	CD304+CD73	CD34	CD19	CD10	CD38	CD20	CD45

*Realizar protocolo de *Bulk Lyse*. Adquirir 5.000.000 de eventos por tubo.



3.4.5 Avaliação de infiltração no SNC

Logo após o diagnóstico, na fase inicial do tratamento de indução (D1 em pacientes tratados pelo protocolo BFM adaptado e D5 pelo protocolo GBTLI 2021) foi realizada punção lombar para coleta de amostra de Líquido Cefalo Raquidiano (LCR) com o objetivo de classificar a leucemia em relação à presença de infiltração leucêmica do SNC. A amostra de LCR foi submetida à análise bioquímica, contagem celular e avaliação morfológica por microscopia óptica. Para exame morfológico, as lâminas foram submetidas a preparação de Cytospin. De acordo com a citologia do LCR os pacientes foram classificados em:

- SNC 1: Definida pela avaliação morfológica do LCR, sem detecção de células blásticas e sem evidências de punção lombar traumática

- SNC 2: Foram incluídas na classificação SNC 2, duas situações em que o prognóstico em relação ao acometimento do SNC é intermediário, ou seja, pior do que o observado em pacientes em que há ausência de detecção de células blásticas e melhor que o prognóstico dos pacientes em que a infiltração do SNC é documentada:

- a. Presença de célula blástica no LCR, cuja contagem de leucócitos/mm² é inferior a 5;

- b. Ocorrência de punção lombar traumática (PLT), definida por contagem de hemácias igual ou maior que 10/mm³ de amostra de LCR;

- SNC 3: Configura infiltração leucêmica do SNC e é definida pela presença de que 5 ou mais leucócitos/mm³ de amostra de LCR com presença de célula blástica identificada por avaliação morfológica.

3.4.6 Avaliação do cariótipo

Citogenética Convencional

Para a avaliação das alterações cromossômicas numéricas e estruturais, foi realizado cultivo de linfócitos a partir das amostras de aspirado de medula óssea. As culturas passaram por protocolo de citogenética clássica e coradas pela técnica de coloração por Banda G (Seabright, 1971) (ANEXO 5).

Foram confeccionadas lâminas que foram tratadas em solução de tripsina 1:250 a 0,1% em tampão Dulbecco e, em seguida, coradas em solução de Giemsa 2% em tampão fosfato. Vinte metáfases foram analisadas e documentadas utilizando-se



microscópio Zeiss com software de captura Ikaros MetaSystem, e os cariótipos foram descritos seguindo o ISCN (2020).

Citogenética Molecular

Os estudos de citogenética molecular foram realizados pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH - *Fluorescent In Situ Hybridization*), seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizadas sondas para os genes *ABL1*, *ABL2*, *CRLF2*, *JAK2*, *KMT2A*, *PDGFRB* e *RUNX1*.

As lâminas foram desidratadas em sequência de etanol 70%, 90% e 100%, tratadas em solução de pepsina/HCL e lavadas em PBS, para eliminação do citoplasma e proteínas. Em seguida, receberam solução pós-fix para inicial desnaturação do material genético, lavadas em PBS e desidratadas novamente. Por fim, foi realizada desnaturação total da amostra e da sonda a 74°C. A hibridização foi feita na estufa de CO₂ a 37°C em câmara úmida por 24h. Foram realizadas lavagens de extringência em Solução Salina-Citrato, e a contra coloração foi feita com solução de 4',6-diamidino-2- phenylindole (DAPI).

As amostras de citogenética foram analisadas em microscópio óptico de fluorescência Axio Imager D2 (Zeiss) e capturadas pelos programas Ikaros e Isis (MetaSystem) e os resultados serão descritos de acordo com o ISCN 2020 (McGowan-Jordan; Simons; Schmid, 2020).

3.4.7 Pesquisa de rearranjos recorrentes em LLA

A pesquisa de rearranjos gênicos em amostras de aspirado de medula óssea de pacientes com diagnóstico de LLA B foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) (ANEXO 6). Foram utilizados primers para detecção dos híbridos *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1*, *KMT2A::AF4*, *BCR::ABL1p190* e *BCR::ABL1p210*. Além dos híbridos, são incluídos nos testes um controle positivo para avaliação de qualidade da amostra por paciente (gene da beta-microglobulina – $\beta 2m$) e controles negativos de cada par de primer (Van Dongen *et al.*, 1999) (Figura 8).

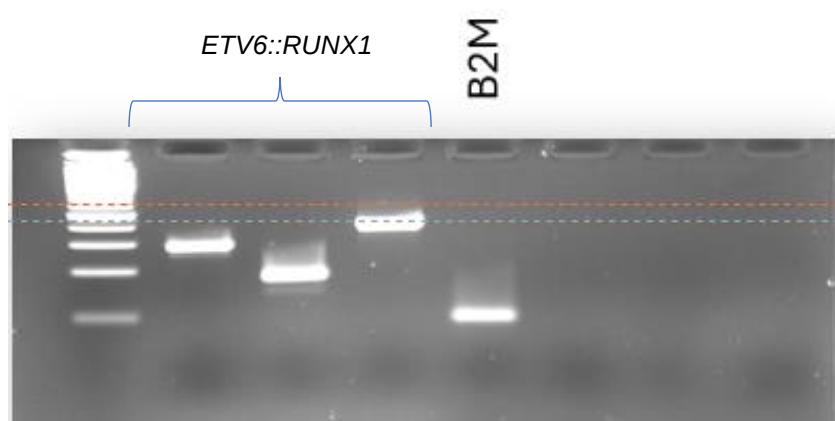


Figura 8 - Gel confirmatório do rearranjo ETV6::RUNX1.

3.5 Caracterização biológica da LLA

Além dos exames de citogenética e RT-PCR para pesquisa de translocações recorrentes, foram utilizadas as seguintes técnicas para uma melhor caracterização biológica da LLA foram: MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Amplification*), RT-PCR, PCR, hibridização in situ fluorescente (FISH), análise de polimorfismo por comprimento de fragmento de restrição (RFLP), análise de fragmento por eletroforese capilar e sequenciamento de nova geração (NGS).

3.5.1 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

Após a caracterização imunofenotípica como LLA B, as amostras foram avaliadas por MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Amplification*) para a detecção de deleções e duplicações em genes e *locus* envolvidos na leucemogênese de células linfóides. O MLPA é um método sensível que se baseia na reação em cadeia de polimerase e eletroforese capilar e que detecta múltiplas cópias de cerca de 50 diferentes alvos de DNA genômicos. Ele tem a vantagem de ter baixo custo e avaliação mais rápida que ensaios de DNA para a identificação de alterações genéticas importantes e atualmente é amplamente utilizado para a identificação de alterações no número de cópias na LLA.

Foram pesquisadas deleções e duplicações nos genes *IKZF1*, *PAX5*, *ETV6*, *RB1*, *BTG1*, *EBF1*, *CDKN2A-CDKN2B*, *ERG*, *CRLF2* e alterações numéricas na região Xp22.33 e no cromossomo 21 (iAMP21).



Os ensaios foram feitos com o kit comercial SALSA MLPA probemix P327 iAMP21-*ERG* e com o kit probemix P335-B2 ALL-*IKZF1* (MRC-Holland), seguindo as recomendações do fabricante. O kit P335 contém oito sondas para *IKZF1* (7p12.2), sete sondas para *PAX5* (9p13.2), seis sondas para *ETV6*, cinco sondas para *RB1* (13q14.2), quatro sondas para *BTG1* (12q21.33), quatro sondas para *EBF1* (5q33.3), três sondas para *CDKN2A-CDKN2B* (9p21.3) e cinco sondas para a região Xp22.33. (região pseudoautosômica PAR1) envolvendo os genes *CRLF2*, *CSF2RA*, *IL3RA* e *P2RY8* (Quadro 21).

Quadro 21 – Número de sondas por gene

Kit	Gene	No de sondas
SALSA MLPA Probemix P335-B2 ALL- <i>IKZF1</i> (MRC-Holland)	<i>IKZF1</i> (7p12.2)	8
	<i>PAX5</i> (9p13.2),	7
	<i>ETV6</i>	6
	<i>RB1</i> (13q14.2)	5
	<i>BTG1</i> (12q21.33)	4
	<i>EBF1</i> (5q33.3)	4
	<i>CDKN2A-CDKN2B</i> (9p21.3)	3
	região Xp22.33 (PAR1)	5
SALSA MLPA Probemix P327 iAMP21- <i>ERG</i>	iAMP	
	<i>ERG</i>	

Os produtos das reações de MLPA foram analisados por eletroforese capilar no equipamento ABI3500 (Applied Biosystems). A interpretação do número de cópias para cada uma das sondas e seus respectivos genes foram feitas no software Coffalyser.Net (MRC-Holland). Avaliamos as razões do número de cópias de cada gene considerando percentual de células blásticas nas amostras de MO analisadas. Em geral, razões entre 0,75 e 1,3 foram considerados normais. Razões abaixo de 0,75 foram consideradas deleções e acima de 1,3 consideradas como amplificação (Figura 9) (Yu *et al*, 2020).

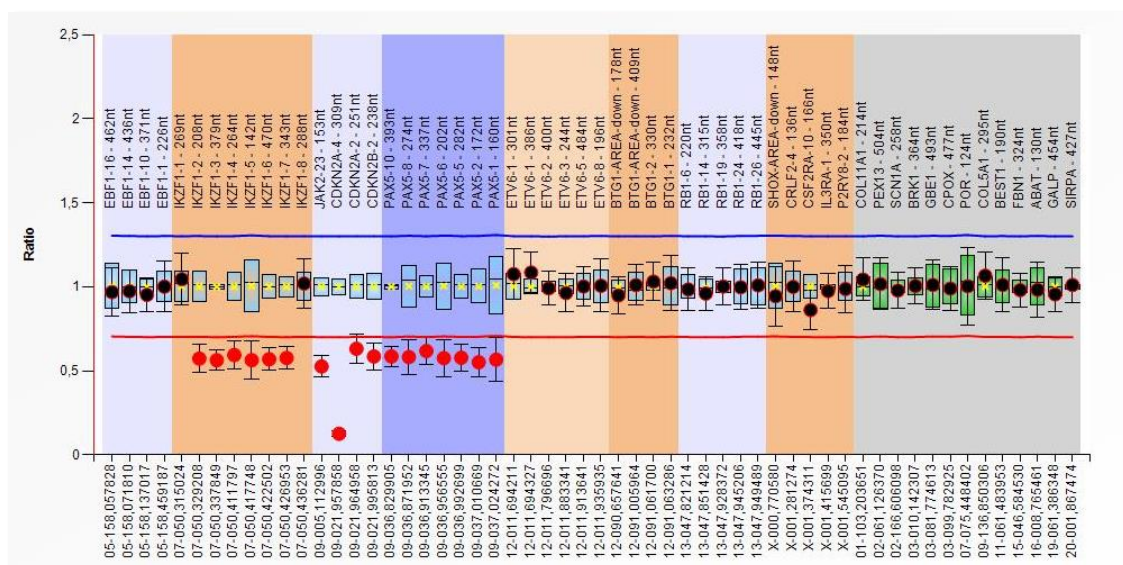


Figura 9 - Imagem de avaliação de MLPA.

Paciente *IKZF1*^{plus} (deleção *IKZF1*Δ2-7 + delCDKN2A + del CDKN2B + delPAX5)

3.5.2 Exames complementares/confirmatórios

De acordo com os resultados obtidos a partir do MLPA, para complementação ou confirmação dos achados, as amostras foram direcionadas para realização de exames adicionais (Tabela 19).

Deleção no *IKZF1*: Para pesquisa de deleção no gene *IKZF1* também foi realizado PCR genômica em multiplex adaptada de Caye e colaboradores. A adaptação consistiu no uso de eletroforese em gel de agarose 1,5% da reação dos pares de primers individualizados após multiplex positivo (Caye *et al.*, 2013).

Fusão *EBF1/PDGFRB*: pesquisa por RT-PCR (Lengline *et al.*, 2013).

Avaliação do *CRLF2*: A expressão de *CRLF2* na superfície celular foi quantificada por citometria de fluxo e fusão *P2RY8::CRLF2* foi pesquisada por RT-PCR (Mullighan *et al* 2009, Hertzberg *et al*, 2010).

JAK1 e *JAK2*: O sequenciamento direto dos éxons 13 e 14 de *JAK1* e 16, 20 e 21 de *JAK2* foram feitos com a utilização do reagente BigDye Direct Terminator V3.1 (Applied Biosystems) e os produtos sequenciados no equipamento ABI3500 (Applied Biosystems). A análise dos eletroferogramas foram feitos com auxílio do programa CLC WorkBench V6.0 (Qiagen) (Chen *et al.*, 2012).

FLT3: A pesquisa de variantes genéticas no domínio da tirosina-quinase *FLT3* (D835) foi realizada através da análise de polimorfismo por comprimento de fragmento

de restrição (RFLP: “restriction fragment length polymorphisme”). A reação de PCR incluiu 1x tampão de PCR, 200 nM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,75 U de Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) e 0,2 mM de cada primer (FWD-CCGCCAGGAACGTGCTTG, REV-CAGCCTCACATTGCCCC). As condições de PCR foram 95°C por 3 minutos, seguidos por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram digeridos usando a enzima de restrição EcoRV (NEB). Amostras que mostraram alterações por RFLP foram submetidas ao sequenciamento de Sanger (Figura 10a).

A detecção de variantes no domínio juxtamembrana (*FLT3*-JM-INDEL) foi conduzida por análise de fragmentos no ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). O PCR foi realizado sob as mesmas condições descritas acima, mas com 27 ciclos, utilizando os primers FWD-6-FAM-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC e REV-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC. O tamanho do fragmento foi estimado usando o padrão de tamanho GeneScan™ 500 LIZ (Thermo Fisher Scientific). A proporção entre o pico mutado e o de tipo selvagem foi determinada dividindo as áreas dos picos (MUT/WT) (Murphy *et al.*, 2003) (Figura 10b).

As mutações *FLT3* foram classificadas de acordo com os critérios da AMP para variantes somáticas (Li *et al.*, 2017) (anexo 9).

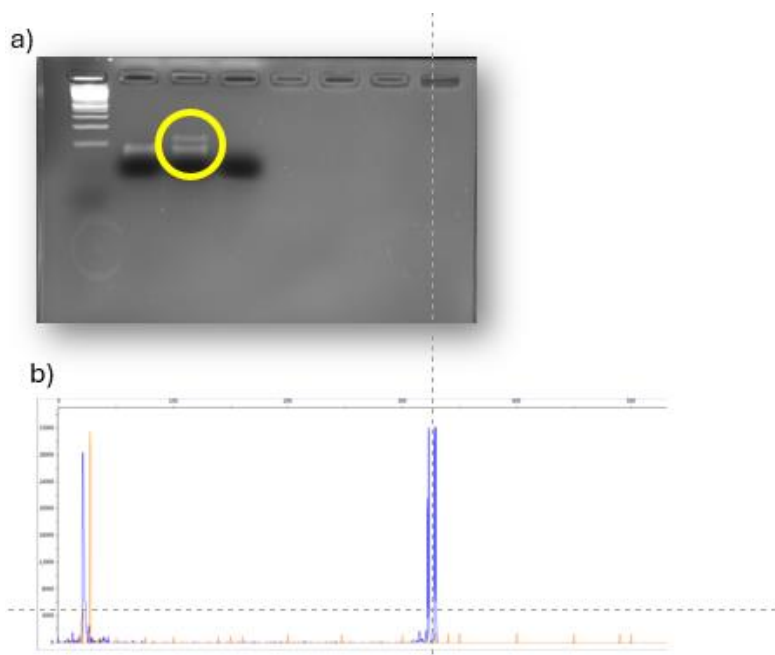


Figura 10 – Pesquisa de mutação no *FLT3*

a) Detecção de variantes no domínio tirosina quinase (*FLT3*-TKD) por RFLP. b) Detecção de variantes no domínio justa-membranar (*FLT3*-JM-INDEL)

A análise de expressão de FLT3 foi realizada através de RT-qPCR em amostras de medula óssea coletadas no momento do diagnóstico (anexo 8).

Para determinar a quantificação relativa (RQ) da expressão gênica, os dados foram analisados usando o método de quantificação comparativa Ct ($\Delta\Delta C_t$). A quantidade de cada mRNA, normalizada para os genes de referência endógenos (HPRT1 e B2M) e relativa ao valor mediano como calibrador, foi convertida em quantificação relativa pela fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Figura 11).

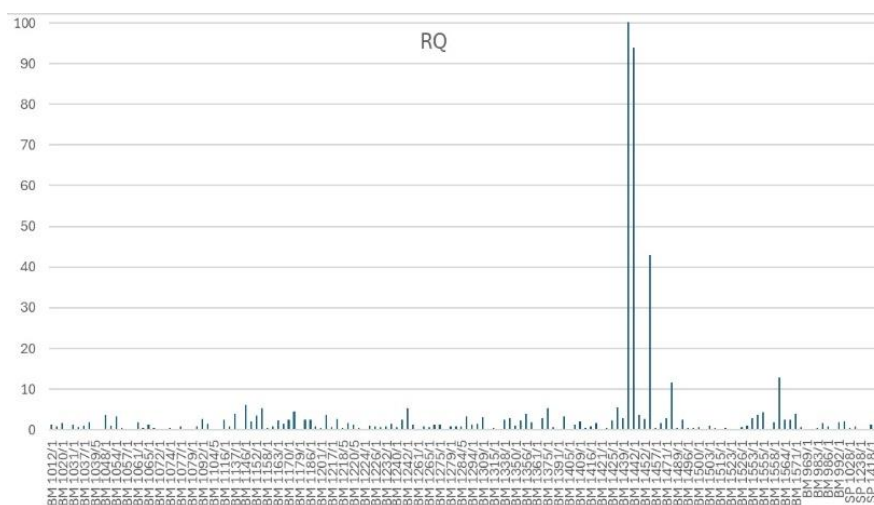


Figura 11 - RTq PCR para avaliação de expressão de FLT3.

Abaixo, o quadro apresenta de forma resumida as metodologias adotadas para a identificação dos diferentes marcadores biológicos na LLA B (quadro 22).

Quadro 22 - Exames complementares para identificação de biomarcadores em LLA B

ALTERAÇÃO	TÉCNICA	REFERÊNCIA
Deleção no <i>IKZF1</i>	PCR genômica em multiplex adaptada	Caye <i>et al.</i> , 2013
Expressão de <i>CRLF2</i> na superfície celular	Imunofenotipagem por citometria de fluxo.	Mullighan <i>et al.</i> , 2009
fusão <i>P2RY8::CRLF2</i>	RT-PCR	Mullighan <i>et al.</i> , 2009
Sequenciamento <i>JAK1</i> (exons 13 e 14) <i>JAK2</i> (exons 16, 20 e 21)	Reagente BigDye Direct Terminator V3.1 (Applied Biosystems) Sequenciados no equipamento ABI3500 (Applied Biosystems) Análise dos eletroferogramas com auxílio do programa CLC WorkBench V6.0 (Qiagen)	Chen <i>et al.</i> , 2012
FLT3 mutação TKD	Análise de polimorfismo por comprimento de fragmento de restrição	MURPHY <i>et al.</i> , 2003.
FLT3 ITD	Análise de fragmento por eletroforese capilar	MURPHY <i>et al.</i> , 2003



3.5.3 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Amostras de 59 pacientes de nosso grupo de estudo foram submetidas ao sequenciamento de Nova Geração (NGS) em painel amplo para pesquisa de mutações, *indels* e fusões gênicas a partir de DNA e RNA de genes associados com a LLA B. Para o NGS foi utilizada a plataforma de sequenciamento da Illumina NextSeq550.

O painel genético utilizado para avaliação em RNA por captura híbrida é composto por cerca de 500 genes. O painel possibilitou a geração de uma biblioteca feita a partir de RNA total.

O fluxo para o NGS constitui no preparo da biblioteca por captura híbrida, controle de qualidade da biblioteca, sequenciamento genético, análise de dados com chamada de variantes, confecção do relatório por paciente à luz de banco de dados de variantes humanas, levantamento da literatura, guias e normativas internacionais de análise e nomenclatura de variantes humanas.

A análise para identificação de variantes incluiu: variantes de nucleotídeo único, inserções e deleções ou fusão gênica e expressão gênica. Os critérios de classificação de variantes incluíram as diretrizes para classificação de variantes somáticas no câncer (Horak *et al*, 2022), bem como diretrizes do Colégio Americano de Genética Médica (Richards *et al.*, 2015).

As análises dos dados de NGS foram feitas usando os programas GATK, Samtools, Freebayes e VarDict e ANNOVAR, em concordância com o consórcio internacional de dados genômicos (<https://dcc.icgc.org/pcawg>). Viés de orientação e posição de leitura foram utilizados para filtrar potenciais artefatos de predições provenientes de dados brutos. As análises dos dados de NGS a partir de RNA foram feitas usando programas que possuam pipelines para alinhamento de RNA-seq (e.g. STAR-CITE). Variantes não silenciosas que passaram no controle de qualidade e na análise de polimorfismos presentes na população geral (quando confrontados com bancos genomas como gnomAD e os 1000 genomas) foram classificadas como: a) patogênicas, b) provavelmente patogênica, c) de significado incerto, d) provavelmente benigna ou e) benigna. Critérios de classificação incluíram informações de bancos de dados, previsões computacionais do efeito mutacional na função da proteína, estudos funcionais.



3.6 Cálculo de frequência de marcadores biológicos e classificação em subtipos biológicos.

Avaliamos frequência de cada alteração biológica individualmente, independente da associação com outra alteração genética e molecular. Para cálculo da frequência de cada alteração, o número utilizado no denominador foi o número de exames realizados para a detecção (e não a população total).

Classificamos os pacientes em 14 diferentes subtipos biológicos de LLA B: alta hiperdiploidia, baixa hiperdiploidia, hipodiploidia, iAMP 21, *ETV6::RUNX1*, rearranjo do *KMT2A*, *TCF3::PBX1*, *BCR::ABL1*, del *IKZF1*, *IKZF1^{plus}*, alteração do *PAX5*, alteração do *ERG*, mutação do *FLT3* e outros. Apresentamos um gráfico de barras com a distribuição dos pacientes nos diferentes subgrupos. Nesta análise, o percentual de cada subtipo representa a proporção de exames positivos para cada marcador dentro da amostra total - 156 pacientes - independentemente do número de pacientes submetidos ao exame para detecção. Nos casos em que houve sobreposição de alteração, o subtipo biológico *IKZF1^{plus}*, a presença do rearranjo *P2RY8::CRLF2*, alterações no *PAX5* e mutações no *FLT3* foram considerados parâmetros prioritários, seguidos pelas alterações moleculares recorrentes e por último, alterações citogenéticas.

3.7 Estratificação de risco e tratamento de LLA B

Foram incluídos no estudo dois grupos de pacientes submetidos a protocolos de tratamento distintos. No período de julho de 2018 a setembro de 2022 as crianças foram submetidas a tratamento quimioterápico fundamentado no protocolo ALLIC BFM 2009 e padronizado para a instituição.

A partir de setembro de 2022, o Hospital da Criança de Brasília, membro do Grupo Cooperativo de Tratamento de Leucemias na Infância, passou a utilizar o tratamento proposto pelo protocolo GBTLI 2021.

Os quimioterápicos utilizados pelos dois esquemas são os mesmos, as fases de tratamento semelhantes. As maiores diferenças estão relacionadas à intensidade do tratamento. No BFM, a abordagem inicial é mais agressiva e após 6 a 8 meses de tratamento mais intensivo, o paciente inicia a fase de manutenção com quimioterapia em menores doses. No GBTLI, a intensidade do tratamento é reduzida, especialmente na fase de indução. Há uma compensação parcial da intensidade do



tratamento com a introdução de períodos subsequentes de intensificação intercalados com fases de manutenção (“descanso”, em que o paciente recebe QT em menores doses).

O Quadro 23 e o Quadro 24 sumarizam as classificações de risco adotadas pelos dois protocolos, os critérios adotados para a estratificação e o tratamento de indução e consolidação preconizados para cada protocolo de tratamento.

Quadro 23 - Classificação de risco, critérios para classificação e tratamento de indução dos protocolos ALLIC BFM 2009 adaptado e GBTLI 2021

	ALLIC BFM 2009 adaptado			GBTLI 2021		
	Baixo Risco	Risco Intermediário (RI)	Alto Risco (AR)	Baixo Risco Provisório (BRP)	Risco Intermediário (RI)	Alto Risco (AR)
Critérios para Classificação de Risco ao Diagnóstico	Idade > 1 e <6 anos GB<20000/mm ³ e Ausência de critério para alto risco	Sem critério para baixo risco ou alto risco	<i>BCR-ABL1 MLL-AF4</i>	Idade ≥ 1 and < 10 GB < 50000/mm ³ SNC1 ou SNC2 Ausência de infiltração testicular	Uso prévio de corticóide BRP e DRM D19 > 0.01	Idade ≥ 10 anos GB ≥ 50000 SNC3 Infiltração testicular (<i>TCF3–PBX1</i>); (<i>KMT2A–AFF1</i>); Ph-like; (<i>TCF3-HLF</i>); hipodiploidia < 45 cromossomos (DNA index < 1)
Quimioterapia de Indução	Fase 1 VCR 1,5mg/m² X 4 Daunorrubicina 25mg/m² X 2 PEG asparaginase 2500UI/m² X 1 Prednisona 40mg/m² D1 a D28 MADIT X 3 (5X se SNC2) Fase 2 Ciclofosfamida 1000mg/m² X 2 Citarabina 75mg/m² X 4 dias X 4 sem 6MP 60mg/m²/dia 28 days MADIT 2X	Fase 1 VCR 1,5mg/m² X 4 Daunorrubicina 25mg/m² X 4 PEG asparaginase 2500UI/m² X 2 Prednisona 40mg/m² D1 a D28 MADIT X 3 (5X se SNC2) Fase 2 Ciclofosfamida 1000mg/m² X 2 Citarabina 75mg/m² X 4 dias X 4 sem 6MP 60mg/m²/dia 28 days MADIT 2X	Fase 1 VCR 1,5mg/m² X 4 Daunorrubicina 25mg/m² X 4 PEG asparaginase 2500UI/m² X 2 Prednisona 40mg/m² D1 a D28 MADIT X 3 (5X se SNC2) Fase 2 Ciclofosfamida 1000mg/m² X 2 Citarabina 75mg/m² X 4 dias X 4 sem 6MP 60mg/m²/dia 28 days MADIT 2X	Fase 1 VCR 1,5mg/m² X 4 Daunorrubicina 25mg/m² X 2 PEG asparaginase 2500UI/m² X 1 Prednisona 40mg/m² D1 a D26 (redução até D30) MADIT X 3 (4X se SNC2) Fase 2-	Fase 1 VCR 1,5mg/m² X 4 Daunorrubicina 25mg/m² X 2 PEG asparaginase 2500UI/m² X 1 Prednisone 40mg/m² D1 a D28 (redução até D33) MADIT X 3 (4X se SNC2 ou SNC3) Fase 2 Ciclofosfamida 1000mg/m² X 1 Citarabina 75mg/m² X 4 days X 2 semanas 6MP 60mg/m²/dia 14dias MADIT 1X *PEG 2500 UI/m² X 1 se DRM D19 ≥ 0,1	Fase 1 VCR 1,5mg/m² X 4 Daunorrubicina 25mg/m² X 2 PEG asparaginase 2500UI/m² X 1 Prednisona 40mg/m² D1 a D28 (redução até D33) MADIT X 3 (4X se SNC2 ou SNC3) Fase 2 Ciclofosfamida 1000mg/m² X 1 Citarabina 75mg/m² X 4 days X 2 semanas 6MP 60mg/m²/dia 14dias MADIT 1X *PEG 2500 UI/m² X 1 se DRM D19 ≥ 0,1
Momentos de avaliação de DRM	D15 D33 D78	D15 D33 D78	D15 D33 D78	D19 D26 D49 Após consolidação (se DRM+ no D49)	D19 D49 Após consolidação (se DRM+ no D49)	D19 D49 Após consolidação (se DRM+ no D49)



Quadro 24 - Classificação e de risco pós indução e tratamento de Consolidação dos protocolos ALLIC BFM 2009 adaptado e GBTLI 2021

	ALLIC BFM 2009 adaptado			GBTLI 2021			
	Baixo Risco	Risco Intermediário (RI)	Alto Risco (AR)	Baixo Risco Verdadeiro	Risco Intermediário (RI)	Alto Risco (AR)	Extremo Alto Risco
Critérios para classificação de risco (após indução)	Idade < 6anos e GB < 20000/mm ³ e DRM D15 < 0,1% e DRM D33 < 0,01% e DRM D78 < 0,01%	Ausência de critério para baixo ou alto risco	DRM no D15 > 5% or DRM do D78 > 0,01%	BRP e DRM D19 < 0,01	Uso previo de corticóide BRP e DRM D19 ≥ 0,01 and <5 e DRM D49 < 0,01 Pacientes com GB > 50000/mm ² e < 10anos e hiperdiploidia ou ETV6-RUNX	AR ao diagnóstico ou DRM D19 ≥ 5 ou DRM D49 ≥ 0,01	DRM D49 > 5% ou DRM pós consolidação ≥ 0,01
Quimioterapia de Consolidação	MTX 2g/m ² em 24h X 4 (ciclos a cada 15 dias) MADIT X 4 6MP 25mg/m ² por 56 dias	MTX 5g/m ² em 24h X 4 (ciclos a cada 15 dias) MADIT X 4 6MP 25mg/m ² por 56 dias	Três ciclos distintos, 2x cada ciclo. HR1-HR2-HR3- HR1-HR2-HR3 HR1 MTX 5g/m ² em 24horas Dexametasona 20mg/m ² 5d Vincristina 1,5mg/m ² X 2 Ciclofosfamida 200mg/m ² X 5 Citarabina 2g/m ² X 2 PEG asparaginase 2500UI/m ² X1 MADIT X1 (2x se SNC3) HR2 MTX 5g/m ² em 24 horas Dexametasona 20mg/m ² 5d Vinblastina 6mg/m ² Ifosfamida 800mg/m ² X 5 Daunorubicina 30mg/m ² X1 PEG asparaginase 2500UI/m ² MADIT X1 (2x se SNC3) HR3 Dexametasona 20mg/m ² 5d Citarabina 2g/m ² X 4 Etoposide 100mg/m ² X5 PEG asparaginase 2500UI/m ² MADIT X 1	MTX 2,5g/m ² em 6h X 4 (ciclos a cada 15 dias) MADIT X 4 6MP 25mg/m ² por 56 dias	MTX 2,5g/m ² em 6h X 4 (ciclos a cada 15 dias) MADIT X 4 6MP 25mg/m ² por 56 dias	MTX 5g/m ² em 6h X 4 (ciclos a cada 15 dias) MADIT X 4 6MP 25mg/m ² por 56 dias	MTX 5g/m ² em 6h X 2 (ciclos a cada 15 dias) MADIT X 2 6MP 25mg/m ² por 28 dias Se DRM negativa após e ciclos, completar 4 ciclos de MTX 5g/m ² em 6hs e uso de 6MP por 56 dias Se DRM + após 2 ciclos: Dexametasona 20mg/m ² por 6 dias Citarabina 2g/m ² X 4 Etoposide 100mg/m ² X5 PEG asparaginase 2500UI/m ² MADIT X 1



3.8 Avaliação de resposta ao tratamento

A avaliação da resposta ao tratamento quimioterápico foi realizada através da detecção de DRM por citometria de fluxo (Anexo 1).

Para os pacientes que receberam tratamento pelo protocolo baseado no protocolo ALLIC BFM 2009, a DRM foi realizada em amostras de medula óssea coletadas no D15, D33 e D78. Para os pacientes tratados pelo protocolo GBTLI 2021 (em andamento), as amostras de medula óssea para avaliação de resposta ao tratamento são coletadas no D19, D26 (no subgrupo de baixo risco), D49 e, nos casos com DRM positiva no D49, nova amostra é coletada após a fase de consolidação.

Para as análises de DRM, foram utilizados painéis de anticorpos monoclonais com 12 cores que permite a incorporação de marcadores para identificação de células tumorais residuais com maior resolução, sensibilidade e especificidade e protocolos de processamento padronizados e validados em diretrizes nacionais e internacionais (Van Dongen *et al.*, 2012; Theunissen *et al.*, 2017; Ikoma-Conturato *et al.*, 2022)

3.9 Coleta de dados clínicos e laboratoriais

Os dados clínicos e referentes ao tratamento quimioterápico foram coletados dos prontuário médicos.

Do período de julho de 2018 a novembro de 2018, os dados foram coletados do prontuário eletrônico adotado pela Secretaria Estadual de Saúde (Track Care) e que era também utilizado pelo Hospital da Criança de Brasília. A partir de novembro de 2018, os dados foram coletados pelo prontuário do Sistema MV (adotado pelo HCB nessa ocasião).

Para coleta de dados foi utilizada uma ferramenta de coleta construída no software RED Cap, especificamente para o projeto atual.

Foram coletados dados referentes a informações demográficas, epidemiológicas, tratamento prescrito e realizado, complicações durante a indução, resultados de exames no diagnóstico e nos momentos específicos de avaliação de resposta ao tratamento preconizado pelo protocolo de tratamento adotado. (Quadro 25)

Os resultados de exames laboratoriais foram coletados dos prontuários

médicos e do banco de dados do laboratório de pesquisa translacional.

Quadro 25 - Dados Coletados dos Pacientes

Informações epidemiológicas	Idade ao diagnóstico	
	Sexo	
	Procedencia	
Informações do diagnóstico	Leucometria	
	Infiltração de SNC	
	Infiltração testicular	
Classificação de risco	Ao diagnóstico	
	Após a indução (de acordo com DRM)	
Tratamento de indução	Medicamentos utilizados (doses e datas)	
	Complicações durante a indução	Infecção
		Diabetes
		Hipertensão
		Trombose
	Internação em UTI	
Avaliação de resposta ao tratamento	Leucometria no D8	
	Mielograma	D15 (BFM adap); D19 (GBTLI)
		D33 (BFM adap)
		D78 (BFM adap); D49 (GBTLI)
	DRM	D15 (BFM adap); D19 (GBTLI)
		D33 (BFM adap)
		D78 (BFM adap); D49 (GBTLI)
Desfecho	1ª Remissão	Término do tratamento (RFT)
		Em tratamento (RET)
	Recidiva	Medular isolada
		SNC isolada
		Combinada
	Óbito	Em remissão (por complicação) (OR)
		Por doença em atividade (OL)

3.10 Definição de desfechos

1ª Remissão fora de tratamento (RFT)

Pacientes que atingiram remissão morfológica e DRM < 0,01 e finalizaram o tratamento quimioterápico

1ª Remissão em de tratamento (RET)

Pacientes que atingiram remissão morfológica e DRM < 0,01 e encontram-se em tratamento quimioterápico



Remissão após recidiva (ou 2ª remissão)

Pacientes que atingiram remissão morfológica e DRM < 0,01 e finalizaram o tratamento com quimioterapia ou com transplante de medula óssea (TMO)

Mortalidade Indutória (MI):

Pacientes que foram a óbito até 35 dias a partir do início do tratamento (óbito durante a primeira fase de indução). (Prucker *et al*, 2009)

Óbito em remissão (OR) ou Óbito relacionado ao tratamento (OR):

Pacientes que atingiram remissão morfológica e DRM < 0,01 mas que foram a óbito por complicações relacionadas ao tratamento.

Óbito sem documentação de remissão (OSDR):

Pacientes que foram a óbito em fase de indução, antes de terem realizado exame de reavaliação para documentação de remissão (em primeiro tratamento ou em tratamento de recidiva)

Óbito relacionado à Leucemia (OL):

Óbito em paciente que não atingiu a remissão morfológica e cuja causa de óbito foi diretamente relacionada aos sintomas e complicações trazidos pela Leucemia

Falha indutória (FI): Presença de > 5% de blastos e/ou DRM > 1% em amostra de medula óssea coletada após a quimioterapia de indução (D78 para BFM adaptado ou D49 para GBTLI 2021).

Recidiva: Identificação de mais que 5% de células blásticas em amostra de MO de paciente que tinha documentação prévia de remissão (< 5% de blastos)

Avaliamos dois grupos de pacientes com evolução desfavorável: 1. Pacientes que apresentaram recidiva; 2. Pacientes que foram a óbito por toxicidade relacionada ao tratamento. No segundo grupo, incluímos os pacientes que foram a óbito precocemente (sem documentação de remissão) ou a óbito em remissão e excluímos os pacientes que apresentaram recidiva.

3.11 Análise de dados

O banco de dados para as análises de correlação foi composto por informações clínicas e resultados de exames laboratoriais.

O banco de dados utilizado para as análises de correlação foi composto por informações clínicas dos pacientes e resultados de exames laboratoriais. As



variáveis foram classificadas em quantitativas e categóricas, sendo analisadas com base nas características de distribuição e na escolha de testes estatísticos apropriados para cada tipo de dado.

As variáveis quantitativas foram expressas por meio de medidas de tendência central (como média e mediana), com base na análise da distribuição de frequência dos dados e a escolha dos testes de hipótese foi guiada pelo coeficiente de assimetria. Testes paramétricos foram aplicados quando os dados apresentaram distribuição simétrica e dentro dos limites de normalidade, e não paramétricos foram usados para dados com distribuição não normal.

As variáveis categóricas foram analisadas por meio do teste qui-quadrado (χ^2) e, em casos de amostras pequenas ou frequências baixas, pelo teste exato de Fisher. Para explorar associações significativas entre variáveis, foram calculados também Risco Relativo (RR) – para avaliar a eficácia terapêutica ou desfechos específicos e Odds Ratio (OR) – para medir a força de associação entre variáveis independentes e desfechos.

Para as variáveis quantitativas não categorizadas, utilizaram-se o teste de Mann-Whitney, para comparar dois grupos independentes, e o teste de Kruskal-Wallis – para comparação entre três ou mais grupos independentes.

As curvas de sobrevida global e sobrevida livre de eventos (SLE) foram calculadas utilizando o teste de log-rank (Mantel-Cox). Todas as análises de sobrevida foram realizadas com o software GraphPad Prism, facilitando a visualização gráfica dos resultados.



4 RESULTADOS

4.1 Descrição da amostra

4.1.1 Características epidemiológicas

No período de julho de 2018 a setembro de 2023, foram admitidas pelo serviço de oncologia pediátrica do HCB 208 crianças com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda, das quais 156 preenchem os critérios para a inclusão no estudo (LLA B, > 1 ano e < 18 anos, ausência de Síndrome de Down e consentimento informado). Houve 5 casos de recusa de assinatura de termo de consentimento.

A idade dos pacientes variou entre 14 e 212 meses. O pico de incidência ocorreu entre 2 e 4 anos de idade (Figura 12). Houve um discreto predomínio de pacientes do sexo masculino (relação homem/mulher: 1,05).

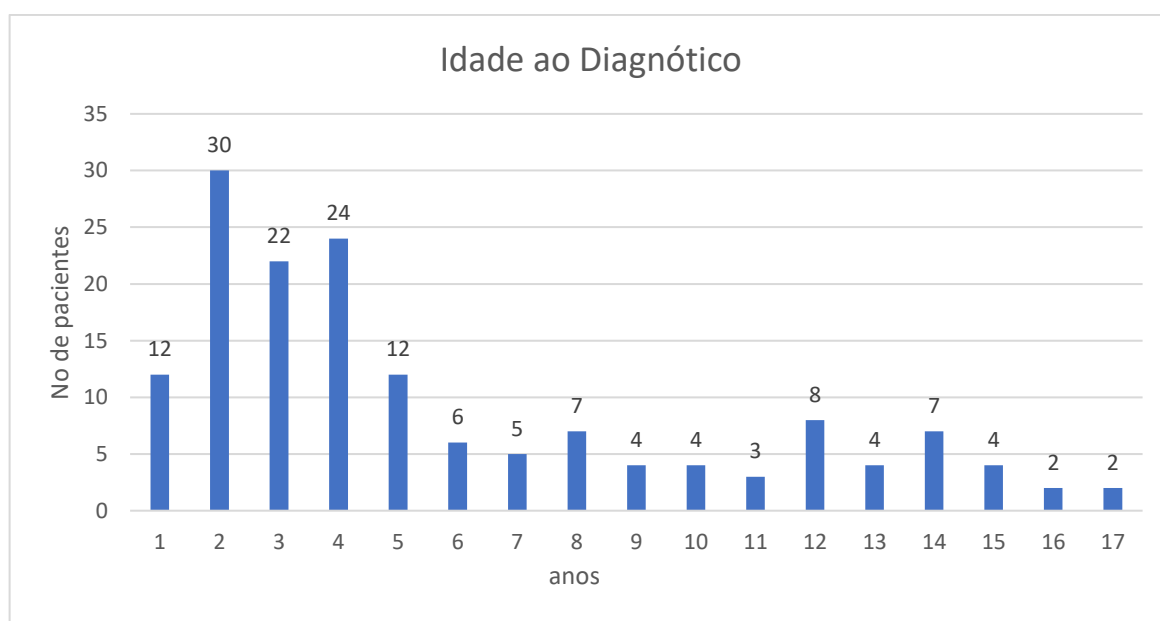


Figura 12 - Distribuição dos pacientes em relação à idade.

Oitenta e seis pacientes (55%) residiam no Distrito Federal no momento do diagnóstico. Os demais, foram provenientes de 8 estados de quatro diferentes regiões do Brasil e um paciente foi procedente da Venezuela (Figura 13).



Local de Procedência dos Pacientes

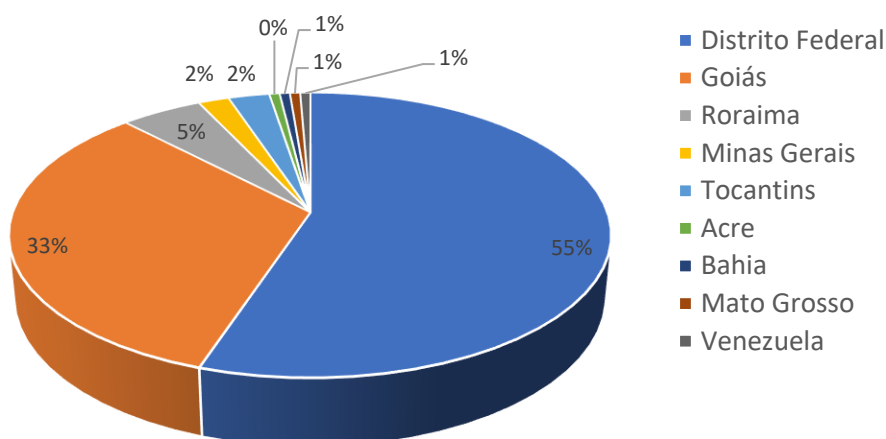


Figura 13 - Distribuição dos pacientes em relação ao local de procedência.

Cento e vinte e dois pacientes receberam tratamento baseado no protocolo BFM ALLIC 2009 e trinta e quatro pacientes estão em tratamento segundo o protocolo GBTLI 2021.

4.1.2 Leucometria ao diagnóstico

Quando dividimos os pacientes em subgrupos de acordo com a leucometria ao diagnóstico, observamos contagem de leucócitos inferior a 50.000 em 133 pacientes (85,25%) e superior a 50.000 em 23 crianças (14,74%) (Figura 14).

Leucometria ao diagnóstico

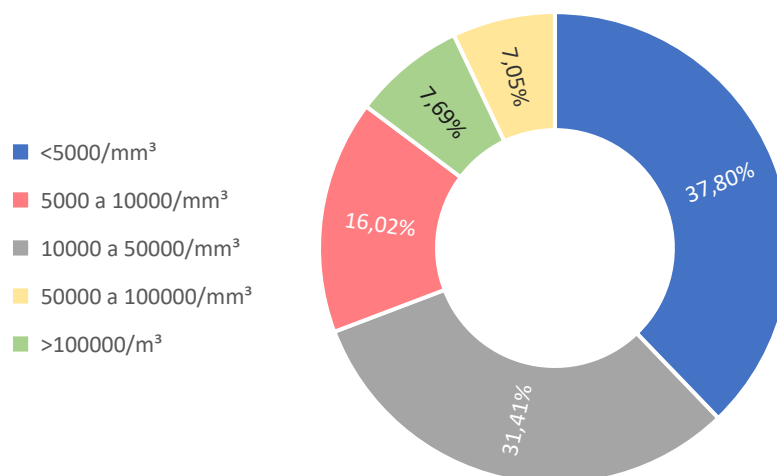


Figura 14 - Distribuição dos pacientes em relação à contagem de glóbulos brancos ao diagnóstico.



4.1.3 Classificação de risco

Entre os pacientes que receberam tratamento baseado no protocolo BFM, 57 (46,7%) foram inicialmente classificados como baixo risco, 59 (48,3%) como Risco Intermediário e 6 (4,91%) como Alto Risco. Após a indução, com a avaliação de resposta biológica ao tratamento pela a DRM, houve um aumento do número de pacientes classificados como risco intermediário (74 pacientes, 60,6%) e de alto risco (23 pacientes, 18,8%), conforme ilustrado na Figura 15. Em dois casos, os pacientes preenchiam critério para estratificação como de baixo risco, mas receberam tratamento de acordo com o esquema proposto para risco intermediário por terem feito uso de corticosteroide oral antes da admissão (decisão da equipe assistencial). Um paciente apresentou infecção fúngica disseminada durante a indução o que impediu a continuidade do tratamento quimioterápico (falha indutória por tratamento descontinuado). Um paciente que havia apresentado documentação de remissão morfológica nos exames realizados no D15 (mielograma sem blastos e DRM 1,42) e D33 (mielograma sem blastos e DRM 0,04), evoluiu com progressão da doença antes do D78 (blastos no sangue periférico).

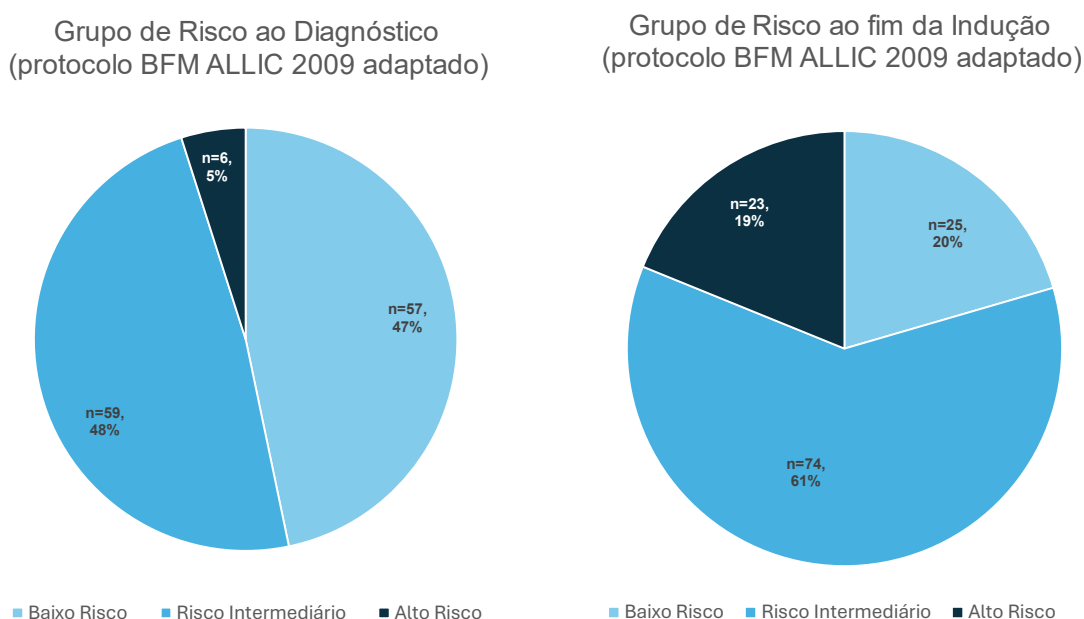


Figura 15 - Classificação de risco dos 122 pacientes tratados pelo protocolo ALL IC BFM 2009 adaptado.



A tabela 2 demonstra a classificação de risco ao diagnóstico e ao fim da indução e detalha os motivos para a mudança na classificação.

Tabela 2 - Classificação de Risco Inicial e após indução baseado na resposta biológica (pacientes tratados pelo protocolo BFM adaptado)

Classificação de risco Inicial / nº de pacientes	Classificação de risco ao fim da indução		Mudança de classificação	
	Risco	n	Motivo	Nº de pacientes
Baixo Risco 57	BR	24	NA	
			DRM D15 > 0,1	22
	RI	25	Uso de corticóide	2
			Não identificada	1
	AR	7	DRM D15 > 5	6
			DRM D78 > 0,1	1
	Outro	1	Interrupção tto /	1
Risco Intermediário 59	BR	1	Toxicidade / Comorbidade prévia (paralisia cerebral)	
	RI	49	NA	
			DRM D15 > 5	6
	AR	8	DRM D33 > 0,1	1 (DRM 0,55)
			DRM D78 > 0,01	1 (DRM 0,34)
	Recidiva	1	Blastos no SP após remissão morfológica e DRM D33 igual a 0,04	
Alto Risco 6	AR	6	NA	

BR: baixo risco; RI: risco intermediário; AR: alto risco; NA: não se aplica

Entre as 34 crianças incluídas no protocolo de tratamento GBTLI 2021, 22 foram estratificadas como baixo risco provisório e 12 pacientes foram inicialmente classificadas como de alto risco, conforme mostrado na Figura 16. Os motivos para classificação inicial de alto risco foram: idade > 10 anos (4 pacientes), leucometria maior que 50 mil/mm³ (3 pacientes); idade maior que 10 anos associada à leucometria acima de 50 mil/mm² (2 casos); rearranjo *TCF3::PBX1* em 2 casos e infiltração de SNC (cloroma) em 1 paciente.

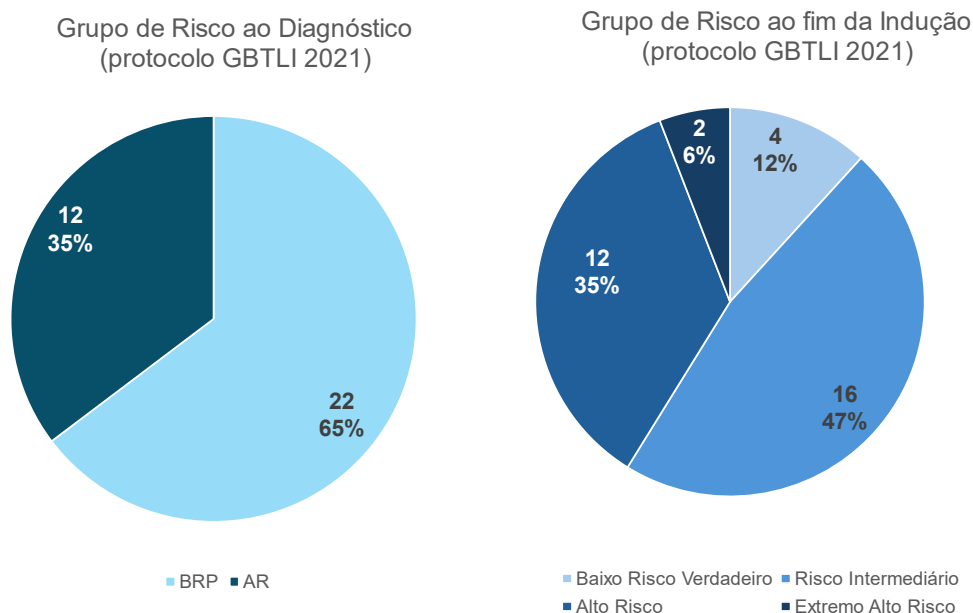


Figura 16 - Classificação de risco dos pacientes tratados pelo protocolo GBTLI 2021 (n=34)

Após a indução, 4 pacientes foram classificados como risco básico verdadeiro, 16 pacientes como risco intermediário, 12 como alto risco e 2 como extremo alto risco. Os dois pacientes que apresentaram falha indutória (DRM D49>1,0%) foram direcionados para tratamento com transplante de medula óssea e encontram-se em remissão (Tabela 3).

Tabela 3 - Classificação de Risco Inicial e após indução (pacientes tratados pelo GBTLI 2021)

Classificação de risco Inicial (nº de pacientes)	Classificação de risco pós indução (nº de pacientes)	Mudança de classificação / (nº de pacientes)
Baixo Risco Provisório (22)	Risco Básico Verdadeiro (4)	NA (4)
	Risco Intermediário (14)	DRM D19 > 0,1 (12) Uso de corticóide e DRM D19 >0,1 (2)
	Alto Risco (3)	Hipodiploidia (2) DRM D49 > 0,01 (1)
	Extremo Alto Risco (1)	DRM D49> 1% (1)
Alto Risco (12)	Risco Intermediário (2)	< 10 anos e <i>ETV6::RUNX1</i> (1) < 10 anos e hiperdiploidia (1)
	Alto Risco (9)	NA (9)
	Extremo alto risco (1)	DRM D49 >1% (1)



4.1.4 Evolução e desfecho

Fase Indutória (Mortalidade Indutória e Taxa de Remissão)

Quatro dos 122 pacientes submetidos a terapia pelo protocolo ALL IC BFM 2009, foram a óbito durante a indução devido a quadros infecciosos graves. Os quatro óbitos ocorreram entre 25 e 34 dias após o diagnóstico. Baseados nesses dados a taxa de mortalidade indutória foi igual a 3,27%. Oito pacientes foram a óbito na segunda fase de indução (entre D35 e D78), totalizando doze (9,8%) óbitos antes do D78 (Figura 17). Os óbitos no segundo mês de tratamento, também foram em sua grande maioria ocasionados por complicações infecciosas (7 casos). Em um caso o paciente apresentou acidente vascular cerebral. Em três desses pacientes, a pesquisa de DRM realizada no D33 estava negativa e em um caso foi igual a 0,27%. Nos outros 4 casos, o exame de MO não foi realizado porque o paciente já se encontrava em situação de gravidade. Os valores de DRM no D15 desses quatro pacientes foram todos inferiores a 1,0% (0,03; 0,23; 0,45; e 0,64).

Um paciente tratado pelo ALLIC 2009 adaptado apresentou DRM no D78 igual a 1,2%, configurando falha de indução (Figura 17).

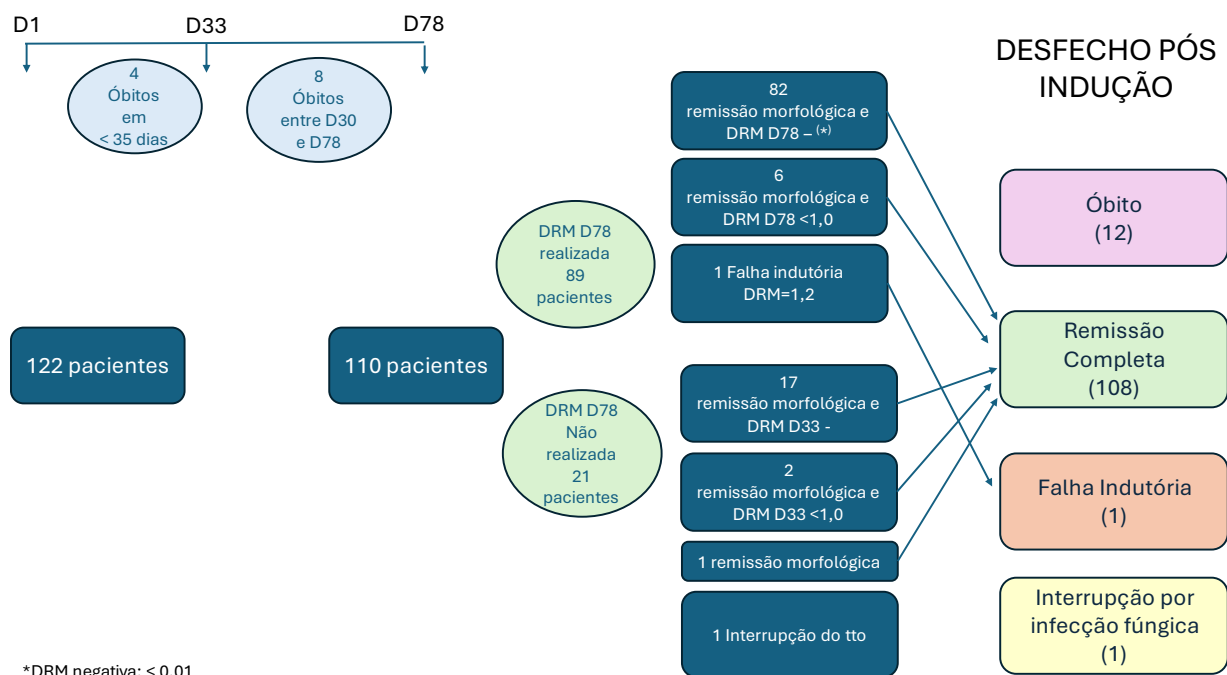
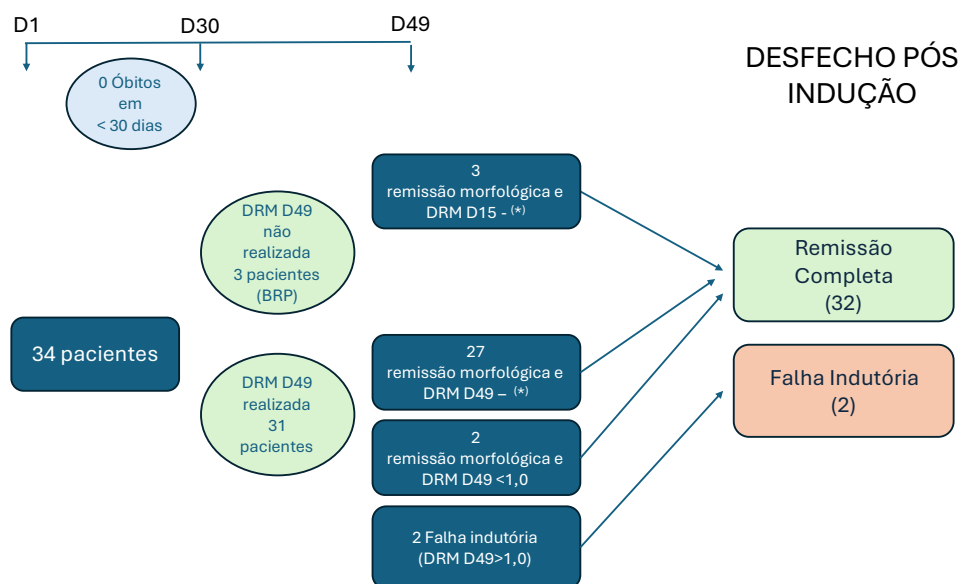


Figura 17 - Desfecho no fim da indução (D78) dos pacientes tratados pelo protocolo baseado no BFM.



Não houve óbito na fase de indução no grupo de pacientes tratado pelo protocolo GBTLI 2021. Dois pacientes desse grupo (5,88%) apresentaram falha de indução (DRM D49>1%) (Figura 18).



*DRM negativa: < 0,01

Figura 18 - Desfecho no fim da indução (D49) dos pacientes tratados pelo protocolo GBTLI.

Recidivas

Doze crianças apresentaram recidiva de LLA B (11 casos no grupo tratado pelo protocolo BFM ALLIC 2009 e 1 caso tratado pelo protocolo GBTLI 2021). Em relação ao momento da recidiva, observamos 5 casos de recidiva muito precoce (< 18 meses após o diagnóstico), 5 casos de recidiva precoce (> 18 meses após o diagnóstico e < 6 meses após o término do tratamento) e dois casos de recidiva tardia (tabela 4).

Entre os pacientes com recidiva muito precoce, 3 apresentaram recidiva isolada medular nos primeiros 6 meses após o diagnóstico e evoluíram para óbito poucos meses após o diagnóstico da recaída (2 meses, 4 meses e 6 meses), sem terem atingido remissão. Uma criança (tratada pelo protocolo GBTLI 2021) apresentou recidiva combinada de MO e SNC e foi a óbito 5 meses após diagnóstico da recidiva. Um outro paciente apresentou recidiva isolada de SNC 15 meses após o diagnóstico e encontra-se em remissão com tempo de seguimento igual a 65 meses.



As recaídas dos cinco casos classificadas como “recidiva precoce” ocorreram entre 22 e 26 meses após o diagnóstico. Em três casos houve recidiva isolada medular e em 2 casos a recaída acometeu exclusivamente o SNC. Um paciente (com recaída isolada em SNC) apresentou óbito em remissão (infecção). Dois pacientes foram tratados com TMO e estão em remissão. Os dois pacientes que receberam tratamento com quimioterapia apresentaram segunda recaída, um deles foi a óbito com doença em atividade e o outro encontra-se em segunda remissão (Tabela 4).

Tabela 4 - Classificação e evolução dos 12 pacientes que apresentaram recidiva.

Tipo de recidiva (nº de pacientes)	Local da recidiva (nº de pacientes)	Classificação (BFM 20022 LLA recaída)	Evolução (n)
Muito Precoce (5)	Isolada medular (3)	Alto Risco (3)	OL (3)
	SNC (1)	Alto Risco (1)	RFT (1)
	Combinada (MO e SNC)* (1)	Alto Risco (1)	OL (1)
Precoce (5)	Isolada Medular (3)	Alto risco (3)	RFT (2) 2ª recidiva em tto (1)
	SNC (2)	S1 (“Risco Standart”) (2)	OL (2ª recaída) OR (1)
	Testicular (1)	S1 (Risco “Standart”) (1)	RFT
Tardia (2)	Isolada Medular (1)	S1 (Risco Standart) (1)	RET

Muito Precoce: até 18m após o diagnóstico e <6m após término do tratamento; Precoce: > 18 meses após o diagnóstico e < 6m após o término do tratamento; Tardia: >6m após o término do tratamento. OL: óbito com leucemia; RFT: Remissão fora de tratamento; OR: óbito em remissão; RET: remissão em tratamento. *paciente tratado pelo protocolo GBTLI 2021.



Óbitos

Foram registrados 24 óbitos entre os pacientes estudados, sendo 22 em pacientes tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado e 2 em pacientes tratados pelo protocolo GBTLI.

No grupo tratado pelo protocolo BFM, 4 pacientes (3,27%) foram a óbito na fase indutória (até 5 semanas após o diagnóstico); 12 pacientes foram a óbito em remissão (mortalidade relacionada ao tratamento); cinco pacientes faleceram após apresentarem recidiva da doença, um deles em segunda remissão e os outros quatro, com doença em atividade. Um paciente apresentou infecção fúngica invasiva disseminada durante a indução com impedimento de continuidade do tratamento quimioterápico. Esse paciente apresentou falha indutória e faleceu após 14 meses do diagnóstico.

Infecção bacteriana foi a causa de morte dos 4 pacientes com óbito precoce, 11 pacientes com óbito em primeira remissão e um paciente em segunda remissão. Sepses também foi o fator desencadeante para a morte dos pacientes que recidivaram e não atingiram remissão. Um paciente foi a óbito em primeira remissão por complicação hemorrágica (acidente vascular cerebral) 45 dias após o diagnóstico.

O tempo de seguimento (*follow-up*) dos pacientes variou entre 21 e 69 meses (até 30 junho de 2024), com mediana de 42 meses.

Entre os 34 pacientes em tratamento pelo protocolo GBTLI 2021, duas crianças foram a óbito: uma com doença em atividade após recidiva precoce combinada (medular e SNC) dois meses após o diagnóstico e outra foi a óbito em remissão por complicação infecciosa (choque séptico) após quimioterapia de re-indução.

A Tabela 5 apresenta um resumo com as características apresentadas pelos pacientes no momento do diagnóstico, a ocorrência de eventos desfavoráveis e a situação clínica atual.



Tabela 5 - Características e Evolução dos pacientes

		Todos os pacientes (156)	BFM (122 pacientes)	GBTLI (34 pacientes)
Idade (meses)	Mínima	14m	16m	14m
	Máxima	212m	212m	209m
	Mediana	53m	51m	60m
	Masculino:	80 (51%)	67 (54,9%)	13 (38%)
Sexo	Feminino:	76 (49%)	55 (45,1%)	21 (62%)
GB	Relação ♂/♀	1,05	1,21	0,61
	Mínimo	510	510	560
	Máxima:	481000	481000	10995
	Mediana:	8135	7630	19780
Status SNC	SNC 1	94 (60,2%)	75 (61,4%)	19 (55,8%)
	SNC 2	57 (36,5%)	44 (36%)	13 (38,2%)
	SNC 3	5 (3,2%)	3 (2,45%)	2 (5,8%)
	Remissão	122 (78,2%)	90 (73,7%)	32 (94,1%)
Evolução	Recidiva	12 (7,7%)	11* (9,0%) (*5 óbitos)	1* (2,9%) (*evolui para óbito)
	Óbito	24 (15,4%) (*6 pós recidiva)	22 (18,0%) (*5 pós recidiva)	2 (5,9%) (*1 paciente da recidiva)
	Transferida	4	4	0
	1ª Remissão fora de tto	79	77	2
Situação atual	1ª Remissão em tratamento	43	13	30
	2ª Remissão fora de tto	4	4	0
	Óbito sem documentação remissão	4	4	0
	Óbito em remissão	14	13	1
	Óbito por doença (recidiva ou FI)	6	5	1
	Recaída em tratamento (remissão)	2	2	0
	Transferida	4	4	0
	Perdeu seguimento			



4.2 Avaliação de sobrevida

As taxas de sobrevida global (SG) e SLE em 5 anos foram iguais a 81% e 78,8% respectivamente. (Figura 19)

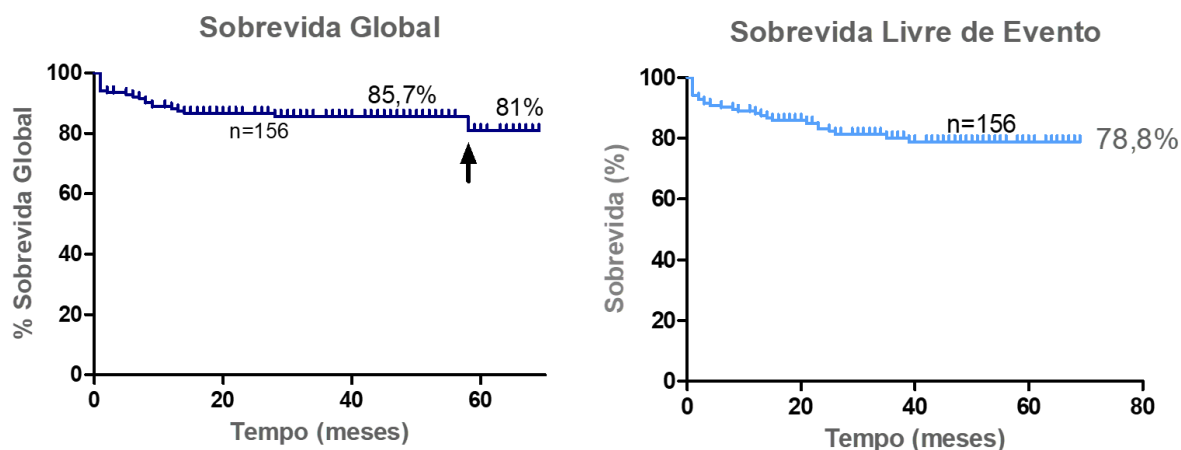


Figura 19 - Sobrevida Global e Sobrevida Livre de Evento de todos os pacientes (n=156). Evento: óbito ou recidiva. Teste log Rank. Em destaque na seta, de óbito de paciente em segunda recaída, com 58 meses de seguimento.

4.2.1 Curvas de sobrevida de acordo com classificação de risco

Foram avaliadas curvas de SG e SLE considerando estratificação de risco dos pacientes tratados pelo protocolo ALL IC BFM 2009 adaptado. Foram realizadas curvas de sobrevida considerando a estratificação no momento do diagnóstico e a classificação de risco ao fim da indução (Figura 20).

Devido o pouco tempo de seguimento e à amostra pequena, não foram realizadas análises de sobrevida no grupo de pacientes tratamento pelo protocolo GBTLI 2021. Os pacientes desse grupo foram incluídos para os cálculos de sobrevida da população global quando foram consideradas as demais variáveis.

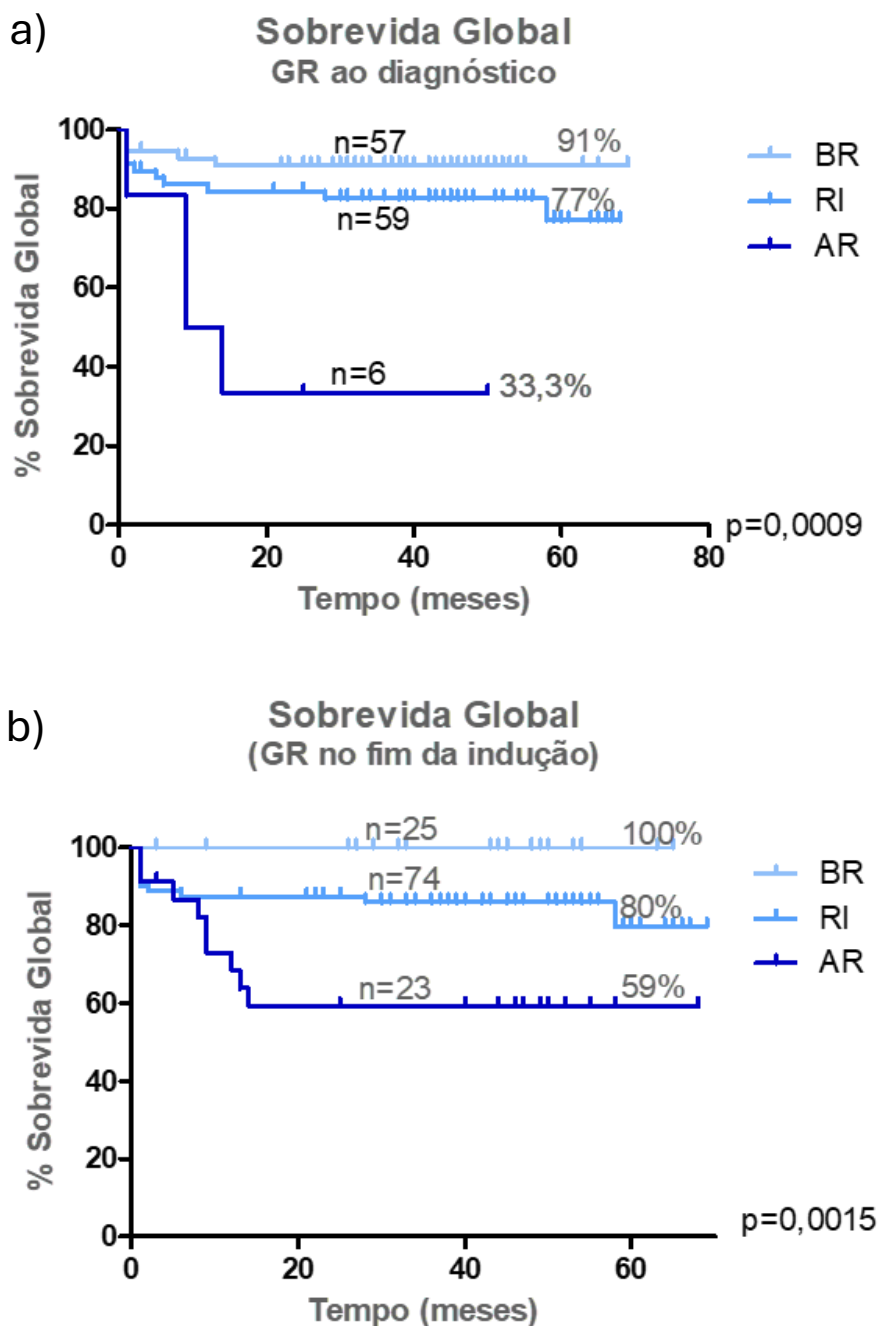


Figura 20 - Curvas de Sobrevida Global (SG) dos pacientes tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 considerando estratificação de risco dos pacientes.

a) SG de acordo com a estratificação de risco ao diagnóstico. b) SG de acordo com classificação de risco ao fim da indução. BR: Baixo Risco; RI: Risco Intermediário; AR: Alto Risco. Teste Log-rank (Mantel-Cox).



4.2.2 Curvas de sobrevida de acordo com os valores de DRM

Avaliamos as curvas de sobrevida dos pacientes tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado considerando os valores de DRM nos D15, D33 e D78. As curvas demonstram taxas de sobrevida inversamente proporcionais aos valores de DRM. (Figura 21). Três pacientes apresentaram valores de DRM no D33 superiores a 20 e após a intensificação do tratamento (1 com TMO) tiveram evolução satisfatória (os três estão em remissão).

Devido ao pouco tempo de seguimento (entre 8 e 20 meses), não avaliamos curva de sobrevida nos grupos de pacientes tratados pelo protocolo GBTLI. Nesse grupo, dois pacientes apresentaram DRM superior a 1,0 (5,8 e 2,7) após a indução e foram encaminhados para tratamento com blinatumumab seguido por TMO. Ambos estão em remissão com tempo de seguimento igual a 19 meses e 12 meses. Os valores de DRM do paciente que apresentou recidiva combinada 2 meses após o diagnóstico e que evoluiu para óbito foram iguais a 3,77 no D15 e 0,19 no D49.

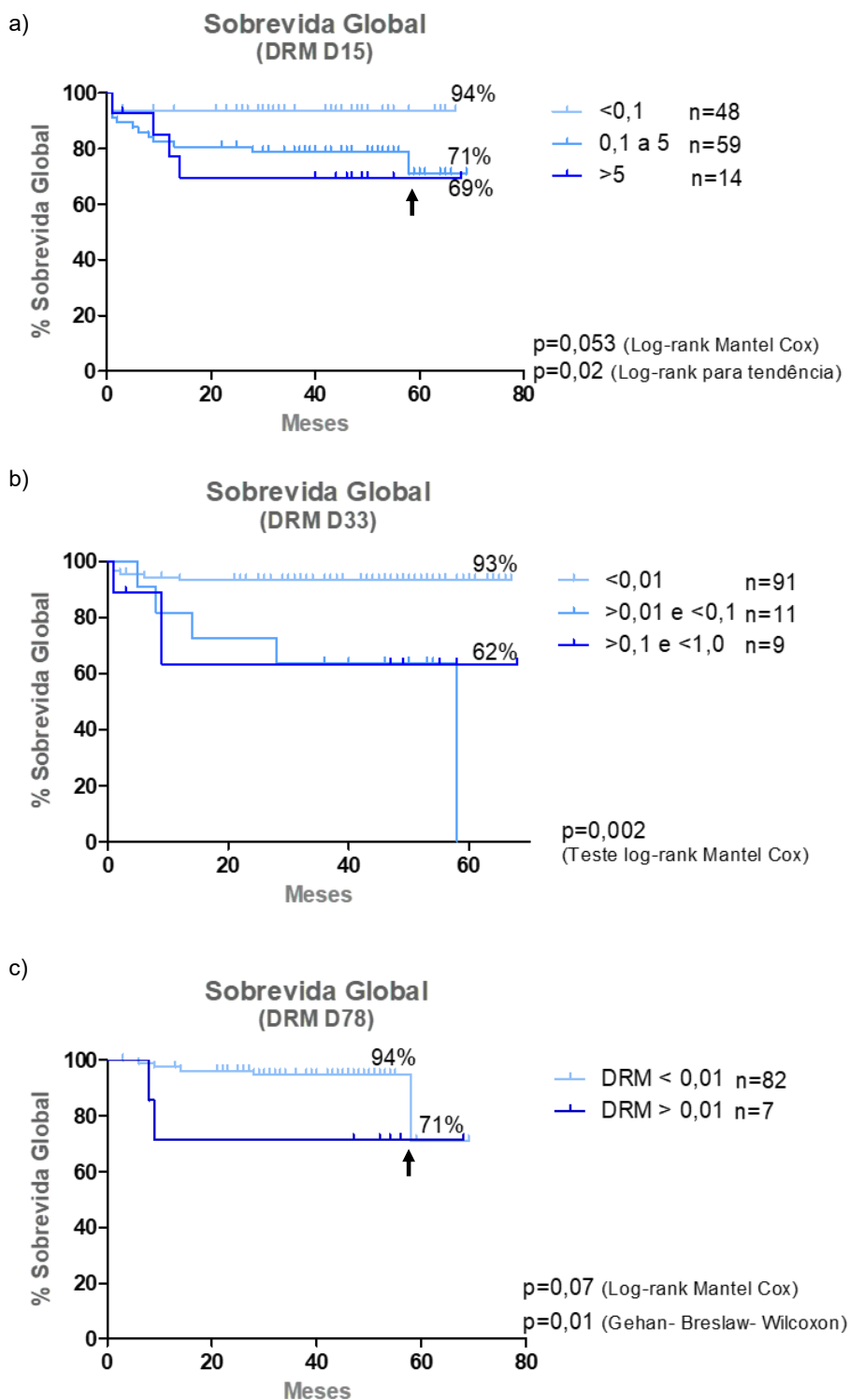


Figura 21 - Curvas de Sobrevida Global dos pacientes de acordo com o valor da DRM em diferentes momentos.

Pacientes tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado. a) SG de acordo com valores de DRM do D15; b) SG de acordo com DRM do D33; c) SG de acordo com valor DRM do D78. Em destaque na seta óbito de um paciente em segunda recaída (58 meses).



4.3 Caracterização biológica da LLA B e avaliação de frequência de alterações biológicas

A Tabela 6 apresenta a frequência encontrada para os diferentes marcadores biológicos e os dados descritos para as mesmas alterações na literatura.

Tabela 6 - Frequência de Marcadores Biológicos na LLA B

	Marcador	pacientes avaliados (n)	positivos (n)	frequência (%)	% descrita	Ref
Citogenética	Alta hiperdiploidia	126	42	33,3	25-30%	(Lejman <i>et al.</i> , 2022)
	Baixa hiperdiploidia		11	8,7	10-11%	(Groeneveld-Krentz <i>et al.</i> , 2019)
	Alta hipodiploidia		3	2,4	0,5%	(Comeaux, Mullighan, 2016).
	Baixa hipodiploidia		5	3,9		
	Alteração estrutural		16	12,7		
rt PCR	<i>ETV6::RUNX1</i>	156	38	24,3	25-30%	(Lejman <i>et al.</i> , 2022).
	<i>TCF3::PBX1</i>		9	5,8	2-6%	(Hein <i>et al.</i> , 2019)
	<i>BCR::ABL1</i>		4	2,7	3-5%	(Kurzrock <i>et al.</i> , 2003)
	Rearranjo no <i>KMT2A</i>		2	0,3	5%	(Zawitkowska <i>et al.</i> , 2022)
	Del <i>IKZF1</i>		21	19,4	15%	(Stanulla; Cave; Moorman, 2020)
MLPA	<i>IKZF1</i> ^{plus}	108	11	10,2	6%	(Stanulla <i>et al.</i> , 2018)
	iAMP21		6	2 (exclusivas): 1,8 4 (<i>ETV6::RUNX1</i>): 3,7	1-2%	(Moorman, 2016).
	AltPAX5		10 (+8 <i>IKZF1</i> ^{plus})	9,2% 16,6%	7-10% 16-33%	(Crepinšek <i>et al.</i> , 2024)
	AltERG		9	5	3-7%	(Clappier <i>et al.</i> , 2014).
Citometria de Fluxo	<i>CRLF2</i>	149	23	15,4		
RT-PCR	<i>P2RY8::CRLF2</i>	150	7	4,7		(Den Boer <i>et al.</i> , 2009)
Pesquisa de mutação de <i>FLT3</i>	Mutação <i>FLT3</i> TKD	155	4	2,6%	5,4%	(Armstrong <i>et al.</i> , 2003)
	Mutação <i>FLT3</i> JM-INDEL		3	1,9%	0-7,5%	(Eyamany <i>et al.</i> , 2014) (Zhang <i>et al.</i> , 2020)
	Mutação <i>FLT3</i> TKD + JM-INDEL		1	0,6%		

A Figura 22 apresenta a classificação e distribuição dos pacientes de acordo com 14 subtipos biológicos de LLA B incluídos na nossa pesquisa.

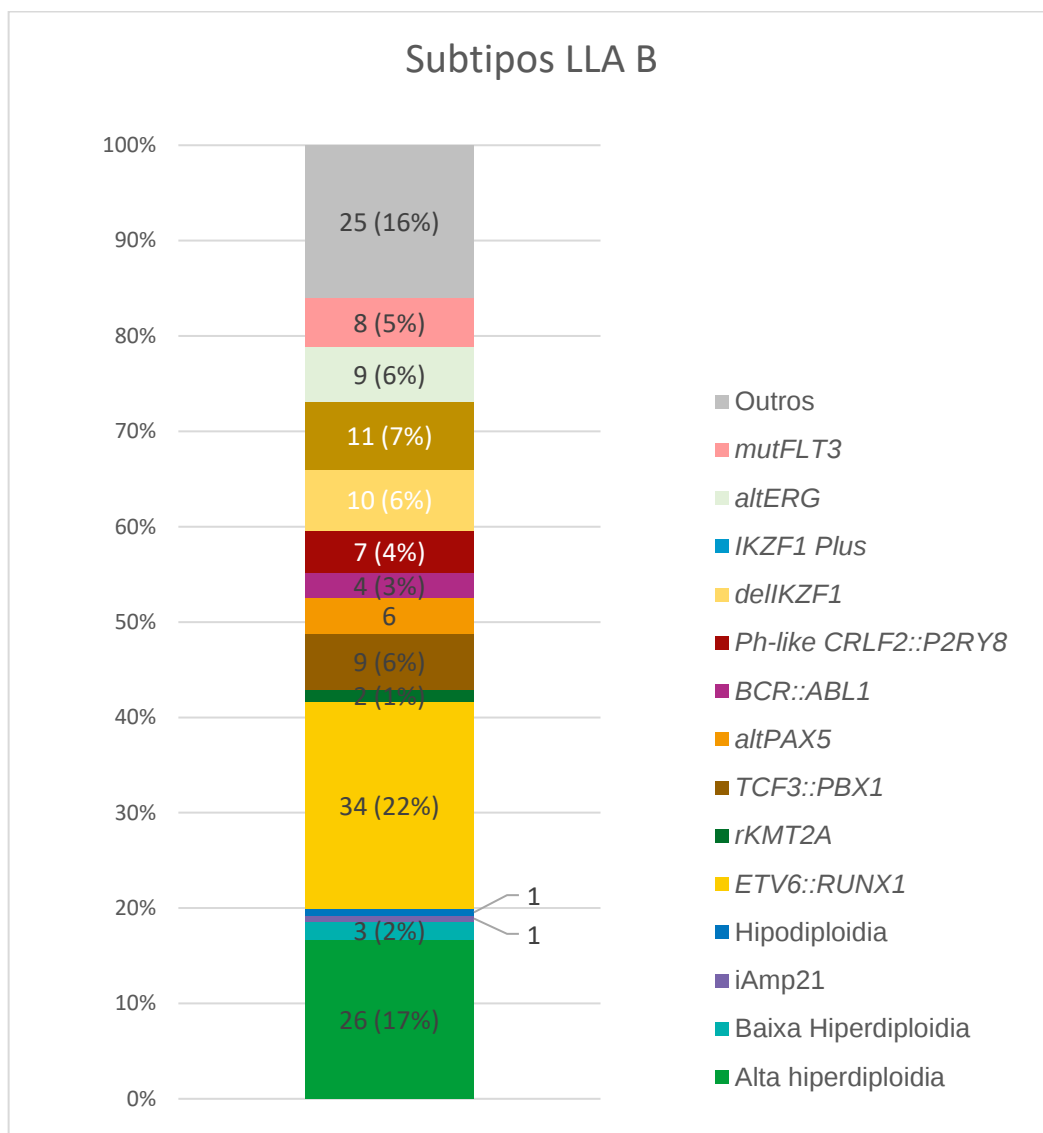


Figura 22 - Subtipos biológicos de LLA B.

4.4 Marcadores biológicos na LLA B: impacto sobre prognóstico e evolução

Avaliamos separadamente os pacientes de acordo com a presença dos marcadores biológicos pesquisados, independente da associação com outras alterações. Foi pesquisada associação com fatores clínicos e laboratoriais no momento do diagnóstico (idade, leucometria), resposta ao tratamento (DRM) e desfecho (recidiva, óbito e sobrevida).

Na Tabela 7 apresentamos as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com os diferentes marcadores biológicos identificados até o momento.



Tabela 7 - Características dos pacientes com diferentes alterações biológicas na LLA B
(continua)

	Alta hiper- diploidia	Baixa hiper- diploidia	Alta hipo- diploidia	Baixa hipo- diploidia	iAMP2 1	ETV6:: RUNX1	Rearranjo no KMT2A	TCF3:: PBX1	BCR:: ABL1	IKZF1 ^{plus}	Del IKZF1	P2RY8:: CRLF2	alt PAX5	alt ERG	mut FLT3
No de pacientes	42	11	3	5	6	38	2	9	4	11	10	7	18	9	8
Mediana idade	51,5	50	150	77	73	49	170	56	46	87	152	50	99	104	52
Rel ♂/♀	0,9	1,75	3 ♂	1,5	5	1,35	2 ♂	0,5	1	0,83	0,66	2,5	0,8	2	0,6
Idade															
1-10	38	7	1	5	5	34	0	6	3	7	4	7	12	5	6
>10	4	4	2	0	1	4	2	3	1	4	6	0	6	4	2
Leucometria															
< 10000	25	2	1	5	5	19	0	2	1	5	5	4	11	6	6
10000 a 50000	15	5	1	0	1	14	0	6	2	3	1	2	5	2	2
50000 a 100000	1	2	0	0	0	3	0	0	0	1	1	1	1	0	0
≥ 100000	1 (2,3%)	2 (18,1%)	1 (33,3%)	0	0	2 (5,2%)	2 (100%)	1 (12,5%)	1 (25%)	2 (18%)	3 (30%)	0	1 (5,5%)	1 (11%)	0
Protocolo de tto															
BFM ALL IC 2009 adap	28	10	3	2	5	33	2	6	4	6	6	7	12	7	6
GBTLI 2021	14	1	0	3	1	5	0	3	0	5	4	0	6	2	2
DRM D15 ou D19															
<0,01	9	2	0	1	2	11	0	1	1	3	1	1	4	2	3
0,01-0,9	23	4	2	3	3	15	0	6	2	4	4	3	8	2	5
1-4,99	5	3	0	1	1	10	1	2	1	2	1	3	4	2	0
≥5	4	2	1	0	0	1	1	0	0	2	4	0	2	3	0
NR	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DRM D33															
<0,01	22	7	1	2	5	28	1	6	2	2	4	5	5	4	5
0,01-0,9	3	3	1	0	0	1	1	0	1	3	1	1	5	2	1
1-4,99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
≥5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
NR	17	1	1	3	1	9	0	3	1	6	4	1	8	0	2
DRM fim da indução															
<0,01	32	6	1	5	4	27	1	7	3	6	6	6	11	7	6
0,01-0,09	1	1	1	0	1	2	1	0	0	1	1	0	1	0	1
1-4,99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
≥5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NR	8	4	1	0	1	9	0	2	1	4	2	1	6	2	1



Tabela 7 – Características dos pacientes com diferentes alterações biológicas na LLA B (conclusão)

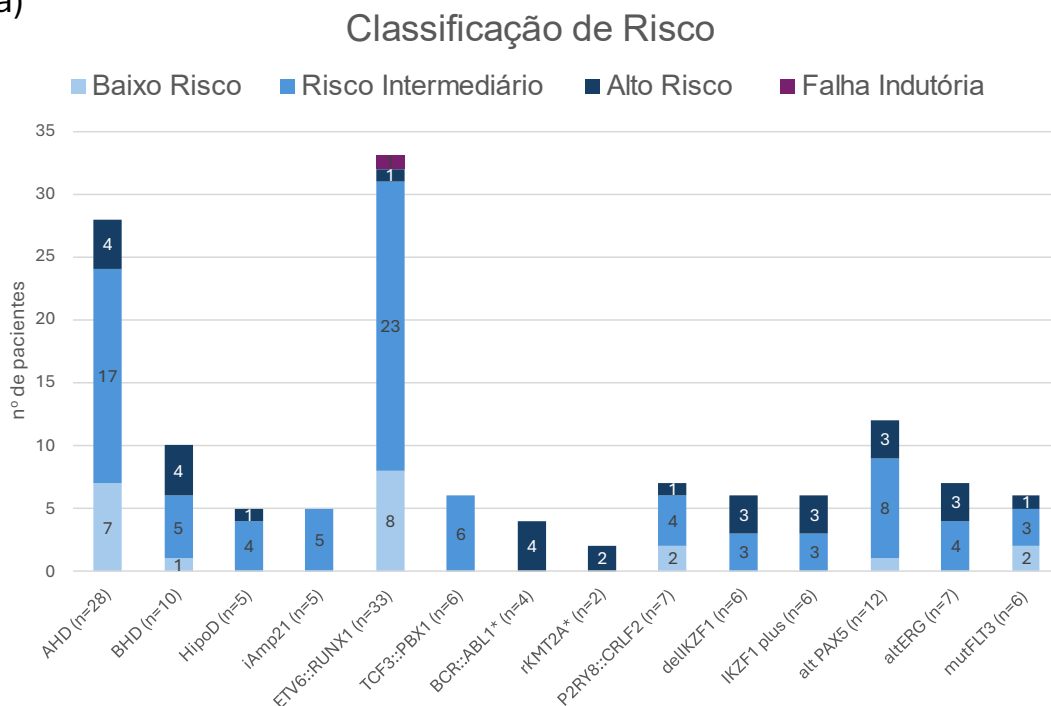
	Alta hiper-diploia	Baixa hiper-diploia	Alta hipo-diploia	Baixa hipo-diploia	iAMP21	ETV6::RUNX1	Rearranjo no KMT2A	TCF3::PBX1	BCR::ABL1	IKZF1 ^{plus}	Del IKZF1	P2RY8::CRLF2	alt PAX5	alt ERG	mut FLT3
No de pacientes	42	11	3	5	6	38	2	9	4	11	10	7	18	9	8
GR fim indução															
BR BFM	7	1	0	0	0	8	0	0	0	0	0	2	1	0	2
RI BFM	17	5	2	2	5	23	0	6	0	3	3	4	8	4	3
AR BFM	4	4	1	0	0	2	2	0	4	2 + 1r	3	1	2 + 1r	3	1
RBV GBTLI	2	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	2	0	0
RI GBTLI	8	0	0	0	0	2	0	0	0	2	2	0	3	2	1
AR GBTLI	3	1	0	3	1	2	0	3	0	1	1	0	1	0	1
EAR GBTLI	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Evento															
Recidiva	3	1	1	0	0	3 + 1FI	0	1	0	3 (27%)	0	0	4	1	2
Óbito	4	4	0	0	0	5	1	0	2	1 (OI)	1	1 (OI)	6	2	1

BR BFM: baixo risco do protocolo BFM; RI BFM: risco intermediário do protocolo BFM; AR BFM: alto risco do protocolo BFM; RBV GBTLI: risco básico verdadeiro do protocolo GBTLI; RI GBTLI: risco intermediário do protocolo GBTLI; AR GBTLI: alto risco do protocolo GBTLI; EAR GBTLI: extremo alto risco do protocolo GBTLI



Abaixo, apresentamos a distribuição dos pacientes com as diferentes alterações biológica de acordo com a classificação de risco.

a)



b)

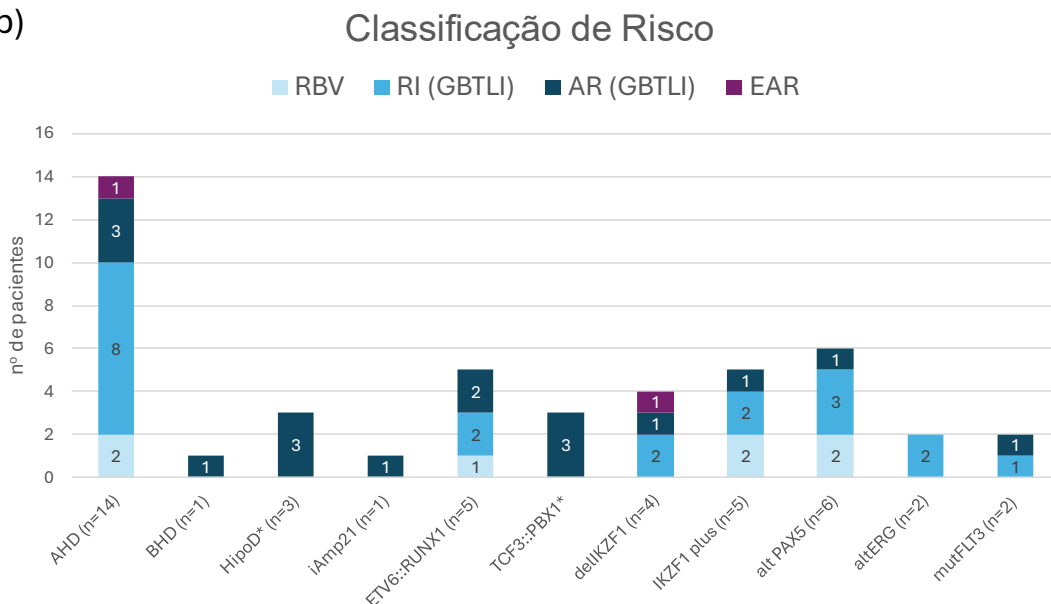


Figura 23 - Classificação de risco ao fim da indução

a) Pacientes tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado. b) Pacientes tratados pelo protocolo GBTLI 2021. Obs.: *BCR::ABL1*, *rKMT2A* são critérios para classificação de alto risco nos protocolos BFM e GBTLI; hipodiploidia e *TCF3::PBX1* são critérios para classificação de alto risco no protocolo GBTLI 2021.



4.4.1 Aneuploidias

Analizamos o cariótipo de 126 pacientes. Em 19 pacientes, não houve identificação de metáfise para determinação do cariótipo. Outros motivos que impossibilitaram a avaliação citogenética foram a falta de coleta de material (6 crianças), ausência de crescimento de células no meio de cultura (3) e amostra inadequada para análise (coagulada em 2 pacientes).

A alta hiperdiploidia, presente em 33,3% dos pacientes com cariótipo analisado (42/126), foi a alteração citogenética mais comum, seguida por alterações estruturais (translocações, deleções ou ganhos cromossômicos – 12,7%), baixa hiperdiploidia (8,7%). Hipodiploidia foi encontrada em 8 pacientes (6,3%), sendo casos 3 de alta hipodiploidia (40 a 44 cromossomos) e 5 casos de baixa hipodiploidia (<40 cromossomos) (Figura 24).

Distribuição dos pacientes de acordo com o cariótipo

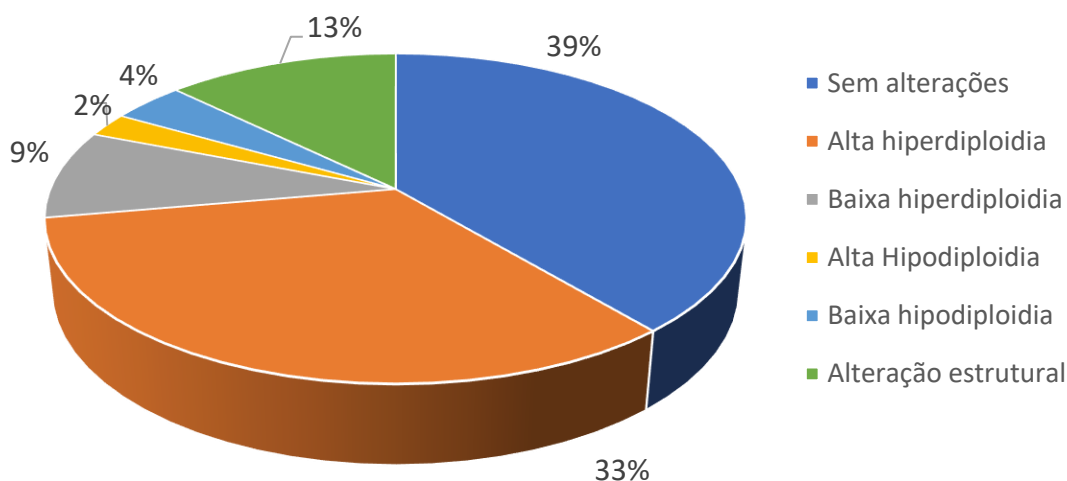


Figura 24 - Distribuição dos pacientes de acordo com a avaliação citogenética (n: 126 pacientes). Alta-hiperdiploidia (50 ou mais cromossomos), Baixa hiperdiploidia (47 a 49 cromossomos), Hipodiploidia (< 46 cromossomos).

Pacientes com alta hiperdiploidia apresentam maior proporção de pacientes com critérios para classificação de baixo risco, enquanto pacientes com baixa hiperdiploidia maior proporção de pacientes estratificados como de alto risco (Tabela 8). Segundo o protocolo BFM ALLIC 2009 original a hipodiploidia constitui um critério



para estratificação como alto risco. Até 2020 a avaliação citogenética dos pacientes era realizada em laboratório parceiro e pelo fato de não termos acesso aos resultados antes do término da indução, não foi possível adotar a avaliação citogenética para a classificação de risco dos pacientes. A partir de setembro de 2022, com a estruturação do serviço de citogenética em nosso serviço e a adoção do protocolo GBTLI 2021, os pacientes com hipodiploidia passaram a ser classificados como alto risco (Tabela 8).

Tabela 8 - Protocolo de tratamento e classificação final de risco dos pacientes com aneuploidias (alta hiperdiploidia, baixa hiperdiploidia e hipodiploidia)

Protocolo de Tratamento	Classificação de risco após a indução n (%)	Alta hiperdiploidia (n=42)	Baixa Hiperdiploidia (n=11)	Hipodiploidia (n=8)
BFM ALLIC 2009 adaptado	Baixo Risco	7 (25%)	1 (10%)	0
	Risco Intermediário	17 (61%)	5 (50%)	4 (80%)
	Alto risco	4 (14%)	4 (40%)	1 (20%)
GBTLI 2009	Baixo Risco Verdadeiro	2 (14%)	0	0
	Risco Intermediário	8 (44%)	0	0
	Alto Risco	3 (21%)	1	3*
	Extremo Alto Risco	1 (7%)	0	0

*Hipodiploidia é critério para classificação de alto risco no protocolo GBTLI

Hipodiploidia

Identificamos hipodiploidia em 8 pacientes, sendo alta hipodiploidia em 2 pacientes tratados pelo protocolo ALLIC 2009 adaptado e um paciente tratado pelo protocolo GBTLI 2021 e baixa hipodiploidia em 3 pacientes tratados pelo protocolo BFM e 2 pacientes tratados pelo protocolo GBTLI 2021. Na nossa amostra, nenhum paciente apresentou quase haploidia (Tabela 9).

Dos três pacientes com alta hipodiploidia, um paciente foi classificado como *IKZF1*^{plus}, apresentou recidiva e evoluiu para óbito. Um paciente apresentou associação com *ETV6::RUNX1* e no outro caso a alta hipodiploidia foi encontrada isoladamente.



Entre os cinco pacientes com baixa hipodiploidia observamos associação com os rearranjos *ETV6::RUNX1* em 2 casos (ambos tratados pelo BFM) e *TCF3::PBX1* em 1 caso (também tratado pelo BFM). Um paciente tratado pelo GBTLI 2021 apresentava critérios para classificação com *IKZF1*^{plus}. Em apenas um caso a baixa hipodiploidia foi encontrada isoladamente.

Entre os 3 pacientes com baixa hipodiploidia tratados pelo protocolo ALLIC 2009 adaptado, dois pacientes foram classificados como risco intermediário e um como alto risco. O motivo pelo qual os pacientes não receberam tratamento para alto risco, como preconizado pelo protocolo BFM original, é o fato de que até 2020, o cariótipo era realizado em outra instituição e não tínhamos acesso aos resultados do cariótipo antes do fim da indução. Por esse motivo, não adotávamos as alterações citogenéticas como critério para classificação de risco. A partir da implementação do protocolo GBTLI 2021, passamos a considerar a presença de hipodiploidia como critério para classificação de alto risco. Desde então (setembro de 2022), identificamos baixa hipodiploidia em 2 pacientes e em ambos os casos o achado foi isolado, ou seja, não foram identificados outros marcadores biológicos de LLA B.

Em relação aos valores de DRM, apenas o paciente com *IKZF1*^{plus} e alta hipodiploidia apresentou DRM superior a 5 no D15 (11%) e positiva no D78 (0,04%). Esse paciente, evoluiu para recidiva isolada medular 3 meses após o diagnóstico e óbito com doença em atividade.

Não houve nenhum caso de óbito associado ao tratamento entre os oito pacientes com hipodiploidia. O tempo de seguimento dos pacientes variou de 12 a 65 meses. Devido número amostral reduzido, consideramos o grupo com “hipodiploidia” (incluindo alta e baixa hipodiploidia) para análise de correlações e de sobrevida.

A tabela 9 sumariza as características biológicas, valores de DRM e evolução do grupo de pacientes com hipodiploidia.



Tabela 9 - Características dos 08 pacientes com hipodiploidia.

	Protocolo de tratamento (n)	Alteração associada (n)	DRM ao fim da indução	Evento (sobrevida em meses)
Baixa Hipodiploidia (5)	BFM ALLIC 2009 adaptado (3)	<i>ETV6::RUNX 1</i> (2)	Negativa (3)	RFT (2)
		<i>TCF3::PBX1</i> (1)		REF (1)
	GBTLI 2021 (2)	<i>IKZF1</i> ^{plus} (1) Não (1)	Negativa (2)	RET
Alta hipodiploidia (3)	BFM ALLIC 2009 adaptado (2)	<i>IKZF1</i> ^{plus}	Positiva (1)	R/OL (1)
		Não (1)	Negativa (1)	RFT (1)
	GBTLI 2021 (1)	<i>ETV6::RUNX1</i> (1)	Negativa (1)	RET (1)

RFT: remissão fora de tratamento; RET: remissão em tratamento; R/OL: recidiva/óbito por leucemia.

Alta hiperdiploidia

Presente em um terço dos pacientes que tiveram cariótipo analisado em 26,9% de todos os casos, a alta hiperdiploidia ocorreu em associação com o rearranjos recorrentes em 6 pacientes: *ETV6::RUNX1* em 4 casos, *BCR::ABL1* em 1 caso e *TCF3::PBX1* em 1 caso.

Em 23 pacientes o laudo do exame citogenético apresentava descrição detalhada com especificação dos ganhos e perdas cromossômicas. Considerando critérios de classificação de risco da alta hiperdiploidia proposto pelo grupo do Reino Unido (UKALL) (Enshei *et al*, 2021), classificamos 18 (78%) pacientes como hiperdiploidia de baixo risco (presença de trissomia dos cromossomos 17 e 18 ou trissomia do 17 ou 18 na ausência de trissomia dos cromossomos 5 ou 20) e houve um caso de recidiva nesse grupo (5,5%). Entre os cinco pacientes classificados como hiperdiploidia de alto risco, um evoluiu para recidiva (20%). Apesar da diferença na proporção, essa diferença não se mostrou estatisticamente significativa ($p=0,39$, teste exato de Fisher).

Em relação aos valores de DRM a fim da indução, um paciente com alta hiperdiploidia tratado pelo protocolo BFM ALLIC apresentou DRM igual a 0,05%, mas entrou em remissão após o ciclo de consolidação e se encontra em remissão após 56 meses de seguimento. Dois pacientes tratados pelo protocolo GBTL mantiveram DRM



detectável após o D49, um das quais foi direcionada para TMO (DRM D49 igual a 5,8%) e está em remissão após 19 meses de seguimento e outro, cuja DRM do D48 foi igual a 0,19%, evoluiu para progressão da doença e óbito.

Ao todo, três pacientes com alta hiperdiploidia apresentaram recidiva. Em dois casos observamos trissomia do cromossomo 20, sendo um deles associada à trissomia dos cromossomos 17 e 18 (ou seja, classificado como hiperdiploidia de baixo risco, segundo critérios do grupo UKALL. O laudo do exame citogenético de um paciente não especificava os ganhos e perdas cromossômicas devido à má qualidade das metáfises. Três pacientes foram a óbito por toxicidade.

A Figura 25 apresenta a avaliação de correlação entre a presença de alta hiperdiploidia, baixa hiperdiploidia, hipodiploidia ou alterações estruturais com as variáveis clínicas (idade e leucometria) e de resposta ao tratamento (valores de DRM).

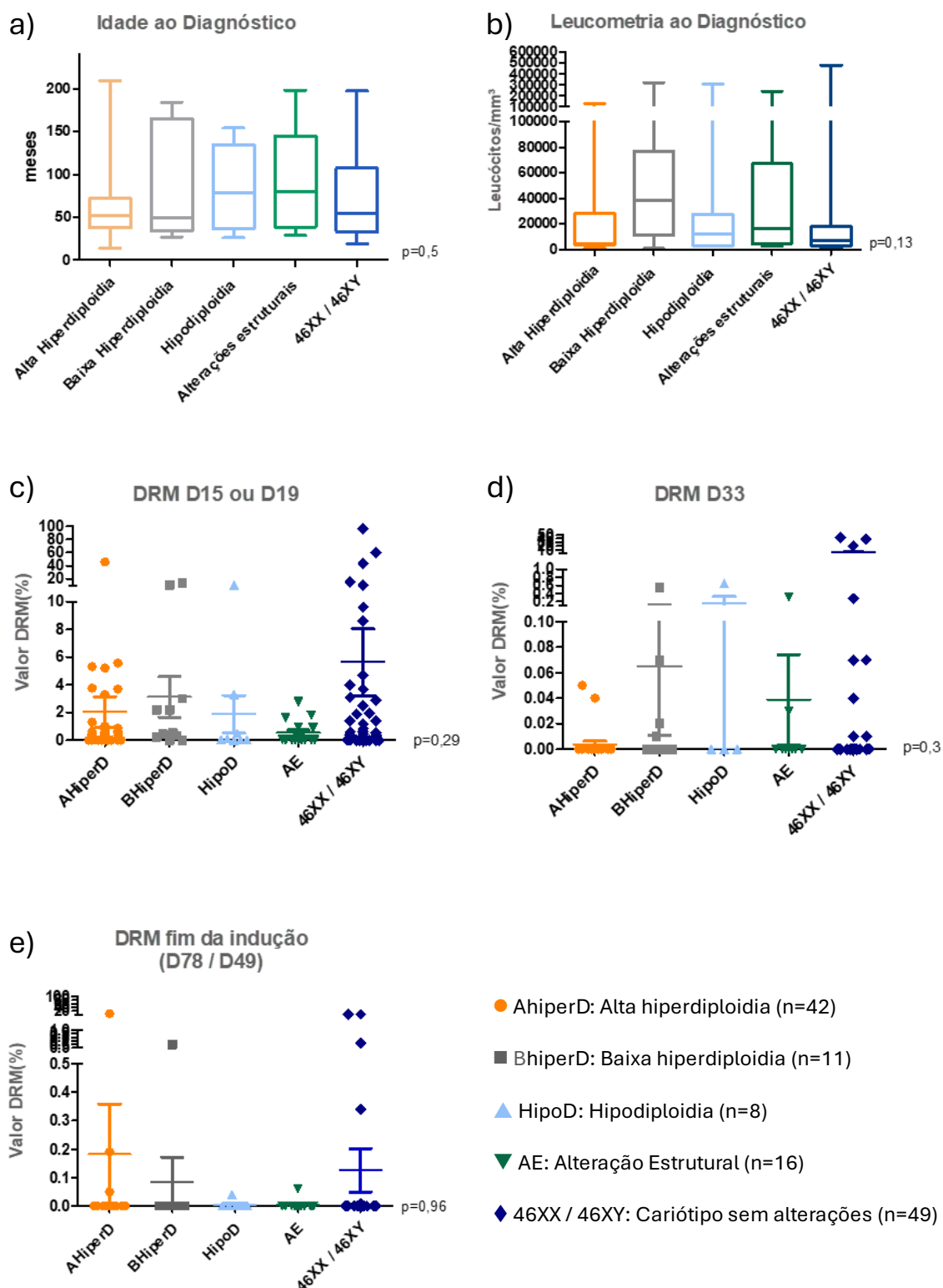


Figura 25 - Avaliação de parâmetros clínicos e de resposta a tratamento (DRM) considerando grupos baseados na presença de alteração citogenética.

a) Idade ao diagnóstico ($p>0,05$); b) Leucometria ao diagnóstico ($p>0,05$); c) Valor de DRM no D15 ou D19 ($p>0,05$); d) Valor de DRM no D33 ($p>0,05$); e) Valor de DRM do D78 ou D49 ($p>0,05$). Teste Kruskal-Wallis.



Quando avaliamos as curvas de sobrevida, pacientes com alta hiperdiploidia mostraram SG e SLE superiores e os pacientes com baixa hiperdiploidia apresentaram as menores taxas, mas os achados não foram estatisticamente significativos (Figura 26).

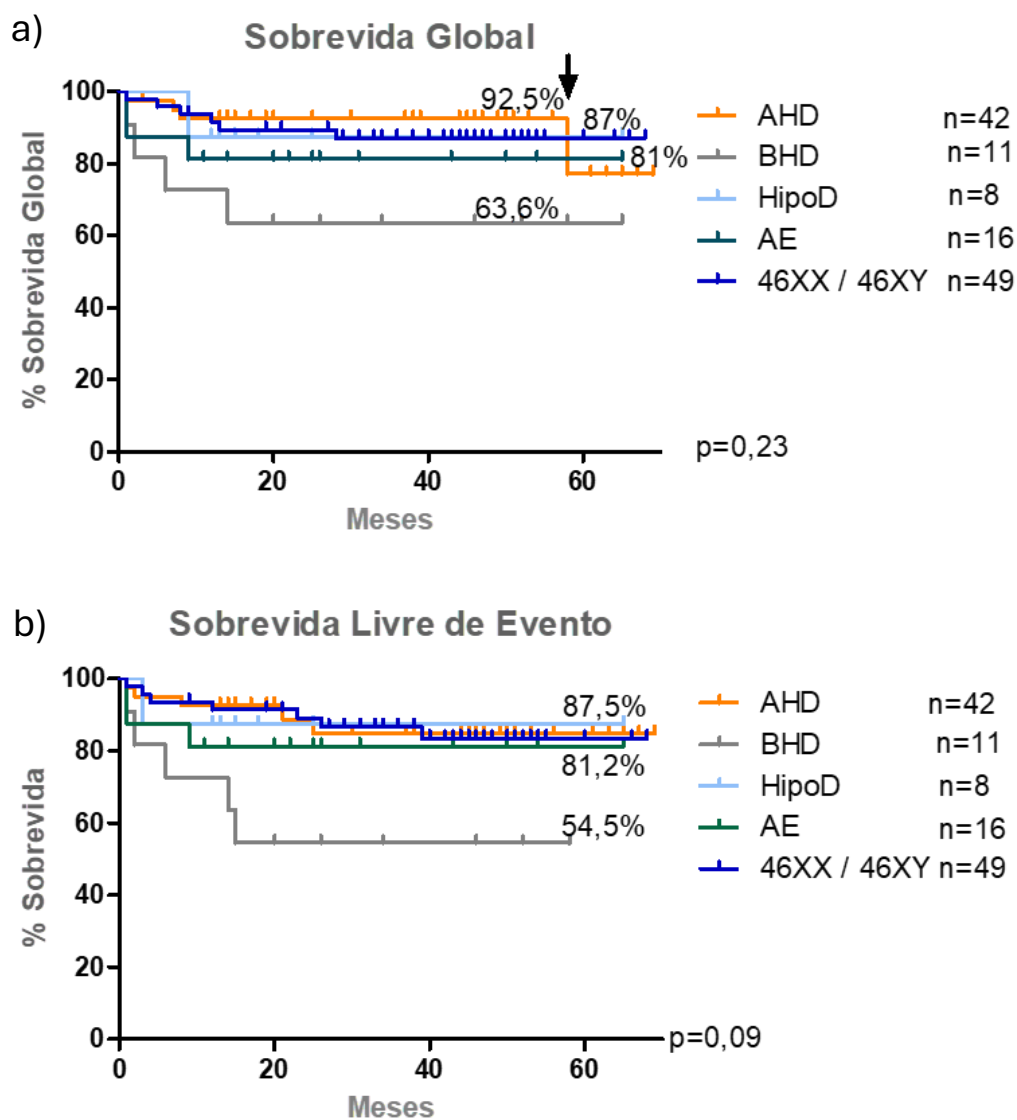


Figura 26 - Curvas de Sobrevida dos pacientes considerando alterações citogenéticas. AHD: alta hiperdiploidia; BHD: baixa hiperdiploidia; HipoD: hipodiploidia; AE: alteração estrutural. a) Sobrevida Global. Em destaque na seta óbito de paciente em segunda recaída 58 meses após o diagnóstico (p=0,23) b) Sobrevida Livre de Evento (p=0,09). Teste Log Rank Mantel Cox.

iAMP21

A pesquisa de iAMP21 foi realizada em 112 pacientes. Isso decorre do fato de que até 2022 a realização de MLPA para a pesquisa de iAMP21 era realizado apenas



para os pacientes que não apresentavam alterações no cariótipo ou rearranjos recorrentes. A partir de 2022 o exame passou a ser introduzido na rotina independente da presença de alterações moleculares ou citogenéticas.

Encontramos iAMP21 em 6 pacientes (5,7% dos casos pesquisados), sendo que em 2 casos, ela estava associada à baixa hipodiploidia e à mutação *ETV6::RUNX1* e em 2 casos associada à mutação *ETV6::RUNX1*. Se considerarmos a presença exclusiva da iAMP21 (2 casos), temos uma frequência igual a 1,9%, como ilustrado na Figura 27.

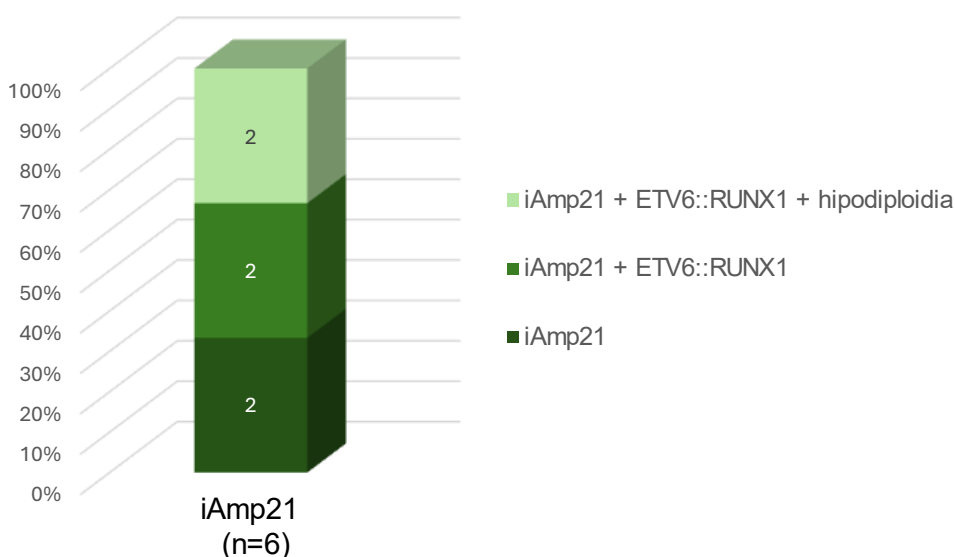


Figura 27 - Representação dos 6 casos de iAMP21 em relação a alterações associadas. *ETV6::RUNX1* esteve presente em 4/6 casos, hipodiploidia em 2 casos (ambos com *ETV6::RUNX1*) e em 2 pacientes a iAMP21 foi encontrada isoladamente.

Em relação à classificação final de risco, os cinco pacientes com iAMP21 tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado foram considerados como de risco intermediário. Um paciente com iAMP21 foi tratado pelo protocolo GBTLI e preenchia critérios para classificação de alto risco (DRM D49 igual a 0,06).

Não encontramos diferença entre idade, GB ao diagnóstico e valores de DRM aferidos no meio e no fim da indução quando comparamos os pacientes com iAMP21 e os demais pacientes (teste Mann Whitney).



Nenhum dos 6 pacientes apresentou óbito ou recidiva. Os seis pacientes estão em remissão com tempo de seguimento que varia entre 20 e 60 meses.

4.4.2 Rearranjos recorrentes detectados por RT-PCR

Em 33,3% dos pacientes estudados, identificamos uma das translocações recorrentes descritas para LLA B. O rearranjo *ETV6::RUNX1* foi o mais frequente, encontrado em 38 pacientes (24,3%). O *TCF3::PBX1* foi encontrado em 9 pacientes (5,8%) e *BCR::ABL1* em 4 pacientes (2,6%). Dois pacientes apresentaram rearranjo no *KMT2A* (*KMT2A/AFF1* e *KMT2A::ELL*) (Figura 28).

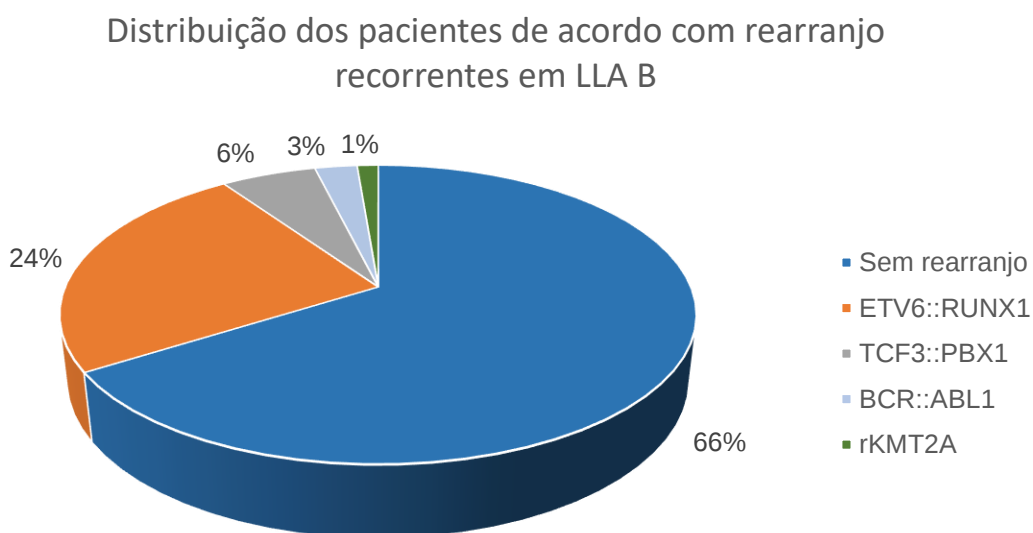


Figura 28 - Distribuição dos pacientes de acordo com a presença de translocações recorrentes. (n=156). Ausência de rearranjo identificado: 103 pacientes, *ETV6::RUNX1*: 38 pacientes, *TCF3::PBX1*: 9 pacientes, *BCR-ABL1*: 4 pacientes, rearranjo no *KMT2A*: 2 pacientes.

A seguir demonstramos a distribuição dos pacientes com diferentes rearranjos recorrentes de acordo com a classificação de risco ao fim da indução (tabela 10) e a avaliação de associação entre diferentes rearranjos recorrentes e variáveis clínicas, valores de DRM e curvas de sobrevida (SG e SLE) (Figura 29 e Figura 30).



Tabela 10 - Protocolo de tratamento e classificação final de risco dos pacientes com rearranjos recorrentes.

Protocolo de Tratamento	Classificação de risco após a indução n (%)	Sem rearranjo (n=103)	<i>ETV6::RUNX1</i> (n=38)	<i>TCF3::PBX1</i> (n=9)	<i>BCR::ABL1</i> (n=4)	<i>rKMT2A</i> (n=2)
BFM ALLIC 2009 adaptado	Baixo Risco	17 (23%)	8 (24%)	0	0	0
	Risco Intermediário	43 (57%)	23 (70%)	6 (100%)	0	0
	Alto risco	15 (30%)	1 (3%)	0	4*	2*
	Falha Indutória (Interrupção por infecção)	0	1 (3%)	0	0	0
GBTLI 2009	Baixo Risco Verdadeiro	3 (11%)	1 (20%)	0	0	0
	Risco Intermediário	16 (57%)	2 (40%)	0	0	0
	Alto Risco	7 (25%)	2 (40%)	3*	0	0
	Extremo Alto Risco	2 (7%)	0	0	0	0

**BCR::ABL1* e *rKMT2A* são critérios para classificação de alto risco nos protocolos BFM e GBTLI. *TCF3::PBX1* é critério para classificação de alto risco no protocolo GBTLI.

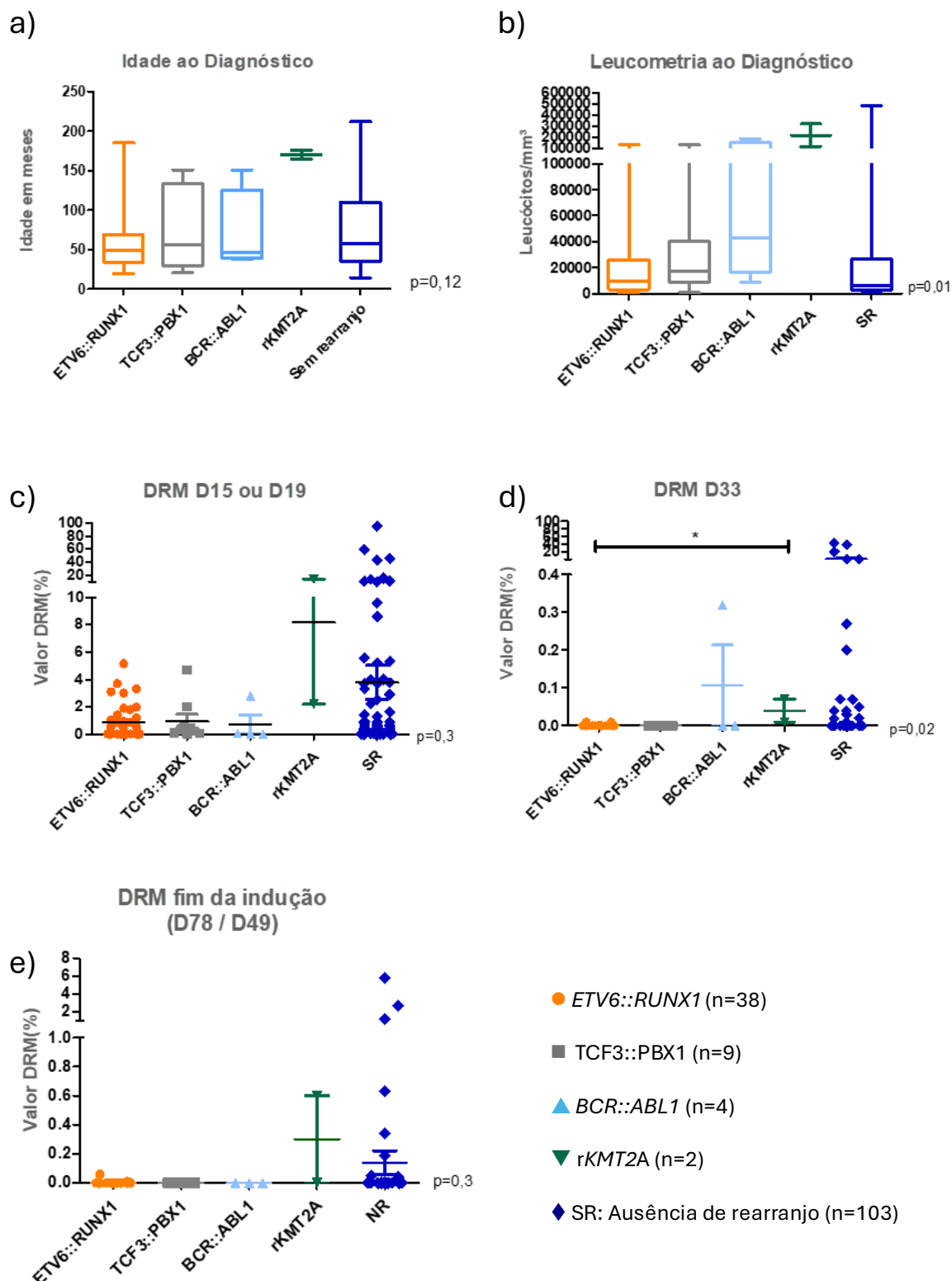
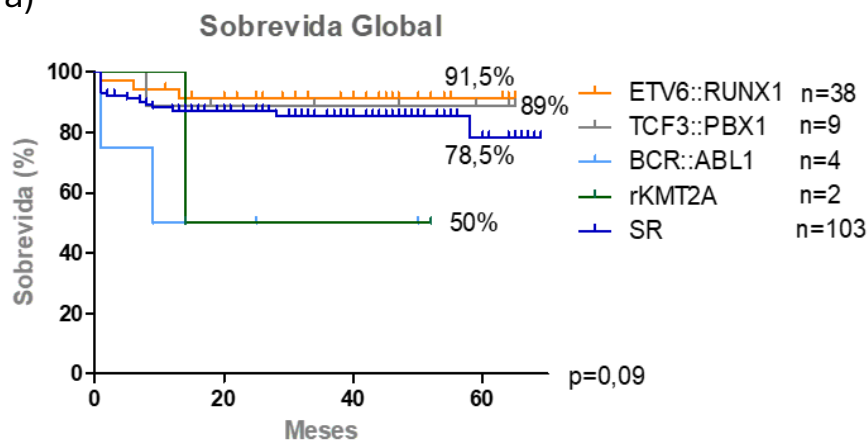


Figura 29 - Avaliação de parâmetros clínicos e de resposta a tratamento (DRM) considerando grupos baseados na presença de translocações recorrentes em LLA B.

a) Idade ao diagnóstico ($p > 0,05$); b) Leucometria ao diagnóstico ($p < 0,05$); c) Valor de DRM no D15 ou D19 ($p > 0,05$); d) Valor de DRM no D33; e) Valor de DRM do D78 ou D49 ($p > 0,05$). Teste Kruskal-Wallis.



a)



b)

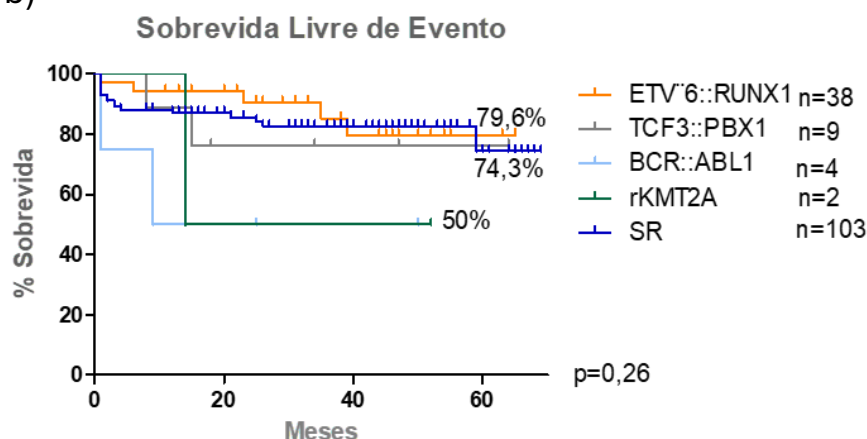


Figura 30 - Curvas de Sobrevida Global (SG) e Sobrevida Livre de Evento (SLE) dos pacientes com diferentes rearranjos recorrentes em LLA B. (Log-rank Mantel Cox). SR: Ausência de rearranjo.

ETV6::RUX1

Presente em 24,3% dos pacientes, o rearranjo *ETV6::RUX1* foi observado em 38 pacientes com idade entre 20 e 185 meses, sendo 58% (22) do sexo masculino e 42% (16) do sexo feminino. Nenhum paciente desse grupo apresentou infiltração do SNC e dois pacientes apresentaram leucometria superior a 50000/mm³ ao diagnóstico. Trinta e dois pacientes foram tratados segundo o protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado, sendo 8 classificados como baixo risco, 22 como risco intermediário, 1 como alto risco e 1 paciente apresentou falha indutória em decorrência de interrupção do tratamento por infecção fúngica invasiva. Entre os pacientes tratados pelo protocolo GBTLI 2021, 4 foram classificados como risco intermediário e 2 como de alto risco. Apenas um paciente, tratado pelo protocolo GBTLI 2021, apresentou



DRM positiva ao fim da indução. Esse paciente foi direcionado para tratamento de alto risco e a DRM negativou após a consolidação.

Quatro pacientes foram a óbito por toxicidade (infecção), sendo dois no período de indução (25 e 26 dias após o diagnóstico), um na segunda fase de indução (D43) e outro paciente 6 meses após o diagnóstico.

Os três pacientes desse grupo que apresentaram recidiva (tardia isolada testicular, precoce isolada medular e tardia isolada medular) estão em remissão com tempo de seguimento de 64, 42 e 40 meses após o diagnóstico.

As taxas de SG e SLE em 5 anos foram iguais a 91,5% e 79,6% respectivamente, com tempo de seguimento variando entre 11 e 64 meses.

TCF3::PBX1

O rearranjo *TCF3::PBX1* foi encontrado em 9 pacientes, sendo 5 do sexo feminino e 3 do sexo masculino. Um paciente apresentou hiperleucocitose acima de 100 mil. Os seis pacientes tratados pelo protocolo BFM foram classificados como risco intermediário. Três pacientes foram tratados pelo protocolo GBTLI e o próprio rearranjo *TCF3::PBX1* foi o critério para que fossem considerados como de alto risco (em um caso, paciente tinha 10 anos de idade, outro critério para classificação de alto risco).

Um paciente (do grupo tratado pelo BFM ALLIC 2009 adaptado) apresentou recidiva isolada de SNC muito precoce, recebeu tratamento e encontra-se em remissão. Uma paciente (tratada pelo GBTLI) foi a óbito remissão por complicação infecciosa no oitavo mês de tratamento (DRM do D19 e do D49 estavam negativas).

BCR::ABL1

Quatro crianças (2,7%) apresentaram a t(9;22). Os quatro casos foram tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado (diagnóstico antes de setembro de 2022). Uma paciente do sexo feminino tinha mais de 10 anos de idade e leucometria inicial igual a 190mil. Os demais tinham idade entre 3 anos e 4 anos e 1 mês e a contagem de GB era inferior a 50 mil. Observamos associação entre maiores níveis de GB ao diagnóstico de a presença de *BCR::ABL1*.

Um paciente foi a óbito durante a indução, mas a DRM coletada no D15 era igual a 0,03%. A DRM ao fim da indução foi indetectável nos outros três pacientes.



Houve um óbito por toxicidade relacionada ao tratamento (infecção) 9 meses após o diagnóstico.

rKMT2A

Dois pacientes apresentaram rearranjos envolvendo o gene *KMT2A*, (*MLLT1::KMT2A* e *AFF1::KMT2A*). Ambos do sexo masculino, idade superior a 10 anos (176 e 165 meses) e apresentaram leucometria acima de 100000/mm³ ao diagnóstico (117500/mm³ e 322000/mm³). Um dos pacientes (*MLLT1::KMT2A*) apresentou valores de DRM no D15, D33 e D78 iguais a 2,2%, 0,01% e 0,6% respectivamente. Esse paciente recebeu tratamento com quimioterapia intensiva (blocos HR), houve negativação da DRM e está em remissão após 52 meses de seguimento. O outro paciente (*AFF1::KMT2A*), apresentou DRM igual a 14% no D15; 0,07% no D33 e negativa no D78, mas foi a óbito por sepse 14 meses após o diagnóstico (após “Protocolo II”).

4.4.3 LLA Ph like *P2RY8::CRLF2*

A fusão dos genes *P2RY8::CRLF2* foi pesquisada em 150 crianças e foi identificada em 7 pacientes (4,7%), todos do grupo tratado pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado. Em quatro deles, a expressão do *CRLF2* foi documentada pela citometria de fluxo (um dos quis com marcação “fraca”). Nos outros três, não houve marcação do *CRLF2* na imunofenotipagem.

Um paciente foi considerado como de alto risco (DRM D33), três com risco intermediário, dois como de baixo risco. Um paciente foi a óbito na indução (D26 de tratamento) por complicação infecciosa. Até o presente momento, não houve recidiva nesse grupo de pacientes. Os tempos de seguimento dos pacientes são iguais a 26, 31, 46, 50, 51 e 28 meses.

Não identificamos associação entre a presença do rearranjo *P2RY8::CRLF2* e idade, leucometria ou valores de DRM (Figura 31).

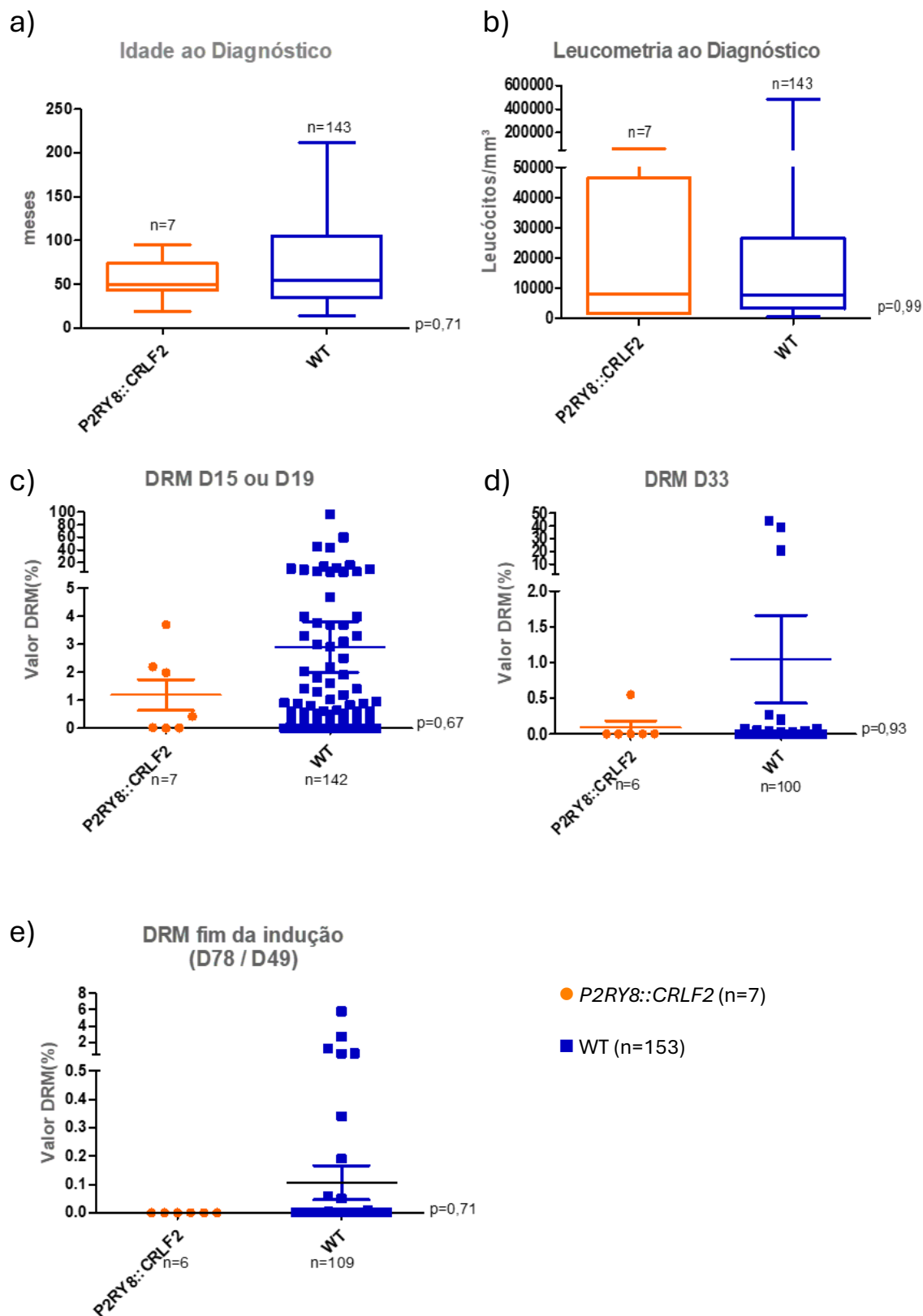


Figura 31 - Avaliação de parâmetros clínicos e de resposta a tratamento (DRM) considerando grupos baseados na presença do rearranjo *P2RY8::CRLF2*.
a) Idade ao diagnóstico; b) Leucometria ao diagnóstico; c) Valor de DRM no D15 ou D19; d) Valor de DRM no D33; e) Valor de DRM do D78 ou D49). Teste Mann Whitney.



Não houve diferença nas taxas de sobrevida no pequeno grupo de pacientes com subtipo Ph like *P2RY8::CRLF2*, conforme apresentado na Figura 32 (deve-se considerar o número amostral reduzido para esta análise).

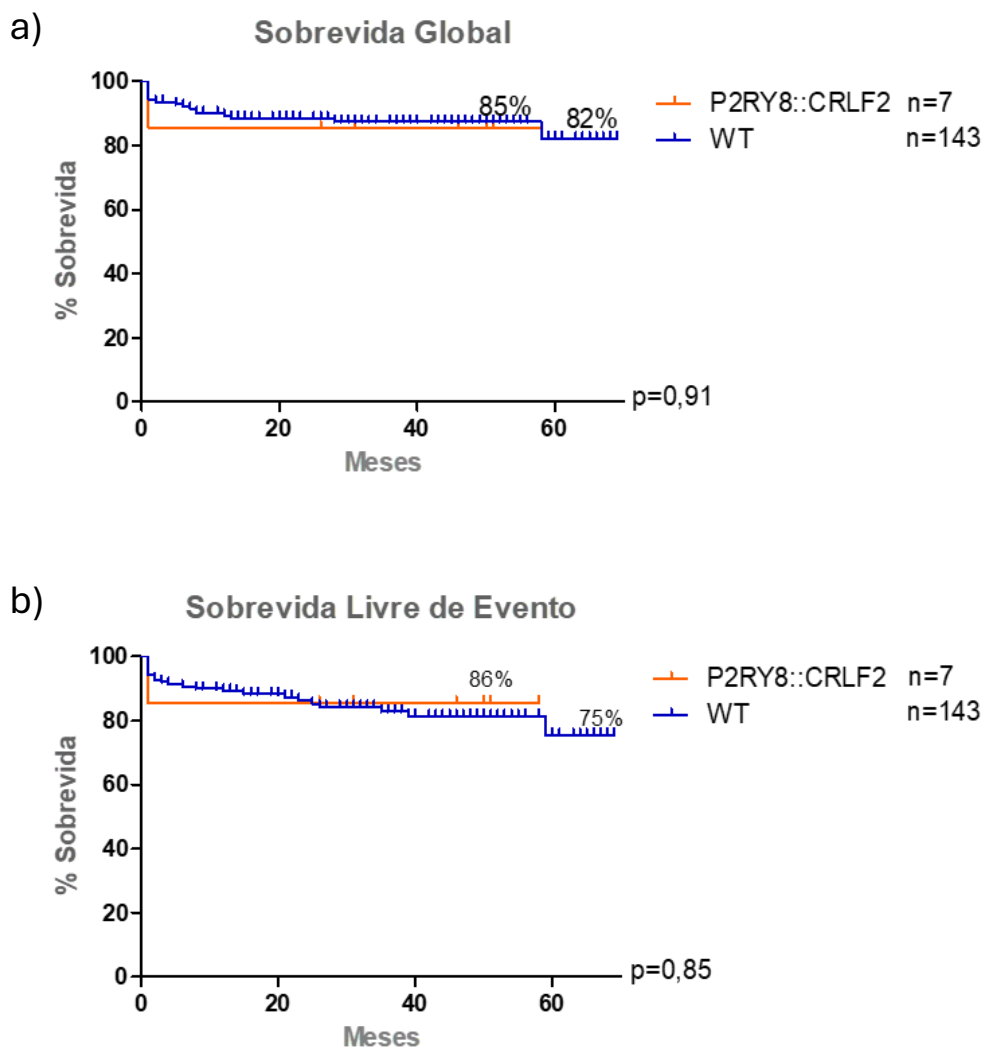


Figura 32 - Curvas de Sobrevida dos pacientes classificados de acordo com a presença de do rearranjo *P2RY8::CRLF2*.

a) Sobrevida Global (SG), $p=0,04$. b) Sobrevida Livre de Evento (SLE), $p=0,06$. Teste Log-rank Mantel Cox.

4.4.4 Alterações no *IKZF1*

Foram pesquisadas alterações no gene *IKZF1* por MLPA em amostras de 108 pacientes sendo encontrado deleção no *IKZF1* em 21(19,4%), pacientes. Alterações no *IKZF1* ocorreram em 5 pacientes com alta hiperdiploidia, um paciente com alta hipodiploidia e em paciente com baixa hipodiploidia. Quando considerados os



pacientes classificados como LLA “B-others”, a frequência de deleção no *IKZF1* foi igual a 23,7% (14/59).

Em 20 casos as deleções no *IKZF1* ocorreram em heterozigose. Um paciente apresentou deleção completa do gene *IKZF1*, aparentemente de maneira subclonal, ou seja, apenas em uma proporção das células neoplásicas. Na amostra desse paciente, a percentagem de blastos correspondia a 85% das células e observamos uma discreta redução na intensidade de fluorescência das sondas correspondentes ao *IKZF1*, que tinha razão inferior a 1 mas superior a 0,5.

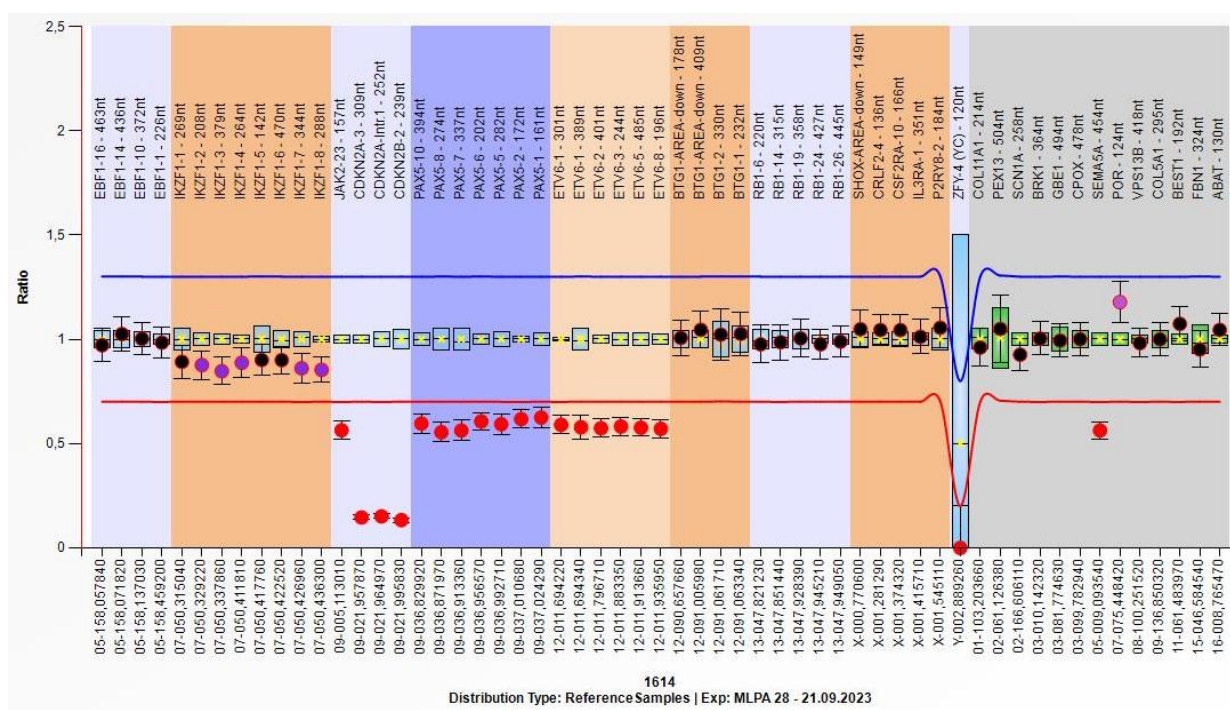


Figura 33 - MLPA com deleção no PAX5 (hetero), del no CDKN2A e CDKN2B (homo) e possível deleção subclonal do *IKZF1*.

Em 11 (10,2%) casos, a deleção do gene *IKZF1* estava associada com outras alterações características do subgrupo chamado de *IKZF1*^{plus} (alteração com deleções dos genes *CDKN2A*, *CDKN2B* ou *PAX5* ou com a deleção da região *PAR1* na ausência de deleção do *ERG*); em 4 casos encontramos associação entre deleção do *IKZF1*, deleção no *CDKN2A/B* e deleção do *ERG* e em 6 casos identificados a deleção do *IKZF1* sem outra deleção associada.

Para avaliação do impacto das deleções do *IKZF1* sobre a apresentação inicial, resposta ao tratamento e desfecho, consideramos 2 subgrupos de pacientes: deleção



do *IKZF1* (incluindo os pacientes com deleção do *IKZF1* associado à deleção do *ERG*) e *IKZF1*^{plus}.

A Figura 34 apresenta os tipos de deleções no *IKZF1* observadas nos pacientes. Entre os pacientes com deleção no *IKZF1* sem critérios para *IKZF1*^{plus}, observamos apenas deleções completas ou deleção $\Delta 4-7$. Os pacientes com *IKZF1*^{plus} apresentaram maior variedade de deleções (deleção completa, del $\Delta 1-3$, del $\Delta 2-7$, del $\Delta 4-7$ e del $\Delta 4-8$).

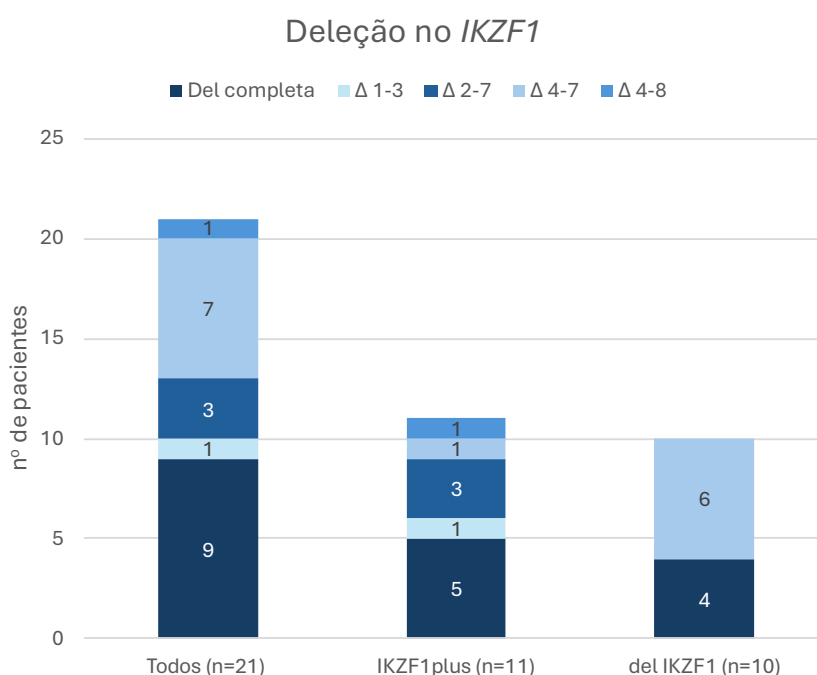


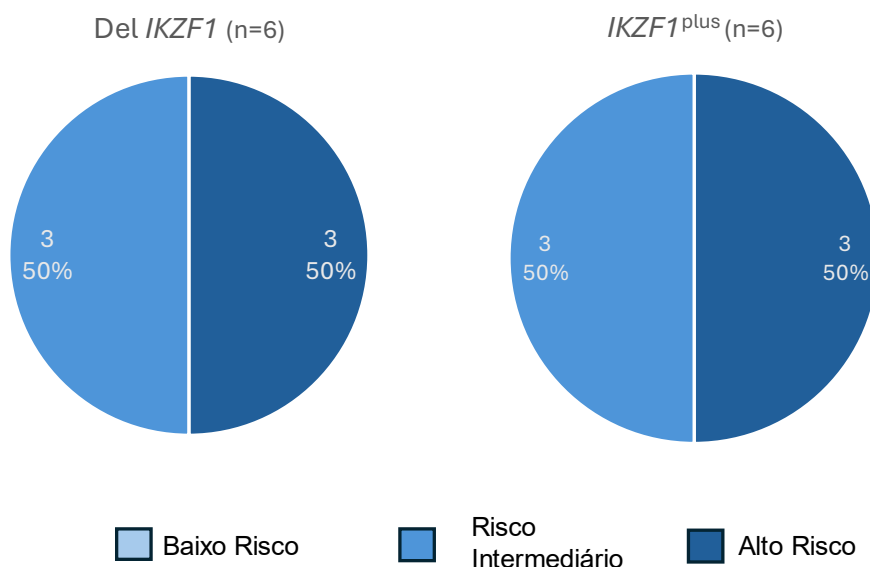
Figura 34 - Distribuição dos pacientes de acordo com o tipo de deleção no gene *IKZF1*. Na barra à esquerda, apresentados todos os pacientes com deleção no *IKZF1* e nas outras barras grupos de pacientes com *IKZF1*^{plus} e del*IKZF1*.

No subgrupo de pacientes tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado, entre os 12 pacientes com alteração no *IKZF1* (6 casos de deleção *IKZF1* e 6 *IKZF1*^{plus}), metade foi estratificada como risco intermediário (3 com del *IKZF1* e 3 com *IKZF1*^{plus}) e a outra metade como alto risco (3 com del *IKZF1* e 3 com *IKZF1*^{plus}). Quando consideramos os pacientes tratados pelo protocolo GBTLI 2021, entre os quatro pacientes com deleção no *IKZF1*, dois foram classificados como de risco intermediário, um como alto risco e um apresentou falha indutória (extremo alto risco). Cinco pacientes com *IKZF1*^{plus} foram tratados pelo GBTLI 2021, sendo 2 casos



classificados como de baixo risco verdadeiro, 2 pacientes de risco intermediário e 1 caso de alto risco. (Figura 35)

a)



b)

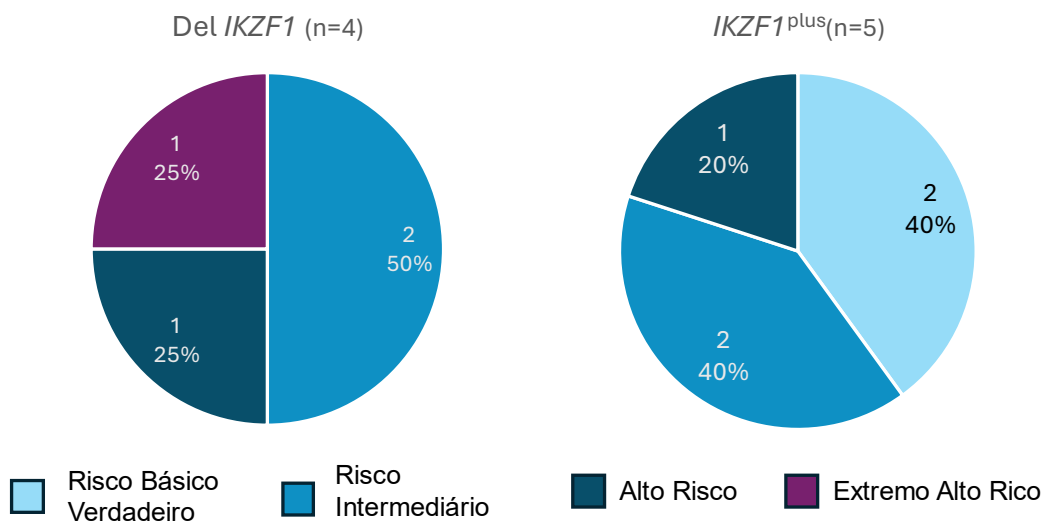


Figura 35 - Classificação de risco dos grupos de pacientes de acordo com a presença de deleção no gene *IKZF1*.

a) Pacientes tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado. b) Pacientes tratados pelo protocolo GBTLI.

A Tabela 11 e a Tabela 12 descrevem as características clínicas, valores de DRM e evolução dos pacientes com deleção no *IKZF1* e *IKZF1^{plus}*. Os pacientes com deleção do *IKZF1* apresentaram maior idade ao diagnóstico quando comparados aos outros pacientes (Figura 36).



Tabela 11 - Características dos pacientes com subtipo com deleção no *IKZF1* (n=10)

Idade (m)	Sexo	GB diag	Status SNC	Protocolo tto	GR diagn	DRM D15/D19*	DRM D33	DRM D78/D49*	GR pos Indução	del <i>IKZF1</i>	Situação Atual	SG (m)	Marcador biológico associado	% blastos
179	F	5800	SNC 2	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	9,6	0	NR	AR	$\Delta 4-7$ (hetero)	OR	12	Del <i>ERG</i> $\Delta 5-10$ Del <i>CDKN2A/B</i> (homo)	70,9
188	M	11300	SNC 1	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	13,7	0,2	NR	AR	$\Delta 4-7$ (hetero)	PS	3	-	96,5
35	F	1270	SNC 1	BFM ALLIC 2009 adaptado	BR	0,58	0	0	RI	Del completa (hetero)	RFT	51	Alta hiperdiploidia PAR demais genes (duplicação X)	52,6
186	M	481000	SNC 1	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	95,8	38,9	0,34	AR	$\Delta 4-7$ (hetero)	RFT (TMO)	47	-	97,54
197	M	960	SNC 2	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	2,9	0	0	RI	$\Delta 4-7$ (hetero)	RFT	42	Del <i>ERG</i> $\Delta 5-10$ Del <i>CDKN2A/B</i> Del <i>PAX5</i> $\Delta 2-5$	75,2
198	F	241000	SNC 1	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	0	0	0	RI	del completa (hetero)	RET	31	Del <i>CDKN2A/B</i>	94,2
126	M	185760	SNC 1	GBTLI 2021	AR	15,4	-	2,7	EAR	$\Delta 4-7$ (hetero)	RFT (TMO)	12	-	73,4
96	F	6610	SNC 1	GBTLI 2021	BRP	0,24	-	0	RI	Del completa (hetero)	RET	12	Del <i>ERG</i> $\Delta 6-10$ Del <i>CDKN2A/B</i> Del <i>PAX5</i> $\Delta 2-6$; ex8	80,6
109	F	68730	SNC 1	GBTLI 2021	AR	0,01	-	0	AR	$\Delta 4-7$ (hetero)	RET	9	-	85,3
52	F	5910	SNC 2	GBTLI 2021	BRP	0,08	-	0	RI	Del completa (hetero)	RET	9	Alta hiperdiploidia	78

GB diag: Glóbulos brancos no diagnóstico; GR diag: grupo de risco ao diagnóstico; GR pós indução: grupo de risco após indução; BR: baixo risco; RI: risco intermediário; AR: alto risco; BRP: baixo risco provisório; RBV: risco básico verdadeiro; EAR: extremo alto risco; NR: não realizado; OR: óbito em remissão; OS: perdeu seguimento; RFT: remissão fora de tratamento; RET: remissão em tratamento.



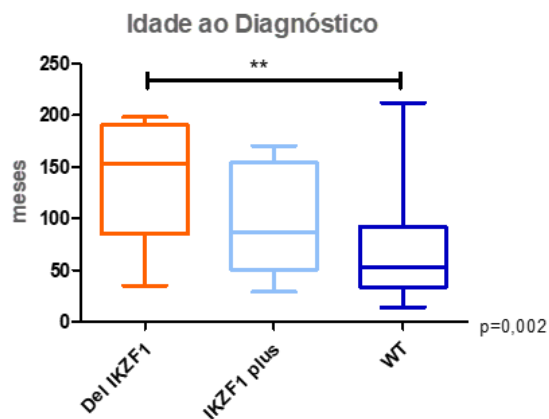
Tabela 12 - Características dos pacientes com subtipo *IKZF1*^{plus} (n=11)

Idade (m)	Sexo	GB diag	Status SNC	Protocolo tto	GR diagn	DRM D15/D19*	DRM D33	DRM D78/D49*	GR pos Indução	del <i>IKZF1</i>	Situação Atual	SG (m)	Marcador biológico associado	% blastos
154	M	308000	SNC 1	BFM ALLIC 2009 adaptado	AR	11	0,65	0,04	AR	Δ2-7 (hetero)	OL (recidiva)	9	Hipodiploidia Del <i>CDKN2A</i> ex4 (homo) ex 2 (hetero) e <i>CDKN2B</i> (hetero) Del <i>PAX5</i> (hetero)	98
166	M	124000	SNC 1	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	0	0	NR	RI	Del completa (hetero)	RFT	65	Del <i>CDKN2A</i> (hetero) e <i>CDKN2B</i> (homo)	94,9
51	M	4220	SNC 2	BFM ALLIC 2009 adaptado	BR	5,32	0	0	AR	Δ4-8 (hetero)	RFT	46	Alta hiperdiploidia Del <i>CDKN2A</i> (homo) e <i>CDKN2B</i> (homo)	82,41
170	F	6300	SNC 3	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	0,34	0,07	0	RI	Δ2-7 (hetero)	OR	28	<i>EBF1</i> Del ex1 (hetero), <i>BTG1</i> del down e ex2 hetero, <i>CDKN2A/B</i> del A e B hetero, <i>RB1</i> del ex19-26 (homo)	98,8
143	M	71130	SNC 1	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	1,42	0,04	NR	AR	del completa (hetero)	OL (recidiva)	5	dup <i>PAX5</i> 2-5 del <i>CDKN2A</i>	95
29	F	14430	SNC 2	BFM ALLIC 2009 adaptado	BR	0,23	NR	NR (óbito)	RI	Δ1-3 (hetero)	OSDR	1	dupSHOX e <i>CRLF2</i> del <i>CSF2RA</i> até <i>P2RY8</i> del <i>EBF1</i> del <i>PAX5</i> Δ5-10 (hetero)	93,9
34	F	6860	SNC 2	GBTLI 2021	BRP	0,59	NR	0	RI	Δ4-7 (hetero)	RET	19	Del <i>CDKN2A</i> (homo) e <i>CDKN2B</i> (homo) del <i>PAX5</i> Δ8-10 (hetero)	88,9
87	F	3800	SNC 2	GBTLI 2021	BRP	0,11	NR	0	AR	Del completa (hetero)	RET	15	Baixa Hipodiploidia Del <i>CDKN2A</i> e <i>CDKN2B</i> del <i>PAX5</i> completa (hetero), del completa <i>ETV6</i> (hetero,) del completa <i>RB1</i> (hetero)	85,9
66	F	26800	SNC 2	GBTLI 2021	BRP	0	NR	NR	RBV	del (subclonal?)	RET	13	Del <i>CDKN2A</i> (hetero) e <i>CDKN2B</i> (hetero) del <i>PAX5</i> completa (hetero)	86,5
103	F	3840	SNC 1	GBTLI 2021	BRP	0	NR	NR	RBV	Del completa (hetero)	RET	13	Alta hiperdiploidia Del <i>CDKN2A</i> (homo) e <i>CDKN2B</i> (homo) del <i>PAX5</i> completa (hetero)	93,1
61	M	39000	SNC2	GBTLI 2021	BRP	3,7	NR	NR	RI	Δ2-7 (hetero)	RET	9	Alta hiperdiploidia Del <i>CDKN2A</i> (homo) e <i>CDKN2B</i> (homo)	98

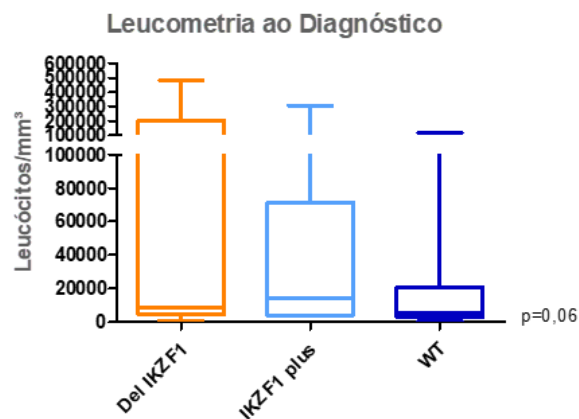
GB diag: Glóbulos brancos no diagnóstico; GR diag: grupo de risco ao diagnóstico; GR pós indução: grupo de risco após indução; BR: baixo risco; RI: risco intermediário; AR: alto risco; BRP: baixo risco provisório; RBV: risco básico verdadeiro; NR: não realizado; OL: óbito por leucemia; RFT: remissão fora de tratamento; OR: óbito em remissão; OSDR: óbito sem documentação de remissão; RET: remissão em tratamento



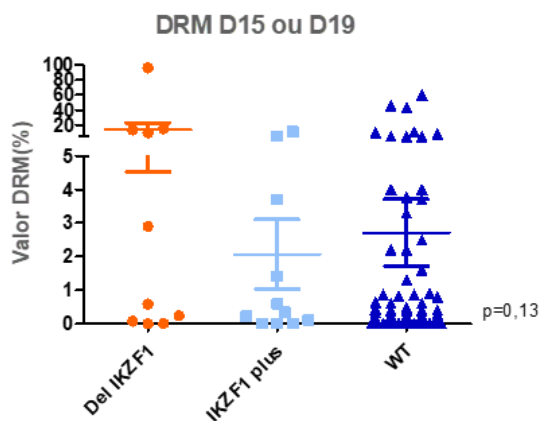
a)



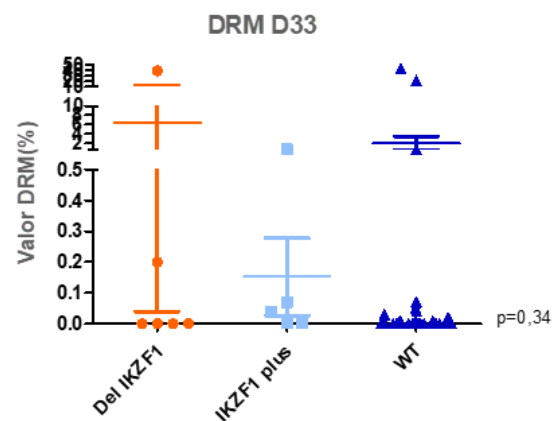
b)



c)



d)



e)

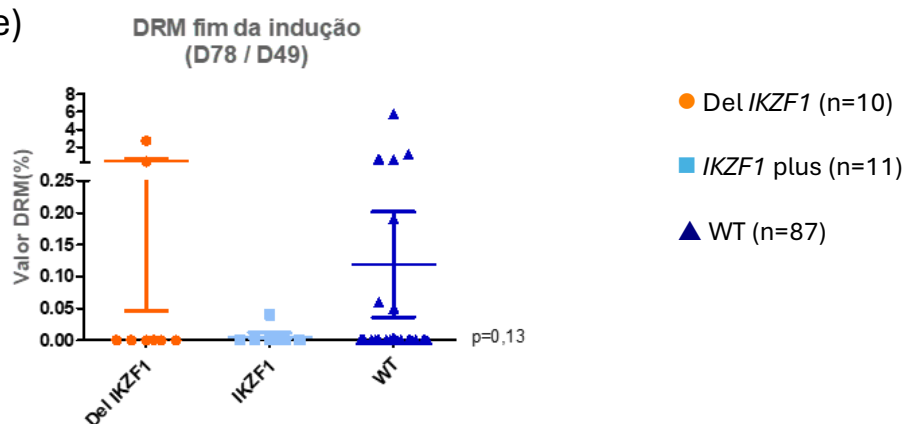


Figura 36 - Avaliação de parâmetros clínicos e de resposta a tratamento (DRM) considerando grupos baseados na presença de deleção no *IKZF1*.

a) Idade ao diagnóstico; b) Leucometria ao diagnóstico; c) Valor de DRM no D15 ou D19; d) Valor de DRM no D33; e) Valor de DRM do D78 ou D49). Teste Kruskal-Wallis.



Não houve recidiva entre os pacientes com deleção do *IKZF1* ("não plus") e um paciente desse grupo foi a óbito por infecção.

Pacientes com *IKZF1*^{plus} apresentaram maior chance de recidiva quando comparados aos pacientes não *IKZF1*^{plus} (del *IKZF1* e WT) (Teste exato de Fisher, $p=0,047$). Quando comparamos pacientes *IKZF1*^{plus} com o grupo de pacientes sem alterações no gene *IKZF1* (WT) a ocorrência de recidiva não foi significativa (Teste exato de Fisher, $p=0,06$). (Figura 37)

Dos três pacientes com *IKZF1*^{plus} que evoluíram para recidiva (3/11=37,5%), dois apresentaram recidiva isolada medular muito precoce e um apresentou recidiva precoce isolada de SNC. Os dois pacientes com recidiva muito precoce não atingiram remissão e foram a óbito com doença em atividade. O paciente com recidiva isolada de SNC entrou em remissão, mas também foi a óbito por quadro infeccioso. Além dos três casos citados, outro paciente com *IKZF1*^{plus} foi a óbito 50 dias após diagnóstico, sem documentação de remissão (sepse na indução).

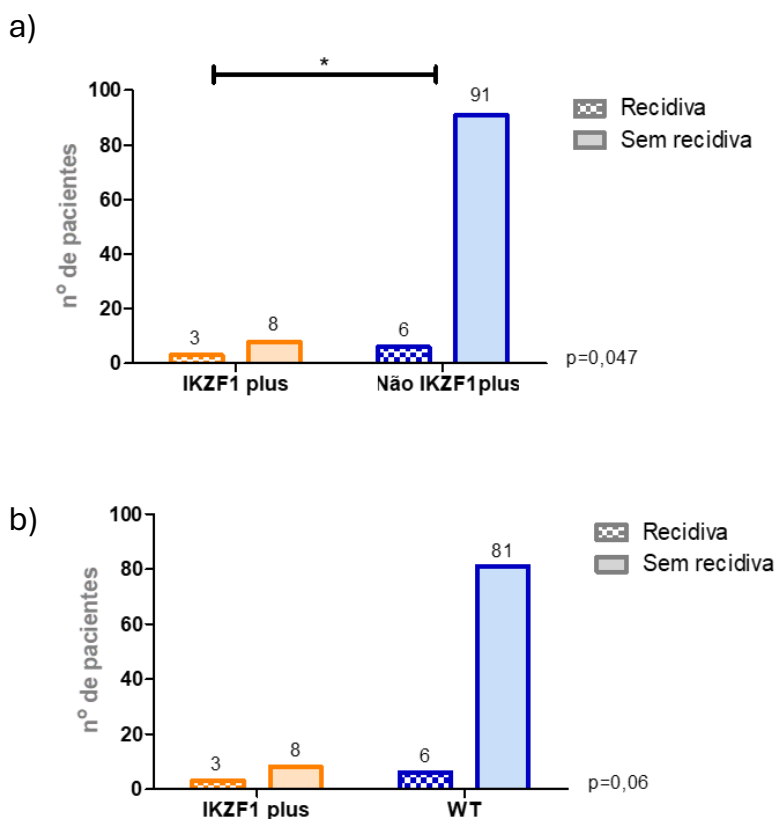


Figura 37 - Associação entre *IKZF1*^{plus} e ocorrência de recidiva.
a) *IKZF1*^{plus} X Não *IKZF1*^{plus} (WT + del*IKZF1*) b) *IKZF1*^{plus} X WT



As taxas de SG dos pacientes do grupo *IKZF1*^{plus} foram inferiores quando comparadas às taxas de sobrevida dos pacientes com del *IKZF1* (“não plus”) e pacientes sem alterações no (SG 48%, 85,7% e 80,6% respectivamente, $p=0,04$, teste log-rank Mantel-Cox) (Figura 38).

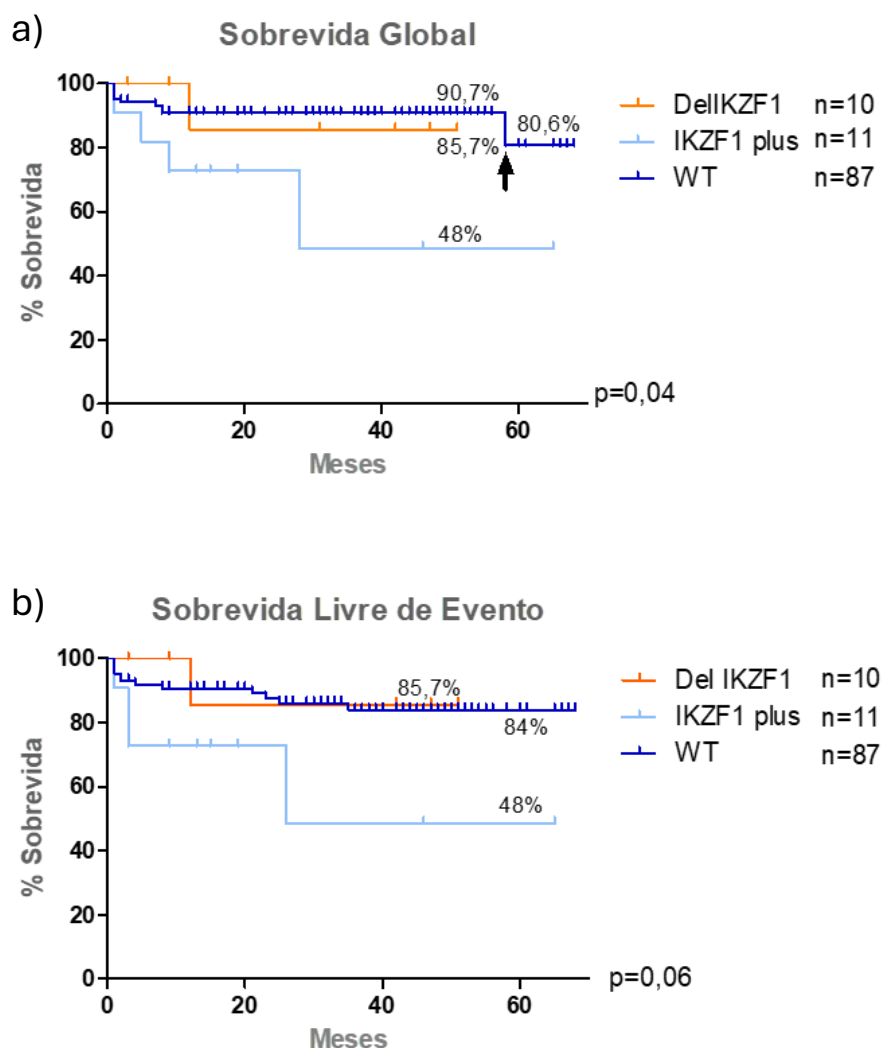


Figura 38 - Curvas de Sobrevida dos pacientes classificados de acordo com a presença de deleção no gene *IKZF1*.

a) Sobrevida Global (SG), $p=0,04$. b) Sobrevida Livre de Evento (SLE), $p=0,06$. Teste Log-rank Mantel Cox. Em destaque na seta óbito de paciente em segunda recidiva com 58 meses de seguimento.



4.4.5 Alterações no *PAX5*

O MLPA para pesquisa de *PAX5* foi realizado em 108 pacientes. Detectamos alterações no *PAX5* em 18 (16,6%) pacientes, sendo 12 tratados pelo BFM e 7 pelo GBTLI. Observamos associação da deleção no *PAX5* com alta hiperdiploidia em 3 pacientes e com hipodiploidia em 3 casos. Entre os 59 pacientes considerados como LLA “B-others” (ausência de hiperdiploidia, hipodiploidia ou rearranjo recorrente), 12 (20,3%) apresentaram alteração do *PAX5* (11 deleções e 1 duplicação).

Em 8 (7,4%) crianças, as alterações no *PAX5* estiveram associadas à deleção do *IKZF1* (em 5 também com deleções do *CDKN2A/CDKN2B*), correspondendo ao subtipo denominado *IKZF1*^{plus}. (Tabela 13)

Em 2 casos, a deleção no *PAX5* esteve associada à deleção do *IKZF1*, deleção do *CDKN2A* mas, devido a associação com deleção do *ERG*, não foram classificados como *IKZF1*^{plus} (esses dois pacientes estão em remissão, um fora de tratamento e um em tratamento). (Tabela 13)

Tabela 13 - Alterações no gene *PAX5* e associações

	Todas as LLA B (n=108)	Alta hiperd. (n=3)	Hipodiploidia (n=3)	B-others (n=59)
Del ou dup <i>PAX5</i> (total)	18 (16,7%)	3	3	12 (20,3%)
<i>IKZF1</i> ^{plus} com del <i>PAX5</i>	8 (7,4%)	1	2	5 (8,5%)
alt <i>PAX5</i> isolada	10 (9,2%)	2	1	7 (11,8%)

Entre os 12 pacientes tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado, 1 (8%), foi classificado como baixo risco, 8 (67%) com risco intermediário e 3 (25%) como alto risco. No grupo tratado pelo GBTLI (6 casos), dois (33%) pacientes foram classificados como baixo risco verdadeiro, três (50%) como risco intermediário e um caso como alto risco (17%) (Figura 39).

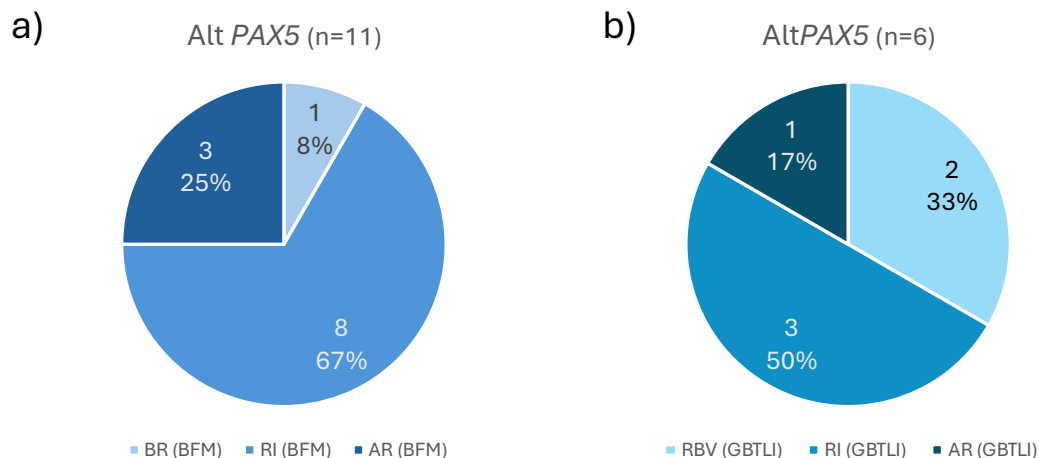


Figura 39 - Classificação de risco dos grupos de pacientes de acordo com a presença de alteração no gene *PAX5*.

a) Pacientes tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado. b) Pacientes tratados pelo protocolo GBTLI. BR: baixo risco, RI: risco intermediário; AR: alto risco; RBV: risco básico verdadeiro.

Para avaliação da associação com idade, leucometria e os valores de DRM e para a avaliação de curvas de sobrevida, em um primeiro momento, comparamos todos os 18 pacientes com alteração no *PAX5*, independente da associação com alterações nos genes *IKZF1*, com os pacientes sem alterações no *PAX5*. Em seguida, consideramos 2 grupos de pacientes: deleção no *PAX5* não *IKZF1*^{plus} (10 casos), deleção no *PAX5* com *IKZF1*^{plus} (8 casos) e ausência de alteração no *PAX5* ("WT", 90 casos) (Figura 40 e Figura 41).

Observamos maiores valores de DRM no D33 entre os pacientes com alteração no *PAX5* (mediana 0,02) quando comparados aos demais pacientes (mediana 0,02 X 0,0; p= 0,034; teste Mann Whitney). Quando subdividimos o grupo de pacientes com alteração no *PAX5*, observamos maiores valores de DRM no 33 no grupo com deleção no *PAX5* associado ao *IKZF1*^{plus}, com mediana igual a 0,07 quando comparados aos pacientes com alt *PAX5* (não *IKZF1*^{plus}) e pacientes sem alterações no *PAX5* (p=0,004, teste Kruskal-Wallis) (Figura 40 e Figura 41).

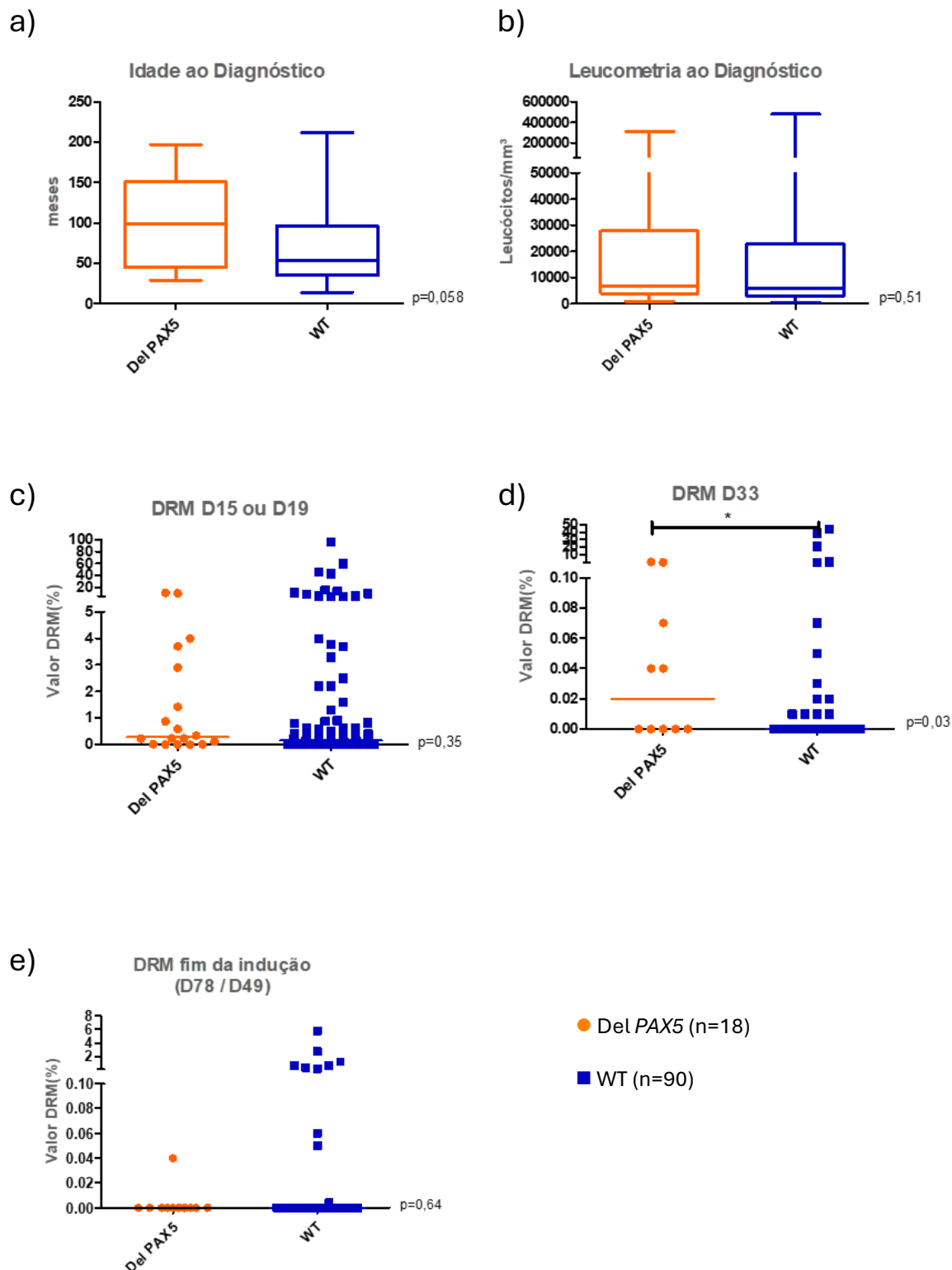


Figura 40 - Avaliação de parâmetros clínicos e de resposta a tratamento (DRM) considerando grupos baseados na presença de deleção no *PAX5* (independente de deleções no *IKZF1*, *CDKN2A/B* ou *ERG* associadas).

a) Idade ao diagnóstico; b) Leucometria ao diagnóstico; c) Valores de DRM no D15 ou D19; d) Valor de DRM no D33; e) Valor de DRM do D78 ou D49). Teste Mann Whitney.

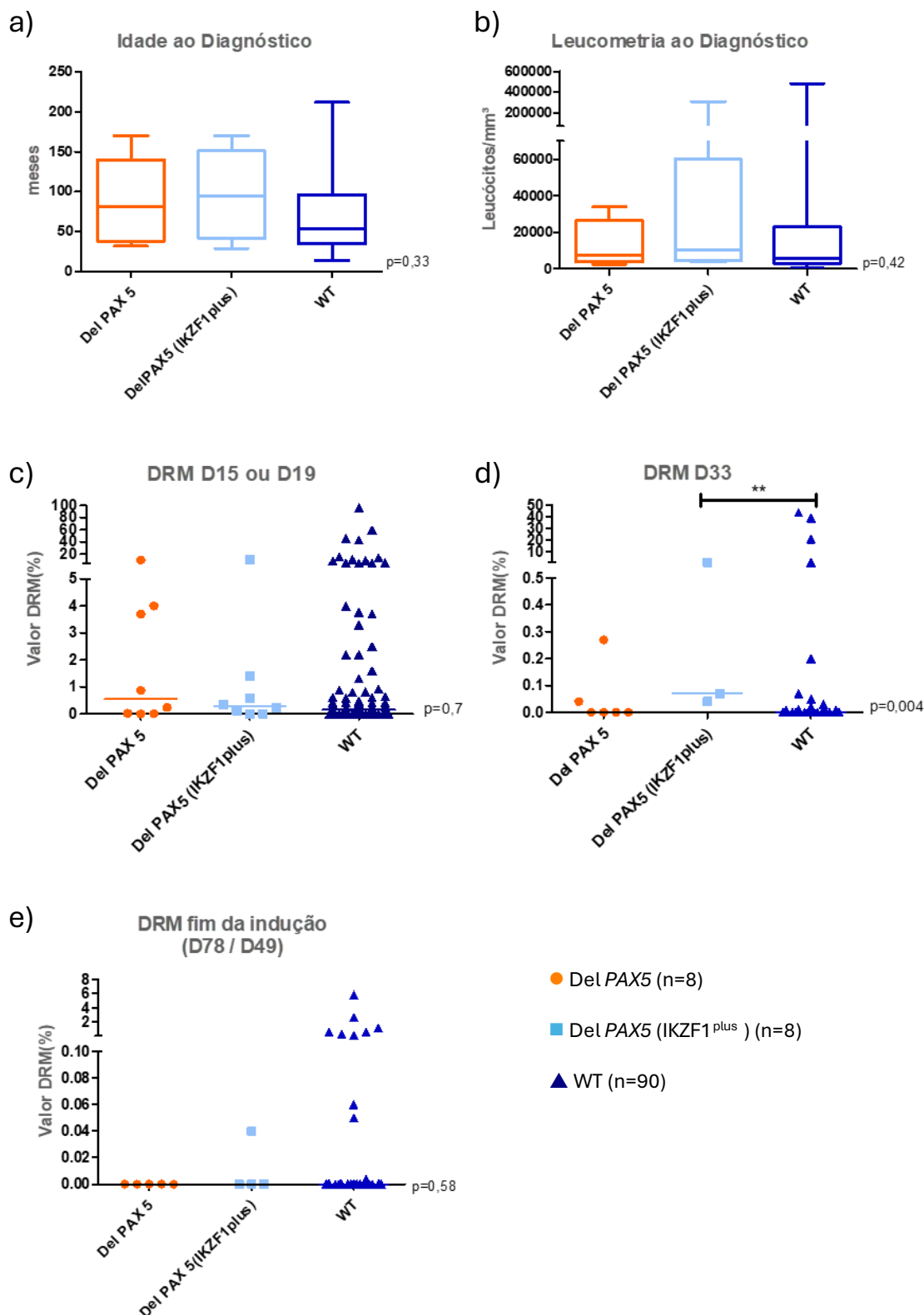


Figura 41 - Avaliação de parâmetros clínicos e de resposta a tratamento (DRM) considerando três grupos de pacientes: deleção no PAX5 (não $IKZF1^{plus}$); deleção no PAX5 ($IKZF1^{plus}$) e ausência de deleção no PAX5.

a) Idade ao diagnóstico; b) Leucometria ao diagnóstico; c) Valor de DRM no D15 ou D19; d) Valor de DRM no D33; e) Valor de DRM do D78 ou D49). Teste Kruskal-Wallis.

Quatro pacientes apresentaram recidiva (3 deles *IKZF1^{plus}*), e evoluíram para óbito, sendo que em um caso o paciente estava em remissão e a causa de morte foi infecção. A associação entre alteração no *PAX5* e ocorrência de recidiva foi estatisticamente significativa (teste exato de Fisher, $p=0,04$) (Figura 42).

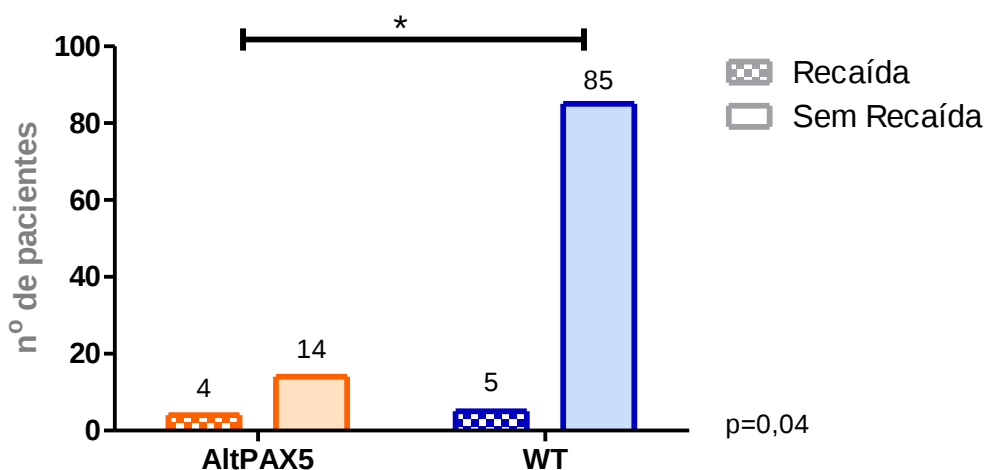


Figura 42 - Correlação entre mutação no *PAX5* e ocorrência de recidiva. Teste exato de Fisher, $p=0,005$.

Além dos quatro pacientes que apresentaram recidiva, outros dois pacientes foram a óbito por complicação infecciosa, totalizando 6 óbitos. Os dois pacientes que foram a óbito em primeiro diagnóstico, foram a óbito precocemente, na segunda fase da indução, um deles sem documentação de remissão (óbitos em 37 dias e 50 dias após o diagnóstico). As taxas de sobrevida dos pacientes foram inferiores quando comparados aos pacientes sem alterações no gene *PAX5* (Figura 43 e Figura 44).

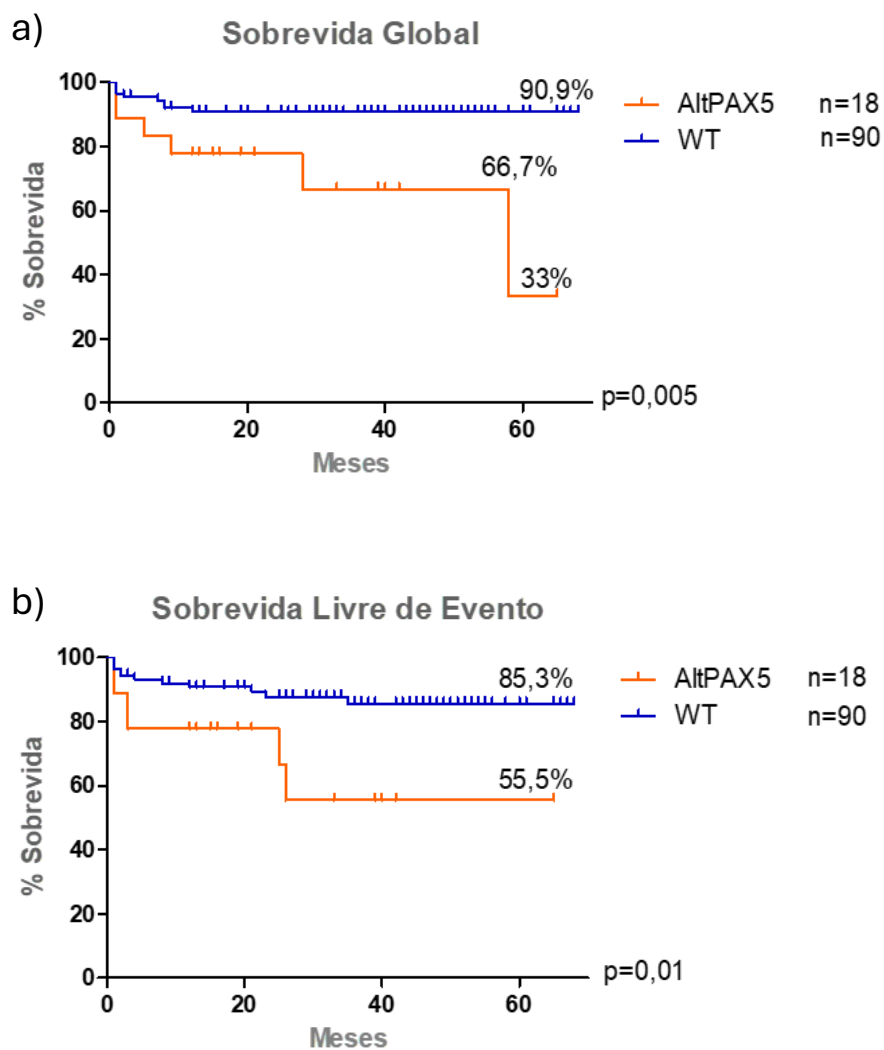


Figura 43 - Curvas de sobrevida dos pacientes com alteração no *PAX5* (independente de outras deleções associadas) e dos pacientes sem deleção no *PAX5* (WT).

a) Sobrevida Global; b) Sobrevida livre de Evento. Teste Log-rank Mantel Cox

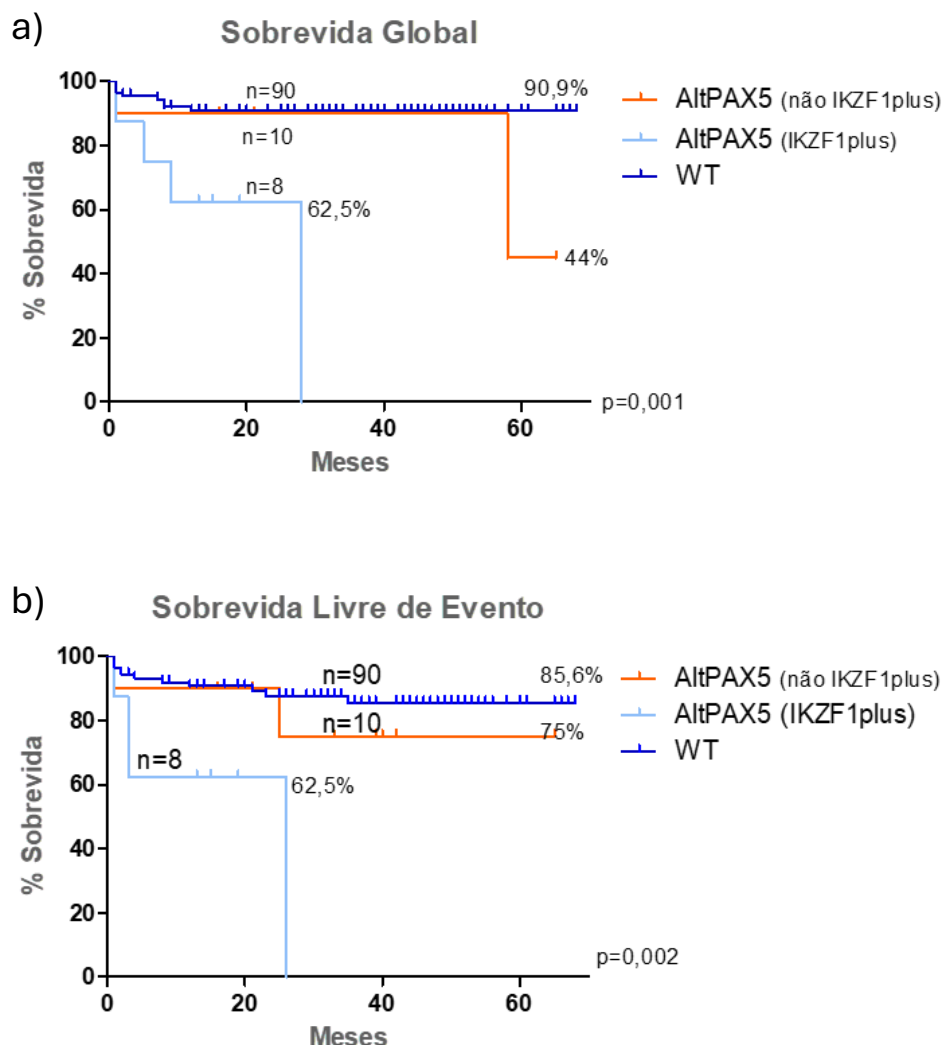


Figura 44 - Curvas de sobrevida dos pacientes com alteração no *PAX5* “não *IKZF1*^{plus}”, alteração no *PAX5* “*IKZF1*^{plus}” e sem alteração no *PAX5* (WT).

a) Sobrevida Global; b) Sobrevida livre de Evento. Teste Log-rank Mantel Cox.

4.4.6 Alterações no *ERG*

O MLPA para pesquisa de alterações do *ERG* foi realizado em 112 pacientes. Nove (8%) pacientes apresentaram alterações no *ERG*, sendo 8 casos de deleções e um caso de duplicação do *ERG*, conforme mostrado na Tabela 14.

Nenhum dos pacientes apresentou translocação recorrente associada e em um caso o cariótipo indicou alta hiperdiploidia. Em 3 casos a *delERG* foi encontrada isoladamente, em 2 casos associada à deleção no *IKZF1* e *CDKN2A/B*, em 2 casos associada às deleções no *IKZF1*, *CDKN2A/B* e *PAX5* e em 2 casos associada à *delPAX5* (1 dos quais com alta hiperdiploidia) (Tabela 14).



Tabela 14 - Descrição de alterações no gene *ERG*

	Todas as LLA B (n=112)	Alta Hiperdiploidia	B-others (n=59)
Del ou dup <i>ERG</i> (total)	9	1	8 (20,3%)
Del <i>ERG</i> + Del <i>PAX5</i>	2	1	1
Del <i>ERG</i> + Del <i>PAX5</i> + Del <i>IKZF1</i> + Del <i>CDKN2A</i>	2	0	2
Del <i>ERG</i> + Del <i>IKZF1</i> + Del <i>CDKN2A</i>	2	0	2
Del <i>ERG</i> isolada	3	0	3

Sete pacientes foram tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado e classificados como risco intermediário (4 casos) ou alto risco (3 casos). Os dois pacientes tratados pelo GBTLI 2021 preenchiam critério para estratificação de risco intermediário (Figura 45).

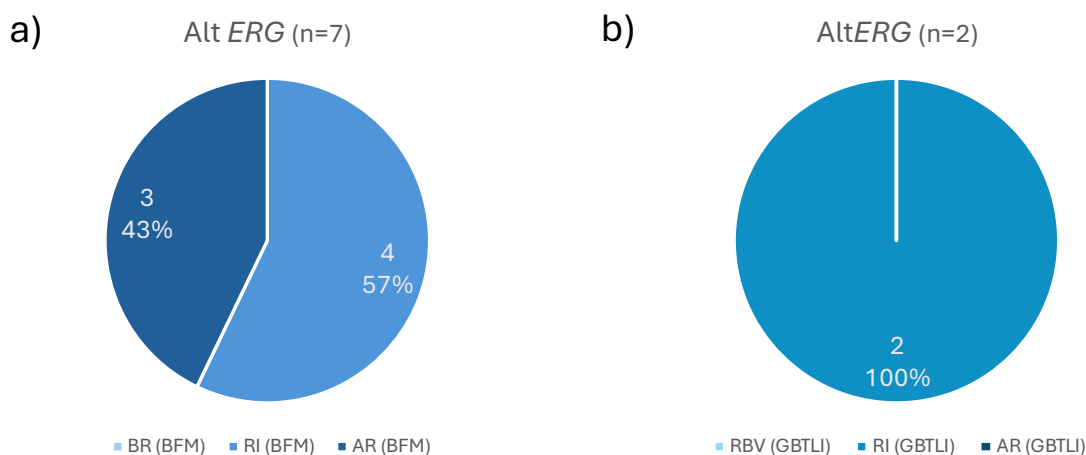


Figura 45 - Classificação de risco dos grupos de pacientes de acordo com a presença de alteração no gene *ERG*.

a) Pacientes tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado. b) Pacientes tratados pelo protocolo GBTLI. BR: baixo risco, RI: risco intermediário; AR: alto risco; RBV: risco básico verdadeiro.

Os pacientes com alteração no *ERG* apresentaram maior idade ao diagnóstico quando comparados aos demais pacientes (Teste Mann Whitney, $p=0,01$) e apresentaram maiores valores de DRM no D15/19 (Teste Mann Whitney, $p=0,051$) (Figura 46). Não houve diferença entre os valores de DRM no D33 e ao fim da indução

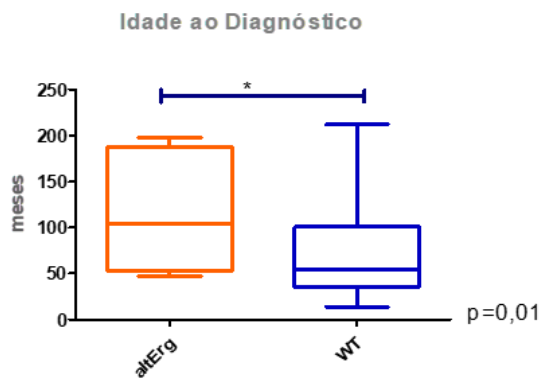


dos pacientes com alteração ou sem alteração no *ERG*. Todos os nove pacientes com alterações no *ERG* apresentaram DRM negativa ao fim da indução: em 2 casos a DRM estava negativa no D33 e não foi realizada pesquisa de DRM no D78, em 5 casos a DRM do D78 foi negativa e nos 2 pacientes tratados pelo GBTLI 2021 a DRM do D49 foi negativa (Figura 46).

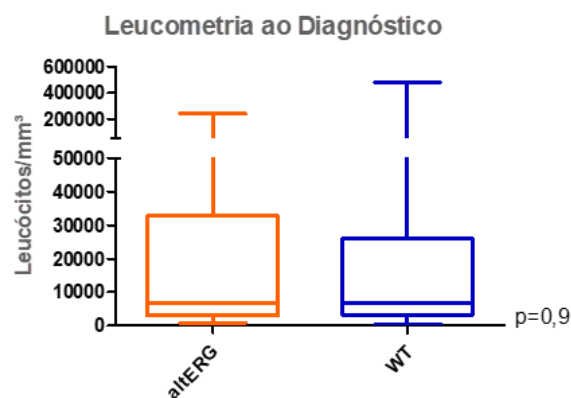
Os quatro pacientes que apresentaram deleção do *ERG* associada à deleção do IKZF1 entraram em remissão com DRM negativa. Um desses pacientes, estratificado como alto risco e tratado pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado foi a óbito em remissão por complicação infecciosa, 12 meses após o diagnóstico. Nenhum dos demais apresentou recidiva até o presente momento (tempo de seguimento igual a 12, 31 e 42 meses).



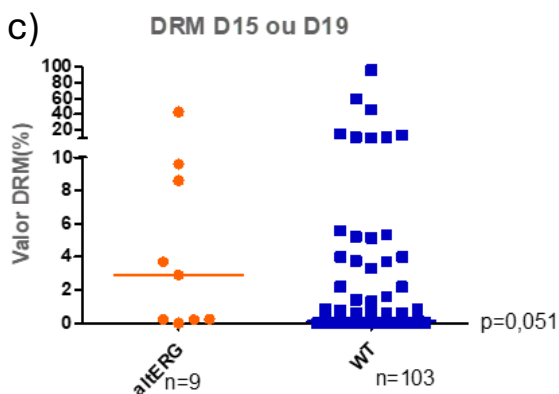
a)



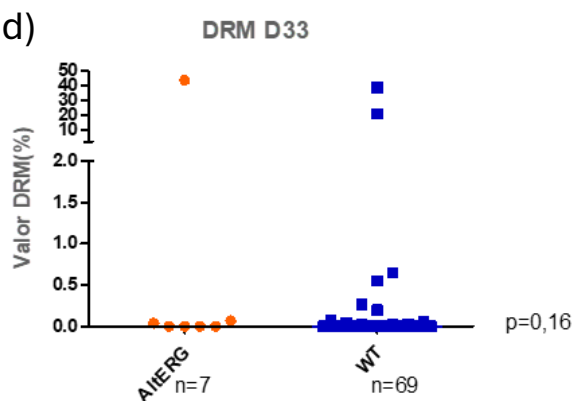
b)



c)



d)



e)

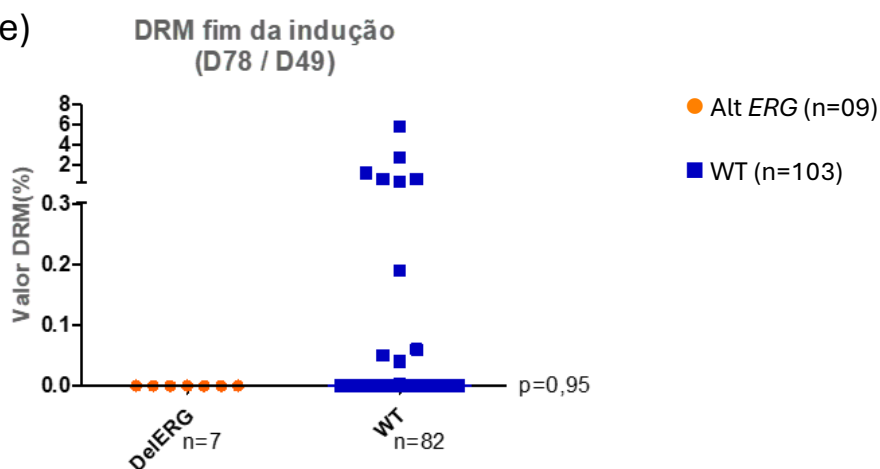


Figura 46 - Avaliação de parâmetros clínicos e de resposta a tratamento (DRM) considerando os pacientes de acordo com alterações no gene *ERG* (MLPA).
a) Idade ao diagnóstico ($p < 0,05$); b) Leucometria ao diagnóstico; c) Valor de DRM no D15 ou D19; d) Valor de DRM no D33; e) Valor de DRM do D78 ou D49). Teste Mann Whitney.



O paciente com *delERG* associada à hiperdiploidia e deleção do *PAX5* apresentou recidiva precoce isolada do SNC (25 meses após diagnóstico) e foi a óbito pela leucemia após segunda recidiva (sobrevida de 58 meses). Outro paciente desse grupo (*altERG*) foi a óbito em remissão por complicação infecciosa 12 meses após o diagnóstico.

Não houve diferença entre as taxas de sobrevivida apresentadas pelos pacientes com alterações no *ERG* quando comparadas às taxas de sobrevivida dos pacientes sem alterações no *ERG* (Figura 47).

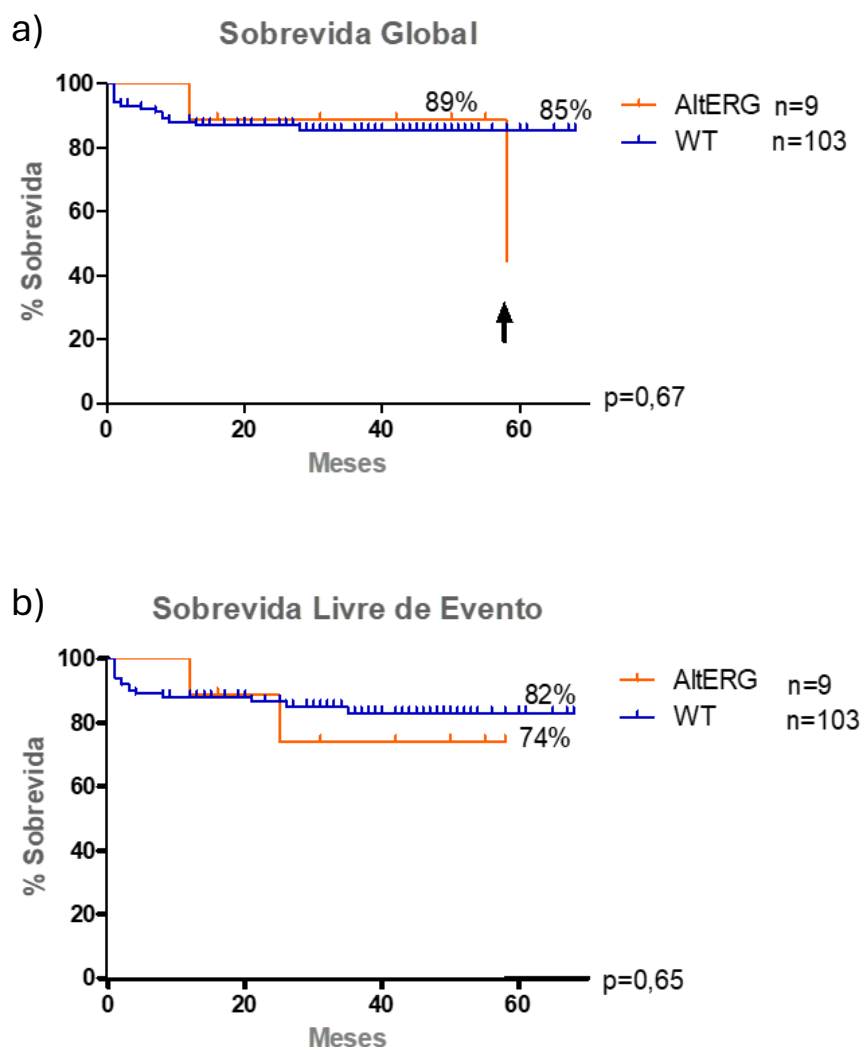


Figura 47 - Curvas de Sobrevida dos pacientes de acordo com a presença de alteração no gene *ERG*. a) Sobrevida Global (SG), $p=0,67$. b) Sobrevida Livre de Evento (SLE), $p=0,65$. Teste Log-rank Mantel Cox

4.4.7 Alterações no *FLT3*

A pesquisa de mutação no gene *FLT3* foi realizada em 155 pacientes e encontrada em 6 pacientes tratados pelo BFM e em 2 pacientes tratados pelo GBTLI, totalizando 8 casos. Em 4 crianças encontramos mutação do domínio tirosina quinase (*FLT3*-TKD), em 3 casos foi identificada inserção ou deleção no domínio justa-membrana (*FLT3*-JM-INDEL) e em um paciente identificamos duas mutações, *FLT3*-TKD e *FLT3*-JM-INDEL associadas (Figura 48).

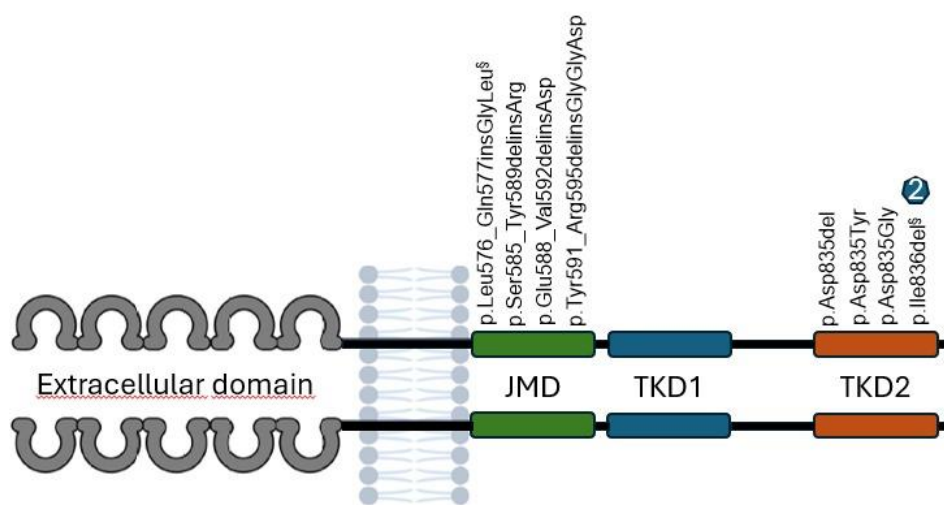


Figura 48 - Descrição das mutações no gene *FLT3* em 8 pacientes com LLA B (9 mutações). Mutações *FLT3*-JM-INDEL foram encontradas em 4 pacientes. Cinco pacientes apresentaram mutações no domínio tirosina quinase (*FLT3*-TKD). Um paciente apresentou duas mutações no gene, uma no domínio justa-membrana (§) e outra no domínio tirosina quinase (§). Dois pacientes apresentaram a mutação pIle836del.

Em relação à classificação de risco, entre os seis pacientes tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado, dois foram classificados como baixo risco, três como risco intermediário e um como alto risco. Um paciente tratado pelo GBTLI 2021 foi classificado como risco intermediário e outro como alto risco (Figura 49).

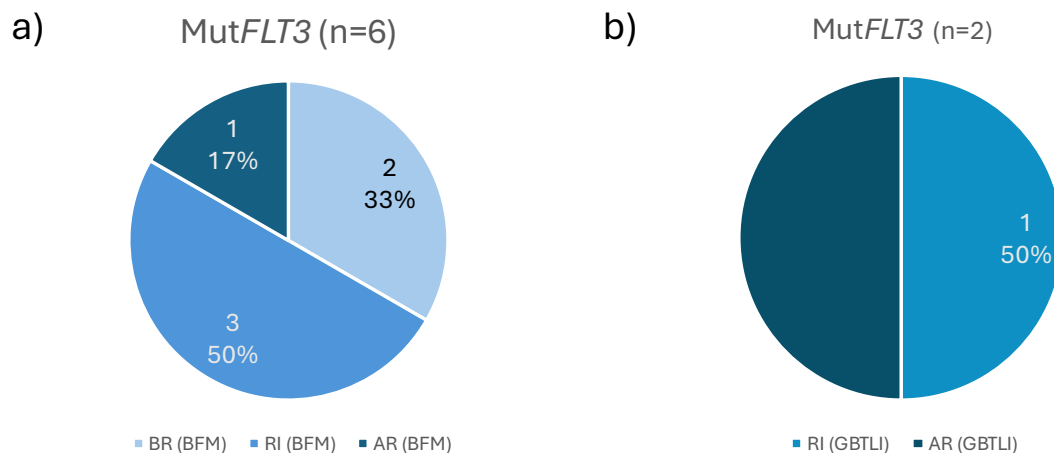


Figura 49 - Classificação de risco dos grupos de pacientes de acordo com a presença de mutação no gene $FLT3$.

a) Pacientes tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado. b) Pacientes tratados pelo protocolo GBTLI. BR: baixo risco, RI: risco intermediário; AR: alto risco; RBV: risco básico verdadeiro.

Não foi identificada associação entre idade, leucometria e valores de DRM e a presença de mutação no $FLT3$ (Figura 50).

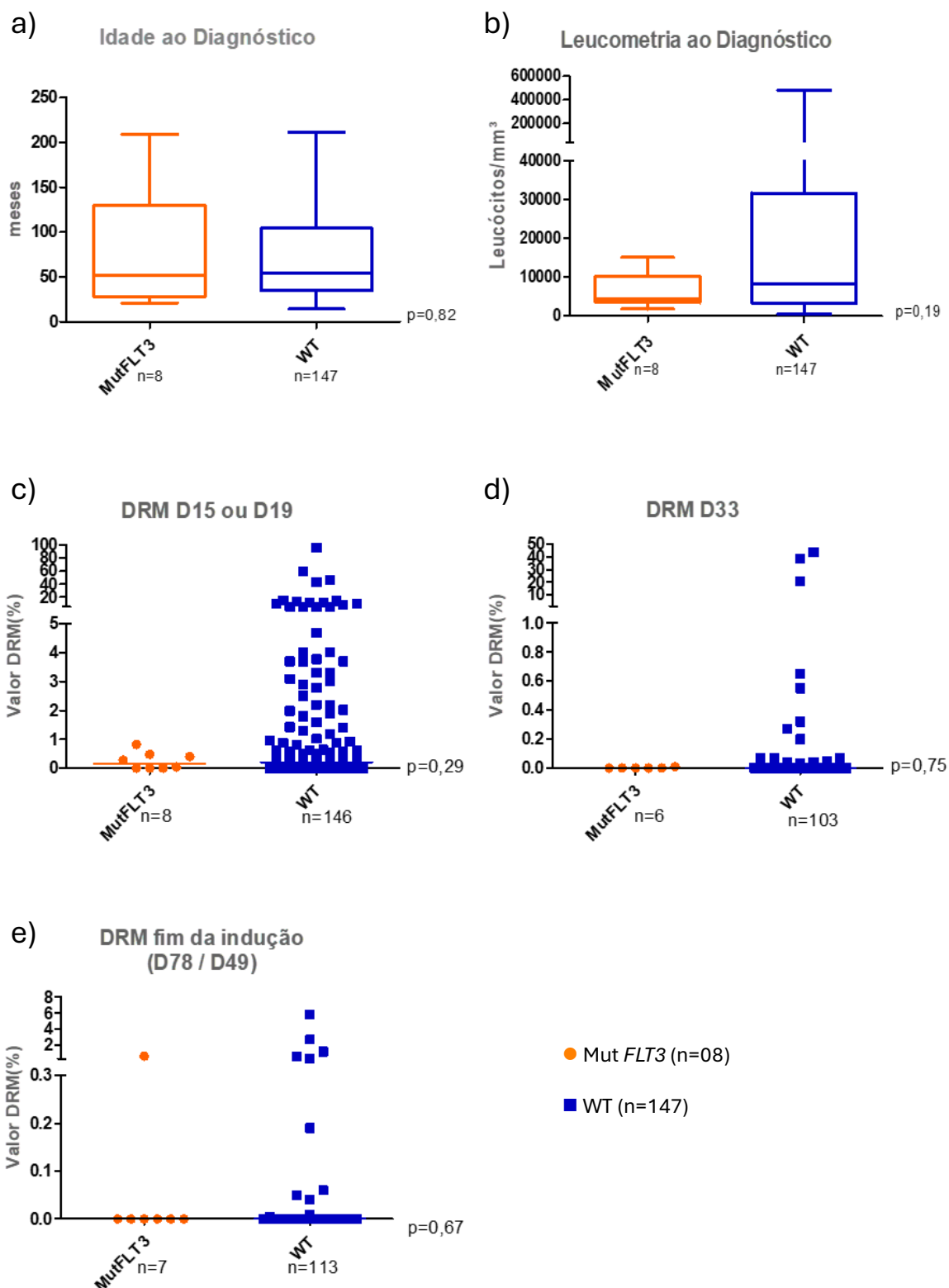


Figura 50 - Avaliação de parâmetros clínicos e de resposta a tratamento (DRM) considerando os pacientes de acordo com mutação no gene *FLT3*.

a) Idade ao diagnóstico ($p=0,82$); b) Leucometria ao diagnóstico ($p=0,19$); c) Valor de DRM no D15 ou D19 ($p=0,29$); d) Valor de DRM no D33 ($p=0,75$); e) Valor de DRM do D78 ou D49 ($p=0,67$). Teste Mann Whitney.

Dois dos cinco pacientes com mutação do tipo TKD apresentaram recidiva medular isolada, uma delas muito precoce (4 meses após o diagnóstico) e outra precoce (23 meses após diagnóstico). Comparando com o grupo de pacientes sem alteração no gene *FLT3*, observamos uma associação estatisticamente significativa entre a presença de mutação TKD e a ocorrência de recaída da LLA (Figura 51). O paciente com recidiva muito precoce não entrou em remissão e foi a óbito com doença em atividade. Não houve outro caso de óbito entre os pacientes com mutação no *FLT3*.

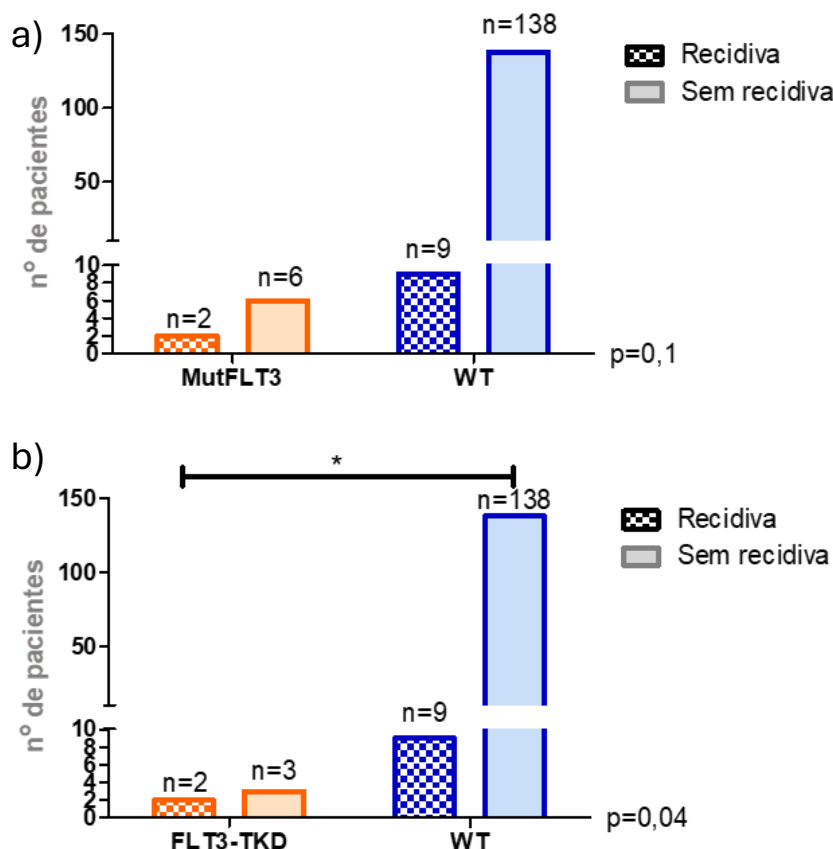


Figura 51 - Correlação entre mutação e recidiva

a) Correlação entre mutação no *FLT3* (*FLT3*-TKD e/ou *FLT3*-JM-INDEL) e ocorrência de recidiva (Teste exato de Fisher, $p=0,1$); b) Correlação entre mutação *FLT3*-TKD e ocorrência de recidiva (Teste exato de Fisher, $p=0,04$);

As taxas de SG e SLE dos pacientes com mutação no *FLT3* não apresentaram diferenças quando comparadas às taxas de SG e SLE dos demais pacientes (SG



87,5% X 80,5%, $p=0,9$; SLE: 87,5%X79,4%, $p=0,64$; teste Log-rank Mantel Cox) (Figura 52).

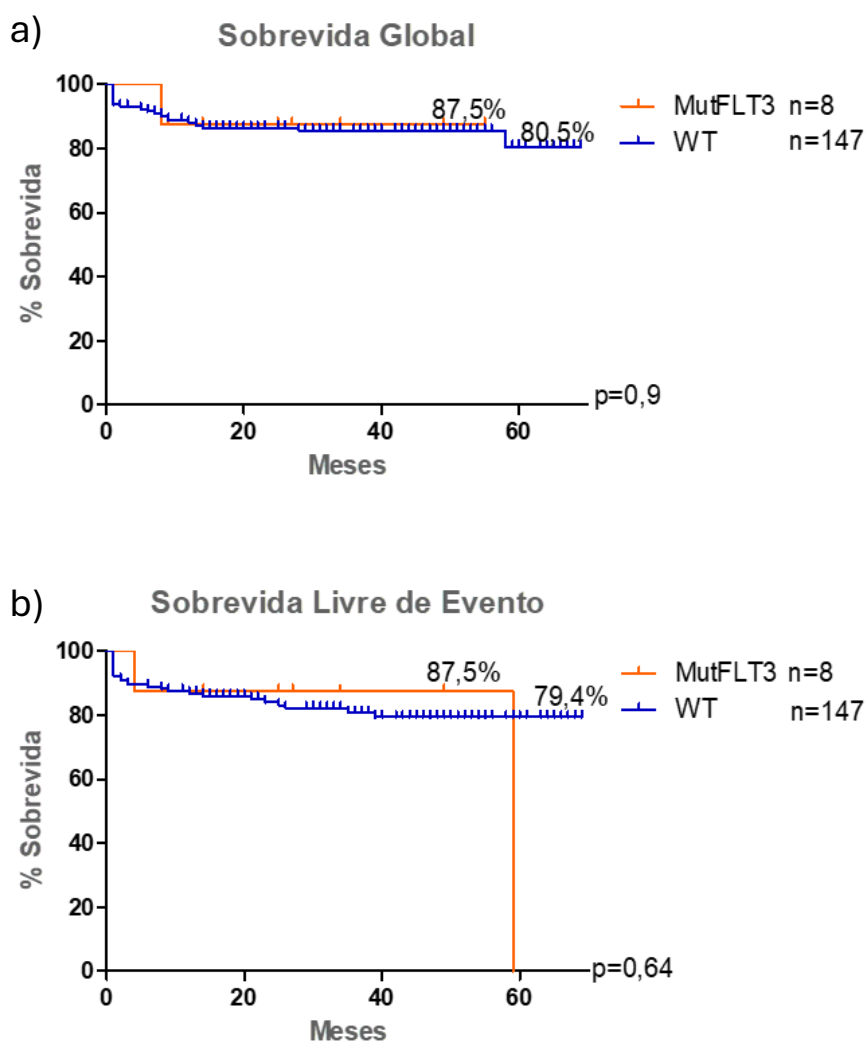


Figura 52 - Curvas de Sobrevida dos pacientes de acordo com a presença de mutação no gene *FLT3*. a) Sobrevida Global (SG), $p=0,9$. b) Sobrevida Livre de Evento (SLE), $p=0,64$. Teste Log-rank Mantel Cox.

Avaliamos a expressão de *FLT3* dos pacientes e a distribuição de frequência de expressão do *FLT3* foi sempre positiva, indicando que existe uma associação entre expressão do *FLT3* e a LLA B. Além disso, pacientes com diferentes marcadores biológicos apresentaram padrões diferentes na expressão de *FLT3* (Figura 53).

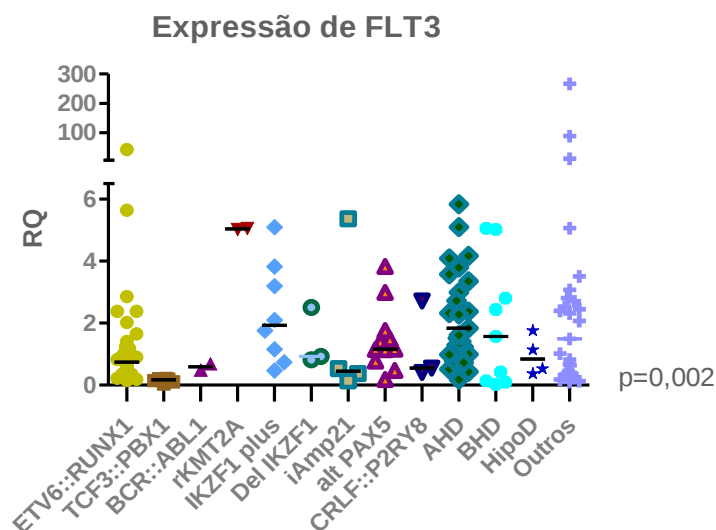


Figura 53 - Níveis de expressão de *FLT3* de acordo com subtipos biológicos de LLA B. Teste de Kruskal-Wallis (p=0,0028).

Os pacientes com mutação no *FLT3* apresentaram maiores níveis de expressão do gene quando comparados aos demais pacientes (teste Mann Whitney, p=0,03, Figura 54b). Quatro pacientes que não possuíam mutação no gene *FLT3* apresentaram expressão de *FLT3* muito acima dos demais (RQ>10) e vimos que eles apresentavam valores de DRM no D15 inferiores quando comparados aos demais pacientes (Figura 54c), mas que os valores de DRM ao fim da indução não foram diferentes dos pacientes sem hiper expressão (Figura 54d).

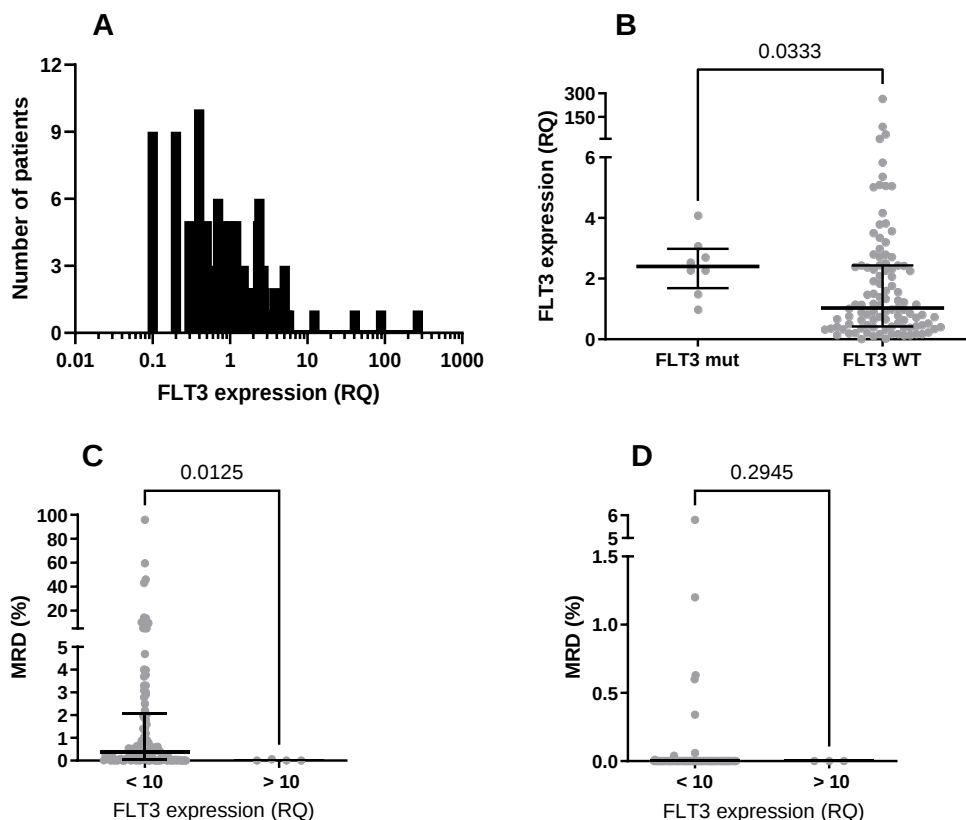


Figura 54 - Análise de expressão em amostra de crianças com LLA B. (n=112). a) Distribuição de frequência da expressão de *FLT3* (quantificação relativa- RQ) na população estudada (atenção para a escala em log). b) Expressão de *FLT3* entre pacientes com mutação no *FLT3* (*FLT3* mut) e pacientes sem mutação no *FLT3* (WT). Teste Mann Whitney. c) Avaliação da DRM no meio da indução (D15 para protocolo BFM ALLIC 2009 e D19 para protocolo GBTLI 2021) de pacientes com hiper expressão de *FLT3* (RQ>10) e demais pacientes (RQ < 10). Teste Mann Whitney. d) Avaliação da DRM ao fim da indução (D78 para protocolo BFM ALLIC 2009 e D49 para protocolo GBTLI 2021) de pacientes com hiper expressão de *FLT3* (RQ>10) e demais pacientes (RQ < 10). Teste Mann Whitney.

A Tabela 15 e a Tabela 16 apresentam as características dos pacientes com mutações e hiper expressão de *FLT3*.



Tabela 15 - Características dos pacientes com mutação no gene *FLT3*

Idade (meses)	Sexo	SNC	GB	Protocolo de tto	DRM D15 ou D19	DRM D33	DRM D78 ou D49	Grupo de Risco	Evento	Situação atual	Associação	Mutação	Expressão (RQ)	Descrição	AMP classificação
134	M	SNC 1	<5000	BFM adaptado	>0,01 e < 0,1	0	0	RI	Rec	2nd recidiva	não avaliada	TKD	NR	c.2503G>T p.Asp835Tyr	Tier 1
35	F	SNC 1	10000 a 50000	BFM adaptado	0	0	0	BR	0	RFT	-	JM-INDEL	1,491	c.1764_1775del p.Glu588_Val592delinsAsp	Tier 1
31	F	SNC 2	5000 a 10000	BFM adaptado	>0,1 e < 1,0	>0,01 e < 0,1	>0,1 e < 1,0	AR	Rec	OL	-	TKD	2,533	c.2508_2510del p.Ile836del	Tier 2
27	M	SNC 2	<5000	BFM adaptado	>0,1 e < 1,0	0	NR	RI	0	RET	-	JM-INDEL	3,077	c.1771_1785delinsGGTGGGGAC p.Tyr591_Arg595delinsGlyGlyAsp	Tier 3
21	F	SNC 1	5000 a 10000	BFM adaptado	<0,01	0	0	BR	0	RET	-	JM-INDEL	2,847	c.1753_1766delinsGC p.Ser585_Tyr589delinsArg	Tier 1
116	F	SNC 2	<5000	BFM adaptado	0	0	0	RI	0	RET	AHD	TKD	0,981	c.2503_2505del p.Asp835del	Tier 2
209	M	SNC 1	10000 a 50000	GBTLI 2021	>0,1 e < 1,0	NR	0	AR	0	RET	AHD	TKD/JM-INDEL	2,276	c.2508_2510del p.Ile836del c.1727_1728insGGGGCT p.Leu576_Gln577insGlyLeu	Tier 2 Tier 1
69	F	SNC 1	<5000	GBTLI 2021	>0,1 e < 1,0	NR	0	RI	0	RET	AHD	TKD	4,082	c.2505T>G; p.Asp835Gly	Tier 1

RI: risco intermediário; BR: Baixo risco; AR: Alto risco; Rec.:recidiva; RFT: remissão fora de tratamento; OL: óbito por leucemia; RET: remissão em tratamento; AHD: alta hiperdiploidia

Tabela 16 - Características dos pacientes com hiper expressão de *FLT3* (RQ>10)

Idade (meses)	Sexo	SNC	GB	Protocolo de tto	DRM D15 ou D19	DRM D33	DRM D78 ou D49	Grupo de Risco	Evento	Situação atual	Associação	Mutação	Expressão (RQ)
51	F	SNC1	10000 a 50000	BFM adaptado	<0,01	0	0	RI	0	RET	-	WT	266,682
212	M	SNC1	<5000	BFM adaptado	> 0,01 e < 0,1	0	NR	RI	Óbito em remissão	OR	DEL CDKN2A e 2B t (12;21)	WT	89,306
45	M	SNC1	<5000	BFM adaptado	<0,01	0	0	BR	0	RET	-	WT	40,882
160	F	SNC1	>100000	GBTLI 2021	<0,01	NR	0	AR	0	RET	-	WT	12,327

RI: risco intermediário; BR: Baixo risco; AR: Alto risco; OR: óbito em remissão; RET: remissão em tratamento.



4.5 Perfil de marcadores biológicos apresentados pelos pacientes com evoluções clínicas distintas

Avaliamos os grupos de pacientes que apresentaram recidiva e dos pacientes que foram a óbito por toxicidade relacionada ao tratamento. As características clínicas e laboratoriais desses pacientes são apresentadas nas Tabela 17, Tabela 18 e Tabela 19.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a idade e leucometria inicial dos pacientes que recidivaram quando comparados aos pacientes que não tiveram recaída. A presença de infiltração de SNC no diagnóstico foi associada a maior chance de recidiva (teste exato de Fisher, $p=0,04$) (Figura 55).

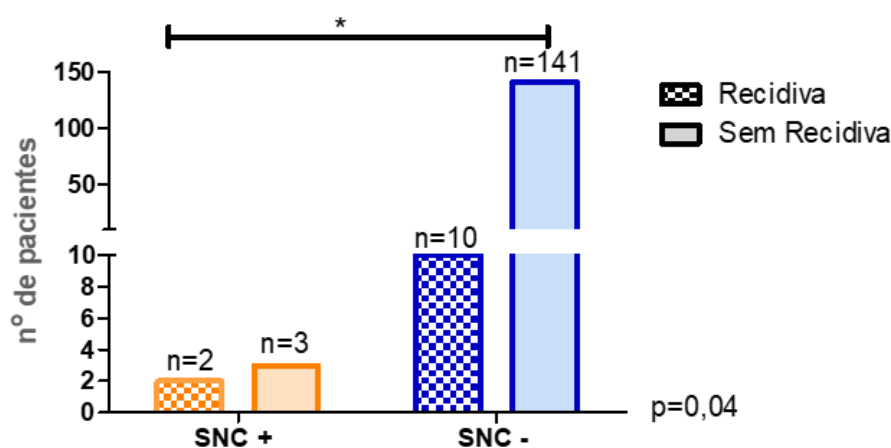


Figura 55 - Correlação entre a presença de infiltração do SNC ao diagnóstico e ocorrência de recidiva. Teste exato de Fisher, ($p=0,04$).



Tabela 17 - Características e Evolução dos pacientes segundo evolução

		Todos os pacientes (156)	Sem recidiva (144)	Com Recidiva (12)	Óbito por toxicidade (17)
Idade (meses)	Mínima	14m	14m	20m	16m
	Máxima	212m	212m	170m	212m
	Mediana	53m	53m	64m	60m
	Masculino:	80 (51%)	73 (51%)	7 (58%)	8 (47%)
Sexo	Feminino:	76 (49%)	71 (49%)	5 (42%)	9 (53%)
	Relação ♂/♀	1,05	1,02	1,4	0,9
GB	Mínimo	510	510	1750	510
	Máxima:	481000	481000	308000	322000
	Mediana:	8135	8135	7675	26050
Status SNC	SNC 1	94 (60,2%)	88 (61%)	6 (50%)	7 (41%)
	SNC 2	57 (36,5%)	53 (37%)	4 (33%)	9 (53%)
	SNC 3	5 (3,2%)	3 (2%)	2 (17%)	1 (6%)
Evolução	Remissão	122 (78,2%)	122	0	0
	Recidiva	12 (7,7%)	0	100%	0
	Óbito	24 (15,4%) (*6 pós recidiva)	18	6 (50%)	17
	Transferida	4	4	0	0
	1ª Remissão	79	79	0	0
	fora de tto				
	1ª Remissão em tratamento	43	43	0	0
	2ª Remissão fora de tto	4		4	0
	Óbito sem documentação remissão	4	4	0	4
Situação atual	Óbito em remissão	14 (9%)	13 (9%)	1 (8,3%)	13 (76%)
	Óbito por doença (recidiva ou FI)	6 (3,8%)	1 (FI) (0,7%)	5 (42%)	0
	Recaída em tratamento (remissão)	2 (1,3%)	0	2 (16,7%)	0
	Transferida Perdeu seguimento	4	4	0	0



Tabela 18 - Características dos pacientes que apresentaram recidiva (n=12)

Idade (m)	Sexo	GB diag	Status SNC	GR Diagn	Protocolo tto	DRM D15/D19*	DRM D33	DRM D78	GR pos Indução	Tipo de recidiva	Tempo até recidiva	Situação Atual	SG (m)	Marcador biológico
20	M	25880	SNC 1	RI	BFM ALLIC 2009 adaptado	0,18	<0,01	NR	RI	Isolada testicular	39	RCC FT	64	ETV6::RUNX1
154	M	308000	SNC 1	AR	BFM ALLIC 2009 adaptado	11	0,65	0,04	AR	Isolada medular	3	OL (recidiva)	9	Hipodiploidia
34	M	38500	SNC 2	RI	BFM ALLIC 2009 adaptado	0,34	<0,01	NR	RI	Isolada SNC	15	RCC FT	65	TCF3 -PBX1** Baixa hiperdiploidia
104	M	3630	SNC 1	RI	BFM ALLIC 2009 adaptado	0,24	0,04	<0,01	RI	Isolada SNC	25	OL (recidiva)	58	Alta Hiperdiploidia + Del ERG + Del PAX5 + Del JAK2
134	M	1750	SNC 1	RI	BFM ALLIC 2009 adaptado	0,04	<0,01	<0,01	RI	Isolada medular	23	2ª RCC em TTO	55	Mut FLT3 TKD CREBBP-ADCY9 INFRAME ^{SS}
31	F	8650	SNC 2	BR	BFM ALLIC 2009 adaptado	0,82	NR	0,63	AR	Isolada Medular	4	OL (recidiva)	8	Mut FLT3 TKD
58	F	3530	SNC 2	BR	BFM ALLIC 2009 adaptado	5,21	NR	<0,01	AR	Isolada Medular	22	RCC FT com TMO	49	Alta Hiperdiploidia
170	F	6300	SNC 3	RI	BFM ALLIC 2009 adaptado	0,34	0,07	<0,01	RI	Isolada SNC	26	OR	28	IKZF1 ^{plus*}
26	F	6700	SNC 2	BR	BFM ALLIC 2009 adaptado	0,11	0,01	<0,01	RI	Isolada medular	23	RCC FT com TMO	42	ETV6::RUNX1** RUNX1::CTC1 [§]
143	M	71130	SNC 1	RI	BFM ALLIC 2009 adaptado	1,42	0,04	76	AR (rec)	Isolada medular	3	OL (recidiva)	5	IKZF1 ^{plus*}
70	M	15680	SNC 1	BR	BFM ALLIC 2009 adaptado	5,15	0,01	0	AR	Isolada medular	35	RCC em TTO (QT)	40	ETV6::RUNX1**
39	F	4160	SNC 3	AR	GBTLI 2021	3,77	NR	0,19	AR	Combinada MO e SNC	2	OL (recidiva)	7	Alta Hiperdiploidia

*NGS sem alteração; ** Confirmado pelo NGS; §Achado exclusivo de NGS; ^{SS}NGS amostra da recidiva



Tabela 19 - Características dos pacientes que foram a óbito por toxicidade (n=17)

Idade (m)	Sexo	GB diag	Status SNC	Protocolo tto	GR Diagn	DRM D15/D19*	DRM D33	DRM D78	GR pos Indução	Causa do óbito	Tempo sobrevida	Marcador biológico
185	M	132000	SNC 1	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	1,02	NR	NR (óbito antes)	RI	Infecção	25d	Alta hiperdiploidia, <i>ETV6::RUNX1</i>
179	F	5800	SNC 2	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	9,6	0	NR	AR	Infecção	12m	<i>delIKZF1</i> , <i>delERG</i> *
165	M	322000	SNC 2	BFM ALLIC 2009 adaptado	AR	14,12	0,07	0	AR	Infecção	14m	Baixa hiperdiploidia, <i>rKMT2A</i>
43	F	6020	SNC 1	BFM ALLIC 2009 adaptado	BR	1,98	NR	NR (óbito antes)	RI	Infecção	26d	<i>ETV6::RUNX1</i> ; <i>P2RY8::CRLF2</i>
60	M	10690	SNC 2	BFM ALLIC 2009 adaptado	BR	10,21	0,27	NR (óbito antes)	AR	Infecção	1m	-
184	F	76950	SNC 2	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	0,24	0	NR (óbito antes)	RI	Infecção	2m	Baixa hiperdiploidia
151	F	1950	SNC 1	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	0	0	NR (óbito antes)	RI	Infecção	1m	-
151	F	190000	SNC 2	BFM ALLIC 2009 adaptado	AR	2,78	0,32	0	AR	Infecção	9m	<i>BCR::ABL1</i>
29	F	14430	SNC 2	BFM ALLIC 2009 adaptado	BR	0,23	NR	NR (óbito antes)	RI	Infecção	1m	<i>IKZF1</i> ^{plus} *
49	M	41050	SNC 2	BFM ALLIC 2009 adaptado	AR	0,03	NR	NR (óbito antes)	AR	Infecção	1m	<i>BCR::ABL1</i>
212	M	510	SNC 1	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	0,06	0	NR (óbito antes)	RI	AVC	1m	-
18	M	35000	SNC 2	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	0,64	NR	NR (óbito antes)	RI	Infecção	1m	-
45	M	31850	SNC 1	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	0,62	NR	NR (óbito antes)	RI	Infecção	29d	Alta hiperdiploidia <i>ENSG00000226824-XPO1</i> [§]
29	F	26050	SNC 1	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	0,54	0	0	RI	Infecção	6m	Baixa hiperdiploidia, <i>ETV6::RUNX1</i>
27	F	67340	SNC 3	BFM ALLIC 2009 adaptado	RI	3	0	NR (óbito antes)	RI	Infecção	1m	Baixa hiperdiploidia, <i>ETV6::RUNX1</i>
16	M	4210	SNC 2	BFM ALLIC 2009 adaptado	BR	0,45	NR	NR (óbito antes)	RI	Infecção	1m	*
120	F	14700	SNC 1	GBTI 2021	AR	0	NR	0	AR	Infecção	8m	Alta hiperdiploidia, <i>TCF3::PBX1</i>

*NGS sem alteração; ** Confirmado pelo NGS; §Achado exclusivo de NGS; §§NGS amostra da recidiva



Dos 122 pacientes tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado, 11 apresentaram recidiva. Em relação à classificação de risco, 4 eram de baixo risco, 6 de risco intermediário e um paciente de alto risco (figura 56). Um paciente tratado pelo protocolo GBTLI 2021 e classificado como alto risco por apresentar infiltração de SNC (cloroma) apresentou recidiva.

Pacientes que apresentaram Recidiva
(protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado)

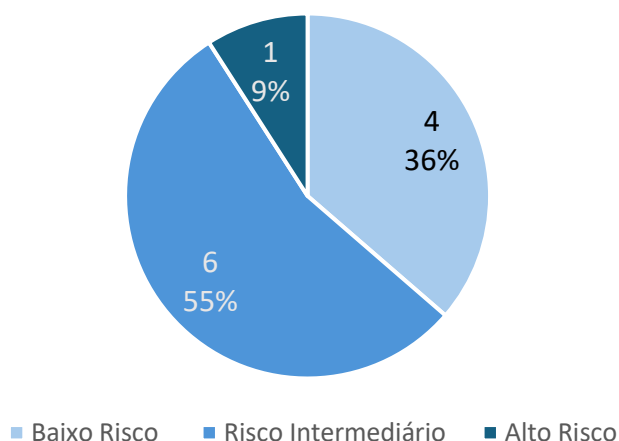


Figura 56 - Classificação de Risco no primeiro tratamento (BFM ALLIC 2009 adaptado) dos pacientes que recidivaram (n=11)

Quando comparamos os subtipos biológicos dos pacientes que apresentaram recidiva com toda a população do estudo, observamos que entre eles houve uma prevalência maior de pacientes com hipodiploidia, *IKZF1*^{plus} e mutação no *FLT3* (figura 57). Não houve associação estatisticamente significativa entre esses subtipos e a ocorrência de recidiva (teste exato de Fisher, $p > 0,05$).

Todos os pacientes que apresentaram recidivas foram classificados em algum subtipo biológico.

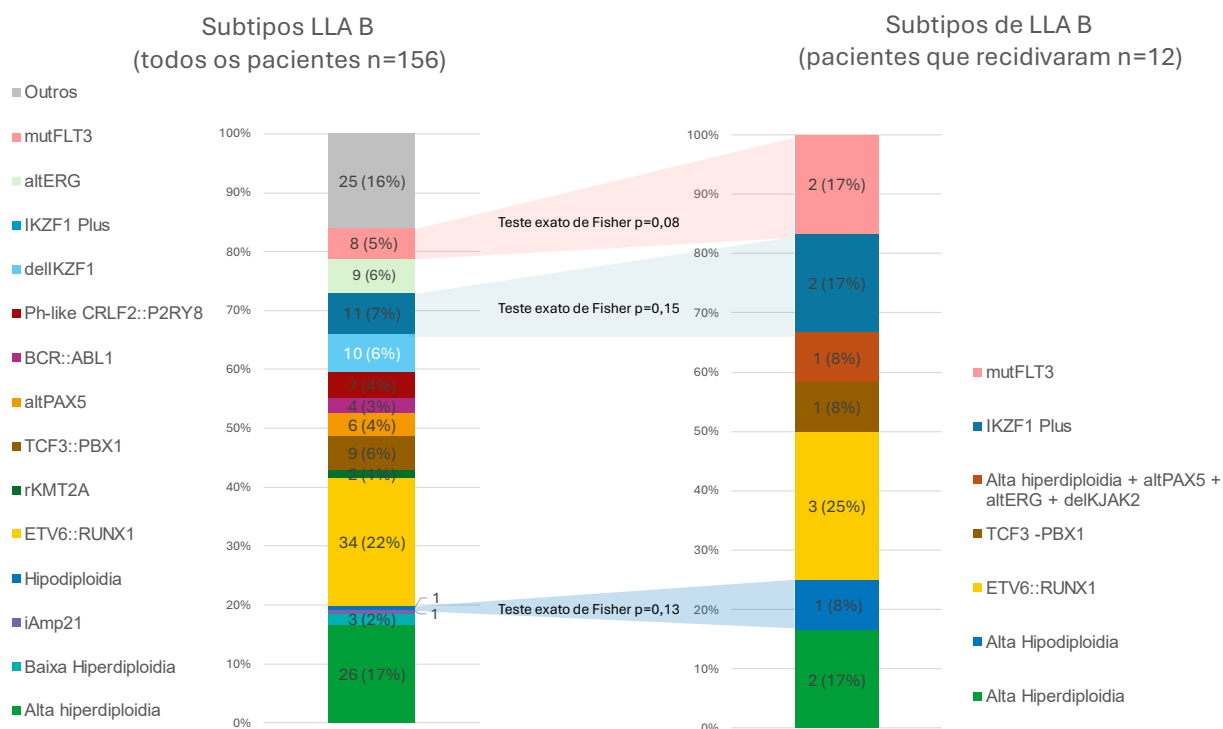


Figura 57 - Distribuição em diferentes subtipos de LLA B (todos / recidivas)

Com intuito de identificar alguma possível associação entre subtipo biológico e toxicidade ao tratamento, avaliamos o grupo de dezessete pacientes que foram a óbito em remissão (mortalidade secundária ao tratamento). Esse grupo de paciente apresentou maior contagem de leucócitos quando comparados aos pacientes que não apresentaram evento (óbito ou recidiva) (Teste Mann Whitney, $p=0,03$). Em relação à classificação de risco ao fim da indução, os pacientes tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado se distribuíram em 5 pacientes de alto risco (31%) e 11 pacientes de risco intermediário (69%) (figura 58). Uma paciente submetida a tratamento pelo protocolo GBTLI 2021 e classificada como de alto risco foi a óbito por toxicidade.



Pacientes que foram a Óbito em Remissão
(BFM ALLIC 2009 adaptado)

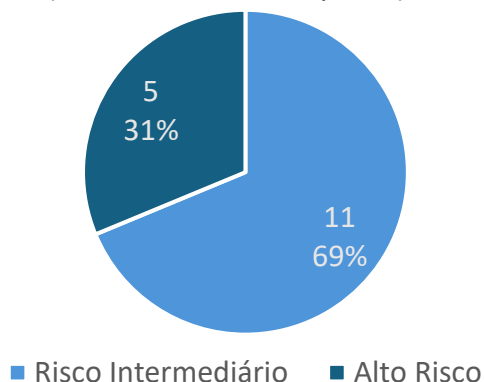


Figura 58 - Classificação de risco dos pacientes que foram a óbito em remissão

Observamos uma maior representatividade dos pacientes com *BCR::ABL1* e menor percentual de pacientes com alta hiperdiploidia entre os pacientes que foram a óbito por toxicidade. Outro achado que nos chamou a atenção foi a maior proporção de pacientes sem marcador biológico identificado entre os pacientes que foram a óbito por toxicidade (29%); mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,25$, teste exato de Fisher). (Figura 59)

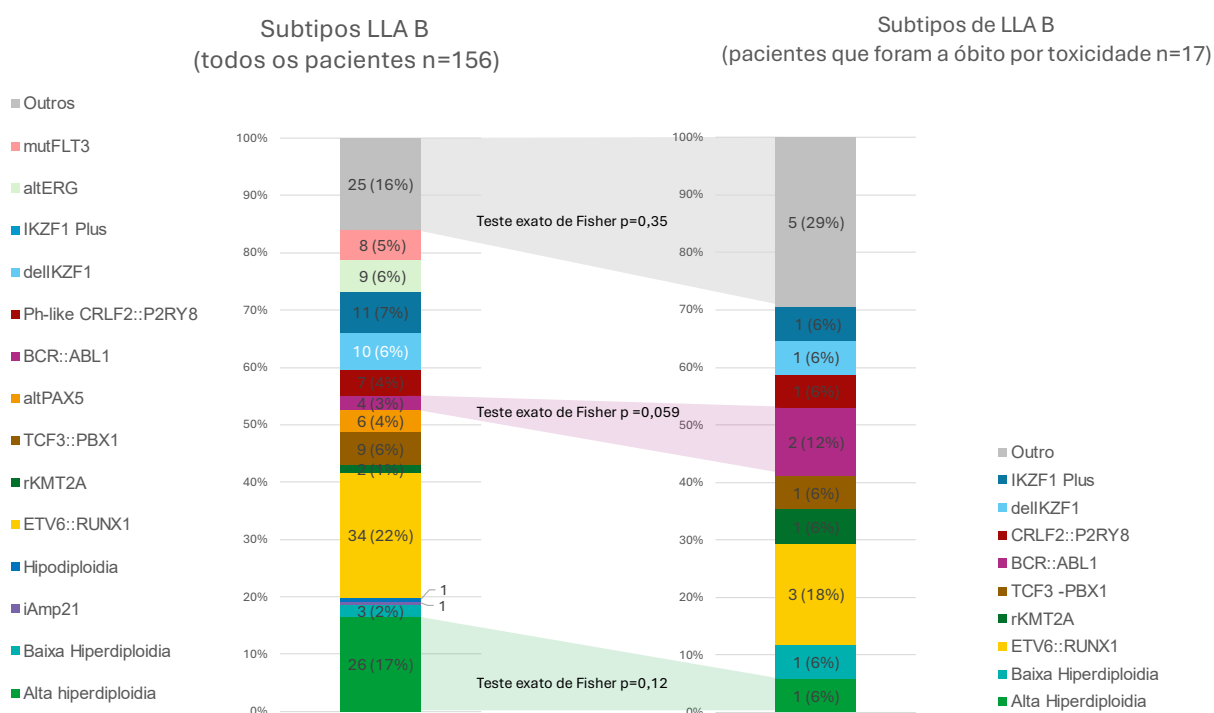


Figura 59 - Distribuição em diferentes subtipos de LLA B (todos / óbitos por toxicidade)

4.6 Sobreposição de diferentes alterações genéticas e moleculares

Avaliamos as situações de co-existência de diferentes marcadores biológicos com o intuito de identificar a influência de associação entre diferentes alterações sobre a evolução clínica prevista. Na figura 60, são identificadas as principais associações entre diferentes marcadores biológicos. Em seguida, na figura 61, há uma representação esquemática das mesmas associações, mas com a demonstração de associações “triplas” e sinalização dos pacientes recidivados.

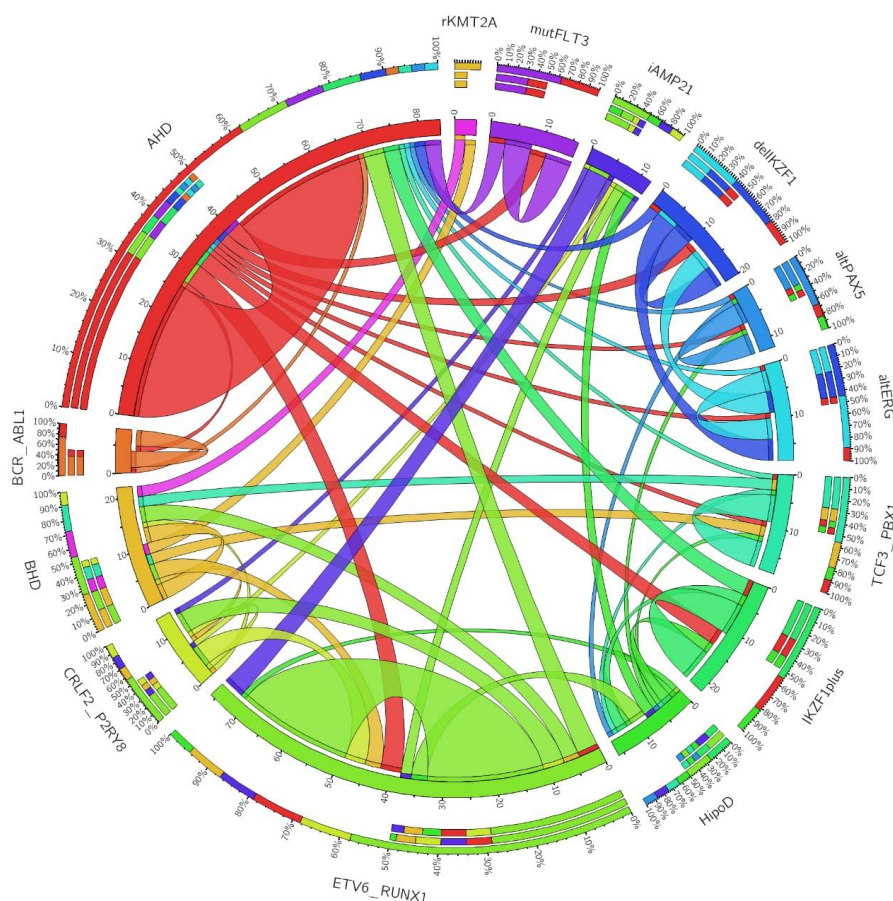


Figura 60 - Associação entre alterações biológicas em 156 pacientes com LLA B.

AHD: alta hiperdiploidia; BHD: Baixa hiperdiploidia; HipoD: hipodiploidia; altERG: alteração no *ERG*; mutFLT3: mutação no *FLT3*; delIKZF1: deleção no *IKZF1* sem critério para *IKZF1*^{plus}; altPAX5: alteração no gene *PAX5*.

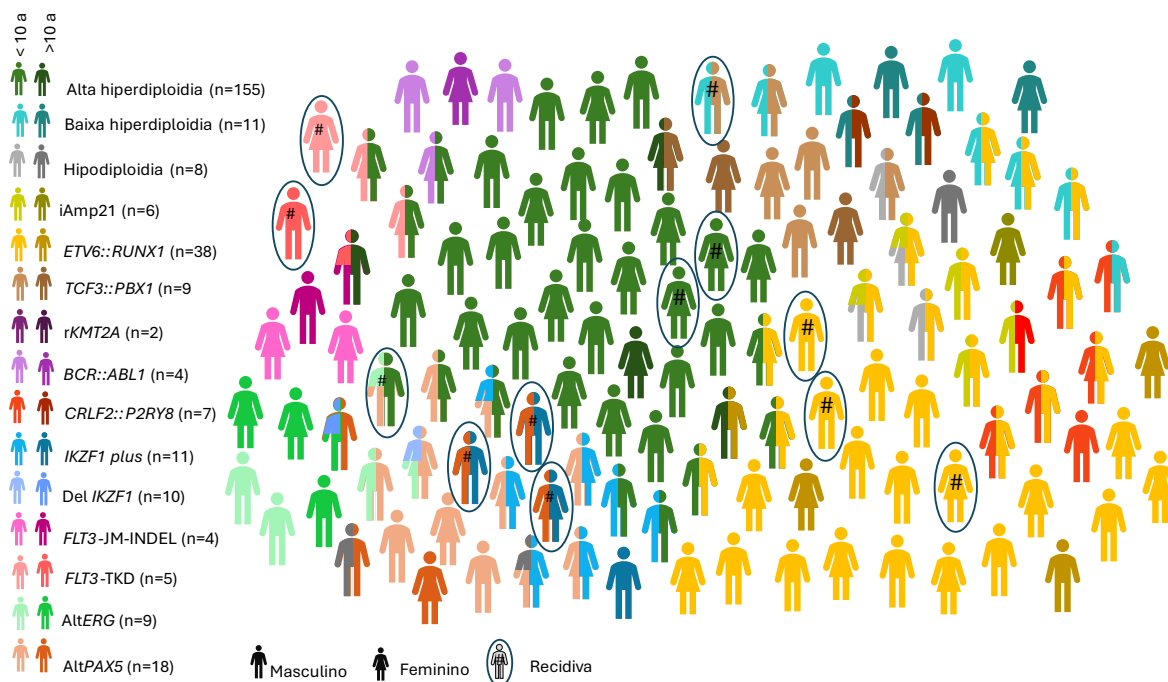


Figura 61 - Representação esquemática da população de pacientes estudados e alterações biológicas identificadas.

Ícones com duas ou três cores distintas representam associação de diferentes marcadores biológicos identificadas em um mesmo paciente. Em destaque (#), pacientes que apresentaram recidiva.

Entre os 42 pacientes que apresentaram hiperdiploidia, 16 pacientes apresentaram outro marcador biológico associado e em 26 casos a hiperdiploidia foi encontrada isoladamente. Em 4 pacientes, a hiperdiploidia foi associada ao rearranjo *ETV6::RUNX1*; em 1 caso ao rearranjo e *TCF3::PBX1* e em 1 caso à LLA PH+ (*BCR::ABL1*). Três pacientes com hiperdiploidia apresentaram fenótipo *IKZF1*^{plus}, sendo um deles com alteração no *PAX5* e outros dois com deleção no *IKZF1* e no *CDKN2A/B*. Dois pacientes com hiperdiploidia apresentavam mutações *FLT3*-TKD e uma criança apresentou as duas mutações *TKD-FLT3* e *INDEL-FLT3*. Quando analisamos a ocorrência de recidiva, houve 3 casos de recidiva entre os pacientes com alta hiperdiploidia, um caso com alterações nos genes *ERG* e *PAX5* e dois casos com alta hiperdiploidia isolada.

Não foi possível identificar influência entre associação de diferentes marcadores biológicos com a hiperdiploidia sobre os valores de DRM (figura 62) ou a ocorrência de recidiva.

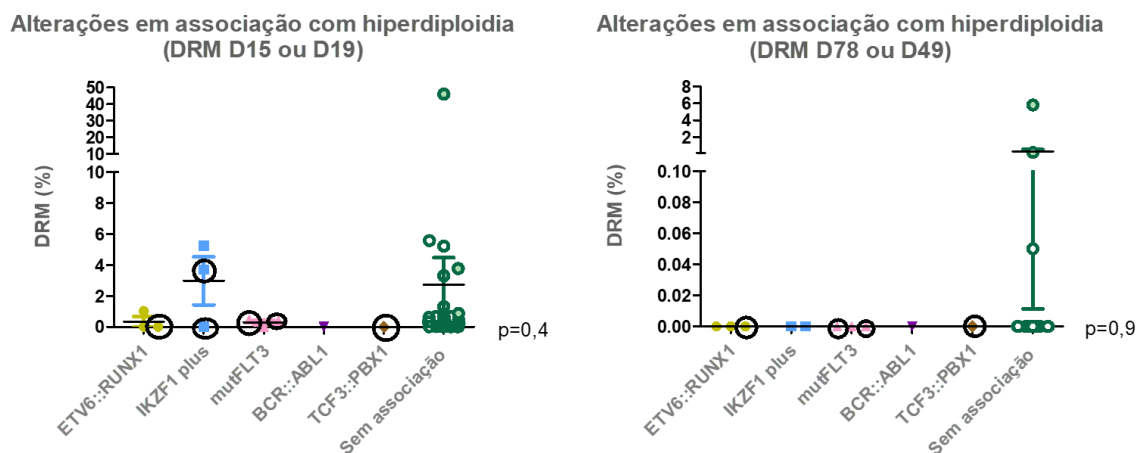


Figura 62 - Valores de DRM dos 42 pacientes com alta hiperdiploidia isoladamente (em verde) ou associado com outros marcadores biológicos.

Vinte e oito pacientes foram tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado e quatorze pacientes tratados pelo protocolo GBLT 2021. Os valores de DRM dos pacientes tratados pelo protocolo GBLT 2021 estão marcados com círculo preto (nas associações). Para o grupo com hiperdiploidia isolada destacados dois pacientes com valores de DRM extremos, ambos tratados pelo GBLT 2021 (preenchidos em verde claro). AHD: alta hiperdiploidia, HipoD: hipodiploidia; BHD: baixa hiperdiploidia. (Teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$)

Chamou a atenção o fato de que entre os cinco pacientes com mutação *FLT3*-TKD, houve recidiva nos dois casos em que não houve associação com alta hiperdiploidia e, em contra-partida, entre os três pacientes com alta hiperdiploidia associada à *FLT3*-TKD não houve recidiva. Apesar de “curioso” esse achado não tem significado estatístico (Teste exato de Fisher, $p = 0,1$).

A segunda alteração biológica mais frequente foi o rearranjo *ETV6::RUNX1*, presente em 38 pacientes (32 tratados pelo BFM ALLIC 2009 adaptado e 6 pacientes tratados pelo GBLT). Em 22 casos (18 tratados pelo BFM e 4 entre os pacientes tratados pelo GBLT) o rearranjo *ETV6::RUNX1* foi encontrado isoladamente. Houve associação com alta hiperdiploidia em 4 casos, rearranjo *P2RY8::CRLF2* em 4 casos, *iAMP21* em 2 casos (1 criança tratada pelo GBLT), hipodiploidia em 1 caso e em 2 pacientes o *ETV6::RUNX1* foi associado com hipodiploidia e *iAMP21* concomitantemente. Não conseguimos identificar influência entre associação de marcadores e valores de DRM no meio e ao fim da indução (Figura 63).



Os três casos de recidiva observados entre os pacientes com *ETV6::RUNX 1* ocorreram em pacientes nos quais o rearranjo foi encontrado “isoladamente”. Após a realização do NGS, identificamos a presença da fusão *RUNX1::CTC1* em uma paciente do sexo feminino com *ETV6::RUNX1* que recidivou.

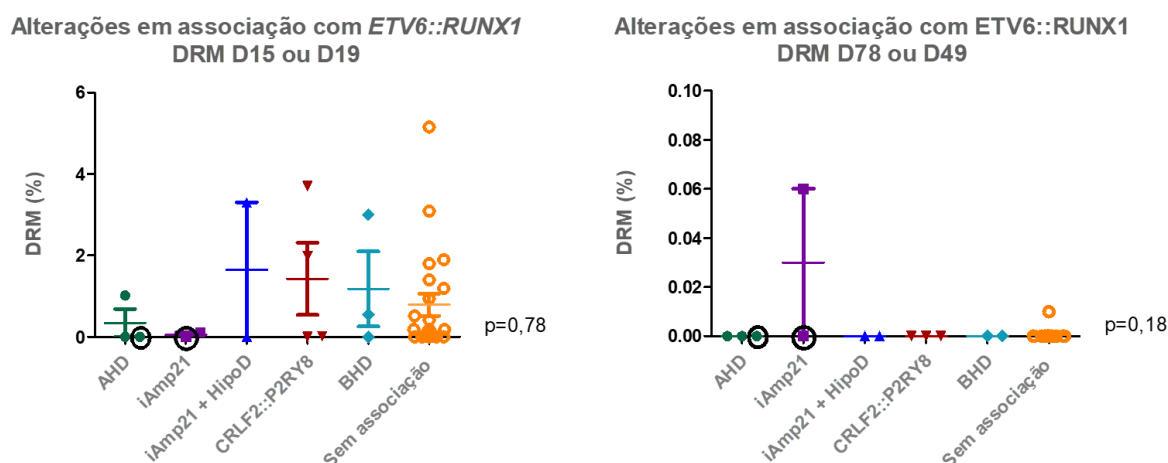


Figura 63 - Valores de DRM dos 38 pacientes com *ETV6::RUNX1* isoladamente (em laranja) ou associado com outros marcadores biológicos.

Trinta e dois pacientes foram tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado e seis pacientes tratados pelo protocolo GBTLI 2021. Marcados com círculo, dois pacientes tratados pelo protocolo GBTLI 2021 que apresentaram rearranjo associado com AHD e com iAMP21. AHD: alta hiperdiploidia, HipoD: hipodiploidia; BHD: baixa hiperdiploidia. Teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$)

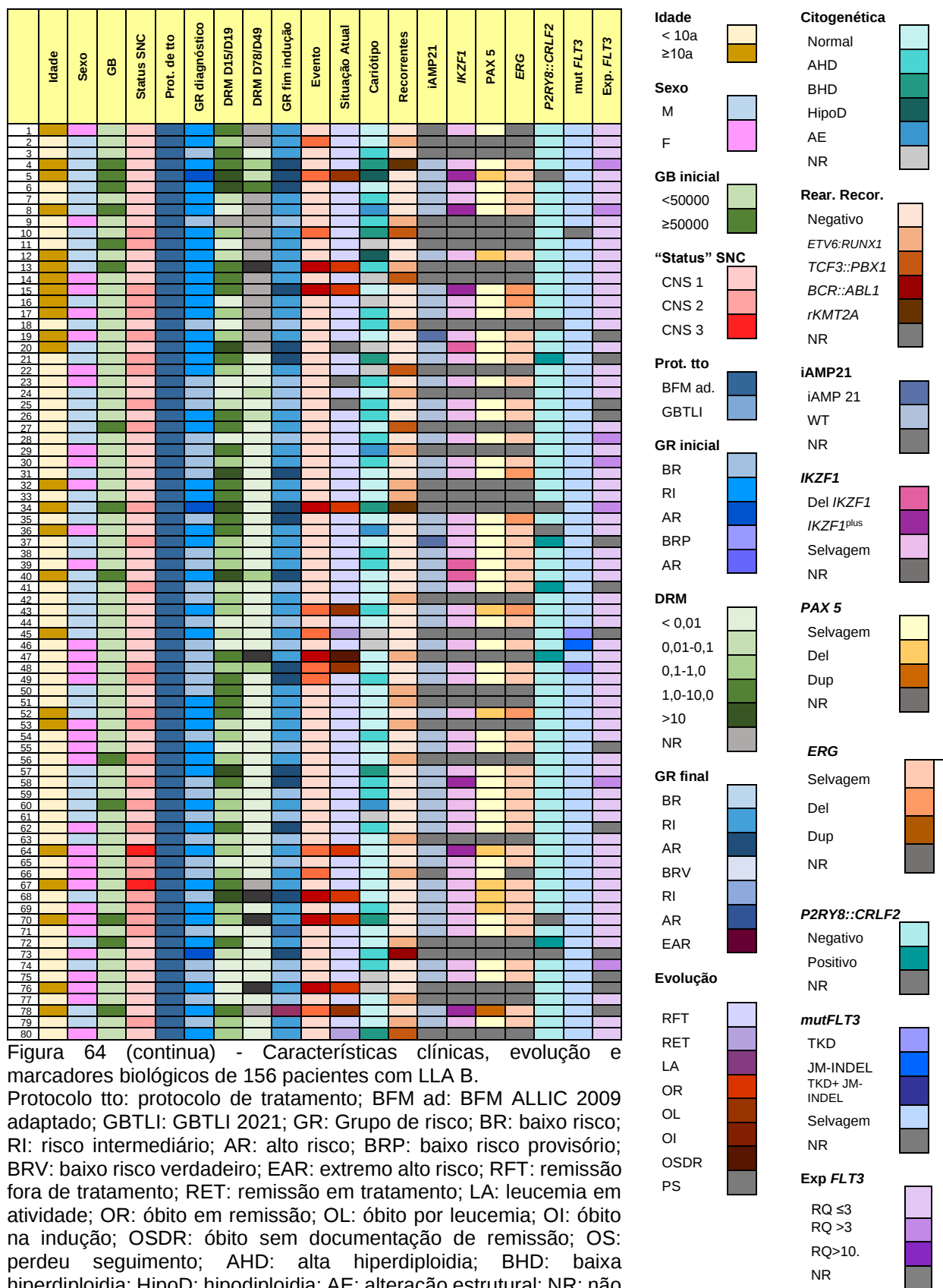


Figura 64 (continua) - Características clínicas, evolução e marcadores biológicos de 156 pacientes com LLA B.

Protocolo tto: protocolo de tratamento; BFM ad: BFM ALLIC 2009 adaptado; GBTLI: GBTLI 2021; GR: Grupo de risco; BR: baixo risco; RI: risco intermediário; AR: alto risco; BRP: baixo risco provisório; BRV: baixo risco verdadeiro; EAR: extremo alto risco; RFT: remissão fora de tratamento; RET: remissão em tratamento; LA: leucemia em atividade; OR: óbito em remissão; OL: óbito por leucemia; OI: óbito na indução; OSDR: óbito sem documentação de remissão; OS: perdeu seguimento; AHD: alta hiperdiploidia; BHD: baixa hiperdiploidia; HipoD: hipodiploidia; AE: alteração estrutural; NR: não realizado; Rear. Recorrente: rearranjo recorrente; Del: deleção; Dup: duplicação

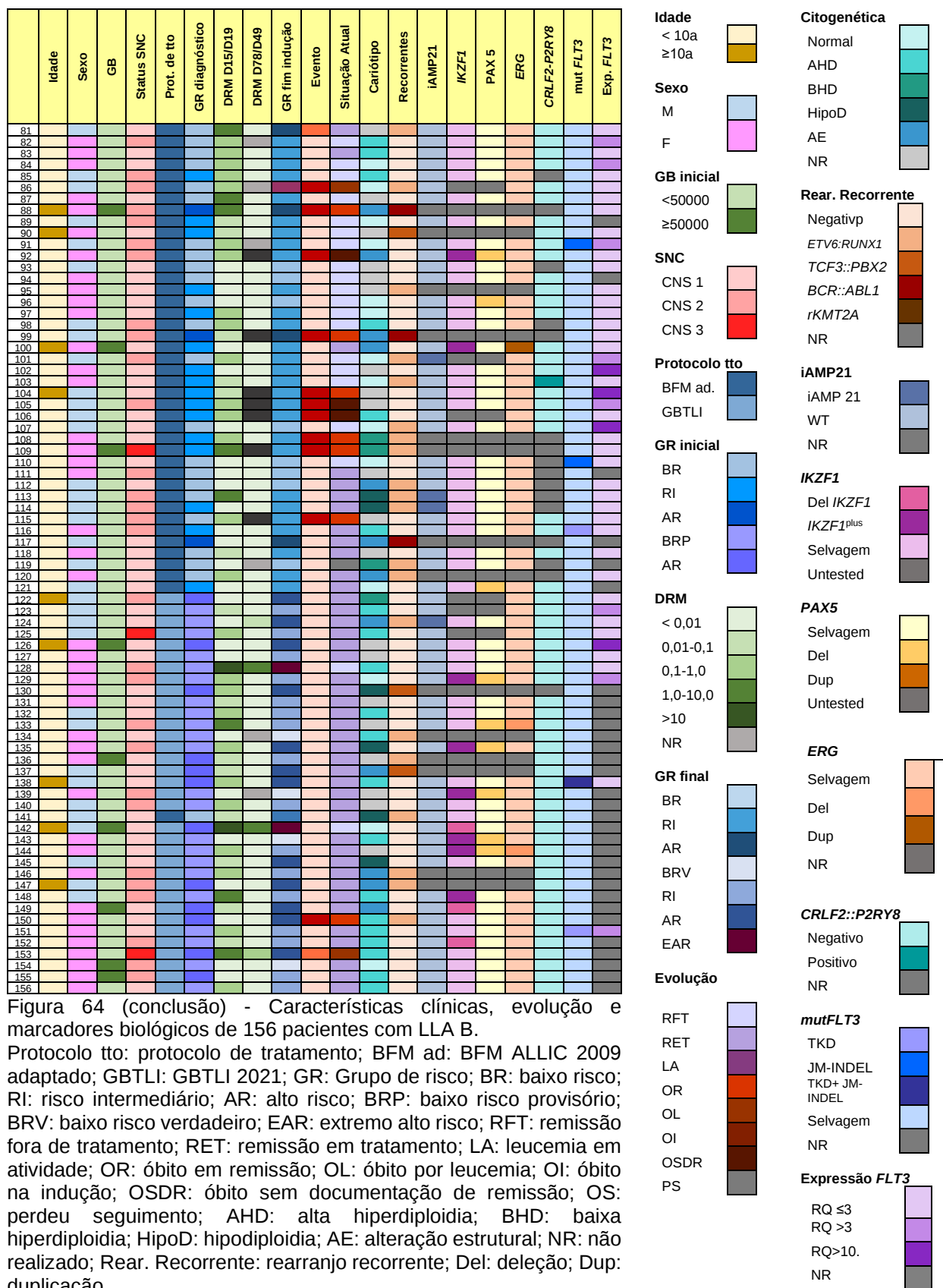


Figura 64 (conclusão) - Características clínicas, evolução e marcadores biológicos de 156 pacientes com LLA B.
Protocolo tto: protocolo de tratamento; BFM ad: BFM ALLIC 2009 adaptado; GBTLI: GBTLI 2021; GR: Grupo de risco; BR: baixo risco; RI: risco intermediário; AR: alto risco; BRP: baixo risco provisório; BRV: baixo risco verdadeiro; EAR: extremo alto risco; RFT: remissão fora de tratamento; RET: remissão em tratamento; LA: leucemia em atividade; OR: óbito em remissão; OL: óbito por leucemia; OI: óbito na indução; OSDR: óbito sem documentação de remissão; OS: perdeu seguimento; AHD: alta hiperdiploidia; BHD: baixa hiperdiploidia; HipoD: hipodiploidia; AE: alteração estrutural; NR: não realizado; Rear. Recorrente: rearranjo recorrente; Del: deleção; Dup: duplicação.



4.7 Fluxograma para caracterização biológica de LLA B

Foi desenvolvido um algoritmo (figura 65) com o objetivo de estabelecer o diagnóstico molecular de LLA fundamentado no uso racional da tecnologia. O instrumento baseia-se na detecção inicial das alterações mais frequentes e/ou relevantes com aplicação sequencial de metodologias de acordo com o custo e benefício do teste.

Primeiro “round”: Assim que confirmado o diagnóstico de LLA B, as amostras de todos os pacientes serão submetidas a avaliação por PCR para pesquisa de rearranjos recorrentes, rearranjos no *KMT2A* (multiplex) e rearranjos no gene *IKZF1* (multiplex). Para pacientes com LLA B *BCR::ABL1* será realizado sequenciamento do gene *ABL1*. A pesquisa de expressão de *CRLF2* será incluída na imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Segundo “round”: De acordo com a positividade ou não do *CRLF2* na imunofenotipagem (IFT), os pacientes serão direcionados para dois braços distintos:

1. nos casos de *CRLF2* positivo, será realizado pesquisa dos rearranjos *P2RY8::CRLF2* (RT-PCR), *IGH::CRLF2* (FISH) e *CRLF2::F232C* (sequenciamento).
2. Nos casos de *CRLF2* negativo, os pacientes serão direcionados para realização de MLPA (Kit SALSA MLPA probemix P327 *iAMP21-ERG* e com o kit probemix P335-B2 ALL-*IKZF1*; MRC-Holland).

Terceiro “round”: 1. Pacientes com expressão ou rearranjos no *CRLF2* serão submetidos a avaliação por sequenciamento dos genes *JAK1* e *JAK2*. 2. Para o grupo de pacientes com *CRLF2* negativo, será realizada avaliação por FISH (rearranjos envolvendo os genes *ABL1*, *ABL2*, *EPOR*, *JAK2*, *PDGFRB*) e pesquisa de mutação no *FLT3* (análise de fragmento e RFLP).

Casos selecionados serão direcionados para avaliação por NGS. Serão realizados exames confirmatórios para fusões Ph like (multiplex RT-PCR) quando estas forem detectadas através do NGS.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LLA-B

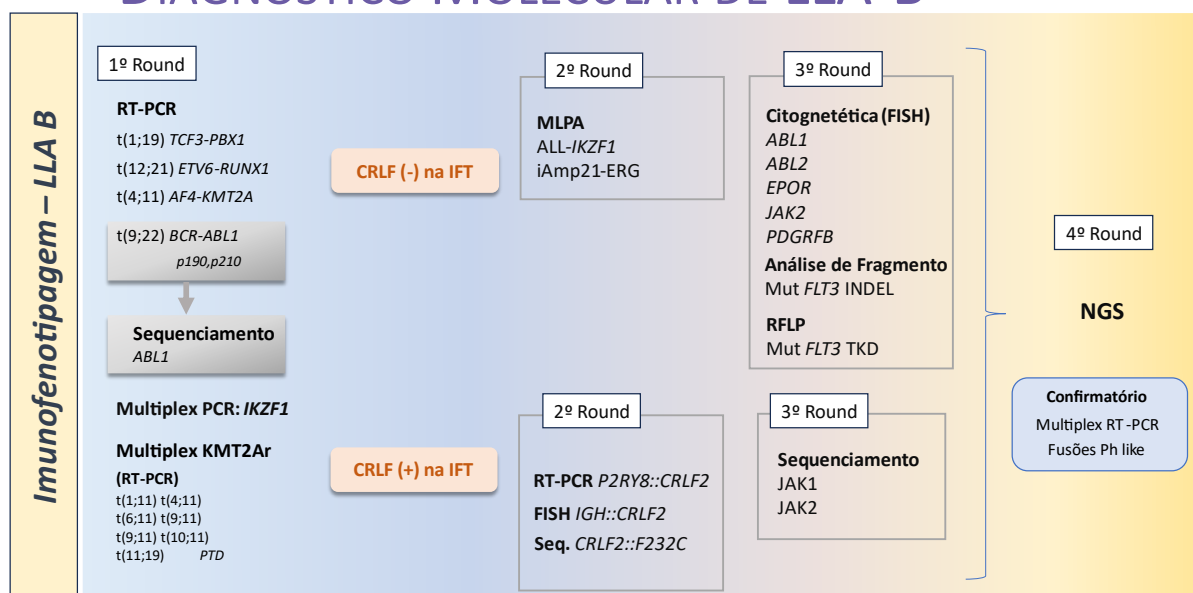


Figura 65 - Algoritmo para diagnóstico de LLA B desenvolvido pelo grupo de pesquisa do LPT / HCB. IFT: imunofenotipagem. ALL-*IKZF1*: kit probemix P335-B2 ALL-*IKZF1*; iAmp-*ERG*: Kit SALSA MLPA probemix P327 iAMP21-*ERG*.

Sequenciamento de Nova Geração (NGS – “New Generation Sequencing”)

Estamos em processo de validação de avaliação dos pacientes com a tecnologia por NGS e de comparação dos resultados obtidos através de NGS com os dados obtidos pelos métodos ortogonais. Não existem painéis para avaliação por NGS específico para pacientes pediátricos. Nesse primeiro momento, utilizamos um painel customizado para identificação de rearranjos e fusões. Nesse painel, selecionamos genes com significado clínico descrito em pacientes com LLA a avaliamos sequencias de RNA nas regiões desses genes, o que permite a identificação de possíveis novos genes de fusão. Não foi utilizado “pipeline” para avaliação de inserções ou deleções. As tabelas abaixo apresentam os dados inicialmente obtidos em 59 pacientes com LLA B (tabela 20) e as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com rearranjos identificados através do sequenciamento (tabela 21).



Tabela 20 - Descrição das alterações encontradas em 59 pacientes que realizaram NGS.

Alteração no NGS	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO NGS	ALTERAÇÃO OUTROS MÉTODOS
ALTERAÇÃO IDENTIFICADA NO NGS (n=24)	ETV6::RUNX1 (10)	ETV6::RUNX1 isolada (5)
		ETV6::RUNX1 + iAMP21 + Baixa hipodiploidia (1)
		ETV6::RUNX1 + Baixa hiperdiploidia (1)
		ETV6::RUNX1 (1)
	ETV6::RUNX1 (1)	ETV6::RUNX1 + CRLF2::P2RY8 (1)
		ETV6::RUNX1 + Alta hiperdiploidia (1)
	BCR::ABL1 (1)	BCR::ABL1 (1)
	TCF3::PBX1 (6)	TCF3::PBX1 isolada (4)
		TCF3::PBX1 + Baixa hiperdiploidia (2)
	ZMZ1::ABL1(1)	delIKZF1 (1)
	CREBBP-ADCY9 INFRAME (amostra recaída) (1)	FLT3-TKD (1)
	IKZF1 del? (1)	IKZF1 ^{plus} + Alta hiperdiploidia (1)
	DNM2-TMUB1 INFRAME (1)	Alta hiperdiploidia (1)
	GUSBP11-IGLL1	ETV6::RUNX1 (1)
NGS SEM ALTERAÇÃO (N=34)	Sem alteração	Alta hiperdiploidia (10)
		Baixa hiperdiploidia (1)
		Alteração estrutural cariótipo (2)
		ETV6::RUNX1 (1)
		IKZF1 ^{plus} (3)
		Del IKZF1 isolada + Alta Hiperdiploidia (1)
		Del IKZF1 + delERG (3)
		Del IKZF1 + delERG + delPAX5 (1)
		Alt ERG (2 isoladas)
		AltPAX5 (1 isolada)
		FLT3-TKD + Alta hiperdiploidia (1)
		FLT3 JM-INDEL (3)
		Sem alteração (6)
	Erro (1pacientes)	ETV6::RUNX1 (1)



Tabela 21 - Características clínicas, laboratoriais e evolução de pacientes com alterações identificadas pelo sequenciamento

Idade (m)	Sexo	GB diag	Status SNC	GR Diagn	Protocolo tto	DRM D15	DRM D33	DRM D78	GR pos Indução	Evento	Alteração Associada	Situação Atual	SG (m)	Alteração NGS
188	M	11300	SNC 1	RI	BFM ALLIC 2009 adaptado	13,7	0,2	NR	AR	-	del <i>IKZF1</i>	OS	3	<i>ABL1::ZM21</i>
134	M	1750	SNC 1	RI	BFM ALLIC 2009 adaptado	0,04	0	0	RI	Recidiva isolada medular	<i>FLT3</i> -TKD	RET 2ª recidiva	55	<i>CREBBP-ADCY9</i> INFRAME (amostra recaída)
51	M	4220	SNC 2	BR	BFM ALLIC 2009 adaptado	5,32	0	0	AR	-	Alta hiperdiploidia <i>IKZF1</i> ^{plus}	RFT	46	<i>IKZF1</i> del?
16	F	35690	SNC 2	RI	BFM ALLIC 2009 adaptado	5,56	0	0	AR	-	Alta hiperdiploidia	RFT	44	DNM2-TMUB1 INFRAME
49	M	27330	SNC 1	BR	BFM ALLIC 2009 adaptado	0,03	0	0	BR	-	<i>ETV6::RUNX1</i>	RFT	44	GUSBP11-IGLL1
41	M	2600	SNC 2	BR	BFM ALLIC 2009 adaptado	0,23	0	0	RI	-	Alta hiperdiploidia	RFT	30	FBXL3-KAT6A OUT OF FRAME
45	M	31850	SNC 1	RI	BFM ALLIC 2009 adaptado	0,62		NR (óbito antes)	RI	Óbito Indução	Alta hiperdiploidia	Óbito indução	1	ENSG00000226824-XPO1
26	F	6700	SNC 2	BR	BFM ALLIC 2009 adaptado	0,11	0,01	0	RI	Recidiva isolada medular	-	RFT TMO	42	<i>ETV6::RUNX1</i> ; <i>RUNX1::CTC1</i>
50	M	63000	SNC 1	RI	BFM ALLIC 2009 adaptado	3,7	0	0	RI		<i>P2RY8-CRLF2</i>	RFT	46	<i>ETV6-RUNX1</i> ; ARBB2-EPOR
50	M	18730	SNC 1	BR	BFM ALLIC 2009 adaptado	0	0	NR	BR		Alta hiperdiploidia	RFT	63	<i>ETV6::RUNX1</i> ; <i>RUNX1::EIF3B</i>



5 DISCUSSÃO

5.1 Descrição da Amostra

5.1.1 Características Epidemiológicas

Os parâmetros clínicos e epidemiológicos da nossa população refletem com certa exatidão as características descritas em LLA B na infância: pico de incidência entre 2 e 4 anos de idade, discreto predomínio do sexo masculino (Ries *et al.*, 1999) (Jeha, *et al.*, 2019), e percentual de 26% (Inaba; Pui, 2021) (Zhang; Habebbu; Li, 2022) (National Cancer Institute, 2021) de todos os casos de neoplasias malignas atendidas na nossa instituição. Essas observações dão sustentação à representatividade do grupo estudado em relação outras populações de crianças com LLA B.

Brasília é uma cidade nova (60 anos), cuja população foi constituída a partir de movimentos migratórios de pessoas das diferentes regiões do Brasil, está localizada em uma posição centralizada no País, com relativa proximidade às diferentes regiões (quando consideradas as amplas distâncias do território nacional) e possui malha aérea e viária que facilita a mobilização de moradores de regiões interioranas de outros estados; além disso, por ser capital do País, recebe profissionais da área jurídica, militares e representantes políticos de todas as federações do Brasil. Estes nos permitem inferir que a população dos pacientes tratados no Hospital da Criança de Brasília pode ser, do ponto de vista genético, um reflexo da população brasileira.

5.1.2 Leucometria ao diagnóstico

Apesar de certa semelhança com o que é descrito em diferentes localidades do mundo (entre 40 a 50% dos pacientes com leucometria inferior a $10.000/\text{mm}^3$ e cerca de 20% com leucócitos acima de $50.000/\text{mm}^3$) (Stary *et al.*, 2013; Jeha *et al.*, 2019), em nossa população há uma maior proporção de pacientes com valores menores de leucócitos e menor proporção de pacientes com leucometria acima de $50000/\text{mm}^3$. Uma limitação para a nossa comparação é o fato de que a maioria dos estudos multicêntricos apresentam os dados referentes à contagem de leucócitos considerando todos os casos de LLA (incluindo os imunofenótipos B e T) (Pui *et al.*, 2000; Pagliaro *et al.*, 2024). A contagem elevada de leucócitos ao diagnóstico é uma



das características típicas das leucemias de células T (Raetz; Teachey, 2016; Jing *et al*, 2024) e isso pode explicar por que na nossa amostra, restrita a pacientes de LLA de linhagem B, existe uma tendência para menor leucometria ao diagnóstico.

5.1.3 Classificação de risco

Avaliando a classificação do risco dos pacientes no momento da admissão e ao fim da indução, confirmamos a importância da avaliação da DRM para o refinamento e adequação da intensidade do tratamento. Na nossa amostra, entre os pacientes tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009, mais de 10% dos pacientes inicialmente classificados como baixo risco, foram reclassificados como de alto risco. Em outras circunstâncias, se não considerada a resposta biológica, estes pacientes não receberiam tratamento adequado à agressividade de sua doença.

Entre os 5060 pacientes incluídos no protocolo ALL IC BFM 2002, 30% dos pacientes com LLA foram estratificados com baixo risco, 52,3% como risco intermediário e 16,7% como alto risco (Stary *et al*, 2002). Na Polônia, entre 1376 pacientes tratados pelo protocolo BFM ALL IC 2009, 14% foram estratificados como de baixo risco, 63,1% como risco intermediário (63,1%) e 23% como alto risco 23% (Zawitkowska *et al*, 2020). Existe uma tendência para estratificação dos pacientes em grupos de maior risco no grupo polonês quando comparado aos dados do protocolo ALL IC 2002. Isso possivelmente decorre do fato de que a avaliação da DRM passou a ser recomendada a partir do protocolo de 2009, permitindo identificar situações nas quais, como descrito acima, doenças com apresentação inicial sugestiva de menor agressividade, são refratárias ou resistentes aos efeitos da quimioterapia e passam a ser reclassificados como de alto risco. As proporções dos diferentes grupos de risco dos nossos pacientes aproximam-se dos achados do estudo polonês.

Apesar de termos adotado ponto de corte de DRM no D15 inferior ao preconizado pelo protocolo original (5% e não 10%) para classificação como alto risco, observamos um percentual um pouco maior de pacientes de baixo risco e menor de pacientes classificados como de alto risco em nossa população. Este fato (assim como observado em relação à leucometria) pode ser atribuído à exclusão dos casos de LLA T na nossa amostra.



Em relação à estratificação de risco dos pacientes tratados pelo protocolo GBTLI 2021, utilizamos para comparação os dados do protocolo total XVI, devido à semelhança de parâmetros adotados por esses dois protocolos. (quadro suplementar 3). O tamanho restrito da amostra impede a realização de conclusão ou comparação consistente, mas na nossa coorte há uma maior proporção de pacientes classificados como baixo risco provisório (64,7% no HCB X 59,7% no Total XVI) (Jeha *et al*, 2019).

Semelhante ao que foi observado na população tratada pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado, entre os pacientes tratados pelo GBTLI o principal motivo para a mudança da classificação de risco dos pacientes foi o valor da DRM coletada após as duas primeiras semanas de QT (DRM D19).

5.1.4 Evolução e desfecho

Fase Indutória (Mortalidade Indutória e Taxa de Remissão)

Com os avanços no tratamento da LLA e a redução das taxas de recidiva da doença, a maioria dos óbitos dos pacientes em tratamento para Leucemia Linfóide Aguda são decorrentes de toxicidade relacionada ao tratamento (Caniza *et al*, 2015; Özdemir *et al*, 2017), com destaque para a fase inicial do tratamento (Gupta *et al*, 2011). A definição de mortalidade precoce (ou mortalidade indutória) varia entre diferentes estudos, de acordo com o tempo de tratamento de indução. Entre pacientes tratados pelo protocolo BFM, define-se por óbito até 4 a 5 semanas após o início do tratamento de LLA (Prucker *et al*, 2009). Outros estudos utilizam o D42 como tempo limite para mortalidade indutória (Gupta *et al*, 2011; Cheng; Pole; Sung, 2014; Gibson *et al*, 2018).

Entre 896 pacientes tratados com protocolo BFM na Áustria, 7 (0,8%) pacientes foram a óbito durante a indução. Nesse mesmo estudo foi demonstrado importante redução nas taxas de mortalidade precoce (de 2,2% para 0,2%) quando os pacientes foram avaliados considerando dois períodos consecutivos (tratamento pelos protocolos BFM 81 e 84 X tratamento pelos protocolos 86, 90 e 95) (Prucker *et al*, 2009). Nos EUA, entre 5377 pacientes com LLA de baixo risco, 0,47% dos pacientes foram a óbito durante a indução (Maloney *et al*, 2020). Na Inglaterra são descritas



taxas de mortalidade indutória igual a 0,5% (Vora *et al.*, 2013) e no Canadá taxas entre 1,1% a 1,38% (Blanco *et al.*, 2012; Cheng; Pole; Sung, 2014).

Quando avaliamos dados de países em desenvolvimento as taxas de mortalidade indutória são superiores a 5% (Gupta *et al.*, 2011). Recentemente Horn e colaboradores descreveram taxas de mortalidade indutória de crianças brasileiras com LLA iguais a 3,1% entre 285 pacientes tratados no período de 1997 e 2007 e 2,4% quando avaliadas 410 pacientes tratados de 2008 a 2018 (Horn *et al.*, 2024). Na nossa população de estudo, encontramos em uma situação intermediária entre os países em desenvolvimento e os países desenvolvidos.

Infecção grave foi a causa de morte dos quatro pacientes que foram a óbito no período de indução e da grande maioria dos casos que foram a óbito no segundo mês de tratamento. Os quatro óbitos na fase indutória ocorreram entre 25 a 34 dias após o diagnóstico, o que indica grande possibilidade de que os efeitos do tratamento quimioterápico e não a apresentação clínica inicial tenham contribuído para o desfecho. Uma observação importante no nosso estudo foi o elevado índice de mortalidade na segunda fase de indução (8 casos), que não é considerado como mortalidade indutória (pois está além das cinco semanas), mas que também decorre de complicações associadas à toxicidade do tratamento inicial.

Os nossos achados são consistentes com o que já foi descrito em relação à discrepância entre a evolução dos pacientes com LLA B tratados com protocolos mais intensivos em países desenvolvidos quando comparados com países em desenvolvimento (RIBEIRO *et al.*, 2016; Pui *et al.*, 2018; Pedrosa *et al.*, 2020).

Considerando os 110 pacientes que finalizaram a indução pelo protocolo BFM ALLC IC 2009, o percentual de falha indutória foi de apenas 1,8%, mas o preço pago foi uma taxa de mortalidade precoce extremamente elevada. Mais da metade dos óbitos aconteceu nesse período inicial do tratamento.

Uma das principais motivações para a estruturação do protocolo GBTLI 2021, encorajada pela experiência positiva do grupo de Recife com o protocolo RELLA (Pedrosa *et al.*, 2020), foi a tentativa de reduzir a toxicidade do tratamento da LLA e consequentemente, reduzir as taxas de mortalidade relacionadas ao tratamento;



(Protocolo GBTLI 2021). Entre os 34 pacientes do nosso estudo tratados pelo protocolo GBTLI 2021, não houve nenhum óbito até o final da indução (D49).

Em contrapartida, a redução da intensidade do tratamento, refletiu em redução das taxas de remissão no fim da indução. Houve falha de resposta (DRM > 1,0 no D49) em 7,69% dos casos. Os dois pacientes com falha indutória foram direcionados precocemente para a realização de TMO e encontram-se em remissão após 19 e 12 meses de seguimento.

A primeira impressão é que, com a adoção do novo protocolo, muitos pacientes são preservados dos efeitos tóxicos e, apenas os pacientes com “real necessidade” são expostos aos riscos do tratamento mais agressivo. O pouco tempo de seguimento e amostra reduzida dos pacientes que foram submetidos ao tratamento pelo protocolo GBTLI 2021 impedem conclusões assertivas. Faz-se necessário a avaliação de maior amostra, com maior tempo de seguimento para determinar os reais impactos trazidos pelo novo protocolo.

Recidivas

Em 15 a 20% dos pacientes com LLA pode ocorrer recidiva. As taxas de sobrevida global em pacientes com LLA recidivada variam de 40 a 70% dependendo do tempo de seguimento e classificação de risco no momento da recidiva. (Tallen *et al.*, 2012; Oskarsson *et al.*, 2016; Stackelberg *et al.*, 2022). Entre os fatores prognósticos relacionados à doença recidivada estão o tempo para recidiva (quanto menor o tempo entre o primeiro diagnóstico e a recidiva, pior a evolução), o local acometido (recidiva medular tem pior evolução do que recidivas extramedulares) e a intensidade do tratamento utilizado previamente (crianças submetidas a tratamentos mais intensivos têm menores chances de resposta ao segundo tratamento) (Hunger; Mullighan, 2015; Schwartz; Muffly, 2024).

A taxa recidiva no grupo de pacientes tratado segundo protocolo BFM adaptado foi inferior a 10%, mas não podemos valorizar esses resultados, uma vez que apenas uma pequena parcela de nossa amostra tem um tempo de seguimento maior que 3 anos.



Entre os pacientes com LLA B recidivada, as chances de segunda remissão são de 50 a 70% e apenas 20 a 30% são curados. (Hunger; Mullighan, 2015; Sidhu *et al*, 2023). Os pacientes com LLA B recidivada de alto risco (segundo critérios do protocolo BFM 2002 para LLA recaída) incluídos no protocolo ALL IC 2009 apresentaram taxas de SLE 22,6% e SG 32,6% (Eckert *et al*, 2021). Para os pacientes de “risco Standard” (recidiva medular tardia ou recidiva precoce combinada) do protocolo BFM 2002 para LLA recaída, as taxas de SLE foram iguais a 68-70% e de SG iguais a 86-87% (Stackelberg *et al*, 2022).

Até o presente momento, em nosso trabalho, 50% dos pacientes recidivados encontram-se vivos e em remissão, com tempo de seguimento que varia de 40 a 64 meses. A evolução dos pacientes recidivados na nossa amostra se mostrou semelhante ao descrito na literatura e “respeitou” as expectativas quando considerados o momento e tipo de recidiva: recidivas precoces evoluem muito mal e recidivas tardias ou isoladas do SNC apresentam melhor prognóstico.

Óbitos

A principal causa de mortalidade entre pacientes com LLA B está associada à toxicidade relacionada ao tratamento, com destaque para os quadros infecciosos. Entre os fatores associados com as elevadas taxas de mortalidade e complicações em pacientes com LLA nos países com baixos recursos estão a escassez de leitos e medicamentos, dificuldade de acesso a serviço de saúde, distância para o centro de atendimento (Ribeiro *et al.*, 2008; Pui *et al.*, 2018; Pedrosa *et al.*, 2020).

Na Áustria, 3,4% dos pacientes tratados com protocolo BFM foram a óbito, sendo 0,7% durante a indução. Nesse mesmo estudo foi demonstrado importante redução nas taxas de mortalidade precoce nos protocolos mais recentes (86, 90 e 95). (Prucker *et al*, 2009). Nos EUA, a mortalidade indutória entre os pacientes com LLA de baixo risco foi igual a 0,47% (Maloney *et al*, 2020). Na Inglaterra são descritas taxas de mortalidade indutória igual a 0,5% (Vora *et al.*, 2013) e no Canadá taxas entre 1,1% e 1,38% (Blanco *et al*, 2012; Cheng; Pole; Sung, 2014).

Na América central, a taxa de mortalidade por complicações relacionadas ao tratamento em pacientes com LLA foi igual a 9,3%, sendo 5,4% no durante a indução



(data limite considerada foi D42). Nesse estudo, ao contrário do que se observa em países desenvolvidos e no Brasil, não houve redução na mortalidade indutória nos grupos de pacientes tratados mais recentemente. (Gupta *et al*, 2011). Na China, a avaliação dos óbitos em crianças com LLA B identificou que 34,61% das mortes foram relacionadas ao tratamento e que a maioria desses óbitos (55%) ocorreram durante o período de indução (Liu *et al*, 2023).

Recentemente Horn e colaboradores descreveram taxas de mortalidade indutória de crianças brasileiras com LLA iguais a 3,1% entre pacientes tratados no período de 1997 e 2007 e 2,4% quando avaliadas pacientes tratados de 2008 a 2018 (Horn *et al*, 2024).

Apesar de inferiores quando comparadas aos números dos países em desenvolvimento (Arora, Arora, 2016; Ramadhan *et al*, 2023), nossas taxas de mortalidade indutória e relacionadas ao tratamento se mostraram superiores às descritas em países desenvolvidos. Até o presente momento, nossos dados sinalizam para uma aparente redução nas taxas de mortalidade indutória e mortalidade relacionada ao tratamento após a introdução do protocolo GBTLI 2021.

Nos últimos cinco anos, diversas medidas foram adotadas com o intuito de reduzir as taxas de mortalidade relacionadas ao tratamento de crianças com câncer em tratamento no Hospital da Criança de Brasília: a) Os pacientes em tratamento são orientados a manterem domicílio em localidades cujo deslocamento ao hospital não ultrapasse uma hora (caso necessário, são alojados em uma casa de apoio), b) possuem livre acesso ao atendimento hospitalar em caso de intercorrências, c) o serviço de oncologia do HCB adota protocolos para manejo de infecção e sepse, com monitoramento sobre o cumprimento dos protocolos, d) crianças com neutropenia severa são internadas em leitos de isolamento, e) a unidade de terapia intensiva fica localizada ao lado da unidade de oncologia, f) não há escassez de vaga em casos de urgência, e g) não existe escassez de antimicrobianos. Apesar da importante melhoria nos cuidados de suporte, as taxas de mortalidade permanecem acima do esperado.

Alguns questionamentos e observações surgem a partir dos nossos dados:



1. Qual o ponto de corte ideal para definição de taxa de mortalidade indutória ou precoce entre paciente tratados pelo protocolo BFM? Apesar de o limite de tempo para definição de mortalidade indutória ser de 4 a 5 semanas, observamos em nossa amostra que foi no mês subsequente que ocorreram a grande maioria das mortes.

2. As maiores taxas de mortalidade decorrentes de toxicidade do tratamento podem ser secundárias a diferenças biológicas e genéticas da população brasileira (e de outros países em desenvolvimento)?

Atualmente a caracterização biológica de crianças com LLA B está direcionada para identificação de fatores associados à leucemogênese e à sobrevivência das células leucêmicas, entretanto, possíveis diferenças associadas à sensibilidade individual (e populacional) aos efeitos do tratamento podem ser responsáveis pelas maiores taxas de mortalidade relacionadas ao tratamento e devem ser consideradas.

5.2 AVALIAÇÃO DE SOBREVIDA

Embora nos países desenvolvidos, as taxas de sobrevida de crianças com LLA B ultrapassem 90% (Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Bélgica, Dinamarca, Alemanha, Suíça e Holanda), sabe-se que os números em outras localidades do mundo, especialmente em países em desenvolvimento, são menos expressivos. Nos países da América Latina, as taxas de SG estão entre 60 e 70%. (ALLEMANI *et al*, 2015). No município de São Paulo, a taxa de sobrevida global de 1160 casos de LLA no período de 1997 a 2013 foi inferior a 70% (67,36%) (Silva; Latorre, 2020) e no Rio de Janeiro as taxas SG e SLE de 410 pacientes tratados pelo protocolo BFM entre 2008 e 2018 foram iguais a 71% e 62%, respectivamente (Horn *et al*, 2024).

A SG dos pacientes incluídos no protocolo ALLIC 2002 foi igual a 82%, e a SLE igual a 74% (STARY *et al*, 2014). Na Polônia as taxas de SG e SLE de pacientes tratados pelo protocolo ALLIC 2009 foram iguais a 87% e 84% respectivamente (Zawitkowska *et al.*, 2022).

Em Recife, as taxas de SG e SLE para os pacientes estratificados como muito baixo risco e tratados pelo protocolo RELLA foram superiores a 90% (96% e 92% respectivamente) (Pedrosa *et al.*, 2020).



Ainda que inferior às descritas nos países desenvolvidos, a SG observada no nosso grupo foi superior aos números observados na população brasileira e nos países em desenvolvimento. Um achado muito positivo do nosso estudo foi o incremento da sobrevida em quase 10% quando comparamos com os registros internos dos casos tratados de 1999 a 2018 (371 pacientes) (dados internos não publicados gentilmente fornecidos por Dra Lucélia Melgares).

Importante ressaltar que poucas mudanças em relação aos protocolos de tratamento e medicamentos quimioterápicos adotados ocorreram entre esses dois diferentes períodos analisados em nossa instituição. A melhora significativa na qualidade da assistência, deve ser atribuída a uma série de fatores.

- a) A construção de um hospital pediátrico próprio (2011) – Ambulatório e internações eletivas
- b) Inauguração do bloco 2 do Hospital da Criança de Brasília (2018) – Internações eletivas e de urgência
- c) Instalação de Unidade de Terapia Intensiva (UTI) no HCB (janeiro de 2019) – Maior disponibilidade de leito e proximidade entre a UTI da enfermaria oncológica (menor tempo para socorro).
- d) Maior disponibilidade de recursos (antibióticos e terapia de suporte). Com a inauguração do novo hospital, o serviço de Oncologia Pediátrica passou a ter uma gestão descentralizada, o que permitiu melhor alocação de recursos e menor tempo dispendido para a aquisição de insumos necessários.
- e) A partir de julho de 2018: Padronização do protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado com maior monitoramento dos pacientes (julho de 2018),
- f) Instalação de Laboratório de Pesquisa Translacional em setembro de 2014, possibilitando a realização de imunofenotipagem por citometria de fluxo e testes moleculares para o diagnóstico de LLA B;
- g) Introdução da pesquisa de DRM por citometria de fluxo para avaliação de resposta e monitoramento dos pacientes (julho de 2018)

A avaliação das taxas de SLE é comprometida pelo fato de que apenas metade da população do estudo tem mais de 36 meses de seguimento.



Considerando que a grande maioria dos óbitos está relacionada à toxicidade do tratamento e ocorre no período de QT intensiva (primeiros 8 meses de tratamento) e que o grupo analisado já é seguido por mais de 12 meses, não são esperadas grandes mudanças nas taxas de sobrevida global com maior tempo de seguimento dos pacientes.

5.2.1 Curvas de Sobrevida de Acordo com Classificação de Risco

Quando analisamos as curvas de sobrevida considerando as estratificações de risco ao final da indução, observamos em há uma melhora da sobrevida dos três subgrupos (baixo, intermediário e alto risco) quando comparados às taxas sobrevida apresentada pelos grupos de risco classificados no momento do diagnóstico. Esse achado demonstra que a classificação de risco baseada nos valores de DRM é mais acurada e possibilita identificar com mais exatidão quais pacientes podem ser seguramente beneficiados com redução da intensidade do tratamento quimioterápico (baixo risco) e em qual grupo de pacientes, justifica-se manter tratamento intensivo e até mesmo aumentar a intensidade da quimioterapia (Verbeek, Van Der Velden, 2024).

Um achado importante foi o fato de não ter havido óbito no grupo de pacientes considerados como baixo risco ao fim da indução. Isso pode ser atribuído tanto a uma menor toxicidade secundária a um tratamento menos intensivo, como à melhor condição clínica do paciente.

As taxas de sobrevida dos diferentes grupos de risco do nosso estudo foram semelhantes às taxas encontradas em estudo recente com 410 pacientes tratados com protocolo BFM adaptado. Encontramos taxas de SG iguais a 100%, 80% e 56% para pacientes classificados como baixo risco, risco intermediário e alto risco, respectivamente. Horn *et al* avaliaram pacientes tratados entre 2008 e 2018 e descreveram taxas de sobrevida global iguais a 93%, 75% e 64%, respectivamente, para pacientes classificados como baixo risco, risco intermediário e alto risco (Horn *et al*, 2024).



5.2.2 Curvas de Sobrevida de Acordo com os valores de DRM

Analisando as taxas de SG e SLE dos pacientes divididos em grupos de acordo com os valores de DRM nos D15, D33 e D78, observamos uma clara associação entre menores valores de DRM e melhores taxas de sobrevida. Essa associação se mostrou estatisticamente significativa nas avaliações do D33 ($p=0,002$) e do D78 ($p=0,01$ teste Gehan Breslaw Wilcoxon). Atualmente os valores de DRM são considerados os principais marcadores de significado prognóstico em pacientes com LLA e nossos achados corroboram esse fundamento.

Um achado interessante foi a forte associação entre os valores da DRM do D33 e as curvas de sobrevida. O protocolo ALL IC BFM 2009 não preconiza a aferição da DRM nesse momento (Zawitkowska *et al.*, 2022; Horn *et al.*, 2024), e a inclusão desse ponto de avaliação foi uma das modificações realizadas pelo grupo de nossa instituição.

5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DA LLA B E AVALIAÇÃO DE FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES BIOLÓGICAS

De uma maneira global, as frequências encontradas das alterações pesquisadas, bem como o comportamento clínico dos subtipos identificados parecem similares aos descritos em pacientes com LLA B de outros lugares do mundo (Zhang; Habeebu; Li, 2022; Migita *et al.*, 2023; Pieters; Mullinghan; Hunger, 2023; He *et al.*, 2024).

Uma observação importante no nosso estudo foi a dificuldade de classificar os pacientes quando há associação de diferentes marcadores biológicos e moleculares. Em algumas situações, como nos casos de sobreposição de alterações citogenéticas e rearranjos moleculares, já está bem estabelecido que o tratamento deve ser direcionado baseado nas alterações genéticas “drivers” com significado prognóstico conhecido como *BCR::ABL1*, *TCF3::PBX1*, *ETV6::RUNX1* e *rKMT2A* e com o status da DRM (PUI *et al.*, 2019). Entretanto, no que se refere à sobreposição de rearranjos recorrentes e alterações citogenéticas com as alterações nos genes *PAX5*, *ERG*, *FLT3*, *IKZF1* e *CRLF2* ainda não está bem definido como deve ser realizada a classificação das LLA B. Como a pesquisa das alterações acima citadas muitas vezes



é restrita aos pacientes que não apresentam alterações citogenéticas ou rearranjos recorrentes (LLA B “others”) (Malard *et al.*, 2020; Migita *et al.*, 2023), embora possa existir, a sobreposição de alterações biológicas não costuma ser evidenciada.

Semelhante ao que acontece em relação ao diagnóstico da LLA Ph like (Tran; Tasian, 2022), observamos que a classificação da LLA B em determinados subtipos biológicos não é um processo uniforme e linear e concluimos que a caracterização biológica necessita ser padronizada para melhor comparação entre os achados de diferentes grupos e centros de tratamento.

As ferramentas diagnósticas atuais possibilitam a descrição de alterações secundárias e abre possibilidade para entendimento de um pano de fundo molecular anteriormente desconhecido, principalmente, pelo uso de métodos direcionados às lesões moleculares já conhecidas. Dessa forma, outros drivers surgem com valor prognóstico que contribuem para refinamento da estratificação de risco. O processo oncogênico é multifatorial e assim deve ser de fato considerado. Cairá por terra o valor atribuído a uma única alteração genética. Logo, todos os hits moleculares, clínicos e citogenéticos devem ser colocados em uma balança para que o somatório das forças reflita de fato a evolução de cada caso.

5.4 MARCADORES BIOLÓGICOS NA LLA B: IMPACTO SOBRE PROGNÓSTICO E EVOLUÇÃO

5.4.1 Aneuploidias

Hipodiploidia

Hipodiploidia, encontrada em 2 a 3% dos pacientes com LLA B, é um fator de mau prognóstico e as taxas de sobrevida dos pacientes com essa alteração são de aproximadamente 70%. Tradicionalmente, o transplante de medula óssea era o tratamento de escolha para pacientes com LLA associada à hipodiploidia. Estudos multicêntricos recentes demonstraram que os pacientes com hipodiploidia que tem DRM negativa após o tratamento de indução não são beneficiados com a realização de transplante (Mcneer *et al.*, 2019; Pui *et al.*, 2019; Inaba;Pui, 2021; He *et al.*, 2024). Curiosamente, pacientes com hipodiploidia apresentam sensibilidade a inibidores de BCL2, como o Venetoclax, e estudos pré-clínicos estão em andamento para avaliar o



uso desses medicamentos nesse grupo de pacientes (Diaz-Flores *et al*, 2019) (Mullingham, 2022).

Existem dois principais subtipos que apresentam perfis de expressão gênica e alterações genéticas distintas e que são associados com prognóstico desfavorável: quase haploidia (24 a 31 cromossomos) e baixa hipodiploidia (com 32 a 39 cromossomos). Os casos com alta hipodiploidia são heterogêneos entre si e não são considerados com uma entidade distinta (Mullingham, 2019).

A baixa hipodiploidia é mais comum em adultos e quando encontrado em crianças, na maioria dos casos está associada a mutação germinativa no gene *TP53*. Identificamos baixa hipodiploidia em 5 (3,2%) dos pacientes, sendo isolada em apenas 1 paciente (0,64%), semelhante ao que é descrito na literatura (0,5%) (Comeaux; Mullighan, 2016). Diferente do esperado, realizamos a pesquisa da mutação no *TP53* nos 5 pacientes com baixa hipodiploidia e não identificamos a mutação em nenhum caso.

Ainda de forma divergente ao que é descrito, não identificamos associação entre a presença de baixa hipodiploidia e evolução desfavorável.

Nossos achados consolidam a importância da avaliação da DRM como fator prognóstico e suportam a recomendação de tratamento exclusivo com quimioterapia convencional para os pacientes com hipodiploidia que apresentam valores de DRM negativos ao fim da indução (Inaba; Pui, 2021; He *et al.*, 2024).

Alta Hiperdiploidia

Semelhante ao descrito na literatura, a alta hiperdiploidia foi a alteração genética mais comum na nossa população de estudo (Inaba; Pui, 2021) e apesar de não termos encontrado significado estatístico (possivelmente em decorrência do número amostral), as curvas de sobrevida apontam para a tendência de uma melhor evolução dos pacientes com essa alteração genética.

Existem evidências de que não apenas a contagem do número de cromossomos, mas também as alterações numéricas de cromossomos específicos são os fatores associados ao melhor prognóstico de pacientes com LLA B e hiperdiploidia (Heerema *et al*, 2000; Moorman *et al*, 2003; Maloney *et al*, 2020;). Em



2021, o grupo do Reino Unido (UKALL) propôs a subclassificação dos pacientes com LLA B com alta hiperdiploidia em baixo e risco e alto risco, baseados na identificação de alterações numéricas de quatro cromossomos específicos (5, 17, 18 e 20) e demonstraram que 80% dos casos de alta hiperdiploidia são classificados como “alta hiperdiploidia de baixo risco” e que esses pacientes apresentam melhor evolução quando comparados aos demais pacientes com alta hiperdiploidia (SG 96% X 86%, $p=0,001$) (Enshaei *et al*, 2021).

Na nossa amostra, foi possível estabelecer a subclassificação da alta hiperdiploidia em 23 pacientes, 78% dos quais preencheram critérios para alta hiperdiploidia de baixo risco. Não encontramos diferença estatística entre as taxas de recidiva dos pacientes com alta hiperdiploidia de baixo risco quando comparadas aos demais pacientes (5,5% X 20%, $p=0,39$), mas o número amostral pode ter limitado essa avaliação.

Foi possível detalhamento do exame citogenético em dois dos três pacientes que recidivaram e em ambos os casos foi identificada a trissomia do cromossomo 20, chamando a atenção para o papel desse cromossomo como determinante de má evolução entre pacientes com hiperdiploidia.

Nossos achados reforçam a importância de uma caracterização genética mais refinada para a predição de risco e direcionamento do tratamento de pacientes com LLA B.

iAMP21

A frequência de iAMP21 no grupo estudado foi superior ao que é relatado na literatura, mas se considerarmos a presença da iAMP21 de forma isolada (1,9%), a frequência em nossa população se assemelha em relação ao descrito por outros grupos (1 a 2%) (Heerema *et al*, 2013; Harisson *et al*, 2024; Harrison, 2015; He *et al*, 2024).

Existem raros relatos de associação entre iAMP21 e alta hiperdiploidia, *BCR::ABL1* ou *ETV6::RUNX1*. Nos chamou a atenção o fato de que na nossa amostra em 2/3 dos pacientes a iAMP21 ocorreu associada com *ETV6::RUNX1*, correspondendo a 3,5% dos casos em que a pesquisa de iAMP21 foi realizada. Essa



associação foi descrita em 0,5% (3/528) pacientes com LLA (Haltrich *et al*, 2013; Harrison *et al*, 2015) e não foi descrita em nenhum de 2465 pacientes do grupo COG e 1200 pacientes do grupo UKALL entre fevereiro de 1978 e dezembro de 2011 (Harrison *et al*, 2014). É possível que a diferença dos nossos achados com os da literatura seja decorrente do fato de que a pesquisa de iAMP21 não era feita de forma rotineira, especialmente entre pacientes em que alterações recorrentes já haviam sido identificadas. De qualquer maneira, esse é um dado que deve ser explorado.

Pacientes com iAMP21 apresentam um espectro de alterações genéticas secundárias que provavelmente contribuem para a progressão da doença e podem ser utilizadas para o refinamento do diagnóstico. Entre elas estão o ganho do cromossomo X, 10 ou 14, perda ou deleção do cromossomo 7, deleções do *ETV6* ou *RB1* e inativação do *SH2B2* (Harrison, 2015; Jiasen, 2024). Observamos deleções do *ETV6* em 3 crianças e em uma delas, havia também deleção do *RB1*.

Divergente do descrito na literatura, que relaciona a iAMP21 com prognóstico intermediário (Inaba; Pui, 2021; Lejman *et al*, 2022), na nossa amostra, pacientes com iAMP21 apresentaram excelente evolução. É possível que a maior intensidade do tratamento com a utilização do protocolo BFM tenha anulado um possível impacto negativo da presença da iAMP21.

5.4.2 Rearranjos recorrentes em LLA

ETV6::RUNX1

O rearranjo *ETV6::RUNX1*, é a translocação recorrente mais comum em crianças com LLA B, sendo encontrado em 17 a 25% dos casos. Existe uma variação na frequência desse achado entre diferentes países do mundo, oscilando de 6% na Índia, 18,2% na China 25,9% na Itália, 27% na França e 34,9% no Irã. Alguns estudos relatam uma menor prevalência desse rearranjo entre pacientes Mexicanos (6,9-24,9%) e hispânicos quando comparados a caucasianos e outras etnias e atribuem essa diferença às diferenças genéticas decorrentes da miscigenação entre europeus e americanos nativos (Kaczmariska *et al*, 2023). Na nossa amostra, o *ETV6::RUNX* foi identificado em aproximadamente um quarto dos pacientes.



A translocação t(12;21) (como descrita anteriormente) foi uma das primeiras alterações genéticas em LLA B associadas com prognóstico favorável. As taxas de SLE são superiores às taxas encontradas em outros subtipos de LLA B e variam de 80% a 98% (Wang; Zeng; Zhang, 2018; Jeha *et al*, 2021; Kaczmarek *et al*, 2023). Geralmente pacientes com esse rearranjo apresentam maior proporção de pacientes estratificados como baixo risco e menores valores de DRM ao fim da indução. Em estudo com 598 pacientes com LLA tratados pelo protocolo Total XVI, entre os 128 (21,4%) pacientes com *ETV6::RUNX1*, 86,7% foram estratificados como baixo risco e 91% apresentou DRM < 0,01% ao fim da indução (Jeha *et al*, 2021).

Entre os nossos pacientes com *ETV6::RUNX1*, observamos uma tendência para maior classificação em grupos de risco intermediário e de alto risco. Na nossa amostra, apenas 28,9% (11/38) dos pacientes com *ETV6::RUNX1* apresentaram valores de DRM no D15 inferiores a 0,01%, enquanto no grupo americano, o percentual de pacientes com *ETV6::RUNX1* e DRM do D15 < 0,01% foi igual a 50% (Jeha *et al*, 2021). O “clearance” mais lento das células leucêmicas em nossa população pode ser explicado pela presença de alterações secundárias associadas, características genéticas relacionadas à etnia ou fatores associados à execução e cumprimento do tratamento.

Apesar da aparente diferença em relação à estratificação de risco, na nossa população esse foi o subtipo de LLA B que apresentou maiores taxas de sobrevida (SG: 91,5% e SLE: 79,6%).

Diversos fatores impedem uma comparação direta entre nossos achados e os descritos por Jeha *et al*,: a) os diferentes critérios adotados para estratificação de risco, b) as diferenças no tratamento e c) o número de nossa amostra. De qualquer maneira, nossos dados são indícios de que outros fatores associados ao rearranjo *ETV6::RUNX1* podem interferir no comportamento da leucemia e que devem ser melhor estudados.

Um exemplo disso é o fato de que as taxas de recaída podem chegar a 20% em alguns estudos (Jeha *et al*, 2021), sugerindo que o rearranjo por si só não seja o responsável pelo prognóstico favorável e que se faz necessário uma melhor



compreensão das alterações genéticas secundárias associadas (Loh et al, 2006; Li et al, 2021; Kaczmarska et al, 2023).

TCF3::PBX1

Identificamos o rearranjo *TCF3::PBX1* em 5,8% (9) dos nossos pacientes. Presente em 2 a 6% dos casos de LLA, essa alteração recorrente em LLA B por muito tempo foi associada com pior evolução clínica e maior probabilidade de recidiva no SNC (Hunger; Mullighan, 2015). Com a intensificação do tratamento quimioterápico e a adoção de tratamento direcionado para a profilaxia e tratamento da LLA no SNC, a presença dessa mutação não é mais valorizada como indicativo de pior evolução (Kato et al, 2017; Inaba; Pui, 2021).

O rearranjo *TCF3::PBX1* foi encontrado em 2,8% (17/598) de pacientes envolvidos no estudo total XVI, sendo 82,4% classificados com risco intermediário. Nesse estudo 2 pacientes mantiveram DRM positiva ao fim da indução e ambos foram a óbito por complicações relacionados ao transplante. (DRM negativa em 88%). Um paciente, que havia apresentado DRM negativa ao fim da indução, apresentou recidiva (Jeha et al, 2021). Na Singapura, 5% (19/380) dos pacientes com LLA B apresentavam *TCF3::PBX1*, e a DRM foi negativa ao fim da indução em 58% dos casos (Lee et al, 2021). No Brasil, estudo realizado no com 695 pacientes com LLA tratados em quatro instituições no Rio de Janeiro, identificou o rearranjo *TCF3::PBX1* em 2,4% (14/564) dos casos de LLA B. Nesse estudo, as taxas de sobrevida global em 5 anos de duas coortes consecutivas foram iguais 50% (pacientes tratados entre 1997 a 2007) e 47% (2008-2018) (Horn et al, 2024).

Na nossa amostra, assim como descrito em alguns estudos mais recentes (Kato et al, 2017), a presença do *TCF3::PBX1* não interferiu negativamente na evolução dos pacientes. Com tempo de seguimento que varia de 14 a 65 meses, a taxas de SG e SLE foram elevadas (89% e 76%) e chegam a ser comparáveis às taxas apresentadas pelos subgrupos de bom prognóstico na LLA B (hiperdiploidia e *ETV6::RUNX1*).



BCR::ABL1

A LLA Ph + ocorre em 2 a 3% dos pacientes com LLA B, é um protótipo de alteração molecular como determinante da leucemogênese e da agressividade da doença e dos benefícios proporcionados pelo uso de terapia alvo em pacientes com neoplasias malignas (Slayton *et al*, 2020).

A associação dos inibidores de tirosina quinase (imatinibe) ao protocolo de quimioterapia intensiva para pacientes com LLA Ph+ possibilitou incremento das taxas de sobrevida e se tornou parte do tratamento de primeira linha. Os resultados do estudo COG AALL0031 demonstraram que a combinação de TKI com a quimioterapia convencional dobrou as taxas de SG de doença, que atualmente chegam a 70%. (Schultz *et al*, 2014). Estudo realizado no Brasil demonstrou uma marcante mudança nas taxas de SG dos pacientes com *BCR::ABL1* de 12% (de 1997 a 2007, antes da era dos inibidores de tirosina quinase) para 68% (de 2008 a 2018) (Horn *et al*, 2024).

A ocorrência do rearranjo *BCR::ABL1* (no nosso grupo de estudo) foi semelhante ao descrito na literatura: 2,8% entre 5060 pacientes tratados pelo BFM 2002 (Stary *et al*, 2013); 2% em Singapura (Lee *et al*, 2021), 2% nos EUA (Jeha *et al*, 2021). Dados recentes em população brasileira descrevem 5% de LLA Ph+ entre os casos de LLA B (Horn *et al*, 2024).

O tratamento adotado para LLA Ph+ se mostrou eficaz para o controle da leucemia, uma vez que, exceto por uma morte durante a indução (cuja da DRM do D15 era igual a 0,03%), todos os pacientes com LLA Ph+ entraram em remissão com DRM negativa ao fim da indução.

A sobrevida global da nossa coorte foi inferior às taxas de sobrevida descritas em pacientes com LLA Ph+: 69% no Brasil (pacientes tratados pelo BFM de 2008 a 2018 no Rio de Janeiro – antes de 1997 a 2007 era 12%) (Horn *et al*, 2024), 75% na Singapura (Lee *et al*, 2021). Esse fato chama a atenção para a toxicidade provocada pela intensidade do tratamento, causa de óbito de dois dos quatro pacientes com LLA Ph+.



Rearranjos do KMT2A

Rearranjos no *KMT2A* estão presentes em aproximadamente 5% das LLA B em crianças com mais de 1 ano e em 75% dos casos de LLA B até 12 meses de idade (Brown; Pieters; Biondi, 2019). O gene *KMT2A*, pode ser rearranjado com mais de 80, parceiros, sendo o *KMT2A::AFF1*, resultante da t(4;11), a alteração mais comum. Essa mutação está presente em cerca de 1 % dos casos de LLA B em maiores de 1 ano (Zawitkowska *et al.*, 2022; Wen *et al.*, 2022).

Rearranjos no *KMT2A* estão associados a uma má evolução em pacientes com LLA B e menos de 1 anos de idade. Em crianças com mais de um ano, o impacto negativo sobre a evolução é menos significativo. (Inaba; Pui, 2021; Wen *et al.*, 2022). As taxas de sobrevida de pacientes com rearrranjos de *KMT2A* variam entre 50 a 60% (Stary *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2021 Horn *et al.*, 2024)

No nosso estudo, dois pacientes (1,3%) apresentaram rearrranjos no gene *KMT2A* e ambos os casos tiveram apresentação clínica inicial típicas de doença agressiva: idade superior a 10 anos, leucometria acima de 100.000 ao diagnóstico e cariótipo com baixa hiperdiploidia. Os pacientes receberam tratamento para o grupo de alto risco (protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado).

5.4.3 LLA Ph like *P2RY8::CRLF2*

Rearranjos no gene *CRLF2* são os achados mais comuns em pacientes com LLA Ph like, encontrados em 50 a 60% dos pacientes com esse subtipo de LLA (Roberts *et al.*, 2014). Em geral os rearrranjos ocorrem ou com o *IGH* (uma região intensificadora de cadeia pesada de imunoglobulinas) ou com uma deleção focal que resulta na expressão do transcrito de fusão *P2RY8-CRLF2* (Maese *et al.*, 2017).

Maior idade ao diagnóstico, comportamento agressivo e menores taxas de sobrevida são características das LLA Ph like. Em estudo realizado na China, a fusão *P2RY8::CRLF2* foi encontrada em 10% dos casos de LLA B (27/271) e foi fator independente de mau prognóstico (Dou *et al.*, 2017).

Encontramos o rearranjo *P2RY8::CRLF2* em 4,7% dos casos (7/150) e, ao contrário do que é descrito na literatura tanto em relação à LLA Ph like (Harvey; Tasian, 2022), como quando avaliada a fusão *P2RY8::CRLF2* isoladamente (Dou *et al.*, 2017),



não encontramos associação entre a presença de *P2RY8::CRLF2* com idade ou outros indicadores de mau prognóstico. Essa avaliação deve ser ampliada para que possamos determinar se a diferença no comportamento nas LLA com *P2RY8::CRLF2* observada em nossos pacientes (que tiveram boa evolução) reflete uma característica da nossa amostra ou se é resultado de viés provocado pelo número reduzido de pacientes.

5.4.4 Alterações no *IKZF1*

Alterações no *IKZF1* são observadas em 9,4% a 15,9% dos pacientes com LLA B e nos últimos 10 anos, diversos estudos apontam para a importância de deleções no gene *IKZF1* como potencial marcador de alto risco de recidiva. A presença de deleções no *IKZF1* é associada com idade mais avançada ao diagnóstico, maior contagem de leucócitos e maior nível de DRM após a indução a consolidação. (Stanulla; Cave; Moorman, 2020). As alterações no *IKZF1* são mais prevalentes em subgrupos específicos de LLA B, como nas LLA B Ph+ (66%) (Van Der Veer *et al.*, 2014), entre pacientes de alto risco ou com doença recidivada (33%) (Mullighan *et al.*, 2009), e em crianças com Sd de Down (Buitenkamp *et al.*, 2012).

Atualmente, o papel do subtipo *IKZF1*^{plus} como fator independente de mau prognóstico é bem consolidado e tem sido proposta a inclusão da detecção de alterações do *IKZF1* (através do MLPA) e combinação dessas alterações com a DRM D15 para a estratificação de risco na LLA B (Lui *et al.*, 2024).

No Brasil, Moreira e colaboradores avaliaram 100 pacientes com LLA B (sendo 3 deles Ph +) para a identificação das isoformas Ik6 e Ik10, nas quais a função da proteína IKAROS é comprometida devido a perda dois ou mais domínios de pontes de zinco, através de metodologia simplificada e de baixo custo (baseada em RT-PCR). A presença das isoformas Ik6 e Ik10 foi associada com menores taxas de SG ($86,3 \pm 5,2\%$ vs. $16,7 \pm 15,2\%$, $P < 0,0001$) e SLE ($81,5 \pm 5,8\%$ vs. $16,7\% \pm 15,2\%$ $P = 0,002$) e maior risco de mortalidade (Moreira *et al.*, 2019).

Através do MLPA observamos diferentes tipos de deleções no *IKZF1*, sendo a deleção completa e deleção $\Delta 4-7$ as alterações mais comuns. Nos chamou a atenção o fato de que entre os pacientes com *IKZF1*^{plus} houve maior diversidade de deleções no *IKZF1* (pelo menos 5 variações) e que nos pacientes com *delIKZF1* identificamos



apenas a deleção completa e a deleção $\Delta 4-7$. Esses achados serão explorados em um momento futuro.

Corroborando com o que tem sido descrito (Stanulla *et al.*, 2018; Lui *et al.*, 2024), as deleções isoladas no *IKZF1* não apresentaram influência sobre prognóstico ao passo que o subtipo *IKZF1^{plus}* foi associado a pior evolução, menores taxas de SG e SLE e maiores chances de recidiva.

5.4.5 Alterações no *PAX5*

Alterações no *PAX5* são identificadas em 16 a 33% dos pacientes com LLA B (Mullighan *et al.*, 2007; Familiades *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2019; Song, Fang, Mi, 2022; Crepinšek *et al.*, 2024). Quando excluídos os casos associados ao subtipo *IKZF1^{plus}*, a frequência de alteração no *PAX5* varia de 7-10% (Jung *et al.*, 2020; Ge *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2018). No Brasil, Migita e colaboradores, avaliando pacientes 144 pacientes com LLA B classificada como “B-others”, ou seja, pacientes que não apresentavam rearranjos *ETV6::RUNX1*; *TCF3::PBX1*; *BCR::ABL1*, *TCF3::HLF*, alta-hiperdiploidia ou hipodiploidia, encontraram 13 casos de alterações no *PAX5* (9%) e 5 (3,5%) casos do subtipo *PAX5 P80R* (Migita *et al.*, 2023). Em estudo realizado com 99 pacientes com LLA B na Slovênia, deleções no *PAX5* foram encontradas em 7,1% de todos os casos e em 29,1% dos casos de LLA “b-others” (Crepinšek *et al.*, 2024).

As frequências encontradas em relação às alterações do *PAX5* na nossa população de estudo são semelhantes ao descrito na literatura. Quando comparados ao estudo brasileiro (Migita *et al.*, 2023), nossos dados revelam uma maior frequência de alterações no *PAX5* entre os pacientes “B-others”, mas importante ressaltar que foram utilizadas técnicas distintas para a avaliação (nós utilizamos MLPA e Migita usou NGS).

Li e colaboradores, no estudo MS2003/2010, demonstraram que a presença de deleções no *IKZF1* apresenta efeito adverso de no grupo de pacientes com alt*PAX5* (Li *et al.*, 2021). Consistentes com esses achados, os valores de DRM no D33 (pacientes tratados pelo BFM ALLIC 2009) foram maiores no grupo de pacientes com alt*PAX5* e *IKZF1^{plus}*. Também observamos que a presença de deleção no *PAX5* (associada ou não ao *IKZF1^{plus}*) interferiu negativamente nas curvas de sobrevida



global e sobrevida livre de evento. Esses dados reforçam que as alterações no *PAX5* caracterizam um subtipo de LLA B com evolução intermediária (Jung *et al.*, 2020; Crepinšek *et al.*, 2024).

5.4.6 Alterações no *ERG*

Encontramos alterações no *ERG* em 8% das LLA B e em 13,5% dos casos b-others. Em outro estudo brasileiro, deleções no *ERG*, avaliada pelo MLPA, foram encontradas em 11,1% (16/144) dos pacientes com LLA B classificada como “B-others” (Migita *et al.*, 2023).

Conforme o que é descrito na literatura, observamos associação entre alterações no gene *ERG* e maior idade ao diagnóstico e com uma maior frequência de deleção no *IKZF1* (4/9, 44%) (Clappier *et al.*, 2014) e identificamos que os pacientes com alterações no *ERG* associadas às deleções do *IKZF1* e deleções no *CDKN2A/B* (com ou sem deleção no *PAX5*), apresentaram boa evolução (Zhang *et al.*, 2016).

Embora todos os pacientes com deleção do *ERG* tenham apresentado DRM negativa ao fim da indução e taxas de SG e SLE semelhantes às taxas dos demais pacientes, os valores de DRM desses pacientes aferidos no meio da indução (D15 ou D19) foi superior quando comparados aos dos demais pacientes ($p=0,051$). Esse achado pode ser um indício de que pacientes com deleção do *ERG* demorem mais para responder aos efeitos da quimioterapia e acreditamos que esse ponto merece ser explorado.

5.4.7 Alterações no *FLT3*

Diferente da LMA, patologia na qual mutações no *FLT3* são sabidamente associadas a pior prognóstico, e cujos pacientes são beneficiados com a associação de terapia alvo (inibidores de *FLT3*), existem poucos estudos relacionados ao papel do *FLT3* na LLA B. A frequência de alterações no *FLT3* é relativamente baixa. (Annesley *et al.*, 2014; Kennedy *et al.*, 2020)

Na nossa amostra, identificamos mutações no *FLT3* em 5,1% dos casos, sendo 2,58% mutações no domínio tirosina quinase, 1,93% de mutações no domínio justamembrana (JM-INDEL) e em 1 (0,64%) paciente encontramos associação de



mutações FLT3-TKD e FLT3-JM-INDEL. Os nossos achados foram consistentes com dados descritos em estudos prévios, que descrevem incidência de mutações entre 4,7 a 6,7% (Taketani *et al*, 2003; Elyamany *et al*, 2014; Barbosa *et al*, 2014; Zhang *et al*, 2019; Gutierrez-Camino *et al*, 2024).

Não conseguimos estabelecer direta entre a presença de mutação no *FLT3* e variáveis clínicas, laboratoriais ou com a ocorrência de recidiva.

A observação de que os pacientes com mutações no *FLT3* não apresentaram alterações recorrentes em LLA-B como *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1*, *BCR::ABL1*, ou *r-KMT2A* nem alterações nos genes *PAX5*, *ERG* ou *IKZF1* aliada ao achado de que diferentes subtipos moleculares de LLA B apresentam diferentes perfis de expressão gênica do *FLT3*, nos levam a hipotetizar que mutações com ganho de função no gene *FLT3* podem ser alterações geradoras (“drivers”) na LLA B.

Maiores níveis de expressão de FLT3 têm sido descritos como comuns em pacientes com LLA B, especialmente em subtipos específicos, como pacientes com *r-KMT2A*, alta hiperdiploidia e ZNF384 (Yeoh *et al*, 2002; Garza-Veloz *et al*, 2015; Reshmi *et al*, 2017; Yang *et al*, 2019; Gutierrez-Camino *et al*, 2024). No nosso estudo não encontramos associação estatisticamente significativa entre os maiores níveis de expressão de *FLT3* e alta hiperdiploidia. Essa falta de associação pode ser uma especificidade de nossa população, mas faz-se necessária a ampliação do tamanho amostral para confirmar esses achados.

Em 2015 Garza-Veloz e colaboradores descreveram que níveis elevados de *FLT3* no fim da indução estão associados a maiores taxas de recidiva e de mortalidade relacionada a leucemia (Garza-Veloz *et al*, 2015). Curiosamente observamos que os pacientes com maiores níveis de expressão de *FLT3* ao diagnóstico apresentaram menores valores de DRM no D15 ou D19 quando comparados aos demais pacientes. Quando consideramos DRM ao fim da indução, não observamos diferenças nos valores de DRM entre pacientes com e sem mutação no *FLT3*. Considerando nossos achados com os dados descritos por Garza-Veloz poderíamos ousar inferir que, maior expressão de *FLT3* deveria estar relacionada a rápida resposta terapêutica (menor DRM na primeira aferição) e que a persistência de elevados níveis de expressão após indução seriam sinal de que houve refratariedade ao tratamento instituído. Essas



observações indicam a necessidade de uma melhor avaliação sobre o impacto prognóstico dos níveis de expressão de *FLT3* entre pacientes com LLA B.

Apesar de algumas evidências justificarem a realização de estudos pré-clínicos com inibidores de *FLT3* para tratamento de subgrupos específicos de LLA B, até o presente momento, não existem dados consistentes para a recomendação de uso de inibidores de *FLT3* como abordagem terapêutica inicial de pacientes com LLA B, mesmo com elevada expressão de *FLT3* (Brown *et al*, 2021).

5.5 Perfil de marcadores biológicos apresentados pelos pacientes com evoluções clínicas distintas

A maioria dos pacientes que apresentaram recidiva haviam sido inicialmente classificados como risco intermediário. Embora isso possa ser apenas um reflexo de um maior percentual de pacientes com essa classificação, o achado alerta para a necessidade da identificação de fatores que possam predizer a chance de recaída dentro dos subgrupos em que se espera evolução favorável (Hunger; Mullighan, 2015; Jedraszek *et al*, 2022).

Essa foi uma das motivações para a exploração das características clínicas e biológicas apresentadas pelos pacientes que recidivaram.

Os 12 pacientes que apresentaram recidivas da LLA B exibiram pelo menos uma das alterações biológicas pesquisadas. Nesse grupo identificamos quatro pacientes com alteração típica de prognóstico favorável (alta hiperdiploidia e *ETV6::RUNX1*). Esses são os casos emblemáticos e que certamente podem se beneficiar da avaliação por NGS. Por exemplo, em um paciente com *ETV6::RUNX1* foi identificado o rearranjo *RUNX1::CTC1* através do NGS, o que reforça a teoria de que as alterações secundárias associadas são determinantes do prognóstico de pacientes com rearranjos recorrentes (Enshaei *et al.*, 2013; Alpar *et al.*, 2015; Moorman, 2016).

Em concordância com o descrito na literatura, a representatividade dos pacientes com hipodiploidia e *IKZF1*^{plus} foi maior na população de pacientes recidivados (Stanulla *et al*, 202). Alterações no *FLT3* também foram mais prevalentes entre os casos de recidiva. Esta observação motivou uma investigação direcionada



aos efeitos das alterações no *FLT3*, incluindo a avaliação da expressão do gene, sobre a evolução dos pacientes com LLA B (artigo em anexo).

Apesar dos avanços nos processos de diagnóstico, tratamento e medidas de suporte para pacientes com LLA, as taxas de sobrevida em nossa instituição ainda estão abaixo das taxas descritas nos EUA e países europeus (Stary *et al*, 2014; Allemani *et al*, 2015; Jeha *et al*, 2021; Zawitkowska *et al.*, 2022). Durante o desenvolvimento do estudo e, a partir da observação da elevada mortalidade por toxicidade (especialmente sepse em vigência de neutropenia) surgiram questionamentos sobre fatores intrínsecos aos pacientes e não relacionados à condição social (como estado nutricional) que justifiquem essa discrepância de evolução. A hipótese é de que fatores genéticos possam estar associados à maior sensibilidade (e consequente toxicidade) aos efeitos da quimioterapia.

Diferente do que foi observado no grupo de pacientes com recidiva, não identificamos nenhuma alteração biológica em 5 (29%) dos 17 pacientes que foram a óbito por toxicidade, mas, apesar de curioso, esse achado não mostrou significância estatística. Proporcionalmente, os casos *BCR::ABL1* foram mais prevalentes entre os pacientes que morreram por toxicidade, o que pode ser atribuído à maior intensidade do tratamento com a associação de TKI à quimioterapia. Adicionalmente, a menor frequência de casos de alta hiperdiploidia nesse grupo pode ser explicada pela menor agressividade da leucemia e maior proporção de pacientes submetidos a tratamento para baixo risco, que é menos intensivo.

A exploração detalhada dessas subpopulações com evolução desfavorável, seja pela resistência da doença, seja decorrente dos efeitos tóxicos do tratamento, poderá revelar mecanismos biológicos e possíveis alvo terapêuticos (Howard *et al*, 2017).

5.6 Sobreposição de diferentes alterações genéticas e moleculares

A análise genômica de células de LLA B com metodologias como sequenciamento de exoma, sequenciamento de genoma e ensaio de polimorfismos de nucleotídeos tem possibilitado maior elucidação dos mecanismos relacionados com a leucemogênese e os achados têm ratificado as hipóteses tradicionais de que a



gênese da leucemia depende de uma sequência de eventos (Lejman *et al*, 2022). A avaliação da fração de células neoplásicas (percentagem de células tumorais) carregando mutações e alterações indutoras relacionadas às linhagens (*ETV6*, *IKZF1* e *PAX5*) são elevadas, sugerindo ocorrência precoce. Por outro lado, mutações de ponto em vias sinalizadoras (*KRAS*, *NRAS*, *JAK1*, *JAK2*, *FLT3*) são geralmente subclonais sugerindo ocorrência de evento tardio. A verdade é que não existe um gatilho único determinante do curso da leucemia e cada vez mais identificaremos alterações associadas aos marcadores prognósticos já estabelecidos que podem interferir na evolução (Mullighan, 2019; Schwab *et al*, 2022; Brady *et al*, 2022).

Observamos a sobreposição de marcadores biológicos em alguns pacientes, muitas vezes com impacto prognóstico divergente. Algumas dessas associações não são relatadas pelo fato de que até recentemente a pesquisa de alterações biológicas adicionais era restrita aos pacientes “B-others” (Migita *et al*, 2023; Schwab *et al*, 2022). Além disso, em alguns subtipos de LLA B com comportamento bem estabelecido, identificam-se um percentual de pacientes que apresentam evoluções discrepantes do esperado. Assim como nós observamos, estudos recentes têm sido direcionados para a identificação de fatores que interferem na evolução prevista em determinados tipos de LLA B (Drozak *et al*, 2022; Lejman *et al*, 2022).

Brady *et al* 2022, avaliaram a contribuição de eventos secundários na evolução de 2288 casos de pacientes com LLA B dos pacientes (considerando SG, SLE e positividade de DRM no final da indução). Identificaram pior evolução em pacientes com *IKZF1*^{plus} em comparação com pacientes com deleção no *IKZF1* (SG 73,8% X 80,9%). Entre pacientes com *ETV6::RUNX1*, pacientes com *TBL1XR1* apresentaram pior prognóstico quando comparados aos demais pacientes desse subgrupo (SG 5 anos 89%X99,6%). Outras alterações associadas com pior evolução em subtipos específicos de LLA são a presença de *SETD2* na hiperdiploidia (SLE 46,9% X94,9%) e *CDKN2A* na LLA *TCF3::PBX1* (SLE 5 anos 63,6%X92,7%).

Na nossa coorte, não conseguimos estabelecer se associação entre alterações de linhagem e possíveis alterações “drivers” causaram impacto sobre o prognóstico dos pacientes. Exploramos os grupos de pacientes com hiperdiploidia de *ETV6::RUNX1* pelo fato de serem as alterações mais comuns, por estarem



associadas a boa evolução e para melhor compreensão sobre os mecanismos associados a recaídas em alguns pacientes desses grupos (encontrar as “ovelhas negras”). Avaliamos os valores de DRM dos pacientes pertencentes a esses subgrupos que apresentavam associações com outras alterações. Não conseguimos identificar impacto entre as associações e os valores de DRM, mas acreditamos que esses achados devem continuar sendo explorados com aumento da população a ser estudada e com a inclusão de metodologias mais precisas (NGS).

No decorrer do nosso estudo, identificamos a necessidade de ampliação da avaliação genética e molecular para todos os pacientes, independente da presença alteração recorrente. A partir de julho de 2022 a pesquisa de MLPA foi estendida para todos os pacientes. Este trabalho representa o início de um processo de padronização do diagnóstico biológico da LLA B em nossa instituição e que pode ser extrapolado para outros centros de tratamento do país. Reconhecemos a necessidade de trabalhos cooperativos para ampliação de amostras e compartilhamento de experiências para a melhor compreensão da biologia e, consequentemente, manejo dos pacientes brasileiros com LLA B.

Outro aspecto importante a ser considerado é a inclusão da avaliação da execução do tratamento quimioterápico (doses administradas e tempo de administração, toxicidade, interrupções) como variável importante que pode influenciar sobre a evolução. Além disso, se faz necessário a definição de limites e critérios para valorização dos achados encontrados através da avaliação genômica, uma vez que a realização do NGS permite a identificação de uma infinidade de alterações com possível significado clínico, mas que esses achados não podem ser considerados como determinantes absolutos da evolução nem desvincilhados do contexto clínico e até mesmo socioeconômico dos pacientes. Intensificar o tratamento pode ter um custo e este aumento da intensidade não pode ser determinado por alteração genética de mal prognóstico sem levar em consideração as particularidades inerentes ao paciente, como resposta clínica (DRM) e tolerância ao tratamento (especialmente no contexto do Brasil, onde a mortalidade relacionada ao tratamento é principal causa de mortalidade entre pacientes com leucemias).



5.7 Fluxograma para caracterização biológica da LLA B

O principal objetivo do nosso estudo foi realizar um mapeamento das características biológicas da LLA B em nossa população, com a incorporação de novas metodologias de diagnóstico, sempre pensando em sua aplicabilidade no contexto brasileiro. A correlação de diferentes marcadores com a resposta ao tratamento e evolução clínica nos permitiram estabelecer um fluxo de diagnóstico que se justifica pelo benefício clínico direto ao paciente.

Com a possibilidade de avaliação genômica através do NGS, outras alterações que caracterizam novos subtipos de LLA B devem ser exploradas: rearranjo do *MEF2D*, rearranjo do *ZNF384*, *ETV6::RUNX* like e rearranjos do *DUX4*, rearranjos *NUTM1*, *IKZF1 N159Y*, rearranjos de *IGH* (Mullinglan, 2019).

Dispor de tecnologias e ferramentas para diagnóstico não justificam a utilização dessas ferramentas de forma desenfreada, especialmente no contexto brasileiro em que a maioria dos pacientes são tratados pelo SUS e os custos devem ser otimizados e utilizados com responsabilidade. Em contrapartida, é importante estabelecer uma cultura em que se compreenda que possíveis “gastos” com pesquisas e exames são investimentos que, em última instância, gerarão ganhos e economias. Isso não apenas considerando os benefícios imensuráveis relacionados aos cuidados com a criança, mas também com os custos objetivos e diretos relacionados às despesas com tratamento de infecções, intercorrências e maior tempo de hospitalização.



6 CONCLUSÕES

Embora a extrapolação dos nossos achados para a população do país dependa de estudos mais robustos, com maior número amostral e maior tempo de seguimento, baseados nos achados encontrados e considerando que a população atendida é representativa da população brasileira, chegamos às seguintes conclusões:

1. As características clínicas e epidemiológicas dos pacientes com idade entre 1 e 18 anos e com diagnóstico de LLA B tratados no Hospital da Criança de Brasília são semelhantes às descritas na literatura para crianças com LLA B;
2. As taxas de sobrevida Global e Sobrevida Livre de Evento dos pacientes com LLA B tratados no HCB são satisfatórias quando comparadas aos dados dos pacientes em desenvolvimento, mas ainda inferiores às taxas encontradas nos melhores centros de tratamento internacional. Observamos um importante incremento (entre 5 e 10%) na sobrevida global quando comparamos com números de nossa instituição há 10 anos;
3. Mais de 80% dos casos de LLA B apresentam marcadores biológicos identificados por técnicas independentes do NGS (métodos ortogonais). As frequências das alterações genéticas e moleculares encontradas em pacientes brasileiros com LLA B são semelhantes às descritas na literatura internacional;
4. Alta hiperdiploidia e *ETV6::RUNX1* são alterações consolidadas como indicadoras de melhor prognóstico e associadas às melhores taxas de sobrevida em pacientes com LLA B; a LLA B classificada como *IKZF1*^{plus} associa-se com pior evolução e menores taxas de sobrevida e alterações no *PAX5* estão associadas à menor de sobrevida e maior chance de recidiva.

Conforme observamos em relação ao rearranjo *P2RY8::CRLF2*, é possível que o impacto prognóstico de algumas alterações biológicas seja diferente nos pacientes com LLA B no Brasil e as razões para essas diferenças devem ser estudadas;

5. A maior proporção de pacientes com hipodiploidia, *IKZF1*^{plus} e mutações no *FLT3* entre os pacientes que apresentam recidiva, embora sem significado



estatístico, apontam para necessidade de avaliação rigorosa e com maior número amostral para a confirmação do impacto negativo dessas alterações em pacientes com LLA B. Nesse contexto, destacamos as mutações no *FLT3* pela escassez de estudos evidenciando influência dessas alterações sobre a evolução de pacientes com LLA B.

A principal causa de mortalidade em pacientes com LLA B está associada aos efeitos tóxicos do tratamento, o que se mostra evidente em pacientes submetidos a esquemas de tratamento para alto risco, especialmente quando associado aos inibidores de tirosina quinase, como nos casos com LLA B Ph+.

6. A presença de marcadores biológicos associados à hiperdiploidia ou com *ETV6::RUNX1* não interferiu nas taxas de resposta ao tratamento (DRM), entretanto, para conclusões mais precisas e avaliação sobre impactos nas taxas de sobrevida, é necessário avaliação de um maior número de pacientes apresentando tais associações.
7. A caracterização biológica da grande maioria dos casos de LLA B pode ser realizada através da utilização de um fluxograma acessível e cuja execução é fundamentada na otimização dos recursos pelos métodos ortogonais.



7 LIMITAÇÕES

A grande variedade de subtipos biológicos e o tamanho da amostra são fatores limitantes do estudo, uma vez que a avaliação estatística do impacto das associações e das correlações entre as variáveis fica prejudicada.

A dificuldade de avaliação do impacto prognóstico de alguns subtipos de LLA B não é uma peculiaridade de nosso estudo. Os estudos mais recentes alertam para a necessidade de trabalhos colaborativos para a definição da verdadeira interferência sobre a evolução proporcionado por algumas alterações, como *PAX5* P80R, *IGH::ID4*, *ZEB2/CEBP*, *rMEF2D*, *rNUTM1* ou *IKZF1* N159 (Mullighan, 2019; Schwab *et al*, 2022; Brady *et al*, 2022)

Outro fator limitante e possível viés a ser considerado é o fato de que até julho de 2022 o MLPA (alterações no *IKZF1*, *PAX5*, *iAMP21*, *ERG*, entre outros genes) era realizado apenas nos pacientes considerados “B-others” por não apresentarem rearranjos recorrentes ou alterações citogenéticas e isso pode ser um viés de seleção.



8 PERSPECTIVAS

Esse trabalho reflete um processo para a consolidação da prática de medicina translacional no Hospital da Criança de Brasília. A concepção do projeto coincidiu com o momento de estruturação do laboratório de pesquisa translacional, padronização da realização de DRM para monitoramento de pacientes com LLA B, adoção do protocolo BFM ALLIC adaptado e inauguração do segundo bloco do HCB (com estrutura de internação e UTI).

No decorrer do trabalho foram identificados muitos pontos de melhoria e acreditamos que o processo de construção apenas iniciou. Nossos principais objetivos e projetos para estudos futuros incluem:

1. Inclusão dos aspectos relacionados ao tratamento realizado (drogas e doses administradas, atrasos ou interrupções do tratamento) como variáveis que podem ter interferir na evolução dos pacientes;
2. Identificação de outros subtipos de LLA B (*ZNF384*; *ETV6::RUNX* like e alterações do *DUX*)
3. Avaliação da biologia das células leucêmicas em momentos distintos do tratamento (assim como se faz com a pesquisa de DRM);
4. Avaliar a presença de co-ocorrências entre alterações moleculares recorrentes e alterações genéticas identificadas pelo NGS e determinar o impacto dessas associações;
5. Inclusão de avaliação genética através do NGS para pacientes selecionados (estabelecer critérios de inclusão e alvos a serem pesquisados), especialmente em casos de evoluções clínicas discrepantes do esperado para a classificação de risco ou alteração molecular identificada;
6. Avaliação da biologia do paciente direcionada para a maior sensibilidade aos efeitos tóxicos do tratamento;
7. Estabelecer cooperação com outros centros de tratamento oncológicos no Brasil para ampliação das amostras a serem estudadas e do número de pacientes a serem beneficiados.



Tradicionalmente se usa a expressão “da bancada para o leito” para falar sobre a medicina translacional. O presente trabalho possibilitou não apenas que transportássemos os conhecimentos e informações adquiridos no ambiente de pesquisa para o cuidado direto com o paciente, mas também permitiu que a vida de cada um dos pacientes, com suas nuances e peculiaridades (belezas, lutas e alegrias) pudesse invadir o ambiente do laboratório e motivar ainda mais os profissionais escondidos que são tão responsáveis pelo cuidado quanto a equipe assistencial.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABROMOWITCH M, OCHS J, PUI CH, FAIRCLOUGH D, MURPHY SB, RIVERA GK. Efficacy of high-dose methotrexate in childhood acute lymphocytic leukemia: analysis by contemporary risk classifications. **Blood**. 1988 Apr;71(4):866-9. PMID: 3281724.

AGARWAL M, SETH R, CHATTERJEE T. Recent Advances in Molecular Diagnosis and Prognosis of Childhood B Cell Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL). **Indian J Hematol Blood Transfus**. 2021 Jan;37(1):10-20. doi: 10.1007/s12288-020-01295-8. Epub 2020 Jun 3. PMID: 33707831; PMCID: PMC7900311.

ALAGGIO R, AMADOR C, ANAGNOSTOPOULOS I, ATTYGALLE AD, ARAUJO IBO, BERTI E, BHAGAT G, BORGES AM, BOYER D, CALAMINICI M, CHADBURN A, CHAN JKC, CHEUK W, CHNG WJ, CHOI JK, CHUANG SS, COUPLAND SE, CZADER M, DAVE SS, DE JONG D, DU MQ, ELENITOBA-JOHNSON KS, FERRY J, GEYER J, GRATZINGER D, GUITART J, GUJRAL S, HARRIS M, HARRISON CJ, HARTMANN S, HOCHHAUS A, JANSEN PM, KARUBE K, KEMPF W, KHOURY J, KIMURA H, KLAPPER W, KOVACH AE, KUMAR S, LAZAR AJ, LAZZI S, LEONCINI L, LEUNG N, LEVENTAKI V, LI XQ, LIM MS, LIU WP, LOUISSAINT A JR, MARCOGLIESE A, MEDEIROS LJ, MICHAL M, MIRANDA RN, MITTELDORF C, MONTES-MORENO S, MORICE W, NARDI V, NARESH KN, NATKUNAM Y, NG SB, OSCHLIES I, OTT G, PARRENS M, PULITZER M, RAJKUMAR SV, RAWSTRON AC, RECH K, ROSENWALD A, SAID J, SARKOZY C, SAYED S, SAYGIN C, SCHUH A, SEWELL W, SIEBERT R, SOHANI AR, TOOZE R, TRAVERSE-GLEHEN A, VEGA F, VERGIER B, WECHALEKAR AD, WOOD B, XERRI L, XIAO W. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. **Leukemia**. 2022 Jul;36(7):1720-1748. doi: 10.1038/s41375-022-01620-2. Epub 2022 Jun 22. Erratum in: *Leukemia*. 2023 Sep;37(9):1944-1951. doi: 10.1038/s41375-023-01962-5. PMID: 35732829; PMCID: PMC9214472.

ALEXANDER S. Clinically defining and managing high-risk pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. 2014 Dec 5;2014(1):181-9. doi: 10.1182/asheducation-2014.1.181. Epub 2014 Nov 18. PMID: 25696853.

ALGHANDOUR, R.; SAKR, D. H.; SHAABAN, Y. Philadelphia-like acute lymphoblastic leukemia: the journey from molecular background to the role of bone marrow transplant—review article. **Annals of Hematology**, v. 102, n. 6, p. 1287–1300, 2023. doi.org/10.1007/s00277-023-05241-2.

ALLEMANI C, MATSUDA T, DI CARLO V, HAREWOOD R, MATZ M, NIKŠIĆ M, BONAVENTURE A, VALKOV M, JOHNSON CJ, ESTÈVE J, OGUNBIYI OJ, AZEVEDO E SILVA G, CHEN WQ, ESER S, ENGHOLM G, STILLER CA, MONNEREAU A, WOODS RR, VISSER O, LIM GH, AITKEN J, WEIR HK, COLEMAN MP; CONCORD Working Group. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. **Lancet**. 2018 Mar 17;391(10125):1023-1075. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29395269; PMCID: PMC5879496.



ALPAR D, WREN D, ERMINI L, MANSUR MB, VAN DELFT FW, BATEMAN CM, TITLEY I, KEARNEY L, SZCZEPANSKI T, GONZALEZ D, FORD AM, POTTER NE, GREAVES M. Clonal origins of ETV6-RUNX1⁺ acute lymphoblastic leukemia: studies in monozygotic twins. **Leukemia**. 2015 Apr;29(4):839-46. doi: 10.1038/leu.2014.322. Epub 2014 Nov 12. PMID: 25388957.

ANDERSSON AK, MA J, WANG J, CHEN X, GEDMAN AL, DANG J, NAKITANDWE J, HOLMFELDT L, PARKER M, EASTON J, HUETHER R, KRIWACKI R, RUSCH M, WU G, LI Y, MULDER H, RAIMONDI S, POUNDS S, KANG G, SHI L, BECKSFORT J, GUPTA P, PAYNE-TURNER D, VADODARIA B, BOGGS K, YERGEAU D, MANNE J, SONG G, EDMONSON M, NAGAHAWATTE P, WEI L, CHENG C, PEI D, SUTTON R, VENN NC, CHETCUTI A, RUSH A, CATCHPOOLE D, HELDRUP J, FIORETOS T, LU C, DING L, PUI CH, SHURTLEFF S, MULLIGHAN CG, MARDIS ER, WILSON RK, GRUBER TA, ZHANG J, DOWNING JR; St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project. The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. **Nat Genet**. 2015 Apr;47(4):330-7. doi: 10.1038/ng.3230. Epub 2015 Mar 2. PMID: 25730765; PMCID: PMC4553269.

ANNESLEY CE, BROWN P. The Biology and Targeting of FLT3 in Pediatric Leukemia. **Front Oncol**. 2014 Sep 23;4:263. doi: 10.3389/fonc.2014.00263. PMID: 25295230; PMCID: PMC4172015.

ARBER DA, ORAZI A, HASSERJIAN R, *et al*. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**. 2016;127(20):2391-2405. Blood. 2016 Jul 21;128(3):462-463. doi: 10.1182/blood-2016-06-721662. PMID: 31659364.

ARICÒ M, VALSECCHI MG, CAMITTA B, SCHRAPPE M, CHESSELLS J, BARUCHEL A, GAYNON P, SILVERMAN L, JANKA-SCHAUB G, KAMPS W, PUI CH, MASERA G. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**. 2000 Apr 6;342(14):998-1006. doi: 10.1056/NEJM200004063421402. PMID: 10749961.

ARICÒ M, SCHRAPPE M, HUNGER SP, CARROLL WL, CONTER V, GALIMBERTI S, MANABE A, SAHA V, BARUCHEL A, VETTENRANTA K, HORIBE K, BENOIT Y, PIETERS R, ESCHERICH G, SILVERMAN LB, PUI CH, VALSECCHI MG. Clinical outcome of children with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated between 1995 and 2005. **J Clin Oncol**. 2010 Nov 1;28(31):4755-61. doi: 10.1200/JCO.2010.30.1325. Epub 2010 Sep 27. PMID: 20876426; PMCID: PMC3020705.

ARMSTRONG SA, STAUNTON JE, SILVERMAN LB, PIETERS R, DEN BOER ML, MINDEN MD, SALLAN SE, LANDER ES, GOLUB TR, KORSMEYER SJ. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. **Nat Genet**. 2002 Jan;30(1):41-7. doi: 10.1038/ng765. Epub 2001 Dec 3. PMID: 11731795.



ARMSTRONG SA, MABON ME, SILVERMAN LB, LI A, GRIBBEN JG, *et al.* *FLT3* mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**. 2004 May 1;103(9):3544-6. doi: 10.1182/blood-2003-07-2441. Epub 2003 Dec 11. PMID: 14670924.

ARORA RS, ARORA B. Acute leukemia in children: A review of the current Indian data. **South Asian J Cancer**. 2016 Jul-Sep;5(3):155-60. doi: 10.4103/2278-330X.187591. PMID: 27606304; PMCID: PMC4991139.

AUR RJ, SIMONE J, HUSTU HO, WALTERS T, BORELLA L, PRATT C, PINKEL D. Central nervous system therapy and combination chemotherapy of childhood lymphocytic leukemia. **Blood**. 1971 Mar;37(3):272-81. PMID: 4322483.

BASSAN R, SPINELLI O, OLDANI E, INTERMESOLI T, TOSI M, PERUTA B, ROSSI G, BORLENGHI E, POGLIANI EM, TERRUZZI E, FABRIS P, CASSIBBA V, LAMBERTENGHI-DELILIERIS G, CORTELEZZI A, BOSI A, GIANFALDONI G, CICERI F, BERNARDI M, GALLAMINI A, MATTEI D, DI BONA E, ROMANI C, SCATTOLIN AM, BARBUI T, RAMBALDI A. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Blood**. 2009 Apr 30;113(18):4153-62. doi: 10.1182/blood-2008-11-185132. Epub 2009 Jan 13. PMID: 19141862.

BLECKMANN K, SCHRAPPE M. Advances in therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia of childhood and adolescence. **Br J Haematol**. 2016 Mar;172(6):855-69. doi: 10.1111/bjh.13896. Epub 2016 Jan 15. PMID: 26773444.

BLANEY SM; HELMANN LJ; ADAMSON PC. **Pizzo e Poplack's Pediatric Oncology**. 8ª edição. Lippincott Williams & Wilkins (LWW). 2020.

BELDJORD K, CHEVRET S, ASNAFI V, HUGUET F, BOULLAND ML, LEGUAY T, THOMAS X, CAYUELA JM, GRARDEL N, CHALANDON Y, BOISSEL N, SCHAEFER B, DELABESSE E, CAVÉ H, CHEVALLIER P, BUZYN A, FEST T, REMAN O, VERNANT JP, LHÉRITIER V, BÉNÉ MC, LAFAGE M, MACINTYRE E, IFRAH N, DOMBRET H; GROUP FOR RESEARCH ON ADULT ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA (GRAALL). Oncogenetics and minimal residual disease are independent outcome predictors in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**. 2014 Jun 12;123(24):3739-49. doi: 10.1182/blood-2014-01-547695. Epub 2014 Apr 16. PMID: 24740809.

BELSON M, KINGSLEY B, HOLMES A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environ Health Perspect**. 2007 Jan;115(1):138-45. doi: 10.1289/ehp.9023. Erratum in: *Environ Health Perspect*. 2010 Sep;118(9):A380. PMID: 17366834; PMCID: PMC1817663.



BENE MC, CASTOLDI G, KNAPP W, LUDWIG WD, MATUTES E, ORFAO A, VAN'T VEER MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). **Leukemia**. 1995 Oct;9(10):1783-6. PMID: 7564526.

BÉNÉ MC, NEBE T, BETTELHEIM P, BULDINI B, BUMBEA H, KERN W, LACOMBE F, LEMEZ P, MARINOV I, MATUTES E, MAYNADIÉ M, OELSCHLAGEL U, ORFAO A, SCHABATH R, SOLENTHALER M, TSCHURTSCHENTHALER G, VLADAREANU AM, ZINI G, FAURE GC, PORWIT A. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. **Leukemia**. 2011 Apr;25(4):567-74. doi: 10.1038/leu.2010.312. Epub 2011 Jan 21. PMID: 21252983.

BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DA, GRALNICK HR, SULTAN C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br J Haematol**. 1976 Aug;33(4):451-8. doi: 10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x. PMID: 188440.

BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DA, GRALNICK HR, SULTAN C. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. **Br J Haematol**. 1981 Apr;47(4):553-61. doi: 10.1111/j.1365-2141.1981.tb02684.x. PMID: 6938236.

BERNT KM, HUNGER SP. Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. **Front Oncol**. 2014 Mar 25;4:54. doi: 10.3389/fonc.2014.00054. PMID: 24724051; PMCID: PMC3971203.

BIONDI A, SCHRAPPE M, DE LORENZO P, CASTOR A, LUCCHINI G, GANDEMER V, PIETERS R, STARY J, ESCHERICH G, CAMPBELL M, LI CK, VORA A, ARICÒ M, RÖTTGERS S, SAHA V, VALSECCHI MG. Imatinib after induction for treatment of children and adolescents with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (EsPhALL): a randomised, open-label, intergroup study. **Lancet Oncol**. 2012 Sep;13(9):936-45. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70377-7. Epub 2012 Aug 14. PMID: 22898679; PMCID: PMC3431502.

BIONDI A, GANDEMER V, DE LORENZO P, CARIO G, CAMPBELL M, CASTOR A, PIETERS R, BARUCHEL A, VORA A, LEONI V, STARY J, ESCHERICH G, LI CK, CAZZANIGA G, CAVÉ H, BRADTKE J, CONTER V, SAHA V, SCHRAPPE M, GRAZIA VALSECCHI M. Imatinib treatment of paediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (EsPhALL2010): a prospective, intergroup, open-label, single-arm clinical trial. **Lancet Haematol**. 2018 Dec;5(12):e641-e652. doi: 10.1016/S2352-3026(18)30173-X. PMID: 30501871.



BIOJONE E, QUEIRÓZ RDE P, VALERA ET, ODASHIMA NS, TAKAYANAGUI OM, VIANA MB, TONE LG, SCRIDEI CA. Minimal residual disease in cerebrospinal fluid at diagnosis: a more intensive treatment protocol was able to eliminate the adverse prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma**. 2012 Jan;53(1):89-95. doi: 10.3109/10428194.2011.606939. Epub 2011 Aug 24. PMID: 21774746.

BLANCO E, BEYENE J, MALONEY AM, ALMEIDA R, ETHIER MC, WINICK N, ALEXANDER S, SUNG L. Non-relapse mortality in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. **Leuk Lymphoma**. 2012 May;53(5):878-85. doi: 10.3109/10428194.2011.639018. Epub 2012 Jan 3. PMID: 22066711.

BOER JM, STEEGHS EM, MARCHANTE JR, BOEREE A, BEAUDOIN JJ, BEVERLOO HB, KUIPER RP, ESCHERICH G, VAN DER VELDEN VH, VAN DER SCHOOT CE, DE GROOT-KRUSEMAN HA, PIETERS R, DEN BOER ML. Tyrosine kinase fusion genes in pediatric BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia. **Oncotarget**. 2017 Jan 17;8(3):4618-4628. doi: 10.18632/oncotarget.13492. PMID: 27894077; PMCID: PMC5354859.

BOETTCHER M, JOECHNER A, LI Z, YANG SF, SCHLEGEL P. Development of CAR T Cell Therapy in Children-A Comprehensive Overview. **J Clin Med**. 2022 Apr 12;11(8):2158. doi: 10.3390/jcm11082158. PMID: 35456250; PMCID: PMC9024694.

BONAVENTURE A, HAREWOOD R, STILLER CA, GATTA G, CLAVEL J, STEFAN DC, CARREIRA H, SPIKA D, MARCOS-GRAGERA R, PERIS-BONET R, PIÑEROS M, SANT M, KUEHNI CE, MURPHY MFG, COLEMAN MP, ALLEMANI C; CONCORD WORKING GROUP. Worldwide comparison of survival from childhood leukaemia for 1995-2009, by subtype, age, and sex (CONCORD-2): a population-based study of individual data for 89 828 children from 198 registries in 53 countries. **Lancet Haematol**. 2017 May;4(5):e202-e217. doi: 10.1016/S2352-3026(17)30052-2. Epub 2017 Apr 11. Erratum in: *Lancet Haematol*. 2017 May;4(5):e201. doi: 10.1016/S2352-3026(17)30067-4. PMID: 28411119; PMCID: PMC5418564.

BOROWITZ MJ, DEVIDAS M, HUNGER SP, BOWMAN WP, CARROLL AJ, CARROLL WL, LINDA S, MARTIN PL, PULLEN DJ, VISWANATHA D, WILLMAN CL, WINICK N, CAMITTA BM; CHILDREN'S ONCOLOGY GROUP. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. **Blood**. 2008 Jun 15;111(12):5477-85. doi: 10.1182/blood-2008-01-132837. Epub 2008 Apr 3. PMID: 18388178; PMCID: PMC2424148.



BRADY SW, ROBERTS KG, GU Z, SHI L, POUNDS S, PEI D, CHENG C, DAI Y, DEVIDAS M, QU C, HILL AN, PAYNE-TURNER D, MA X, IACOBucci I, BAVISKAR P, WEI L, ARUNACHALAM S, HAGIWARA K, LIU Y, FLASCH DA, LIU Y, PARKER M, CHEN X, ELSAYED AH, PATHAK O, LI Y, FAN Y, MICHAEL JR, RUSCH M, WILKINSON MR, FOY S, HEDGES DJ, NEWMAN S, ZHOU X, WANG J, REILLY C, SIOSON E, RICE SV, PASTOR LOYOLA V, WU G, RAMPERSAUD E, RESHMI SC, GASTIER-FOSTER J, GUIDRY AUVIL JM, GESUWAN P, SMITH MA, WINICK N, CARROLL AJ, HEEREMA NA, HARVEY RC, WILLMAN CL, LARSEN E, RAETZ EA, BOROWITZ MJ, WOOD BL, CARROLL WL, ZWEIDLER-MCKAY PA, RABIN KR, MATTANO LA, MALONEY KW, WINTER SS, BURKE MJ, SALZER W, DUNSMORE KP, ANGIOLILLO AL, CREWS KR, DOWNING JR, JEHA S, PUI CH, EVANS WE, YANG JJ, RELLING MV, GERHARD DS, LOH ML, HUNGER SP, ZHANG J, MULLIGHAN CG. The genomic landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet.** 2022 Sep;54(9):1376-1389. doi: 10.1038/s41588-022-01159-z. Epub 2022 Sep 1. PMID: 36050548; PMCID: PMC9700506.

BRABANT C, GEERINCK A, BEAUDART C, TIRELLI E, GEUZAIN C, BRUYÈRE O. Exposure to magnetic fields and childhood leukemia: a systematic review and meta-analysis of case-control and cohort studies. **Rev Environ Health.** 2022 Mar 15;38(2):229-253. doi: 10.1515/reveh-2021-0112. PMID: 35302721.

BRANDALISE S, ODONE V, PEREIRA W, ANDREA M, ZANICHELLI M, ARANEGA V. Treatment results of three consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols: GBTLI-80, GBTLI-82 and -85. ALL Brazilian Group. **Leukemia.** 1993 Aug;7 Suppl 2:S142-5. PMID: 8361220.

BRANDALISE RS. Comparison of intermittent versus continuous methotrexate plus 6-mp in maintenance regimen for standard risk acute lymphoblastic leukemia in children (GBTLI ALL-99). **Journal of Clinical Oncology** 2007 25:18_suppl, 9512

BRANDALISE SR, VIANA MB, PINHEIRO VR, MENDONÇA N, LOPES LF, PEREIRA WV, LEE ML, PONTES EM, ZOUAIN-FIGUEIREDO GP, AZEVEDO AC, PIMENTEL N, FERNANDES MZ, OLIVEIRA HM, VIANNA SR, SCRIDELI CA, WERNECK FA, ÁLVARES MN, BOLDRINI É, LOGGETTO SR, BRUNIERA P, MASTELLARO MJ, SOUZA EM, ARAÚJO RA, BANDEIRA F, TAN DM, CARVALHO NA, SALGADO MA. Shorter Maintenance Therapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: The Experience of the Prospective, Randomized Brazilian GBTLI ALL-93 Protocol. **Front Pediatr.** 2016 Oct 17;4:110. doi: 10.3389/fped.2016.00110. PMID: 27800472; PMCID: PMC5066157.



BRISCO MJ, SYKES PJ, HUGHES E, DOLMAN G, NEOH SH, PENG LM, TOOGOOD I, MORLEY AA. Monitoring minimal residual disease in peripheral blood in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**. 1997 Nov;99(2):314-319. doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.3723186.x. PMID: 9375747.

BRIVIO E, LOCATELLI F, LOPEZ-YURDA M, MALONE A, DÍAZ-DE-HEREDIA C, BIELORAI B, ROSSIG C, VAN DER VELDEN VHJ, AMMERLAAN ACJ, THANO A, VAN DER SLUIS IM, DEN BOER ML, CHEN Y, SLEIGHT B, BRETHON B, NYSOM K, SRAMKOVA L, ØRA I, VINTI L, CHEN-SANTEL C, ZWAAN CM. A phase 1 study of inotuzumab ozogamicin in pediatric relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia (ITCC-059 study). **Blood**. 2021 Mar 25;137(12):1582-1590. doi: 10.1182/blood.2020007848. PMID: 33067614; PMCID: PMC7995290.

BROWN P, PIETERS R, BIONDI A. How I treat infant leukemia. *Blood*. 2019 Jan 17;133(3):205-214. doi: 10.1182/blood-2018-04-785980. Epub 2018 Nov 20. PMID: 30459160.

BROWN PA, KAIRALLA JA, HILDEN JM, DREYER ZE, CARROLL AJ, HEEREMA NA, WANG C, DEVIDAS M, GORE L, SALZER WL, WINICK NJ, CARROLL WL, RAETZ EA, BOROWITZ MJ, SMALL D, LOH ML, HUNGER SP. FLT3 inhibitor lestaurtinib plus chemotherapy for newly diagnosed KMT2A-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group trial AALL0631. **Leukemia**. 2021 May;35(5):1279-1290. doi: 10.1038/s41375-021-01177-6. Epub 2021 Feb 23. Erratum in: *Leukemia*. 2021 May;35(5):1527. doi: 10.1038/s41375-021-01245-x. PMID: 33623141; PMCID: PMC8763141.

BUCHMANN S, SCHRAPPE M, BARUCHEL A, BIONDI A, *et al*. Remission, treatment failure, and relapse in pediatric ALL: an international consensus of the Ponte-di-Legno Consortium. **Blood**. 2022 Mar 24;139(12):1785-1793. doi: 10.1182/blood.2021012328. PMID: 34192312; PMCID: PMC8952186.

BUFFLER PA, KWAN ML, REYNOLDS P, URAYAMA KY. Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. **Cancer Invest**. 2005;23(1):60-75. PMID: 15779869.

BÜRGER B, ZIMMERMANN M, MANN G, KÜHL J, LÖNING L, RIEHM H, REITER A, SCHRAPPE M. Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. **J Clin Oncol**. 2003 Jan 15;21(2):184-8. doi: 10.1200/JCO.2003.04.096. PMID: 12525508.



CAMPBELL M, KISS C, ZIMMERMANN M, RICCHERI C, KOWALCZYK J, FELICE MS, KUZMANOVIC M, KOVACS G, KOSMIDIS H, GONZALEZ A, BILIC E, CASTILLO L, KOLENOVA A, JAZBEC J, POPA A, KONSTANTINOV D, KAPPELMAYER J, SZCZEPANSKI T, DWORZAK M, BULDINI B, GAIPA G, MARINOV N, ROSSI J, NAGY A, GASPAR I, STARY J, SCHRAPPE M. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of the Randomized Acute Lymphoblastic Leukemia Intercontinental-Berlin-Frankfurt-Münster 2009 Trial. **J Clin Oncol**. 2023 Jul 1;41(19):3499-3511. doi: 10.1200/JCO.22.01760. Epub 2023 May 4. PMID: 37141547.

CAPRIA S, MOLICA M, MOHAMED S, BIANCHI S, MOLETI ML, TRISOLINI SM, CHIARETTI S, TESTI AM. A review of current induction strategies and emerging prognostic factors in the management of children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. **Expert Rev Hematol**. 2020 Jul;13(7):755-769. doi: 10.1080/17474086.2020.1770591. Epub 2020 Jun 1. PMID: 32419532.

CAMPO E, SWERDLOW SH, HARRIS NL, PILERI S, STEIN H, JAFFE ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. **Blood**. 2011 May 12;117(19):5019-32. doi: 10.1182/blood-2011-01-293050. Epub 2011 Feb 7. PMID: 21300984; PMCID: PMC3109529.

carroll aj, shago m, mikhail fm, raimondi sc, hirsch ba, loh ml, raetz ea, borowitz mj, wood bl, maloney kw, mattano la jr, larsen ec, gastier-foster j, stonerock e, ell d, kahwash s, devidas m, harvey rc, chen il, willman cl, hunger sp, winick nj, carroll wl, rao kw, heerema na. Masked hypodiploidy: Hypodiploid acute lymphoblastic leukemia (ALL) mimicking hyperdiploid ALL in children: A report from the Children's Oncology Group. **Cancer Genet**. 2019 Oct;238:62-68. doi: 10.1016/j.cancergen.2019.07.009. Epub 2019 Jul 30. PMID: 31425927; PMCID: PMC6768693.

CAYE A, BELDJORD K, MASS-MALO K, DRUNAT S, SOULIER J, GANDEMER V, BARUCHEL A, BERTRAND Y, CAVÉ H, CLAPPIER E. Breakpoint-specific multiplex polymerase chain reaction allows the detection of IKZF1 intragenic deletions and minimal residual disease monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**. 2013 Apr;98(4):597-601. doi: 10.3324/haematol.2012.073965. Epub 2012 Oct 12. PMID: 23065506; PMCID: PMC3659991.

CHEN IM, HARVEY RC, MULLIGHAN CG, GASTIER-FOSTER J, WHARTON W, KANG H, BOROWITZ MJ, CAMITTA BM, CARROLL AJ, DEVIDAS M, PULLEN DJ, PAYNE-TURNER D, TASIAN SK, RESHMI S, COTTRELL CE, REAMAN GH, BOWMAN WP, CARROLL WL, LOH ML, WINICK NJ, HUNGER SP, WILLMAN CL. Outcome modeling with CRLF2, IKZF1, JAK, and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. **Blood**. 2012 Apr 12;119(15):3512-22. doi: 10.1182/blood-2011-11-394221. Epub 2012 Feb 24. PMID: 22368272; PMCID: PMC3325039.



CHEN B, ZOU Z, ZHANG Q, CHEN K, ZHANG X, XIAO D, LI X. Efficacy and safety of blinatumomab in children with relapsed/refractory B cell acute lymphoblastic leukemia: A systematic review and meta-analysis. **Front Pharmacol**. 2023 Jan 10;13:1032664. doi: 10.3389/fphar.2022.1032664. PMID: 36703737; PMCID: PMC9871389.

CHENG S, POLE JD, SUNG L. Early deaths in pediatric acute leukemia: a population-based study. **Leuk Lymphoma**. 2014 Jul;55(7):1518-22. doi: 10.3109/10428194.2013.850685. Epub 2013 Nov 19. PMID: 24090501.

CLAPPIER E, AUCLERC MF, RAPION J, BAKKUS M, CAYE A, KHEMIRI A, GIROUX C, HERNANDEZ L, KABONGO E, SAVOLA S, LEBLANC T, YAKOUBEN K, PLAT G, COSTA V, FERSTER A, GIRARD S, FENNETEAU O, CAYUELA JM, SIGAUX F, DASTUGUE N, SUCIU S, BENOIT Y, BERTRAND Y, SOULIER J, CAVÉ H. An intragenic *ERG* deletion is a marker of an oncogenic subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a favorable outcome despite frequent *IKZF1* deletions. **Leukemia**. 2014 Jan;28(1):70-7. doi: 10.1038/leu.2013.277. Epub 2013 Sep 25. PMID: 24064621.

COLLINS FS, VARMUS H. A new initiative on precision medicine. **N Engl J Med**. 2015 Feb 26;372(9):793-5. doi: 10.1056/NEJMp1500523. Epub 2015 Jan 30. PMID: 25635347; PMCID: PMC5101938.

COMEAUX EQ, MULLIGHAN CG. *TP53* Mutations in Hypodiploid Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 2017 Mar 1;7(3):a026286. doi: 10.1101/cshperspect.a026286. PMID: 28003275; PMCID: PMC5334249.

CONTER V, BARTRAM CR, VALSECCHI MG, SCHRAUDER A, PANZER-GRÜMAYER R, MÖRICKE A, ARICÒ M, ZIMMERMANN M, MANN G, DE ROSSI G, STANULLA M, LOCATELLI F, BASSO G, NIGGLI F, BARISONE E, HENZE G, LUDWIG WD, HAAS OA, CAZZANIGA G, KOEHLER R, SILVESTRI D, BRADTKE J, PARASOLE R, BEIER R, VAN DONGEN JJ, BIONDI A, SCHRAPPE M. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. **Blood**. 2010 Apr 22;115(16):3206-14. doi: 10.1182/blood-2009-10-248146. Epub 2010 Feb 12. PMID: 20154213.

CONTRERAS YAMETTI GP, OSTROW TH, JASINSKI S, RAETZ EA, CARROLL WL, EVENSEN NA. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Current Practice and Future Directions. **Cancers (Basel)**. 2021 Apr 13;13(8):1847. doi: 10.3390/cancers13081847. PMID: 33924381; PMCID: PMC8069391.



COUSTAN-SMITH E, SANCHO J, HANCOCK ML, RAZZOUK BI, RIBEIRO RC, RIVERA GK, RUBNITZ JE, SANDLUND JT, PUI CH, CAMPANA D. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**. 2002 Oct 1;100(7):2399-402. doi: 10.1182/blood-2002-04-1130. PMID: 12239148.

CREASEY T, ENSHAEI A, NEBRAL K, SCHWAB C, WATTS K, CUTHBERT G, VORA A, MOPPETT J, HARRISON CJ, FIELDING AK, HAAS OA, MOORMAN AV. Single nucleotide polymorphism array-based signature of low hypodiploidy in acute lymphoblastic leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**. 2021 Sep;60(9):604-615. doi: 10.1002/gcc.22956. Epub 2021 May 17. Erratum in: *Genes Chromosomes Cancer*. 2022 Apr;61(4):212-214. doi: 10.1002/gcc.23021. PMID: 33938069; PMCID: PMC8600946.

ČREPINŠEK K, KLOBUČAR N, TESOVIK T, ŠKET R, JENKO BIZJAN B, KOVAČ J, KAVČIČ M, PRELOG T, KITANOVSKI L, JAZBEC J, DEBELJAK M. PAX5 Alterations in a Consecutive Childhood B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cohort Treated Using the ALL IC-BFM 2009 Protocol. **Cancers (Basel)**. 2024 Mar 15;16(6):1164. doi: 10.3390/cancers16061164. PMID: 38539499; PMCID: PMC10969035.

DA SILVA, F. F.; DE OLIVEIRA LATORRE, M. D. R. D. Survival from acute lymphocytic leukemia in children in the city of São Paulo, Brazil. **Cadernos de Saude Publica**, v. 36, n. 3, p. 1–9, 2020.

DE CAMARGO B, DE OLIVEIRA SANTOS M, REBELO MS, DE SOUZA REIS R, FERMAN S, NORONHA CP, POMBO-DE-OLIVEIRA MS. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14 population-based cancer registries. **Int J Cancer**. 2010 Feb 1;126(3):715-20. doi: 10.1002/ijc.24799. PMID: 19642142.

DELLA STARZA I, CHIARETTI S, DE PROPRIIS MS, ELIA L, CAVALLI M, DE NOVI LA, SOSCIA R, MESSINA M, VITALE A, GUARINI A, FOÀ R. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Technical and Clinical Advances. **Front Oncol**. 2019 Aug 7;9:726. doi: 10.3389/fonc.2019.00726. PMID: 31448230; PMCID: PMC6692455.

DEN BOER ML, VAN SLEGTHENHORST M, DE MENEZES RX, CHEOK MH, BUIJS-GLADDINES JG, PETERS ST, VAN ZUTVEN LJ, BEVERLOO HB, VAN DER SPEK PJ, ESCHERICH G, HORSTMANN MA, JANKA-SCHAUB GE, KAMPS WA, EVANS WE, PIETERS R. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. **Lancet Oncol**. 2009 Feb;10(2):125-34. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70339-5. Epub 2009 Jan 8. PMID: 19138562; PMCID: PMC2707020.



DIAZ-FLORES E, COMEAUX EQ, KIM KL, MELNIK E, BECKMAN K, DAVIS KL, WU K, AKUTAGAWA J, BRIDGES O, MARINO R, WOHLFEIL M, BRAUN BS, MULLIGHAN CG, LOH ML. Bcl-2 Is a Therapeutic Target for Hypodiploid B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer Res.** 2019 May 1;79(9):2339-2351. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0236. Epub 2019 Mar 12. PMID: 30862722; PMCID: PMC6497548.

DING YY, STERN JW, JUBELIRER TF, WERTHEIM GB, LIN F, CHANG F, GU Z, MULLIGHAN CG, LI Y, HARVEY RC, CHEN IM, WILLMAN CL, HUNGER SP, LI MM, TASIAN SK. Clinical efficacy of ruxolitinib and chemotherapy in a child with Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia with *GOLGA5-JAK2* fusion and induction failure. **Haematologica.** 2018 Sep;103(9):e427-e431. doi: 10.3324/haematol.2018.192088. Epub 2018 May 17. PMID: 29773603; PMCID: PMC6119161.

DOU H, CHEN X, HUANG Y, SU Y, LU L, YU J, YIN Y, BAO L. Prognostic significance of P2RY8-CRLF2 and CRLF2 overexpression may vary across risk subgroups of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Genes Chromosomes Cancer.** 2017 Feb;56(2):135-146. doi: 10.1002/gcc.22421. Epub 2016 Nov 5. PMID: 27637012.

ECKERT C, PARKER C, MOORMAN AV, IRVING JA, KIRSCHNER-SCHWABE R, GROENEVELD-KRENTZ S, RÉVÉSZ T, HOOGERBRUGGE P, HANCOCK J, SUTTON R, HENZE G, CHEN-SANTEL C, ATTARBASCHI A, BOURQUIN JP, SRAMKOVA L, ZIMMERMANN M, KRISHNAN S, VON STACKELBERG A, SAHA V. Risk factors and outcomes in children with high-risk B-cell precursor and T-cell relapsed acute lymphoblastic leukaemia: combined analysis of ALLR3 and ALL-REZ BFM 2002 clinical trials. **Eur J Cancer.** 2021 Jul;151:175-189. doi: 10.1016/j.ejca.2021.03.034. Epub 2021 May 16. PMID: 34010787.

EL ASHRY MS, ELSAYED GM, MADNEY Y, ARAFAH O, ALLAM RM, RASEKH EO. Duplication 1q is highly correlated with poor prognosis in high hyperdiploid pediatric B-acute lymphoblastic leukemia. **Int J Lab Hematol.** 2021 Apr;43(2):235-243. doi: 10.1111/ijlh.13369. Epub 2020 Oct 19. PMID: 33073918.

ELYAMANY G, AWAD M, ALSUHAIBANI O, FADALLA K, AL SHARIF O, AL SHAHRANI M, ALABBAS F, AL-ABULAALY A. *FLT3* Internal Tandem Duplication and D835 Mutations in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia and its Clinical Significance. **Mediterr J Hematol Infect Dis.** 2014 Jun 1;6(1):e2014038. doi: 10.4084/MJHID.2014.038. PMID: 24959335; PMCID: PMC4063605.



EMERENCIANO M, MEYER C, MANSUR MB, MARSCHALEK R, POMBO-DE-OLIVEIRA MS; Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukaemia. The distribution of *MLL* breakpoints correlates with outcome in infant acute leukaemia. **Br J Haematol**. 2013 Apr;161(2):224-36. doi: 10.1111/bjh.12250. Epub 2013 Feb 21. PMID: 23432364.

ENSHAEI A, SCHWAB CJ, KONN ZJ, MITCHELL CD, KINSEY SE, WADE R, VORA A, HARRISON CJ, MOORMAN AV. Long-term follow-up of ETV6-RUNX1 ALL reveals that NCI risk, rather than secondary genetic abnormalities, is the key risk factor. **Leukemia**. 2013 Nov;27(11):2256-9. doi: 10.1038/leu.2013.136. Epub 2013 May 2. PMID: 23636228.

ENSHAEI A, VORA A, HARRISON CJ, MOPPETT J, MOORMAN AV. Defining low-risk high hyperdiploidy in patients with paediatric acute lymphoblastic leukaemia: a retrospective analysis of data from the UKALL97/99 and UKALL2003 clinical trials. **Lancet Haematol**. 2021 Nov;8(11):e828-e839. doi: 10.1016/S2352-3026(21)00304-5. Erratum in: **Lancet Haematol**. 2021 Dec;8(12):e874. doi: 10.1016/S2352-3026(21)00340-9. PMID: 34715050; PMCID: PMC8567211.

EVANS WE, CROM WR, ABROMOWITCH M, DODGE R, LOOK AT, BOWMAN WP, GEORGE SL, PUI CH. Clinical pharmacodynamics of high-dose methotrexate in acute lymphocytic leukemia. Identification of a relation between concentration and effect. **N Engl J Med**. 1986 Feb 20;314(8):471-7. doi: 10.1056/NEJM198602203140803. PMID: 3456079.

FAMILIADES J, BOUSQUET M, LAFAGE-POCHITALOFF M, BÉNÉ MC, BELDJORD K, DE VOS J, DASTUGUE N, COYAUD E, STRUSKI S, QUELEN C, PRADE-HOUELIER N, DOBBELSTEIN S, CAYUELA JM, SOULIER J, GARDEL N, PREUDHOMME C, CAVÉ H, BLANCHET O, LHÉRITIER V, DELANNOY A, CHALANDON Y, IFRAH N, PIGNEUX A, BROUSSET P, MACINTYRE EA, HUGUET F, DOMBRET H, BROCCARDO C, DELABESSE E. PAX5 mutations occur frequently in adult B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia and PAX5 haploinsufficiency is associated with BCR-ABL1 and TCF3-PBX1 fusion genes: a GRAALL study. **Leukemia**. 2009 Nov;23(11):1989-98. doi: 10.1038/leu.2009.135. Epub 2009 Jul 9. PMID: 19587702.

FARBER S, DIAMOND LK. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. **N Engl J Med**. 1948 Jun 3;238(23):787-93. doi: 10.1056/NEJM194806032382301. PMID: 18860765.

FEDOROV K, MAITI A, KONOPLEVA M. Targeting *FLT3* Mutation in Acute Myeloid Leukemia: Current Strategies and Future Directions. **Cancers (Basel)**. 2023 Apr 15;15(8):2312. doi: 10.3390/cancers15082312. PMID: 37190240; PMCID: PMC10136888.



FELICE MS, GALLEG0 MS, ALONSO CN, ALFARO EM, GUITTER MR, BERNASCONI AR, RUBIO PL, ZUBIZARRETA PA, ROSSI JG. Prognostic impact of t(1;19)/ *TCF3-PBX1* in childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of Berlin-Frankfurt-Münster-based protocols. **Leuk Lymphoma**. 2011 Jul;52(7):1215-21. doi: 10.3109/10428194.2011.565436. Epub 2011 May 3. PMID: 21534874.

FELICIANO SV, SANTOS MO, POMBO-DE-OLIVEIRA MS. Incidência e Mortalidade por Câncer entre Crianças e Adolescentes: uma Revisão Narrativa. **Revista Brasileira de Cancerologia**; 64(3): 389-396. 2018 doi: 10.32635/2176-9745.RBC.2018v64n3.45

FOURNIER B, BALDUCCI E, DUPLOYEZ N, CLAPPIER E, CUCCUINI W, ARFEUILLE C, CAYE-EUDE A, DELABESSE E, BOTTOLLIER-LEMALLAZ COLOMB E, NEBRAL K, CHRÉTIEN ML, DERRIEUX C, CABANNES-HAMY A, DUMEZY F, ETANCELIN P, FENNETEAU O, FRAYFER J, GOURMEL A, LOOSVELD M, MICHEL G, NADAL N, PENTHER D, TIGAUD I, FOURNIER E, REISMÜLLER B, ATTARBASCHI A, LAFAGE-POCHITALOFF M, BARUCHEL A. B-ALL With t(5;14)(q31;q32); *IGH-IL3* Rearrangement and Eosinophilia: A Comprehensive Analysis of a Peculiar *IGH*-Rearranged B-ALL. **Front Oncol**. 2019 Dec 10;9:1374. doi: 10.3389/fonc.2019.01374. PMID: 31921638; PMCID: PMC6914849.

FREEMAN AI, WEINBERG V, BRECHER ML, JONES B, GLICKSMAN AS, SINKS LF, WEIL M, PLEUSS H, HANANIAN J, BURGERT EO JR, GILCHRIST GS, NECHELES T, HARRIS M, KUNG F, PATTERSON RB, MAURER H, LEVENTHAL B, CHEVALIER L, FORMAN E, HOLLAND JF. Comparison of intermediate-dose methotrexate with cranial irradiation for the post-induction treatment of acute lymphocytic leukemia in children. **N Engl J Med**. 1983 Mar 3;308(9):477-84. doi: 10.1056/NEJM198303033080902. PMID: 6571946.

FRISHMAN-LEVY L, IZRAELI S. Advances in understanding the pathogenesis of CNS acute lymphoblastic leukaemia and potential for therapy. **Br J Haematol**. 2017 Jan;176(2):157-167. doi: 10.1111/bjh.14411. Epub 2016 Oct 21. PMID: 27766623.

GAJJAR A, RIBEIRO RC, MAHMOUD HH, SANDLUND JT, LIU Q, FURMAN WL, SANTANA VM, CRIST WM, RIVERA GK, PUI CH. Overt testicular disease at diagnosis is associated with high risk features and a poor prognosis in patients with childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**. 1996 Dec 1;78(11):2437-42. PMID: 8941016.

GAJJAR A, HARRISON PL, SANDLUND JT, RIVERA GK, RIBEIRO RC, RUBNITZ JE, RAZZOUK B, RELLING MV, EVANS WE, BOYETT JM, PUI CH. Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**. 2000 Nov 15;96(10):3381-4. PMID: 11071631.



GARZA-VELOZ I, MARTINEZ-FIERRO ML, JAIME-PEREZ JC, CARRILLO-SANCHEZ K, RAMOS-DEL HOYO MG, LUGO-TRAMPE A, ROJAS-MARTINEZ A, GUTIERREZ-AGUIRRE CH, GONZALEZ-LLANO O, SALAZAR-RIOJAS R, HIDALGO-MIRANDA A, GOMEZ-ALMAGUER D, ORTIZ-LOPEZ R. Identification of differentially expressed genes associated with prognosis of B acute lymphoblastic leukemia. **Dis Markers**. 2015;2015:828145. doi: 10.1155/2015/828145. Epub 2015 Feb 24. PMID: 25802479; PMCID: PMC4354728.

GAYNON PS, TRIGG ME, HEEREMA NA, SENSEL MG, SATHER HN, HAMMOND GD, BLEYER WA. Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995. **Leukemia**. 2000 Dec;14(12):2223-33. doi: 10.1038/sj.leu.2401939. PMID: 11187913.

GHAZAVI F, LAMMENS T, VAN ROY N, POPPE B, SPELEMAN F, BENOIT Y, VAN VLIERBERGHE P, DE MOERLOOSE B. Molecular basis and clinical significance of genetic aberrations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Exp Hematol**. 2015 Aug;43(8):640-53. doi: 10.1016/j.exphem.2015.05.015. Epub 2015 Jun 20. PMID: 26101161.

GIBSON P, POLE JD, LAZOR T, JOHNSTON D, PORTWINE C, SILVA M, ALEXANDER S, SUNG L; International Pediatric Oncology Mortality Classification (IPOMC) Group. Treatment-related mortality in newly diagnosed pediatric cancer: a population-based analysis. **Cancer Med**. 2018 Mar;7(3):707-715. doi: 10.1002/cam4.1362. Epub 2018 Feb 23. PMID: 29473334; PMCID: PMC5852352.

GÖKBUGET N, KNEBA M, RAFF T, TRAUTMANN H, BARTRAM CR, ARNOLD R, FIETKAU R, FREUND M, GANSER A, LUDWIG WD, MASCHMEYER G, RIEDER H, SCHWARTZ S, SERVE H, THIEL E, BRÜGGEMANN M, HOELZER D; GERMAN MULTICENTER STUDY GROUP FOR ADULT ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. **Blood**. 2012 Aug 30;120(9):1868-76. doi: 10.1182/blood-2011-09-377713. Epub 2012 Mar 22. PMID: 22442346.

GOTESMAN M, VO TT, HERZOG LO, TEA T, MALLYA S, TASIAN SK, KONOPLEVA M, FRUMAN DA. mTOR inhibition enhances efficacy of dasatinib in *ABL*-rearranged Ph-like B-ALL. **Oncotarget**. 2018 Jan 6;9(5):6562-6571. doi: 10.18632/oncotarget.24020. PMID: 29464092; PMCID: PMC5814232.

GREAVES MF. Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**. 1988 Feb;2(2):120-5. PMID: 3278171.



GREAVES M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. **Nat Rev Cancer**. 2006 Mar;6(3):193-203. doi: 10.1038/nrc1816. PMID: 16467884.

GREAVES M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Nat Rev Cancer**. 2018 Aug;18(8):471-484. doi: 10.1038/s41568-018-0015-6. Erratum in: *Nat Rev Cancer*. 2018 Aug;18(8):526. doi: 10.1038/s41568-018-0029-0. PMID: 29784935; PMCID: PMC6986894.

GRIFFITH M, GRIFFITH OL, KRYSIAK K, SKIDMORE ZL, CHRISTOPHER MJ, KLCO JM, *et al*. Comprehensive genomic analysis reveals *FLT3* activation and a therapeutic strategy for a patient with relapsed adult B-lymphoblastic leukemia. **Exp Hematol**. 2016 Jul;44(7):603-13. doi: 10.1016/j.exphem.2016.04.011. Epub 2016 May 13. PMID: 27181063; PMCID: PMC4914477.

GROENEVELD-KRENTZ S, SCHROEDER MP, REITER M, POGODZINSKI MJ, PIMENTEL-GUTIÉRREZ HJ, VAGKOPOULOU R, HOF J, CHEN-SANTEL C, NEBRAL K, BRADTKE J, TÜRKMEN S, BALDUS CD, GATTENLÖHNER S, HAAS OA, VON STACKELBERG A, KARAWAJEW L, ECKERT C, KIRSCHNER-SCHWABE R. Aneuploidy in children with relapsed B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: clinical importance of detecting a hypodiploid origin of relapse. **Br J Haematol**. 2019 Apr;185(2):266-283. doi: 10.1111/bjh.15770. Epub 2019 Feb 3. PMID: 30714092.

GU Z, CHURCHMAN ML, ROBERTS KG, MOORE I, ZHOU X, NAKITANDWE J, HAGIWARA K, PELLETIER S, GINGRAS S, BERNIS H, PAYNE-TURNER D, HILL A, IACOBUCCHI I, SHI L, POUNDS S, CHENG C, PEI D, QU C, NEWMAN S, DEVIDAS M, DAI Y, RESHMI SC, GASTIER-FOSTER J, RAETZ EA, BOROWITZ MJ, WOOD BL, CARROLL WL, ZWEIDLER-MCKAY PA, RABIN KR, MATTANO LA, MALONEY KW, RAMBALDI A, SPINELLI O, RADICH JP, MINDEN MD, ROWE JM, LUGER S, LITZOW MR, TALLMAN MS, RACEVSKIS J, ZHANG Y, BHATIA R, KOHLSCHMIDT J, MRÓZEK K, BLOOMFIELD CD, STOCK W, KORNBLAU S, KANTARJIAN HM, KONOPLEVA M, EVANS WE, JEHA S, PUI CH, YANG J, PAIETTA E, DOWNING JR, RELLING MV, ZHANG J, LOH ML, HUNGER SP, MULLIGHAN CG. PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet**. 2019 Feb;51(2):296-307. doi: 10.1038/s41588-018-0315-5. Epub 2019 Jan 14. PMID: 30643249; PMCID: PMC6525306.

GUPTA S, ANTILLON FA, BONILLA M, FU L, HOWARD SC, RIBEIRO RC, SUNG L. Treatment-related mortality in children with acute lymphoblastic leukemia in Central America. **Cancer**. 2011 Oct 15;117(20):4788-95. doi: 10.1002/cncr.26107. Epub 2011 Mar 28. PMID: 21446043.



GUTIERREZ-CAMINO A, RICHER C, OUIMET M, FUCHS C, LANGLOIS S, KHATER F, CARON M, BEAULIEU P, *et al.* Characterisation of *FLT3* alterations in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Cancer**. 2024 Feb;130(2):317-326. doi: 10.1038/s41416-023-02511-8. Epub 2023 Dec 4. PMID: 38049555; PMCID: PMC10803556.

HALTRICH I, CSÓKA M, KOVÁCS G, TÖRÖK D, ALPÁR D, OTTOFFY G, FEKETE G. Six cases of rare gene amplifications and multiple copy of fusion gene in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Pathol Oncol Res**. 2013 Jan;19(1):123-8. doi: 10.1007/s12253-012-9533-9. Epub 2012 Apr 24. PMID: 22528566.

HAMMOND D, SATHER H, NESBIT M, MILLER D, COCCIA P, BLEYER A, LUKENS J, SIEGEL S. Analysis of prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia. **Med Pediatr Oncol**. 1986;14(3):124-34. doi: 10.1002/mpo.2950140305. PMID: 3462458.

HAREWOOD L, ROBINSON H, HARRIS R, AL-OBAIDI MJ, JALALI GR, MARTINEAU M, MOORMAN AV, SUMPTION N, RICHARDS S, MITCHELL C, HARRISON CJ. Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases. **Leukemia**. 2003 Mar;17(3):547-53. doi: 10.1038/sj.leu.2402849. PMID: 12646943.

HARRISON CJ, MOORMAN AV, BROADFIELD ZJ, CHEUNG KL, HARRIS RL, REZA JALALI G, ROBINSON HM, BARBER KE, RICHARDS SM, MITCHELL CD, EDEN TO, HANN IM, HILL FG, KINSEY SE, GIBSON BE, LILLEYMAN J, VORA A, GOLDSTONE AH, FRANKLIN IM, DURRANT J, MARTINEAU M; CHILDHOOD AND ADULT LEUKAEMIA WORKING PARTIES. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**. 2004 Jun;125(5):552-9. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.04948.x. PMID: 15147369.

Harrison CJ. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**. 2009 Jan;144(2):147-56. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07417.x. Epub 2008 Nov 1. PMID: 19006567.

HARRISON CJ, MOORMAN AV, SCHWAB C, CARROLL AJ, RAETZ EA, DEVIDAS M, STREHL S, NEBRAL K, HARBOTT J, TEIGLER-SCHLEGEL A, ZIMMERMAN M, DASTUGE N, BARUCHEL A, SOULIER J, AUCLERC MF, ATTARBASCHI A, MANN G, STARK B, CAZZANIGA G, CHILTON L, VANDENBERGHE P, FORESTIER E, HALTRICH I, RAIMONDI SC, PARIHAR M, BOURQUIN JP, TCHINDA J, HAFERLACH C, VORA A, HUNGER SP, HEEREMA NA, HAAS OA; PONTE DI LEGNO INTERNATIONAL WORKSHOP IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. **Leukemia**. 2014 May;28(5):1015-21. doi: 10.1038/leu.2013.317. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24166298; PMCID: PMC4283797.



HARRISON CJ. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. **Blood**. 2015 Feb 26;125(9):1383-6. doi: 10.1182/blood-2014-08-569228. Epub 2015 Jan 21. PMID: 25608562.

HARVEY RC, TASIAN SK. Clinical diagnostics and treatment strategies for Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. **Blood Adv**. 2020 Jan 14;4(1):218-228. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000163. PMID: 31935290; PMCID: PMC6960477.

HAYAKAWA F, SAKURA T, YUJIRI T, KONDO E, FUJIMAKI K, SASAKI O, MIYATAKE J, HANDA H, UEDA Y, AOYAMA Y, TAKADA S, TANAKA Y, USUI N, MIYAWAKI S, SUENOBU S, HORIBE K, KIYOI H, OHNISHI K, MIYAZAKI Y, OHTAKE S, KOBAYASHI Y, MATSUO K, NAOE T; JAPAN ADULT LEUKEMIA STUDY GROUP (JALSG). Markedly improved outcomes and acceptable toxicity in adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia following treatment with a pediatric protocol: a phase II study by the Japan Adult Leukemia Study Group. **Blood Cancer J**. 2014 Oct 17;4(10):e252. doi: 10.1038/bcj.2014.72. PMID: 25325302; PMCID: PMC4220650.

HE J, MUNIR F, CATUENO S, CONNORS JS, GIBSON A, ROBUSTO L, MCCALL D, NUNEZ C, ROTH M, TEWARI P, GARCES S, CUGLIEVAN B, GARCIA MB. Biological Markers of High-Risk Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancers (Basel)**. 2024 Feb 21;16(5):858. doi: 10.3390/cancers16050858. PMID: 38473221; PMCID: PMC10930495.

HEEREMA NA, CARROLL AJ, DEVIDAS M, LOH ML, BOROWITZ MJ, GASTIER-FOSTER JM, LARSEN EC, MATTANO LA JR, MALONEY KW, WILLMAN CL, WOOD BL, WINICK NJ, CARROLL WL, HUNGER SP, RAETZ EA. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 is associated with inferior outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia treated in contemporary standard-risk children's oncology group studies: a report from the children's oncology group. **J Clin Oncol**. 2013 Sep 20;31(27):3397-402. doi: 10.1200/JCO.2013.49.1308. Epub 2013 Aug 12. PMID: 23940221; PMCID: PMC3770866.

HEEREMA NA, SATHER HN, SENSEL MG, ZHANG T, HUTCHINSON RJ, NACHMAN JB, LANGE BJ, STEINHERZ PG, BOSTROM BC, REAMAN GH, GAYNON PS, UCKUN FM. Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). **J Clin Oncol**. 2000 May;18(9):1876-87. doi: 10.1200/JCO.2000.18.9.1876. PMID: 10784628.

HEFAZI M, LITZOW MR. Recent advances in the biology and treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood Lymphat Cancer**. 2018 Sep 25;8:47-61. doi: 10.2147/BLCTT.S170351. PMID: 31360093; PMCID: PMC6467350.



HEIN D, DREISIG K, METZLER M, IZRAELI S, SCHMIEGELOW K, BORKHARDT A, FISCHER U. The preleukemic TCF3-PBX1 gene fusion can be generated in utero and is present in $\approx 0.6\%$ of healthy newborns. **Blood**. 2019 Oct 17;134(16):1355-1358. doi: 10.1182/blood.2019002215. PMID: 31434706; PMCID: PMC7005361.

HENZE G, LANGERMANN HJ, BRÄMSWIG J, BREU H, GADNER H, SCHELLONG G, WELTE K, RIEHM H. Ergebnisse der Studie BFM 76/79 zur Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie bei Kindern und Jugendlichen [The BFM 76/79 acute lymphoblastic leukemia therapy study (author's transl)]. **Klin Padiatr**. 1981 May;193(3):145-54. German. doi: 10.1055/s-2008-1034450. PMID: 6943387.

HEROLD T, SCHNEIDER S, METZELER KH, NEUMANN M, HARTMANN L, ROBERTS KG, KONSTANDIN NP, GREIF PA, BRÄUNDL K, KSIENZYK B, HUK N, SCHNEIDER I, ZELLMEIER E, JURINOVIC V, MANSMANN U, HIDDEMANN W, MULLIGHAN CG, BOHLANDER SK, SPIEKERMANN K, HOELZER D, BRÜGGEMANN M, BALDUS CD, DREYLING M, GÖKBUGET N. Adults with Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia frequently have IGH-CRLF2 and JAK2 mutations, persistence of minimal residual disease and poor prognosis. **Haematologica**. 2017 Jan;102(1):130-138. doi: 10.3324/haematol.2015.136366. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27561722; PMCID: PMC5210243.

HERTZBERG L, VENDRAMINI E, GANMORE I, CAZZANIGA G, SCHMITZ M, CHALKER J, SHILOH R, IACOBucci I, SHOCHAT C, ZELIGSON S, CARIO G, STANULLA M, STREHL S, RUSSELL LJ, HARRISON CJ, BORNHAUSER B, YODA A, RECHAVI G, BERCOVICH D, BORKHARDT A, KEMPSKI H, TE KRONNIE G, BOURQUIN JP, DOMANY E, IZRAELI S. Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM Study Group. **Blood**. 2010 Feb 4;115(5):1006-17. doi: 10.1182/blood-2009-08-235408. Epub 2009 Nov 24. PMID: 19965641.

HIJIYA N, LIU W, SANDLUND JT, JEHA S, RAZZOUK BI, RIBEIRO RC, RUBNITZ JE, HOWARD SC, KYZER EP, REDD DS, CHENG C, RIVERA GK, HUDSON MM, RELLING MV, PUI CH. Overt testicular disease at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: lack of therapeutic role of local irradiation. **Leukemia**. 2005 Aug;19(8):1399-403. doi: 10.1038/sj.leu.2403843. PMID: 15973454.



HIRABAYASHI S, BUTLER ER, OHKI K, KIYOKAWA N, BERGMANN AK, MÖRICKE A, BOER JM, CAVÉ H, CAZZANIGA G, YEOH AEJ, SANADA M, IMAMURA T, INABA H, MULLIGHAN C, LOH ML, NORÉN-NYSTRÖM U, PASTORCZAK A, SHIH LY, ZALIOVA M, PUI CH, HAAS OA, HARRISON CJ, MOORMAN AV, MANABE A. Clinical characteristics and outcomes of B-ALL with ZNF384 rearrangements: a retrospective analysis by the Ponte di Legno Childhood ALL Working Group. **Leukemia**. 2021 Nov;35(11):3272-3277. doi: 10.1038/s41375-021-01199-0. Epub 2021 Mar 10. PMID: 33692463; PMCID: PMC8550960.

HOLMFELDT L, WEI L, DIAZ-FLORES E, WALSH M, ZHANG J, DING L, PAYNE-TURNER D, CHURCHMAN M, ANDERSSON A, CHEN SC, MCCASTLAIN K, BECKSFORT J, MA J, WU G, PATEL SN, HEATLEY SL, PHILLIPS LA, SONG G, EASTON J, PARKER M, CHEN X, RUSCH M, BOGGS K, VADODARIA B, HEDLUND E, DRENBORG C, BAKER S, PEI D, CHENG C, HUETHER R, LU C, FULTON RS, FULTON LL, TABIB Y, DOOLING DJ, OCHOA K, MINDEN M, LEWIS ID, TO LB, MARLTON P, ROBERTS AW, RACA G, STOCK W, NEALE G, DREXLER HG, DICKINS RA, ELLISON DW, SHURTLEFF SA, PUI CH, RIBEIRO RC, DEVIDAS M, CARROLL AJ, HEEREMA NA, WOOD B, BOROWITZ MJ, GASTIER-FOSTER JM, RAIMONDI SC, MARDIS ER, WILSON RK, DOWNING JR, HUNGER SP, LOH ML, MULLIGHAN CG. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet**. 2013 Mar;45(3):242-52. doi: 10.1038/ng.2532. Epub 2013 Jan 20. PMID: 23334668; PMCID: PMC3919793.

HODDER A, MISHRA AK, ENSHAEI A, BAIRD S, ELBESHLAWI I, BONNEY D, CLESHAM K, CUMMINS M, VEDI A, GIBSON B, GEORGE L, INGHAM D, JIGOULINA G, LANCASTER D, LINDSAY K, MADNI M, MALONE A, MITCHELL B, MOPPETT J, MOTWANI J, MOORMAN AV, PATRICK K, SAMRIN L, TEWARI S, THAKUR I, O'CONNOR D, SAMARASINGHE S, VORA A. Blinatumomab for First-Line Treatment of Children and Young Persons With B-ALL. **J Clin Oncol**. 2024 Mar 10;42(8):907-914. doi: 10.1200/JCO.23.01392. Epub 2023 Nov 15. Erratum in: J Clin Oncol. 2024 Sep 20;42(27):3262. doi: 10.1200/JCO-24-01672. PMID: 37967307.

HOGAN LE, BROWN PA, JI L, XU X, DEVIDAS M, BHATLA T, BOROWITZ MJ, RAETZ EA, CARROLL A, HEEREMA NA, ZUGMAIER G, SHARON E, BERNHARDT MB, TEREZAKIS SA, GORE L, WHITLOCK JA, HUNGER SP, LOH ML. Children's Oncology Group AALL1331: Phase III Trial of Blinatumomab in Children, Adolescents, and Young Adults With Low-Risk B-Cell ALL in First Relapse. **J Clin Oncol**. 2023 1;41(25):4118-4129. doi: 10.1200/JCO.22.02200. Epub 2023 May 31. PMID: 37257143; PMCID: PMC10852366.



HORN PRCB, RIBEIRO-CARVALHO MM, AZEVEDO AMB, SOUSA AM, FARIA S, WIGGERS C, ROUXINOL S, SCHRAMM MT, SANCHES BS, DUARTE NL, SEIXAS TSF, GOMES BE, OLIVEIRA E, ARCURI LJ, COSTA ESD, LAND MGP, SOUZA MHFO. Long-Term Outcomes of Childhood Acute Lymphocytic Leukemia Treated with Adapted Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) Protocols: A Multicentric Analysis from a Developing Country. **Cancers (Basel)**. 2024 Aug 21;16(16):2898. doi: 10.3390/cancers16162898. PMID: 39199668; PMCID: PMC11352647.

HOUGH R, VORA A. Crisis management in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: putting right what can go wrong (emergency complications of disease and treatment). **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. 2017 Dec 8;2017(1):251-258. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.251. PMID: 29222263; PMCID: PMC6142611.

HOWARD SC, PEDROSA M, LINS M, PEDROSA A, PUI CH, RIBEIRO RC, PEDROSA F. Establishment of a pediatric oncology program and outcomes of childhood acute lymphoblastic leukemia in a resource-poor area. **JAMA**. 2004 May 26;291(20):2471-5. doi: 10.1001/jama.291.20.2471. PMID: 15161898.

HOWARD SC, DAVIDSON A, LUNA-FINEMAN S, ISRAELS T, CHANTADA G, LAM CG, HUNGER SP, BAILEY S, RIBEIRO RC, ARORA RS, PEDROSA F, HARIF M, METZGER ML. A framework to develop adapted treatment regimens to manage pediatric cancer in low- and middle-income countries: The Pediatric Oncology in Developing Countries (PODC) Committee of the International Pediatric Oncology Society (SIOP). **Pediatr Blood Cancer**. 2017 Dec;64 Suppl 5. doi: 10.1002/pbc.26879. PMID: 29297619.

HOWLADER N, NOONE AM, KRAPCHO M, MILLER D, BISHOP K, KOSARY CL, YU M, RUHL J, TATALOVICH Z, MARIOTTO A, LEWIS DR, CHEN HS, FEUER EJ, CRONIN KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/, based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2017

HUNGER SP, MULLIGHAN CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **N Engl J Med**. 2015 Oct 15;373(16):1541-52. doi: 10.1056/NEJMra1400972. PMID: 26465987.

HUNGER SP, MULLIGHAN CG. Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. **Blood**. 2015 Jun 25;125(26):3977-87. doi: 10.1182/blood-2015-02-580043. Epub 2015 May 21. PMID: 25999453; PMCID: PMC4481590.



HUNGER SP, CARROLL WL, CAMITTA B; CHILDREN'S ONCOLOGY GROUP. Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study AALL0031. **Leukemia**. 2014 Jul;28(7):1467-71. doi: 10.1038/leu.2014.30. Epub 2014 Jan 20. PMID: 24441288; PMCID: PMC4282929.

HUNGER SP, TRAN TH, SAHA V, DEVIDAS M, VALSECCHI MG, GASTIER-FOSTER JM, CAZZANIGA G, RESHMI SC, BOROWITZ MJ, MOORMAN AV, HEEREMA NA, CARROLL AJ, MARTIN-REGUEIRA P, LOH ML, RAETZ EA, SCHULTZ KR, SLAYTON WB, CARIO G, SCHRAPPE M, SILVERMAN LB, BIONDI A. Dasatinib with intensive chemotherapy in de novo paediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (CA180-372/COG AALL1122): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. **Lancet Haematol**. 2023 Jul;10(7):e510-e520. doi: 10.1016/S2352-3026(23)00088-1. PMID: 37407142.

IACOBUCCI I, KIMURA S, MULLIGHAN CG. Biologic and Therapeutic Implications of Genomic Alterations in Acute Lymphoblastic Leukemia. **J Clin Med**. 2021 Aug 25;10(17):3792. doi: 10.3390/jcm10173792. PMID: 34501239; PMCID: PMC8432032.

IKOMA-COLTURATO MRV, BERTOLUCCI CM, CONTI-SPILARI JE, OLIVEIRA E, SIMIONI AJ, FIGUEREDO-PONTES LL, FURTADO FM, ALEGRETTI AP, AZAMBUJA AP, GEVERT F, GOMES BE, AVELAR DMV, SOARES ACCV, RAMOS PM, SANTOS B, CORTEZ ML, BELTRAME MP, BACAL NS, WAGNER A, LUCENA-SILVA N, SANDES AF, CUNHA F, OLIVEIRA GHM, COSTA ES, YAMAMOTO M. Multicentric standardization of minimal/measurable residual disease in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia using next-generation flow cytometry in a low/middle-level income country. **Br J Haematol**. 2023 Feb;200(3):381-384. doi: 10.1111/bjh.18499. Epub 2022 Oct 12. PMID: 36222259; PMCID: PMC10091773.

INABA H, PUI CH. Advances in the Diagnosis and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic **Leukemia**. **J Clin Med**. 2021 Apr 29;10(9):1926. doi: 10.3390/jcm10091926. PMID: 33946897; PMCID: PMC8124693.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2019. www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf



JABBOUR E, SHORT NJ, RAVANDI F, HUANG X, DAVER N, DINARDO CD, KONOPLEVA M, PEMMARAJU N, WIERDA W, GARCIA-MANERO G, SASAKI K, CORTES J, GARRIS R, KHOURY JD, JORGENSEN J, JAIN N, ALVAREZ J, O'BRIEN S, KANTARJIAN H. Combination of hyper-CVAD with ponatinib as first-line therapy for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia: long-term follow-up of a single-centre, phase 2 study. **Lancet Haematol**. 2018 Dec;5(12):e618-e627. doi: 10.1016/S2352-3026(18)30176-5. PMID: 30501869; PMCID: PMC10020885.

JĘDRASZEK K, MALCZEWSKA M, PARYSEK-WÓJCIK K, LEJMAN M. Resistance Mechanisms in Pediatric B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Int J Mol Sci**. 2022 Mar 12;23(6):3067. doi: 10.3390/ijms23063067. PMID: 35328487; PMCID: PMC8950780.

JEHA S, PEI D, CHOI J, CHENG C, SANDLUND JT, COUSTAN-SMITH E, CAMPANA D, INABA H, RUBNITZ JE, RIBEIRO RC, GRUBER TA, RAIMONDI SC, KHAN RB, YANG JJ, MULLIGHAN CG, DOWNING JR, EVANS WE, RELLING MV, PUI CH. Improved CNS Control of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Without Cranial Irradiation: St Jude Total Therapy Study 16. **J Clin Oncol**. 2019 Dec 10;37(35):3377-3391. doi: 10.1200/JCO.19.01692. Epub 2019 Oct 28. PMID: 31657981; PMCID: PMC7351342.

JEHA S, CHOI J, ROBERTS KG, PEI D, COUSTAN-SMITH E, INABA H, RUBNITZ JE, RIBEIRO RC, GRUBER TA, RAIMONDI SC, KAROL SE, QU C, BRADY SW, GU Z, YANG JJ, CHENG C, DOWNING JR, EVANS WE, RELLING MV, CAMPANA D, MULLIGHAN CG, PUI CH. Clinical significance of novel subtypes of acute lymphoblastic leukemia in the context of minimal residual disease-directed therapy. **Blood Cancer Discov**. 2021 Jul;2(4):326-337. doi: 10.1158/2643-3230.BCD-20-0229. PMID: 34250504; PMCID: PMC8265990.

JIAO Q, BI L, REN Y, SONG S, WANG Q, WANG YS. Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. **Mol Cancer**. 2018 Feb 19;17(1):36. doi: 10.1186/s12943-018-0801-5. PMID: 29455664; PMCID: PMC5817861.

JING J, MA Y, XIE Z, WANG B, CHEN Y, CHI E, WANG J, ZHANG K, WANG Z, LI S. Acute T-cell lymphoblastic leukemia: chimeric antigen receptor technology may offer a new hope. **Front Immunol**. 2024 Aug 13;15:1410519. doi: 10.3389/fimmu.2024.1410519. PMID: 39192970; PMCID: PMC11347323.

JOLLIFFE, A. United Kingdom National Randomised Trial for Children and Young Adults with Acute Lymphoblastic Leukaemia and Lymphoma 2011–UKALL 2011 Trial. Children's Cancer Trials Team; Version 3.0. 1 October 2013.



JUNG M, SCHIECK M, HOFMANN W, TAUSCHER M, LENTES J, BERGMANN A, STELTER M, MÖRICKE A, ALTEN J, SCHLEGELBERGER B, SCHRAPPE M, ZIMMERMANN M, STANULLA M, CARIO G, STEINEMANN D. Frequency and prognostic impact of *PAX5* p.P80R in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients treated on an AIEOP-BFM acute lymphoblastic leukemia protocol. *Genes Chromosomes Cancer*. 2020 Nov;59(11):667-671. doi: 10.1002/gcc.22882. Epub 2020 Jul 7. PMID: 32592278; PMCID: PMC7540392.

KACZMARSKA A, DEREBAS J, PINKOSZ M, NIEDŹWIECKI M, LEJMAN M. The Landscape of Secondary Genetic Rearrangements in Pediatric Patients with B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia with t(12;21). *Cells*. 2023 Jan 18;12(3):357. doi: 10.3390/cells12030357. PMID: 36766699; PMCID: PMC9913634.

KARAPETYAN K, GIZHLARYAN M, KALINOVSKAIA O, HOVHANNISYAN A, TADEVOSYAN G, MATINYAN L, TAMAMYAN G, GHAZARYAN N. Investigating residual leukemic cells in acute lymphoblastic leukemia: a practical approach using a streamlined interphase fluorescence in situ hybridization method on cerebrospinal fluid. *Mol Cytogenet*. 2023 Jul 27;16(1):17. doi: 10.1186/s13039-023-00649-x. PMID: 37501073; PMCID: PMC10375734.

KAPLAN JA. Leukemia in Children. *Pediatr Rev*. 2019 Jul;40(7):319-331. doi: 10.1542/pir.2018-0192. PMID: 31263040.

KATO M, ISHIMARU S, SEKI M, YOSHIDA K, SHIRAISHI Y, CHIBA K, KAKIUCHI N, SATO Y, UENO H, TANAKA H, INUKAI T, TOMIZAWA D, HASEGAWA D, OSUMI T, ARAKAWA Y, AOKI T, OKUYA M, KAIZU K, KATO K, TANEYAMA Y, GOTO H, TAKI T, TAKAGI M, SANADA M, KOH K, TAKITA J, MIYANO S, OGAWA S, OHARA A, TSUCHIDA M, MANABE A. Long-term outcome of 6-month maintenance chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia*. 2017 Mar;31(3):580-584. doi: 10.1038/leu.2016.274. Epub 2016 Oct 4. PMID: 27698447.

KOLEILAT A, SMADBECK JB, ZEPEDA-MENDOZA CJ, WILLIAMSON CM, PITEL BA, GOLDEN CL, XU X, GREIPP PT, KETTERLING RP, HOPPMAN NL, PETERSON JF, HARRISON CJ, AKKARI YMN, TSUCHIYA KD, SHAGO M, BAUGHN LB. Characterization of unusual iAMP21 B-lymphoblastic leukemia (iAMP21-ALL) from the Mayo Clinic and Children's Oncology Group. *Genes Chromosomes Cancer*. 2022 Dec;61(12):710-719. doi: 10.1002/gcc.23084. Epub 2022 Jul 19. PMID: 35771717; PMCID: PMC9549522.

KRATZER TB, JEMAL A, MILLER KD, NASH S, WIGGINS C, REDWOOD D, SMITH R, SIEGEL RL. Cancer statistics for American Indian and Alaska Native individuals, 2022: Including increasing disparities in early onset colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*. 2023 Mar;73(2):120-146. doi: 10.3322/caac.21757. Epub 2022 Nov 8. PMID: 36346402.



KRUSE A, ABDEL-AZIM N, KIM HN, RUAN Y, PHAN V, OGANA H, WANG W, LEE R, GANG EJ, KHAZAL S, KIM YM. Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Int J Mol Sci**. 2020 Feb 5;21(3):1054. doi: 10.3390/ijms21031054. PMID: 32033444; PMCID: PMC7037356.

KRYNETSKI EY, SCHUETZ JD, GALPIN AJ, PUI CH, RELLING MV, EVANS WE. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1995 Feb 14;92(4):949-53. doi: 10.1073/pnas.92.4.949. PMID: 7862671; PMCID: PMC42614.

KURZROCK R, KANTARJIAN HM, DRUKER BJ, TALPAZ M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. **Ann Intern Med**. 2003 May 20;138(10):819-30. doi: 10.7326/0003-4819-138-10-200305200-00010. PMID: 12755554.

LEE SHR, LI Z, TAI ST, OH BLZ, YEOH AEJ. Genetic Alterations in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Interactions with Clinical Features and Treatment Response. **Cancers (Basel)**. 2021 Aug 12;13(16):4068. doi: 10.3390/cancers13164068. PMID: 34439222; PMCID: PMC8393341.

LEJMAN M, CHAŁUPNIK A, CHILIMONIUK Z, DOBOSZ M. Genetic Biomarkers and Their Clinical Implications in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **Int J Mol Sci**. 2022 Mar 2;23(5):2755. doi: 10.3390/ijms23052755. PMID: 35269896; PMCID: PMC8911213.

LENGLINE E, BELDJORD K, DOMBRET H, SOULIER J, BOISSEL N, CLAPPIER E. Successful tyrosine kinase inhibitor therapy in a refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with EBF1-PDGFRB fusion. **Haematologica**. 2013 Nov;98(11):e146-8. doi: 10.3324/haematol.2013.095372. PMID: 24186319; PMCID: PMC3815191.

Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, Tsimberidou AM, Vnencak-Jones CL, Wolff DJ, Younes A, Nikiforova MN. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. **J Mol Diagn**. 2017 Jan;19(1):4-23. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.10.002. PMID: 27993330; PMCID: PMC5707196.

LI S, ILARIA RL JR, MILLION RP, DALEY GQ, VAN ETEN RA. The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. **J Exp Med**. 1999 May 3;189(9):1399-412. doi: 10.1084/jem.189.9.1399. PMID: 10224280; PMCID: PMC2193055.



LI XY, LI JQ, LUO XQ, WU XD, SUN X, XU HG, LI CG, LIU RY, SUN XF, CHEN HQ, LIN YD, LI CK, FANG JP. Reduced intensity of early intensification does not increase the risk of relapse in children with standard risk acute lymphoblastic leukemia - a multi-centric clinical study of GD-2008-ALL protocol. **BMC Cancer**. 2021 Jan 13;21(1):59. doi: 10.1186/s12885-020-07752-x. PMID: 33435902; PMCID: PMC7805214.

LILLJEBJÖRN H, HENNINGSSON R, HYRENIUS-WITTSTEN A, OLSSON L, ORSMARK-PIETRAS C, VON PALFFY S, ASKMYR M, RISSLER M, SCHRAPPE M, CARIO G, CASTOR A, PRONK CJ, BEHRENDTZ M, MITELMAN F, JOHANSSON B, PAULSSON K, ANDERSSON AK, FONTES M, FIORETOS T. Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4-rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **Nat Commun**. 2016 Jun 6;7:11790. doi: 10.1038/ncomms11790. PMID: 27265895; PMCID: PMC4897744.

LIU K, SHAO J, CAI J, TANG J, SHEN S, XU F, REN Y, ZHANG A, TIAN X, LU X, HU S, HU Q, JIANG H, ZHOU F, LIANG C, LEUNG AWK, ZHAI X, LI C, FANG Y, WANG Z, WEN L, YANG H, WANG N, JIANG H. Causes of death and treatment-related mortality in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia treatment with Chinese Children's Cancer Group study ALL-2015. **Ann Hematol**. 2023 Dec;102(12):3431-3444. doi: 10.1007/s00277-023-05389-x. Epub 2023 Aug 8. PMID: 37550503.

LOH ML, GOLDWASSER MA, SILVERMAN LB, POON WM, VATTIKUTI S, CARDOSO A, NEUBERG DS, SHANNON KM, SALLAN SE, GILLILAND DG. Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. **Blood**. 2006 Jun 1;107(11):4508-13. doi: 10.1182/blood-2005-08-3451. Epub 2006 Feb 21. PMID: 16493009; PMCID: PMC1895800.

LOH ML, ZHANG J, HARVEY RC, ROBERTS K, PAYNE-TURNER D, KANG H, WU G, CHEN X, BECKSFORT J, EDMONSON M, BUETOW KH, CARROLL WL, CHEN IM, WOOD B, BOROWITZ MJ, DEVIDAS M, GERHARD DS, BOWMAN P, LARSEN E, WINICK N, RAETZ E, SMITH M, DOWNING JR, WILLMAN CL, MULLIGHAN CG, HUNGER SP. Tyrosine kinome sequencing of pediatric acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group TARGET Project. **Blood**. 2013 Jan 17;121(3):485-8. doi: 10.1182/blood-2012-04-422691. Epub 2012 Dec 4. PMID: 23212523; PMCID: PMC3548168.

MAESE L, TASIAN SK, RAETZ EA. How is the Ph-like signature being incorporated into ALL therapy? **Best Pract Res Clin Haematol**. 2017 Sep;30(3):222-228. doi: 10.1016/j.beha.2017.06.001. Epub 2017 Jun 15. PMID: 29050695; PMCID: PMC6053910.



MAHMOUD HH, RIVERA GK, HANCOCK ML, KRANCE RA, KUN LE, BEHM FG, RIBEIRO RC, SANDLUND JT, CRIST WM, PUI CH. Low leukocyte counts with blast cells in cerebrospinal fluid of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med.** 1993 Jul 29;329(5):314-9. doi: 10.1056/NEJM199307293290504. PMID: 8321259.

MALARD F, MOHTY M. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet.** 2020 Apr 4;395(10230):1146-1162. doi: 10.1016/S0140-6736(19)33018-1. PMID: 32247396.

MALCZEWSKA M, KOŚMIDER K, BEDNARZ K, OSTAPIŃSKA K, LEJMAN M, ZAWITKOWSKA J. Recent Advances in Treatment Options for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancers (Basel).** 2022 Apr 16;14(8):2021. doi: 10.3390/cancers14082021. PMID: 35454927; PMCID: PMC9032060.

MALONEY KW, DEVIDAS M, WANG C, MATTANO LA, FRIEDMANN AM, BUCKLEY P, BOROWITZ MJ, CARROLL AJ, GASTIER-FOSTER JM, HEEREMA NA, KADANLOTTICK N, LOH ML, MATLOUB YH, MARSHALL DT, STORK LC, RAETZ EA, WOOD B, HUNGER SP, CARROLL WL, WINICK NJ. Outcome in Children With Standard-Risk B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of Children's Oncology Group Trial AALL0331. **J Clin Oncol.** 2020 Feb 20;38(6):602-612. doi: 10.1200/JCO.19.01086. Epub 2019 Dec 11. PMID: 31825704; PMCID: PMC7030893.

MARKE R, VAN LEEUWEN FN, SCHEIJEN B. The many faces of IKZF1 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica.** 2018 Apr;103(4):565-574. doi: 10.3324/haematol.2017.185603. Epub 2018 Mar 8. PMID: 29519871; PMCID: PMC5865415.

MAUDE SL, FREY N, SHAW PA, APLENC R, BARRETT DM, BUNIN NJ, CHEW A, GONZALEZ VE, ZHENG Z, LACEY SF, MAHNKE YD, MELENHORST JJ, RHEINGOLD SR, SHEN A, TEACHEY DT, LEVINE BL, JUNE CH, PORTER DL, GRUPP SA. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. **N Engl J Med.** 2014 Oct 16;371(16):1507-17. doi: 10.1056/NEJMoa1407222. Erratum in: **N Engl J Med.** 2016 Mar 10;374(10):998. doi: 10.1056/NEJMr160005. PMID: 25317870; PMCID: PMC4267531.

MCCLURE BJ, HEATLEY SL, REHN J, BREEN J, SUTTON R, HUGHES TP, SUPPIAH R, REVESZ T, OSBORN M, WHITE D, YEUNG DT, WHITE DL. High-risk B-cell acute lymphoblastic leukaemia presenting with hypereosinophilia and acquiring a novel *PAX5* fusion on relapse. **Br J Haematol.** 2020 Oct;191(2):301-304. doi: 10.1111/bjh.17002. Epub 2020 Jul 30. PMID: 32731299.



MCCLURE BJ, HEATLEY SL, KOK CH, SADRAS T, AN J, HUGHES TP, LOCK RB, YEUNG D, SUTTON R, WHITE DL. Pre-B acute lymphoblastic leukaemia recurrent fusion, EP300-ZNF384, is associated with a distinct gene expression. **Br J Cancer**. 2018 Apr;118(7):1000-1004. doi: 10.1038/s41416-018-0022-0. Epub 2018 Mar 13. PMID: 29531323; PMCID: PMC5931087.

MCGOWAN-JORDAN, J.; SIMONS, A.; SCHMID, M. E. ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature, 2020. Switzerland: S. Karger AG 2020. 3318067067. doi: 10.1159/isbn.978-3-318-06867-2

MCNEER JL, DEVIDAS M, DAI Y, CARROLL AJ, HEEREMA NA, GASTIER-FOSTER JM, KAHWASH SB, BOROWITZ MJ, WOOD BL, LARSEN E, MALONEY KW, MATTANO L, WINICK NJ, SCHULTZ KR, HUNGER SP, CARROLL WL, LOH ML, RAETZ EA. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation Does Not Improve the Poor Outcome of Children With Hypodiploid Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From Children's Oncology Group. **J Clin Oncol**. 2019 Apr 1;37(10):780-789. doi: 10.1200/JCO.18.00884. Epub 2019 Feb 11. PMID: 30742559; PMCID: PMC6440386.

MIGITA NA, JOTTA PY, NASCIMENTO NPD, VASCONCELOS VS, CENTODUCATTE GL, MASSIRER KB, AZEVEDO AC, BRANDALISE SR, YUNES JA. Classification and genetics of pediatric B-other acute lymphoblastic leukemia by targeted RNA sequencing. **Blood Adv**. 2023 Jul 11;7(13):2957-2971. doi: 10.1182/bloodadvances.2022009179. PMID: 36848637; PMCID: PMC10320209.

MOORMAN AV, RICHARDS SM, MARTINEAU M, CHEUNG KL, ROBINSON HM, JALALI GR, BROADFIELD ZJ, HARRIS RL, TAYLOR KE, GIBSON BE, HANN IM, HILL FG, KINSEY SE, EDEN TO, MITCHELL CD, HARRISON CJ; UNITED KINGDOM MEDICAL RESEARCH COUNCIL'S CHILDHOOD LEUKEMIA WORKING PARTY. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. **Blood**. 2003 Oct 15;102(8):2756-62. doi: 10.1182/blood-2003-04-1128. Epub 2003 Jun 26. PMID: 12829593.

MOORMAN AV, ROBINSON H, SCHWAB C, RICHARDS SM, HANCOCK J, *et al*. Risk-directed treatment intensification significantly reduces the risk of relapse among children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia and intrachromosomal amplification of chromosome 21: a comparison of the MRC ALL97/99 and UKALL2003 trials. **J Clin Oncol**. 2013 Sep 20;31(27):3389-96. doi: 10.1200/JCO.2013.48.9377. Epub 2013 Aug 12. PMID: 23940220.

MOORMAN AV. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**. 2016 Apr;101(4):407-16. doi: 10.3324/haematol.2015.141101. PMID: 27033238; PMCID: PMC5004393.



MOORMAN AV, SCHWAB C, WINTERMAN E, HANCOCK J, CASTLETON A, CUMMINS M, GIBSON B, GOULDEN N, KEARNS P, JAMES B, KIRKWOOD AA, LANCASTER D, MADI M, MCMILLAN A, MOTWANI J, NORTON A, O'MARCAIGH A, PATRICK K, BHATNAGAR N, QURESHI A, RICHARDSON D, STOKLEY S, TAYLOR G, VAN DELFT FW, MOPPETT J, HARRISON CJ, SAMARASINGHE S, VORA A. Adjuvant tyrosine kinase inhibitor therapy improves outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukaemia who have an ABL-class fusion. **Br J Haematol**. 2020 Dec;191(5):844-851. doi: 10.1111/bjh.17093. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32926422.

MOREIRA LBP, QUEIRÓZ RP, SUAZO VK, PERNA E, BRANDALISE SR, YUNES JA, TONE LG, SCRIDELI CA. Detection by a simple and cheaper methodology of Ik6 and Ik10 isoforms of the *IKZF1* gene is highly associated with a poor prognosis in B-lineage paediatric acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**. 2019 Nov;187(3):e58-e61. doi: 10.1111/bjh.16172. Epub 2019 Sep 4. PMID: 31483479.

MUGHAL TI, RADICH JP, DEININGER MW, APPERLEY JF, HUGHES TP, HARRISON CJ, GAMBACORTI-PASSERINI C, SAGLIO G, CORTES J, DALEY GQ. Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. **Haematologica**. 2016 May;101(5):541-58. doi: 10.3324/haematol.2015.139337. PMID: 27132280; PMCID: PMC5004358.

MÜHLBACHER V, ZENGER M, SCHNITTGER S, WEISSMANN S, KUNZE F, KOHLMANN A, BELLOS F, KERN W, HAFERLACH T, HAFERLACH C. Acute lymphoblastic leukemia with low hypodiploid/near triploid karyotype is a specific clinical entity and exhibits a very high *TP53* mutation frequency of 93%. **Genes Chromosomes Cancer**. 2014 Jun;53(6):524-36. doi: 10.1002/gcc.22163. Epub 2014 Mar 11. PMID: 24619868.

MULLIGHAN CG, GOORHA S, RADTKE I, MILLER CB, COUSTAN-SMITH E, DALTON JD, GIRTMAN K, MATHEW S, MA J, POUNDS SB, SU X, PUI CH, RELING MV, EVANS WE, SHURTLEFF SA, DOWNING JR. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007 Apr 12;446(7137):758-64. doi: 10.1038/nature05690. PMID: 17344859.

MULLIGHAN CG, SU X, ZHANG J, RADTKE I, PHILLIPS LA, MILLER CB, MA J, LIU W, CHENG C, SCHULMAN BA, HARVEY RC, CHEN IM, CLIFFORD RJ, CARROLL WL, REAMAN G, BOWMAN WP, DEVIDAS M, GERHARD DS, YANG W, RELING MV, SHURTLEFF SA, CAMPANA D, BOROWITZ MJ, PUI CH, SMITH M, HUNGER SP, WILLMAN CL, DOWNING JR; CHILDREN'S ONCOLOGY GROUP. Deletion of *IKZF1* and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**. 2009 Jan 29;360(5):470-80. doi: 10.1056/NEJMoa0808253. Epub 2009 Jan 7. PMID: 19129520; PMCID: PMC2674612.



MULLIGHAN CG, JEHA S, PEI D, PAYNE-TURNER D, COUSTAN-SMITH E, ROBERTS KG, WAANDERS E, CHOI JK, MA X, RAIMONDI SC, FAN Y, YANG W, SONG G, YANG JJ, INABA H, DOWNING JR, LEUNG WH, BOWMAN WP, RELLING MV, EVANS WE, ZHANG J, CAMPANA D, PUI CH. Outcome of children with hypodiploid ALL treated with risk-directed therapy based on MRD levels. **Blood**. 2015 Dec 24;126(26):2896-9. doi: 10.1182/blood-2015-09-671131. Epub 2015 Nov 2. PMID: 26527677; PMCID: PMC4692147.

MULLIGHAN CG. How advanced are we in targeting novel subtypes of ALL? **Best Pract Res Clin Haematol**. 2019 Dec;32(4):101095. doi: 10.1016/j.beha.2019.101095. Epub 2019 Oct 18. PMID: 31779973; PMCID: PMC6927537.

MURPHY KM, LEVIS M, HAFEZ MJ, GEIGER T, COOPER LC, SMITH BD, SMALL D, BERG KD. Detection of *FLT3* internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay. **J Mol Diagn**. May;5(2):96-102. 2003. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60458-8. PMID: 12707374; PMCID: PMC1907323.

NATH UK, MDDM, CHTOPADHYAY D, BAKLIWAL A, VANIYATH S, MD, *et al*. Encouraging Results with ALL IC-BFM 2009 Protocol Therapy in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma in Resource-Limited Setting: A Single-Center Study from India. **Blood**. 2019 Nov 134 (Supplement_1): 5118-5118. doi:10.1182/blood-2019-127985

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Age-Adjusted and Age-Specific SEER Cancer Incidence Rates, 2014–2018. Disponível em: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/results_mERGED/sect_02_childhood_cancer_iccc.pdf (acesso em 18 de abril de 2021).

NATIONAL CANCER INSTITUTE. SEER cancer statistics review, 1975-2015: Leukemia, annual incidence rates (acute lymphocytic leukemia). 2018. Disponível em: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/.

NOWELL PC, HUNGERFORD DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. **J Natl Cancer Inst**. 1960 Jul;25:85-109. PMID: 14427847.

NGUYEN HTK, TERAOKA MA, GREEN DM, PUI CH, INABA H. Testicular involvement of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: Diagnosis, biology, and management. **Cancer**. 2021 Sep 1;127(17):3067-3081. doi: 10.1002/cncr.33609. Epub 2021 May 25. PMID: 34031876; PMCID: PMC9677247.



ODERO MD, CARLSON K, CALASANZ MJ, LAHORTIGA I, CHINWALLA V, ROWLEY JD. Identification of new translocations involving ETV6 in hematologic malignancies by fluorescence in situ hybridization and spectral karyotyping. **Genes Chromosomes Cancer**. 2001 Jun;31(2):134-42. doi: 10.1002/gcc.1127. PMID: 11319801.

OMAR AA, BASIOUNY L, ELNOBY AS, ZAKI A, ABOUZID M. St. Jude Total Therapy studies from I to XVII for childhood acute lymphoblastic leukemia: a brief review. **J Egypt Natl Canc Inst**. 2022 Jun 13;34(1):25. doi: 10.1186/s43046-022-00126-3. PMID: 35696003.

ONYIJE FM, OLSSON A, BAAKEN D, ERDMANN F, STANULLA M, WOLLSCHLÄGER D, SCHÜZ J. Environmental Risk Factors for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: An Umbrella Review. **Cancers (Basel)**. Jan 13;14(2):382, 2022. doi: 10.3390/cancers14020382. PMID: 35053543; PMCID: PMC8773598.

OSKARSSON T, SÖDERHÄLL S, ARVIDSON J, FORESTIER E, MONTGOMERY S, BOTTAI M, LAUSEN B, CARLSEN N, HELLEBOSTAD M, LÄHTEENMÄKI P, SAARINEN-PIHKALA UM, JÓNSSON ÓG, HEYMAN M; NORDIC SOCIETY OF PAEDIATRIC HAEMATOLOGY AND ONCOLOGY (NOPHO) ALL RELAPSE WORKING GROUP. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia in the Nordic countries: prognostic factors, treatment and outcome. **Haematologica**. 2016 Jan;101(1):68-76. doi: 10.3324/haematol.2015.131680. Epub 2015 Oct 22. PMID: 26494838; PMCID: PMC4697893.

OU Z, SHERER M, CASEY J, BAKOS HA, VITULLO K, HU J, FRIEHLING E, GOLLIN SM, SURTI U, YATSENKO SA. The Genomic Landscape of PAX5, IKZF1, and CDKN2A/B Alterations in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cytogenet Genome Res**. 2016;150(3-4):242-252. doi: 10.1159/000456572. Epub 2017 Feb 18. PMID: 28214896.

ÖZDEMİR ZC, KAR YD, TURHAN AB, BÖR O. Assessment of Hematological Toxicity in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia, Receiving Treatment with ALL IC-BFM 2009 Protocol. **Open Access Library Journal**, Vol.4 No.8, 2017. DOI: 10.4236/oalib.1103807

PAGLIARO L, CHEN SJ, HERRANZ D, MECUCCI C, HARRISON CJ, MULLIGHAN CG, ZHANG M, CHEN Z, BOISSEL N, WINTER SS, ROTI G. Acute lymphoblastic leukaemia. **Nat Rev Dis Primers**. 2024 Jun 13;10(1):41. doi: 10.1038/s41572-024-00525-x. PMID: 38871740.



PANG L, LIANG Y, PAN J, WANG JR, CHAI YH, ZHAO WL. Clinical features and prognostic significance of *TCF3-PBX1* fusion gene in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia by using a modified ALL-BFM-95 protocol. **Pediatr Hematol Oncol**. 2015 Apr;32(3):173-81. doi: 10.3109/08880018.2014.983625. Epub 2014 Dec 31. PMID: 25551271.

PAULSSON K, JOHANSSON B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**. 2009 Aug;48(8):637-60. doi: 10.1002/gcc.20671. PMID: 19415723.

PEDROSA F, COUSTAN-SMITH E, ZHOU Y, CHENG C, PEDROSA A, LINS MM, PEDROSA M, LUCENA-SILVA N, RAMOS AML, VINHAS E, RIVERA GK, CAMPANA D, RIBEIRO RC. Reduced-dose intensity therapy for pediatric lymphoblastic leukemia: long-term results of the Recife RELLA05 pilot study. *Blood*. 2020 Apr 23;135(17):1458-1466. doi: 10.1182/blood.2019004215. PMID: 32027741; PMCID: PMC7180080.

PIETERS R, DE GROOT-KRUSEMAN H, VAN DER VELDEN V, FIOCCO M, VAN DEN BERG H, DE BONT E, EGELER RM, HOOGERBRUGGE P, KASPERS G, VAN DER SCHOOT E, DE HAAS V, VAN DONGEN J. Successful Therapy Reduction and Intensification for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Based on Minimal Residual Disease Monitoring: Study ALL10 From the Dutch Childhood Oncology Group. **J Clin Oncol**. 2016 Aug 1;34(22):2591-601. doi: 10.1200/JCO.2015.64.6364. Epub 2016 Jun 6. PMID: 27269950.

PIETERS R, MULLIGHAN CG, HUNGER SP. Advancing Diagnostics and Therapy to Reach Universal Cure in Childhood ALL. **J Clin Oncol**. 2023 Dec 20;41(36):5579-5591. doi: 10.1200/JCO.23.01286. Epub 2023 Oct 11. PMID: 37820294; PMCID: PMC10730082.

PILLER G. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. **Br J Haematol**. 2001 Feb;112(2):282-92. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.02411.x. PMID: 11167820.

PINKEL D. Five-year follow-up of "total therapy" of childhood lymphocytic leukemia. **JAMA**. 1971 Apr 26;216(4):648-52. PMID: 5279904.

PIZZO PA; POPLACK DG. **Principles and Practice of Pediatric Oncology**. 7a edição. Lippincott Williams & Wilkins (LWW). 2015



PŁOTKA A, LEWANDOWSKI K. *BCR/ABL1*-Like Acute Lymphoblastic Leukemia: From Diagnostic Approaches to Molecularly Targeted Therapy. **Acta Haematol.** 2022;145(2):122-131. doi: 10.1159/000519782. Epub 2021 Nov 24. PMID: 34818644.

POLLARD JA, ALONZO TA, GERBING R, BROWN P, FOX E, CHOI J, FISHER B, HIRSCH B, KAHWASH S, GETZ K, LEVINE J, BRODERSEN LE, LOKEN MR, RAIMONDI S, TARLOCK K, WOOD A, SUNG L, KOLB EA, GAMIS A, MESHINCHI S, APLENC R. Sorafenib in Combination With Standard Chemotherapy for Children With High Allelic Ratio *FLT3*/ITD+ Acute Myeloid Leukemia: A Report From the Children's Oncology Group Protocol AAML1031. **J Clin Oncol.** 2022 Jun 20;40(18):2023-2035. doi: 10.1200/JCO.21.01612. Epub 2022 Mar 29. PMID: 35349331; PMCID: PMC9197362.

POUBEL CP, MANSUR MB, BORONI M, EMERENCIANO M. *FLT3* overexpression in acute leukaemias: New insights into the search for molecular mechanisms. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer.** 2019 Aug;1872(1):80-88. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.06.001. Epub 2019 Jun 12. PMID: 31201827.

Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda da Criança e do Adolescente GBTLI LLA - Estudo 2021

PRUCKER C, ATTARBASCHI A, PETERS C, DWORZAK MN, PÖTSCHGER U, URBAN C, FINK FM, MEISTER B, SCHMITT K, HAAS OA, GADNER H, MANN G; AUSTRIAN BERLIN-FRANKFURT-MÜNSTER (BFM) STUDY GROUP. Induction death and treatment-related mortality in first remission of children with acute lymphoblastic leukemia: a population-based analysis of the Austrian Berlin-Frankfurt-Münster study group. **Leukemia.** 2009 Jul;23(7):1264-9. doi: 10.1038/leu.2009.12. Epub 2009 Feb 12. PMID: 19212332.

PUI CH, RAIMONDI SC, WILLIAMS DL. Isochromosome 17q in childhood acute lymphoblastic leukemia: an adverse cytogenetic feature in association with hyperdiploidy? **Leukemia.** 1988 Apr;2(4):222-5. PMID: 3163078.

PUI CH, EVANS WE. Acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med.** 1998 Aug 27;339(9):605-15. doi: 10.1056/NEJM199808273390907. PMID: 9718381.

PUI CH, BOYETT JM, RIVERA GK, HANCOCK ML, SANDLUND JT, RIBEIRO RC, RUBNITZ JE, BEHM FG, RAIMONDI SC, GAJJAR A, RAZZOUK B, CAMPANA D, KUN LE, RELLING MV, EVANS WE. Long-term results of Total Therapy studies 11, 12 and 13A for childhood acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. **Leukemia.** 2000 Dec;14(12):2286-94. doi: 10.1038/sj.leu.2401938. PMID: 11187920.



PUI CH, SCHRAPPE M, MASERA G, NACHMAN J, GADNER H, EDEN OB, EVANS WE, GAYNON P; PONTE DI LEGNO WORKING GROUP. Ponte di Legno Working Group: statement on the right of children with leukemia to have full access to essential treatment and report on the Sixth International Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Workshop. **Leukemia**. 2004 Jun;18(6):1043-53. doi: 10.1038/sj.leu.2403365. PMID: 15085155.

PUI CH, HOWARD SC. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. **Lancet Oncol**. 2008 Mar;9(3):257-68. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70070-6. PMID: 18308251.

PUI CH, CAMPANA D, PEI D, BOWMAN WP, SANDLUND JT, KASTE SC, RIBEIRO RC, RUBNITZ JE, RAIMONDI SC, ONCIU M, COUSTAN-SMITH E, KUN LE, JEHA S, CHENG C, HOWARD SC, SIMMONS V, BAYLES A, METZGER ML, BOYETT JM, LEUNG W, HANDGRETINGER R, DOWNING JR, EVANS WE, RELLING MV. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. **N Engl J Med**. 2009 Jun 25;360(26):2730-41. doi: 10.1056/NEJMoa0900386. PMID: 19553647; PMCID: PMC2754320.

PUI CH, EVANS WE. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. **Semin Hematol**. 2013 Jul;50(3):185-96. doi: 10.1053/j.seminhematol.2013.06.007. PMID: 23953334; PMCID: PMC3771494.

PUI CH, PEI D, COUSTAN-SMITH E, JEHA S, CHENG C, BOWMAN WP, SANDLUND JT, RIBEIRO RC, RUBNITZ JE, INABA H, BHOJWANI D, GRUBER TA, LEUNG WH, DOWNING JR, EVANS WE, RELLING MV, CAMPANA D. Clinical utility of sequential minimal residual disease measurements in the context of risk-based therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prospective study. **Lancet Oncol**. 2015 Apr;16(4):465-74. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70082-3. Epub 2015 Mar 20. PMID: 25800893; PMCID: PMC4612585.

PUI CH, YANG JJ, BHAKTA N, RODRIGUEZ-GALINDO C. Global efforts toward the cure of childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet Child Adolesc Health**. 2018 Jun;2(6):440-454. doi: 10.1016/S2352-4642(18)30066-X. Epub 2018 Mar 30. Erratum in: *Lancet Child Adolesc Health*. 2018 Nov;2(11):e25. doi: 10.1016/S2352-4642(18)30316-X. PMID: 30169285; PMCID: PMC6467529.

PUI CH, REBORA P, SCHRAPPE M, ATTARBASCHI A, BARUCHEL A, BASSO G, CAVÉ H, ELITZUR S, KOH K, LIU HC, PAULSSON K, PIETERS R, SILVERMAN LB, STARY J, VORA A, YEOH A, HARRISON CJ, VALSECCHI MG; PONTE DI LEGNO CHILDHOOD ALL WORKING GROUP. Outcome of Children With Hypodiploid Acute Lymphoblastic Leukemia: A Retrospective Multinational Study. **J Clin Oncol**. 2019 Apr 1;37(10):770-779. doi: 10.1200/JCO.18.00822. Epub 2019 Jan 18. PMID: 30657737; PMCID: PMC7051863.



PUI CH. Precision medicine in acute lymphoblastic leukemia. **Front Med.** Dec;14(6):689-700. 2020. doi: 10.1007/s11684-020-0759-8. Epub 2020 Oct 19. PMID: 33074527; PMCID: PMC9671279.

QIN YZ, JIANG Q, XU LP, WANG Y, JIANG H, DAO FT, CHEN WM, ZHAO XS, LIU YR, ZHANG XH, LIU KY, HUANG XJ. The Prognostic Significance of ZNF384 Fusions in Adult Ph-Negative B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: A Comprehensive Cohort Study From a Single Chinese Center. **Front Oncol.** 2021 Mar 17;11:632532. doi: 10.3389/fonc.2021.632532. PMID: 33816270; PMCID: PMC8010301.

RADU LE, COLITA A, PASCA S, TOMULEASA C, POPA C, SERBAN C, GHEORGHE A, SERBANICA A, JERCAN C, MARCU A, BICA A, TEODORESCU P, CONSTANTINESCU C, PETRUSHEV B, ASAN M, JARDAN C, DRAGOMIR M, TANASE A, COLITA A. Day 15 and Day 33 Minimal Residual Disease Assessment for Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Treated According to the BFM ALL IC 2009 Protocol: Single-Center Experience of 133 Cases. **Front Oncol.** 2020 Jun 30;10:923. doi: 10.3389/fonc.2020.00923. PMID: 32695667; PMCID: PMC7338564.

RAETZ EA, TEACHEY DT. T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program.** 2016 Dec 2;2016(1):580-588. doi: 10.1182/asheducation-2016.1.580. PMID: 27913532; PMCID: PMC6142501.

RAMADHAN MH, SARI NM, PERYOGA SU, SUSANAH S. Survival and Treatment Outcomes of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in a Low-Middle Income Country: A Single-Center Experience in West Java, Indonesia. **J Blood Med.** 2024 Feb 19;15:77-85. doi: 10.2147/JBM.S438042. PMID: 38405084; PMCID: PMC10887884.

RAMOS-MUNTADA M, TRINCADO JL, BLANCO J, BUENO C, RODRÍGUEZ-CORTEZ VC, BATALLER A, LÓPEZ-MILLÁN B, SCHWAB C, ORTEGA M, VELASCO P, BLANCO ML, NOMDEDEU J, RAMÍREZ-ORELLANA M, MINGUELA A, FUSTER JL, CUATRECASAS E, CAMÓS M, BALLERINI P, ESCHERICH G, BOER J, DENBOER M, HERNÁNDEZ-RIVAS JM, CALASANZ MJ, CAZZANIGA G, HARRISON CJ, MENÉNDEZ P, MOLINA O. Clonal heterogeneity and rates of specific chromosome gains are risk predictors in childhood high-hyperdiploid B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Mol Oncol.** 2022 Aug;16(16):2899-2919. doi: 10.1002/1878-0261.13276. Epub 2022 Jul 19. PMID: 35726693; PMCID: PMC9394234.

REITER A, SCHRAPPE M, LUDWIG WD, HIDDEMANN W, SAUTER S, HENZE G, ZIMMERMANN M, LAMPERT F, HAVERS W, NIETHAMMER D, *et al.* Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. **Blood.** 1994 Nov 1;84(9):3122-33. PMID: 7949185.



RIBEIRO KB, BUFFLER PA, METAYER C. Socioeconomic status and childhood acute lymphocytic leukemia incidence in São Paulo, Brazil. **Int J Cancer**. 2008 Oct 15;123(8):1907-12. doi: 10.1002/ijc.23738. PMID: 18688860.

RIBEIRO RC, ANTILLON F, PEDROSA F, PUI CH. Global Pediatric Oncology: Lessons From Partnerships Between High-Income Countries and Low- to Mid-Income Countries. **J Clin Oncol**. 2016 Jan 1;34(1):53-61. doi: 10.1200/JCO.2015.61.9148. Epub 2015 Nov 17. PMID: 26578620; PMCID: PMC4980571.

RIBERA JM, ORIOL A, MORGADES M, MONTESINOS P, SARRÀ J, GONZÁLEZ-CAMPOS J, BRUNET S, TORMO M, FERNÁNDEZ-ABELLÁN P, GUÀRDIA R, BERNAL MT, ESTEVE J, BARBA P, MORENO MJ, BERMÚDEZ A, CLADERA A, ESCODA L, GARCÍA-BOYERO R, DEL POTRO E, BERGUA J, AMIGO ML, GRANDE C, RABUÑAL MJ, HERNÁNDEZ-RIVAS JM, FELIU E. Treatment of high-risk Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in adolescents and adults according to early cytologic response and minimal residual disease after consolidation assessed by flow cytometry: final results of the PETHEMA ALL-AR-03 trial. **J Clin Oncol**. 2014 May 20;32(15):1595-604. doi: 10.1200/JCO.2013.52.2425. Epub 2014 Apr 21. PMID: 24752047.

RIEHM H, REITER A, SCHRAPPE M, BERTHOLD F, DOPFER R, GEREIN V, LUDWIG R, RITTER J, STOLLMANN B, HENZE G. Die Corticosteroid-abhängige Dezimierung der Leukämiezellzahl im Blut als Prognosefaktor bei der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter (Therapiestudie ALL-BFM 83) [Corticosteroid-dependent reduction of leukocyte count in blood as a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia in childhood (therapy study ALL-BFM 83)]. **Klin Padiatr**. 1987 May-Jun;199(3):151-60. German. doi: 10.1055/s-2008-1026781. PMID: 3306129.

RIES LAG, SMITH MA, GURNEY JG, LINET M, TAMRA T, YOUNG JL, BUNIN GR. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995. **National Cancer Institute, SEER Program**. NIH Pub. No. 99-4649. Bethesda, MD, 1999.



ROBERTS KG, MORIN RD, ZHANG J, HIRST M, ZHAO Y, SU X, CHEN SC, PAYNE-TURNER D, CHURCHMAN ML, HARVEY RC, CHEN X, KASAP C, YAN C, BECKSFORT J, FINNEY RP, TEACHEY DT, MAUDE SL, TSE K, MOORE R, JONES S, MUNGALL K, BIROL I, EDMONSON MN, HU Y, BUETOW KE, CHEN IM, CARROLL WL, WEI L, MA J, KLEPPE M, LEVINE RL, GARCIA-MANERO G, LARSEN E, SHAH NP, DEVIDAS M, REAMAN G, SMITH M, PAUGH SW, EVANS WE, GRUPP SA, JEHA S, PUI CH, GERHARD DS, DOWNING JR, WILLMAN CL, LOH M, HUNGER SP, MARRA MA, MULLIGHAN CG. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Cell**. 2012 Aug 14;22(2):153-66. doi: 10.1016/j.ccr.2012.06.005. PMID: 22897847; PMCID: PMC3422513.

ROBERTS KG, LI Y, PAYNE-TURNER D, HARVEY RC, YANG YL, PEI D, MCCAUSTLAIN K, DING L, LU C, SONG G, MA J, BECKSFORT J, RUSCH M, CHEN SC, EASTON J, CHENG J, BOGGS K, SANTIAGO-MORALES N, IACOBUCCI I, FULTON RS, WEN J, VALENTINE M, CHENG C, PAUGH SW, DEVIDAS M, CHEN IM, RESHMI S, SMITH A, HEDLUND E, GUPTA P, NAGAHAWATTE P, WU G, CHEN X, YERGEAU D, VADODARIA B, MULDER H, WINICK NJ, LARSEN EC, CARROLL WL, HEEREMA NA, CARROLL AJ, GRAYSON G, TASIAN SK, MOORE AS, KELLER F, FREI-JONES M, WHITLOCK JA, RAETZ EA, WHITE DL, HUGHES TP, GUIDRY AUVIL JM, SMITH MA, MARCUCCI G, BLOOMFIELD CD, MRÓZEK K, KOHLSCHMIDT J, STOCK W, KORNBLAU SM, KONOPLEVA M, PAIETTA E, PUI CH, JEHA S, RELLING MV, EVANS WE, GERHARD DS, GASTIER-FOSTER JM, MARDIS E, WILSON RK, LOH ML, DOWNING JR, HUNGER SP, WILLMAN CL, ZHANG J, MULLIGHAN CG. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**. 2014 Sep 11;371(11):1005-15. doi: 10.1056/NEJMoa1403088. PMID: 25207766; PMCID: PMC4191900.

ROBERTS KG, RESHMI SC, HARVEY RC, CHEN IM, PATEL K, STONEROCK E, JENKINS H, DAI Y, VALENTINE M, GU Z, ZHAO Y, ZHANG J, PAYNE-TURNER D, DEVIDAS M, HEEREMA NA, CARROLL AJ, RAETZ EA, BOROWITZ MJ, WOOD BL, MATTANO LA JR, MALONEY KW, CARROLL WL, LOH ML, WILLMAN CL, GASTIER-FOSTER JM, MULLIGHAN CG, HUNGER SP. Genomic and outcome analyses of Ph-like ALL in NCI standard-risk patients: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 2018 Aug 23;132(8):815-824. doi: 10.1182/blood-2018-04-841676. Epub 2018 Jul 11. PMID: 29997224; PMCID: PMC6107876.

ROCHA JMC, MURAO M, CANCELA CSP, DE OLIVEIRA LP, PERIM LP, SANTOS JP, DE OLIVEIRA BM. Comparative analysis between cytomorphology and flow cytometry methods in central nervous system infiltration assessment in oncohematological patients. **Hematol Transfus Cell Ther**. 2023 Apr-Jun;45(2):188-195. doi: 10.1016/j.htct.2021.09.016. Epub 2021 Dec 14. PMID: 34949559; PMCID: PMC10244250.



RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ G, HAUER J, MARTÍN-LORENZO A, SCHÄFER D, BARTENHAGEN C, GARCÍA-RAMÍREZ I, AUER F, GONZÁLEZ-HERRERO I, RUIZ-ROCA L, GOMBERT M, OKPANYI V, FISCHER U, CHEN C, DUGAS M, BHATIA S, LINKA RM, GARCIA-SUQUIA M, RASCÓN-TRINCADO MV, GARCIA-SANCHEZ A, BLANCO O, GARCÍA-CENADOR MB, GARCÍA-CRIADO FJ, COBALEDA C, ALONSO-LÓPEZ D, DE LAS RIVAS J, MÜSCHEN M, VICENTE-DUEÑAS C, SÁNCHEZ-GARCÍA I, BORKHARDT A. Infection Exposure Promotes *ETV6-RUNX1* Precursor B-cell Leukemia via Impaired H3K4 Demethylases. **Cancer Res.** 2017 Aug 15;77(16):4365-4377. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0701. Epub 2017 Jun 19. PMID: 28630052.

ROSNET O, BIRNBAUM D. Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. **Crit Rev Oncog.** 1993;4(6):595-613. PMID: 7506935.

ROWLEY JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature.** 1973 Jun 1;243(5405):290-3. doi: 10.1038/243290a0. PMID: 4126434.

SALLAN SE, HITCHCOCK-BRYAN S, GELBER R, CASSADY JR, FREI E 3RD, NATHAN DG. Influence of intensive asparaginase in the treatment of childhood non-T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Res.** 1983 Nov;43(11):5601-7. PMID: 6352020.

SCHÄFER D, OLSEN M, LÄHNEMANN D, STANULLA M, SLANY R, SCHMIEGELOW K, BORKHARDT A, FISCHER U. Five percent of healthy newborns have an *ETV6-RUNX1* fusion as revealed by DNA-based GIPFEL screening. **Blood.** 2018 Feb 15;131(7):821-826. doi: 10.1182/blood-2017-09-808402. Epub 2018 Jan 8. PMID: 29311095; PMCID: PMC5909885.

SCHIECK M, LENTES J, THOMAY K, HOFMANN W, BEHRENS YL, HAGEDORN M, EBERSOLD J, DAVENPORT CF, FAZIO G, MÖRICKE A, BUCHMANN S, ALTEN J, CARIO G, SCHRAPPE M, BERGMANN AK, STANULLA M, STEINEMANN D, SCHLEGELBERGER B, CAZZANIGA G, GÖHRING G. Implementation of RNA sequencing and array CGH in the diagnostic workflow of the AIEOP-BFM ALL 2017 trial on acute lymphoblastic leukemia. **Ann Hematol.** 2020 Apr;99(4):809-818. doi: 10.1007/s00277-020-03953-3. Epub 2020 Feb 20. PMID: 32078009; PMCID: PMC7069912.

SCHRAPPE M, REITER A, RIEHM H. Prophylaxis and treatment of neoplastic meningeosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Neurooncol.** 1998 Jun-Jul;38(2-3):159-65. doi: 10.1023/a:1005903414734. PMID: 9696367.



SCHRAPPE M, VALSECCHI MG, BARTRAM CR, SCHRAUDER A, PANZER-GRÜMAYER R, MÖRICKE A, PARASOLE R, ZIMMERMANN M, DWORZAK M, BULDINI B, REITER A, BASSO G, KLINGEBIEL T, MESSINA C, RATEI R, CAZZANIGA G, KOEHLER R, LOCATELLI F, SCHÄFER BW, ARICÒ M, WELTE K, VAN DONGEN JJ, GADNER H, BIONDI A, CONTER V. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. **Blood**. 2011 Aug 25;118(8):2077-84. doi: 10.1182/blood-2011-03-338707. Epub 2011 Jun 30. PMID: 21719599.

SCHRAPPE M, NACHMAN J, HUNGER S, SCHMIEGELOW K, CONTER V, MASERA G, PIETERS R, PUI CH. 'Educational symposium on long-term results of large prospective clinical trials for childhood acute lymphoblastic leukemia (1985-2000)'. **Leukemia**. 2010 Feb;24(2):253-4. doi: 10.1038/leu.2009.276. PMID: 20145664.

SCHRAPPE M, HUNGER SP, PUI CH, SAHA V, GAYNON PS, BARUCHEL A, CONTER V, OTTEN J, OHARA A, VERSLUYS AB, ESCHERICH G, HEYMAN M, SILVERMAN LB, HORIBE K, MANN G, CAMITTA BM, HARBOTT J, RIEHM H, RICHARDS S, DEVIDAS M, ZIMMERMANN M. Outcomes after induction failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**. 2012 Apr 12;366(15):1371-81. doi: 10.1056/NEJMoa1110169. PMID: 22494120; PMCID: PMC3374496.

SCHULTZ KR, BOWMAN WP, ALEDO A, SLAYTON WB, SATHER H, DEVIDAS M, WANG C, DAVIES SM, GAYNON PS, TRIGG M, RUTLEDGE R, BURDEN L, JORSTAD D, CARROLL A, HEEREMA NA, WINICK N, BOROWITZ MJ, HUNGER SP, CARROLL WL, CAMITTA B. Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. **J Clin Oncol**. 2009 Nov 1;27(31):5175-81. doi: 10.1200/JCO.2008.21.2514. Epub 2009 Oct 5. PMID: 19805687; PMCID: PMC2773475.

SCHULTZ KR, CARROLL A, HEEREMA NA, BOWMAN WP, ALEDO A, SLAYTON WB, SATHER H, DEVIDAS M, ZHENG HW, DAVIES SM, GAYNON PS, TRIGG M, RUTLEDGE R, JORSTAD D, WINICK N, BOROWITZ MJ, HUNGER SP, CARROLL WL, CAMITTA B; CHILDREN'S ONCOLOGY GROUP. Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study AALL0031. **Leukemia**. 2014 Jul;28(7):1467-71. doi: 10.1038/leu.2014.30. Epub 2014 Jan 20. PMID: 24441288; PMCID: PMC4282929.



SCHWAB CJ, CHILTON L, MORRISON H, JONES L, AL-SHEHHI H, ERHORN A, RUSSELL LJ, MOORMAN AV, HARRISON CJ. Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: association with cytogenetics and clinical features. **Haematologica**. 2013 Jul;98(7):1081-8. doi: 10.3324/haematol.2013.085175. Epub 2013 Mar 18. PMID: 23508010; PMCID: PMC3696612.

SCHWAB C, CRANSTON RE, RYAN SL, BUTLER E, WINTERMAN E, HAWKING Z, BASHTON M, ENSHAEI A, RUSSELL LJ, KINGSBURY Z, PEDEN JF, BARRETTA E, MURRAY J, GIBSON J, HINCHLIFFE AC, BAIN R, VORA A, BENTLEY DR, ROSS MT, MOORMAN AV, HARRISON CJ. Integrative genomic analysis of childhood acute lymphoblastic leukaemia lacking a genetic biomarker in the UKALL2003 clinical trial. **Leukemia**. 2023 Mar;37(3):529-538. doi: 10.1038/s41375-022-01799-4. Epub 2022 Dec 22. PMID: 36550215; PMCID: PMC9991913.

SCRIDELI CA, ASSUMPÇÃO JG, GANAZZA MA, ARAÚJO M, TOLEDO SR, LEE ML, DELBUONO E, PETRILLI AS, QUEIRÓZ RP, BIONDI A, VIANA MB, YUNES JA, BRANDALISE SR, TONE LG. A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. **Haematologica**. 2009 Jun;94(6):781-9. doi: 10.3324/haematol.2008.003137. PMID: 19483156; PMCID: PMC2688569.

SEABRIGHT M. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet**. 1971 Oct 30;2(7731):971-2. doi: 10.1016/s0140-6736(71)90287-x. PMID: 4107917.

SCHWARTZ MS, MUFFLY LS. Predicting relapse in acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma**. 2024 Aug 31:1-7. doi: 10.1080/10428194.2024.2387728. Epub ahead of print. PMID: 39216505.

SHEN S, CHEN X, CAI J, YU J, GAO J, HU S, ZHAI X, LIANG C, JU X, JIANG H, JIN R, WU X, WANG N, TIAN X, PAN K, JIANG H, SUN L, FANG Y, LI CK, HU Q, YANG M, ZHU Y, ZHANG H, LI C, PEI D, JEHA S, YANG JJ, CHENG C, TANG J, ZHU X, PUI CH. Effect of Dasatinib vs Imatinib in the Treatment of Pediatric Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Clinical Trial. **JAMA Oncol**. 2020 Mar 1;6(3):358-366. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.5868. PMID: 31944221; PMCID: PMC6990720.

SIDDIQUE HR, RAO VN, LEE L, REDDY ES. Characterization of the DNA binding and transcriptional activation domains of the erg protein. **Oncogene**. 1993 Jul;8(7):1751-5. PMID: 8510921.

SIDHU J, GOGOI MP, KRISHNAN S, SAHA V. Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia. **Indian J Pediatr**. 2024 Feb;91(2):158-167. doi: 10.1007/s12098-023-04635-4. Epub 2023 Jun 21. PMID: 37341952; PMCID: PMC10791726.



SMITH M, ARTHUR D, CAMITTA B, CARROLL AJ, CRIST W, GAYNON P, GELBER R, HEEREMA N, KORN EL, LINK M, MURPHY S, PUI CH, PULLEN J, REAMON G, SALLAN SE, SATHER H, SHUSTER J, SIMON R, TRIGG M, TUBERGEN D, UCKUN F, UNGERLEIDER R. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**. 1996 Jan;14(1):18-24. doi: 10.1200/JCO.1996.14.1.18. PMID: 8558195.

SILVA FFD, LATORRE MDRDO. Sobrevida das leucemias linfoides agudas em crianças no Município de São Paulo, Brasil [Survival from acute lymphocytic leukemia in children in the city of São Paulo, Brazil]. **Cad Saude Publica**. 2020 Mar 23;36(3):e00008019. Portuguese. doi: 10.1590/0102-311X00008019. PMID: 32215509.

SILVA RAM, DE MENDONÇA RMH, DOS SANTOS AGUIAR S, YAJIMA JC, MARSON FAL, BRANDALISE SR, LEVY CE. Induction therapy for acute lymphoblastic leukemia: incidence and risk factors for bloodstream infections. **Support Care Cancer**. 2022 Jan;30(1):695-702. doi: 10.1007/s00520-021-06471-8. Epub 2021 Aug 7. PMID: 34363492.

SLAYTON WB, SCHULTZ KR, SILVERMAN LB, HUNGER SP. How we approach Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in children and young adults. **Pediatr Blood Cancer**. 2020 Oct;67(10):e28543. doi: 10.1002/pbc.28543. Epub 2020 Aug 11. PMID: 32779849.

SLAYTON WB, SCHULTZ KR, KAIRALLA JA, DEVIDAS M, MI X, PULSIPHER MA, CHANG BH, MULLIGHAN C, IACOBUCCI I, SILVERMAN LB, BOROWITZ MJ, CARROLL AJ, HEEREMA NA, GASTIER-FOSTER JM, WOOD BL, MIZRAHY SL, MERCHANT T, BROWN VI, SIEGER L, SIEGEL MJ, RAETZ EA, WINICK NJ, LOH ML, CARROLL WL, HUNGER SP. Dasatinib Plus Intensive Chemotherapy in Children, Adolescents, and Young Adults With Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of Children's Oncology Group Trial AALL0622. **J Clin Oncol**. 2018 Aug 1;36(22):2306-2314. doi: 10.1200/JCO.2017.76.7228. Epub 2018 May 29. PMID: 29812996; PMCID: PMC6067800.

SMITH M, ARTHUR D, CAMITTA B, CARROLL AJ, CRIST W, GAYNON P, GELBER R, HEEREMA N, KORN EL, LINK M, MURPHY S, PUI CH, PULLEN J, REAMON G, SALLAN SE, SATHER H, SHUSTER J, SIMON R, TRIGG M, TUBERGEN D, UCKUN F, UNGERLEIDER R. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**. 1996 Jan;14(1):18-24. doi: 10.1200/JCO.1996.14.1.18. PMID: 8558195.



SPECK NA, GILLILAND DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. **Nat Rev Cancer**. 2002 Jul;2(7):502-13. doi: 10.1038/nrc840. PMID: 12094236.

STACKELBERG AV, BOURQUIN JP, M, TAMAS REVESZ T, ATTARBASCHI A, FERSTER A, SRAMKOVA L, et al. Lymphoblastic Leukemia, while Maintaining Comparable Efficacy in Patients with Bone Marrow Relapse. Results of the Multi-National, Multi-Center Trial IntReALL SR 2010. **Blood** 140 (Supplement 1): 3247–3249. 2022

STAM RW, SCHNEIDER P, DE LORENZO P, VALSECCHI MG, DEN BOER ML, PIETERS R. Prognostic significance of high-level *FLT3* expression in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. **Blood**. 2007 Oct 1;110(7):2774-5. doi: 10.1182/blood-2007-05-091934. PMID: 17881645.

STANULLA M, DAGDAN E, ZALIOVA M, MÖRICKE A, PALMI C, CAZZANIGA G, ECKERT C, TE KRONNIE G, BOURQUIN JP, BORNHAUSER B, KOEHLER R, BARTRAM CR, LUDWIG WD, BLECKMANN K, GROENEVELD-KRENTZ S, SCHEWE D, JUNK SV, HINZE L, KLEIN N, KRATZ CP, BIONDI A, BORKHARDT A, KULOZIK A, MUCKENTHALER MU, BASSO G, VALSECCHI MG, IZRAELI S, PETERSEN BS, FRANKE A, DÖRGE P, STEINEMANN D, HAAS OA, PANZER-GRÜMAYER R, CAVÉ H, HOULSTON RS, CARIO G, SCHRAPPE M, ZIMMERMANN M; TRANSCALL CONSORTIUM; INTERNATIONAL BFM STUDY GROUP. *IKZF1*^{plus} Defines a New Minimal Residual Disease-Dependent Very-Poor Prognostic Profile in Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. **J Clin Oncol**. 2018 Apr 20;36(12):1240-1249. doi: 10.1200/JCO.2017.74.3617. Epub 2018 Mar 2. PMID: 29498923.

STANULLA M, CAVÉ H, MOORMAN AV. *IKZF1* deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia: still a poor prognostic marker? **Blood**. 2020 Jan 23;135(4):252-260. doi: 10.1182/blood.2019000813. PMID: 31821407; PMCID: PMC7019035.

STARY J, ZIMMERMANN M, CAMPBELL M, CASTILLO L, DIBAR E, DONSKA S, GONZALEZ A, IZRAELI S, JANIC D, JAZBEC J, KONJA J, KAISEROVA E, KOWALCZYK J, KOVACS G, LI CK, MAGYAROSY E, POPA A, STARK B, JABALI Y, TRKA J, HRUSAK O, RIEHM H, MASERA G, SCHRAPPE M. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. **J Clin Oncol**. 2014 Jan 20;32(3):174-84. doi: 10.1200/JCO.2013.48.6522. Epub 2013 Dec 16. PMID: 24344215.



STELIAROVA-FOUCHER E, COLOMBET M, RIES LAG, MORENO F, DOLYA A, BRAY F, HESSELING P, SHIN HY, STILLER CA; IICC-3 CONTRIBUTORS. International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. **Lancet Oncology**. 2017 Jun;18(6):719-731. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30186-9. Epub 2017 Apr 11. Erratum in: *Lancet Oncol*. 2017 Jun;18(6):e301. PMID: 28410997; PMCID: PMC5461370.

STILLER CA. Epidemiology and genetics of childhood cancer. **Oncogene**. 2004 Aug 23;23(38):6429-44. doi: 10.1038/sj.onc.1207717. PMID: 15322515.

SULLIVAN MP, CHEN T, DYMENT PG, HVIZDALA E, STEUBER CP. Equivalence of intrathecal chemotherapy and radiotherapy as central nervous system prophylaxis in children with acute lymphatic leukemia: a pediatric oncology group study. **Blood**. 1982 Oct;60(4):948-58. PMID: 6956376.

SUTCLIFFE MJ, SHUSTER JJ, SATHER HN, CAMITTA BM, PULLEN J, SCHULTZ KR, BOROWITZ MJ, GAYNON PS, CARROLL AJ, HEEREMA NA. High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative. **Leukemia**. 2005 May;19(5):734-40. doi: 10.1038/sj.leu.2403673. PMID: 15789069.

TALLEN G, RATEI R, MANN G, KASPERS G, NIGGLI F, KARACHUNSKY A, EBELL W, ESCHERICH G, SCHRAPPE M, KLINGEBIEL T, FENGLER R, HENZE G, VON STACKELBERG A. Long-term outcome in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia after time-point and site-of-relapse stratification and intensified short-course multidrug chemotherapy: results of trial ALL-REZ BFM 90. **J Clin Oncol**. 2010 May 10;28(14):2339-47. doi: 10.1200/JCO.2009.25.1983. Epub 2010 Apr 12. PMID: 20385996.

TANASI I, BA I, SIRVENT N, BRAUN T, CUCCUINI W, BALLERINI P, DUPLOYEZ N, TANGUY-SCHMIDT A, TAMBURINI J, MAURY S, DORÉ E, HIMBERLIN C, DUCLOS C, CHEVALLIER P, ROUSSELOT P, BONIFACIO M, CAVÉ H, BARUCHEL A, DOMBRET H, SOULIER J, LANDMAN-PARKER J, BOISSEL N, CLAPPIER E. Efficacy of tyrosine kinase inhibitors in Ph-like acute lymphoblastic leukemia harboring ABL-class rearrangements. *Blood*. 2019 Oct 17;134(16):1351-1355. doi: 10.1182/blood.2019001244. PMID: 31434701.

TASIAN SK, LOH ML, HUNGER SP. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. **Blood**. 2017 Nov 9;130(19):2064-2072. doi: 10.1182/blood-2017-06-743252. Epub 2017 Oct 2. PMID: 28972016; PMCID: PMC5680607.



TE LOO DM, KAMPS WA, VAN DER DOES-VAN DEN BERG A, VAN WERING ER, DE GRAAF SS, DUTCH CHILDHOOD ONCOLOGY GROUP. Prognostic significance of blasts in the cerebrospinal fluid without pleiocytosis or a traumatic lumbar puncture in children with acute lymphoblastic leukemia: experience of the Dutch Childhood Oncology Group. **J Clin Oncol.** 2006 May 20;24(15):2332-6. doi: 10.1200/JCO.2005.03.9727. PMID: 16710032.

TEMBHARE PR, NARULA G, KHANKA T, GHOGALE S, CHATTERJEE G, PATKAR NV, PRASAD M, BADRINATH Y, DESHPANDE N, GUDAPATI P, VERMA S, SANYAL M, KUNJACHAN F, MANGANG G, GUJRAL S, BANAVALI S, SUBRAMANIAN PG. Post-induction Measurable Residual Disease Using Multicolor Flow Cytometry Is Strongly Predictive of Inferior Clinical Outcome in the Real-Life Management of Childhood T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Study of 256 Patients. **Front Oncol.** 2020 Apr 24;10:577. doi: 10.3389/fonc.2020.00577. PMID: 32391267; PMCID: PMC7193086.

THEUNISSEN P, MEJSTRIKOVA E, SEDEK L, VAN DER SLUIJS-GELLING AJ, GAIPA G, BARTELS M, SOBRAL DA COSTA E, KOTROVÁ M, NOVAKOVA M, SONNEVELD E, BURACCHI C, BONACCORSO P, OLIVEIRA E, TE MARVELDE JG, SZCZEPANSKI T, LHERMITTE L, HRUSAK O, LECREVISSE Q, GRIGORE GE, FROŇKOVÁ E, TRKA J, BRÜGGEMANN M, ORFAO A, VAN DONGEN JJ, VAN DER VELDEN VH; EUROFLOW CONSORTIUM. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood.** 2017 Jan 19;129(3):347-357. doi: 10.1182/blood-2016-07-726307. Epub 2016 Nov 30. PMID: 27903527; PMCID: PMC5291958.

TOPP MS, GÖKBUGET N, STEIN AS, ZUGMAIER G, O'BRIEN S, BARGOU RC, DOMBRET H, FIELDING AK, HEFFNER L, LARSON RA, NEUMANN S, FOÀ R, LITZOW M, RIBERA JM, RAMBALDI A, SCHILLER G, BRÜGGEMANN M, HORST HA, HOLLAND C, JIA C, MANIAR T, HUBER B, NAGORSEN D, FORMAN SJ, KANTARJIAN HM. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. **Lancet Oncol.** 2015 Jan;16(1):57-66. doi: 10.1016/S1470-2045(14)71170-2. Epub 2014 Dec 16. Erratum in: *Lancet Oncol.* 2015 Apr;16(4):e158. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70154-3. PMID: 25524800.

TORRES-FLORES J, ESPINOZA-ZAMORA R, GARCIA-MENDEZ J, CERVERA-CEBALLOS E, SOSA-ESPINOZA A, ZAPATA-CANTO N. Treatment-Related Mortality From Infectious Complications in an Acute Leukemia Clinic. **J Hematol.** 2020 Dec;9(4):123-131. doi: 10.14740/jh751. Epub 2020 Nov 6. PMID: 33224392; PMCID: PMC7665858.



TRAN TH, TASIAN SK. Clinical screening for Ph-like ALL and the developing role of TKIs. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. 2022 Dec 9;2022(1):594-602. doi: 10.1182/hematology.2022000357. PMID: 36485164; PMCID: PMC9821133.

VAN DER VELDEN VH, JACOBS DC, WIJKHUIJS AJ, COMANS-BITTER WM, WILLEMSE MJ, HÄHLEN K, KAMPS WA, VAN WERING ER, VAN DONGEN JJ. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), but not in precursor-B-ALL. **Leukemia**. 2002 Aug;16(8):1432-6. doi: 10.1038/sj.leu.2402636. PMID: 12145681.

VAN DONGEN JJ, MACINTYRE EA, GABERT JA, DELABESSE E, ROSSI V, SAGLIO G, GOTTARDI E, RAMBALDI A, DOTTI G, GRIESINGER F, PARREIRA A, GAMEIRO P, DIÁZ MG, MALEC M, LANGERAK AW, SAN MIGUEL JF, BIONDI A. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. **Leukemia**. 1999 Dec;13(12):1901-28. doi: 10.1038/sj.leu.2401592. PMID: 10602411.

VAN DONGEN JJ, LHERMITTE L, BÖTTCHER S, ALMEIDA J, VAN DER VELDEN VH, FLORES-MONTERO J, RAWSTRON A, ASNAFI V, LÉCREVISSE Q, LUCIO P, MEJSTRIKOVA E, SZCZEPAŃSKI T, KALINA T, DE TUTE R, BRÜGGEMANN M, SEDEK L, CULLEN M, LANGERAK AW, MENDONÇA A, MACINTYRE E, MARTIN-AYUSO M, HRUSAK O, VIDRIALES MB, ORFAO A; EUROFLOW CONSORTIUM (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. **Leukemia**. 2012 Sep;26(9):1908-75. doi: 10.1038/leu.2012.120. Epub 2012 May 3. PMID: 22552007; PMCID: PMC3437410.

VARDIMAN JW, THIELE J, ARBER DA, BRUNNING RD, BOROWITZ MJ, PORWIT A, HARRIS NL, LE BEAU MM, HELLSTRÖM-LINDBERG E, TEFFERI A, BLOOMFIELD CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**. 2009 Jul 30;114(5):937-51. doi: 10.1182/blood-2009-03-209262. Epub 2009 Apr 8. PMID: 19357394.

VERBEEK MWC, VAN DER VELDEN VHJ. The Evolving Landscape of Flowcytometric Minimal Residual Disease Monitoring in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. **Int J Mol Sci**. 2024 Apr 30;25(9):4881. doi: 10.3390/ijms25094881. PMID: 38732101; PMCID: PMC11084622.



VORA A, GOULDEN N, WADE R, MITCHELL C, HANCOCK J, HOUGH R, ROWNTREE C, RICHARDS S. Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): a randomised controlled trial. **Lancet Oncol.** 2013 Mar;14(3):199-209. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70600-9. Epub 2013 Feb 7. PMID: 23395119.

VORA A, GOULDEN N, MITCHELL C, HANCOCK J, HOUGH R, ROWNTREE C, MOORMAN AV, WADE R. Augmented post-remission therapy for a minimal residual disease-defined high-risk subgroup of children and young people with clinical standard-risk and intermediate-risk acute lymphoblastic leukaemia (UKALL 2003): a randomised controlled trial. **Lancet Oncol.** 2014 Jul;15(8):809-18. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70243-8. Epub 2014 Jun 9. PMID: 24924991.

VROOMAN LM, BLONQUIST TM, HARRIS MH, STEVENSON KE, PLACE AE, HUNT SK, O'BRIEN JE, ASSELIN BL, ATHALE UH, CLAVELL LA, COLE PD, KELLY KM, LAVERDIERE C, LECLERC JM, MICHON B, SCHORIN MA, SULIS ML, WELCH JJG, NEUBERG DS, SALLAN SE, SILVERMAN LB. Refining risk classification in childhood B acute lymphoblastic leukemia: results of DFCI ALL Consortium Protocol 05-001. **Blood Adv.** 2018 Jun 26;2(12):1449-1458. doi: 10.1182/bloodadvances.2018016584. PMID: 29941458; PMCID: PMC6020806.

XU H, YANG W, PEREZ-ANDREU V, DEVIDAS M, FAN Y, CHENG C, PEI D, SCHEET P, BURCHARD EG, ENG C, HUNTSMAN S, TORGERSON DG, DEAN M, WINICK NJ, MARTIN PL, CAMITTA BM, BOWMAN WP, WILLMAN CL, CARROLL WL, MULLIGHAN CG, BHOJWANI D, HUNGER SP, PUI CH, EVANS WE, RELLING MV, LOH ML, YANG JJ. Novel susceptibility variants at 10p12.31-12.2 for childhood acute lymphoblastic leukemia in ethnically diverse populations. **J Natl Cancer Inst.** 2013 May 15;105(10):733-42. doi: 10.1093/jnci/djt042. Epub 2013 Mar 19. PMID: 23512250; PMCID: PMC3691938.

YANG M, VESTERLUND M, SIAVELIS I, MOURA-CASTRO LH, CASTOR A, FIORETOS T, JAFARI R, LILLJEBJÖRN H, ODOM DT, OLSSON L, RAVI N, WOODWARD EL, HAREWOOD L, LEHTIÖ J, PAULSSON K. Proteogenomics and Hi-C reveal transcriptional dysregulation in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. **Nat Commun.** 2019 Apr 3;10(1):1519. doi: 10.1038/s41467-019-09469-3. PMID: 30944321; PMCID: PMC6447538.

YEOH AEJ, LU Y, CHIN WHN, CHIEW EKH, LIM EH, LI Z, KHAM SKY, CHAN YH, ABDULLAH WA, LIN HP, CHAN LL, LAM JCM, TAN PL, QUAH TC, TAN AM, ARIFFIN H. Intensifying Treatment of Childhood B-Lymphoblastic Leukemia With IKZF1 Deletion Reduces Relapse and Improves Overall Survival: Results of Malaysia-Singapore ALL 2010 Study. **J Clin Oncol.** 2018 Sep 10;36(26):2726-2735. doi: 10.1200/JCO.2018.78.3050. Epub 2018 Jul 25. PMID: 30044693.



YILDIRIM UM, TEKKESIN F, KOC BS, AYDOGDU S, ASARCIKLI F, KILIC SC. Acute complications observed during intensive chemotherapy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: Single-center experience. **North Clin Istanb.** 2023 Aug 10;10(4):458-469. doi: 10.14744/nci.2022.47600. PMID: 37719261; PMCID: PMC10500240.

YU CH, LIN TK, JOU ST, LIN CY, LIN KH, LU MY, CHEN SH, CHENG CN, WU KH, WANG SC, CHANG HH, LI MJ, NI YL, SU YN, LIN DT, CHEN HY, HARRISON CJ, HUNG CC, LIN SW, YANG YL. MLPA and DNA index improve the molecular diagnosis of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Sci Rep.** 2020 Jul 13;10(1):11501. doi: 10.1038/s41598-020-68311-9. PMID: 32661308; PMCID: PMC7359332.

WANG Y, ZENG HM, ZHANG LP. ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia in China: excellent prognosis with improved BFM protocol. **Ital J Pediatr.** 2018 Aug 16;44(1):94. doi: 10.1186/s13052-018-0541-6. PMID: 30115129; PMCID: PMC6097322.

WANG YZ, QIN YZ, CHANG Y, YUAN XY, CHEN WM, HE LL, HAO L, SHI WH, JIANG Q, JIANG H, HUANG XJ, LIU YR. Immunophenotypic characteristics of ZNF384 rearrangement compared with BCR-ABL1, KMT2A rearrangement, and other adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Cytometry B Clin Cytom.** 2022 Sep;102(5):360-369. doi: 10.1002/cyto.b.22086. Epub 2022 Jun 23. PMID: 35735203.

WEN J, ZHOU M, SHEN Y, LONG Y, GUO Y, SONG L, XIAO J. Poor treatment responses were related to poor outcomes in pediatric B cell acute lymphoblastic leukemia with KMT2A rearrangements. **BMC Cancer.** 2022 Aug 6;22(1):859. doi: 10.1186/s12885-022-09804-w. PMID: 35933338; PMCID: PMC9357304.

WESTON BW, HAYDEN MA, ROBERTS KG, BOWYER S, HSU J, FEDORIW G, RAO KW, MULLIGHAN CG. Tyrosine kinase inhibitor therapy induces remission in a patient with refractory EBF1-PDGFRB-positive acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol.** 2013 Sep 1;31(25):e413-6. doi: 10.1200/JCO.2012.47.6770. Epub 2013 Jul 8. PMID: 23835704.

WILLIAMS DL, TSIATIS A, BRODEUR GM, LOOK AT, MELVIN SL, BOWMAN WP, KALWINSKY DK, RIVERA G, DAHL GV. Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood.** 1982 Oct;60(4):864-71. PMID: 6956375.



ZALIOVA M, ZIMMERMANNNOVA O, DÖRGE P, ECKERT C, MÖRICKE A, ZIMMERMANN M, STUCHLY J, TEIGLER-SCHLEGEL A, MEISSNER B, KOEHLER R, BARTRAM CR, KARAWAJEW L, RHEIN P, ZUNA J, SCHRAPPE M, CARIO G, STANULLA M. *ERG* deletion is associated with *CD2* and attenuates the negative impact of *IKZF1* deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**. 2014 Jan;28(1):182-5. doi: 10.1038/leu.2013.282. Epub 2013 Sep 27. Erratum in: *Leukemia*. 2015 May;29(5):1222. doi: 10.1038/leu.2015.77. PMID: 24072102.

ZALIOVA M, KOTROVA M, BRESOLIN S, STUCHLY J, STARY J, HRUSAK O, TE KRONNIE G, TRKA J, ZUNA J, VASKOVA M. *ETV6/RUNX1*-like acute lymphoblastic leukemia: A novel B-cell precursor leukemia subtype associated with the *CD27/CD44* immunophenotype. **Genes Chromosomes Cancer**. 2017 Aug;56(8):608-616. doi: 10.1002/gcc.22464. Epub 2017 May 5. PMID: 28395118.

ZALIOVA M, POTUCKOVA E, HOVORKOVA L, MUSILOVA A, WINKOWSKA L, FISER K, STUCHLY J, MEJSTRIKOVA E, STARKOVA J, ZUNA J, STARY J, TRKA J. *ERG* deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia with *DUX4* rearrangements are mostly polyclonal, prognostically relevant and their detection rate strongly depends on screening method sensitivity. **Haematologica**. 2019 Jul;104(7):1407-1416. doi: 10.3324/haematol.2018.204487. Epub 2019 Jan 10. PMID: 30630977; PMCID: PMC6601096.

ZAWITKOWSKA J, LEJMAN M, ROMISZEWSKI M, MATYSIAK M, ĆWIKLIŃSKA M, BALWIERZ W, OWOC-LEMPACH J, KAZANOWSKA B, DERWICH K, WACHOWIAK J, NIEDŹWIECKI M, ADAMKIEWICZ-DROŻYŃSKA E, *et al.* Results of two consecutive treatment protocols in Polish children with acute lymphoblastic leukemia. **Sci Rep**. 19;10(1):20168, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-75860-6. PMID: 33214594; PMCID: PMC7678856.



ZHANG J, MCCAUSTLAIN K, YOSHIHARA H, XU B, CHANG Y, CHURCHMAN ML, WU G, LI Y, WEI L, IACOBucci I, LIU Y, QU C, WEN J, EDMONSON M, PAYNE-TURNER D, KAUFMANN KB, TAKAYANAGI SI, WIENHOLDS E, WAANDERS E, NTZIACHRISTOS P, BAKOGIANNI S, WANG J, AIFANTIS I, ROBERTS KG, MA J, SONG G, EASTON J, MULDER HL, CHEN X, NEWMAN S, MA X, RUSCH M, GUPTA P, BOGGS K, VADODARIA B, DALTON J, LIU Y, VALENTINE ML, DING L, LU C, FULTON RS, FULTON L, TABIB Y, OCHOA K, DEVIDAS M, PEI D, CHENG C, YANG J, EVANS WE, RELLING MV, PUI CH, JEHA S, HARVEY RC, CHEN IL, WILLMAN CL, MARCUCCI G, BLOOMFIELD CD, KOHLSCHMIDT J, MRÓZEK K, PAIETTA E, TALLMAN MS, STOCK W, FOSTER MC, RACEVSKIS J, ROWE JM, LUGER S, KORNBLAU SM, SHURTLEFF SA, RAIMONDI SC, MARDIS ER, WILSON RK, DICK JE, HUNGER SP, LOH ML, DOWNING JR, MULLIGHAN CG; St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project. Deregulation of *DUX4* and *ERG* in acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet.** 2016 Dec;48(12):1481-1489. doi: 10.1038/ng.3691. Epub 2016 Oct 24. PMID: 27776115; PMCID: PMC5144107.

ZHANG Y, ZHANG Y, WANG F, WANG M, LIU H, CHEN X, CAO P, MA X, TENG W, ZHANG X, LIU H. The mutational spectrum of *FLT3* gene in acute lymphoblastic leukemia is different from acute myeloid leukemia. **Cancer Gene Ther.** 2020 Feb;27(1-2):81-88. doi: 10.1038/s41417-019-0120-z. Epub 2019 Jul 9. PMID: 31285539.

ZHANG L, HABEEBU SSM, LI W. Prognostic and Predictive Biomarkers in Precursor B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Li W, editor. **Leukemia** [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022 Oct 16. Chapter 10. PMID: 36395319

ZOU X, CALAME K. Signaling pathways activated by oncogenic forms of Abl tyrosine kinase. **J Biol Chem.** 1999 Jun 25;274(26):18141-4. doi: 10.1074/jbc.274.26.18141. PMID: 10373409.



APÊNDICE A – BIOMARCADORES EM LLA B (QUADRO SUPLEMENTAR)

Quadro Suplementar (continua)

Biomarcador	Alteração descrita		Frequência em LLA B	Impacto prognóstico	Alterações associadas	Prognóstico com associação	Observação
		parceiros					
Alta hiperdiploidia	51-65 Cromossomos	NA	25-30% crianças 10% adultos	Muito bom	Alterações <i>CREBP</i> , <i>FLT3</i>		
Baixa Hiperdiploidia	47-50 Cromossomos		10 a 11%	Pior			
Quase haploidia	24-29 Cromossomos		2 a 5% crianças	Muito pior	Alterações no <i>NF1</i> , <i>NRAS</i> , <i>KRAS</i> , <i>FLT3</i> , <i>IKZF1</i> , <i>CREBBP</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>RB1</i> , <i>PAX 5</i>		Inibidores Bcl2
Baixa hipodiploidia	30-39 cromossomos		0,5% crianças 4-10% adultos	Muito pior	alteração <i>TP53</i> (90%), <i>IKZF1</i> , <i>RB1</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>CREBBP</i>		
Alta hipodiploidia	40-44 cromossomos			Pior			
<i>ETV6-RUNX1</i>	t(12;21)		25-30% crianças	Excelente		Permanece bom	
<i>ETV6-RUNX1</i> like	del <i>ETV6</i> Rearranjo com <i>IKZF1</i> Del <i>EMO1</i> , <i>IKZF1</i> , <i>ARP21</i> fusão <i>TCF3:FLI1</i> e <i>FUS::ERG</i>		2-3%	Pior			
<i>BCR-ABL1</i>	t(9;22)		3-5% crianças 25% adultos	Pior prognóstico	Del <i>IKZF1</i> (80%) Del <i>PAX5</i> (50%) Del <i>CDKN2A</i> (50%) Del <i>EBF1</i>		Uso de ITK melhorou prognóstico
<i>BCR-ABL1</i> like	Rearranjos ou mutações no <i>CRLF2</i> Fusões <i>JAK2</i> Rearranjos <i>EPOR</i> Del ou mutações <i>SH2B3</i> Fusões <i>ABL1</i> , <i>ABL2</i> , <i>CSF1R</i> , <i>PDGFRB</i> , <i>PDGFRA</i> Alterações <i>NRAS</i> , <i>KRAS</i> , <i>PTPN11</i> , <i>FLT3</i>		12% crianças	Pior	Alterações <i>IKZF1</i> (70-80%) Alterações <i>PAX 5</i> (30%)		
<i>TCF3::PBX1</i>	t(1;19)		2-6% crianças	Intermediário a excelente			Melhor prognóstico após tto para SNC

Habeebu, Li W, 2022 ; Inaba, Pui 2021; Lejman *Et Al*, 2022)

(Zhang,



Quadro Suplementar (continuação)

Biomarcador	Alteração descrita		Frequência em LLA B	Impacto prognóstico	Alterações associadas	Prognóstico com associação	Observação
		parceiros					
<i>TCF3::HLF</i>	t (17;19)		<1%	Muito pior	Alterações no <i>PAX5</i> , <i>VPREB1</i> e mutações nos genes da via <i>RAS</i>		
<i>KMT2A</i>	t (4;11) t (9;11) t (11;19) Outras translocações		75-80% em < 1 ano 5% em crianças	Muito pior em < ano Pior em > 1 ano	Alterações <i>FLT3</i> , <i>NF1</i> , <i>KRAS</i>	pior	
<i>iAMP21</i>	Amplificação		1 a 2% crianças rara em adultos	Pior	Ganho do Cr X del Cr 7, del ETV6 e RB Mutações dos genes da via <i>RAS</i>		
<i>IKZF1</i>	Deleções (90%) Mutações de ponto Translocações (raro)	*Raro <i>PRDM16</i> , <i>NUMT</i> , <i>ETV6</i> , <i>CDK2</i> , <i>ZEB2</i> , <i>SETD5</i> , <i>STIM2</i>	crianças 15% adultos 40-50%	Pior	<i>IKZF1 plus</i> : Deleções de <i>CDKN2A</i> , <i>CDKN2B</i> ou <i>PAX5</i> ou deleção da região PAR1 na ausência de deleção do <i>ERG</i> .	Deleção do <i>ERG</i> : anula o prognóstico negativo da deleção do <i>IKZF1</i>	85% na LLA Ph+ 70% LLA B Ph like
<i>IGH-IL3</i>	t (5;14)		<1% crianças	Pior	Deleções do <i>CDKN2A</i> e/ou <i>PAX5</i>		
<i>CRLF2</i>	rearranjos	<i>IGH</i> <i>P2RY8</i>	5% crianças 5% adultos (50% das Ph like)	Pior	Deleção do <i>IKZF1</i> Ativação das vias <i>JAK-STAT</i> , <i>ERK</i> e <i>mTOR</i> / <i>PI3K</i> (50% de mutação do <i>JAK</i>) <i>iAMP</i> hiperdiploidia	<i>CRLF2</i> + <i>JAK2</i> – pior	
<i>DUX4</i>	Rearranjo	<i>IGH</i> <i>ERG</i> <i>ZNF384</i>	4-7% crianças Raro em adulto	Bom	Deleção intra gênica do <i>ERG</i> (50%)	<i>DUX</i> + deleção do <i>ERG</i> – neutraliza efeito negativo de alteração do <i>IKZF1</i>	
<i>ZNF384</i>	Rearranjos	<i>EP300</i> <i>TCF3</i> <i>TAF15</i> <i>CREBBP</i>	3-5% crianças 3-8% adultos	Intermediário (Varia com o parceiro)	<i>NRAS</i> e <i>FLT3</i> (60% dos casos) Deleção <i>LEF1</i> , <i>EBF1</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>FBXW7</i> , e <i>ETV6</i>		CD10 fraco ou negativo CD13 e CD33 aberrante Inibidores de <i>FLT3</i>
<i>MEF2D</i>	Rearranjo	<i>BCL9</i> <i>HNRNPUL1</i>	1-4% crianças (mais velhos e adolescentes) 1% adultos	Intermediário para mau prognóstico	Deleção do <i>IKZF1</i> Deleção <i>CDKN2A/CDKN2B</i>		CD10 baixo ou negativo Elevado CD38
<i>NUTM1</i>	Rearranjo	<i>ACIN1</i> , <i>CUX1</i> , <i>BRD9</i> , e <i>ZNF618</i>	5-7% em < 1 ano 1% crianças Não descrita em adultos	Excelente			

(Zhang, Habeebu, Li W, 2022 ; Inaba, Pui 2021; Lejman *Et Al*, 2022)



Quadro Suplementar (conclusão)

Biomarcador	Alteração descrita		Frequência em LLA B	Impacto prognóstico	Alterações associadas	Prognóstico com associação	Observação
		parceiros					
PAX 5	Mutação de ponto PAX5P80R (driver)		3-4% crianças 4% adultos	Pior em crianças Intermediário em adultos	Inativação do segundo alelo (deleção ou segunda mutação) Deleção bialélica do CDKN2A/B Mutações nas vias RAS ou JAK/STAT (<i>FLT3, BRAF, PIK3CA</i>)		Maioria das alterações no PAX5
	altPAX5 (rearranjos, amplificações intra-gênicas, mutações de sequência) (driver)	ETV6 (mais comum) Mais de 20 parceiros	7,4%	Intermediário em crianças (QT intensiva) e mau em adultos	Codeleção com <i>IKZF1</i> and <i>CDKN2A/B</i>		
	Deleções e mutações		30%				Presentes em muitos subtipos de LLA B e consideradas secundárias
CDKN2A	Deleções		15-30% crianças 30-45% adultos	Sem efeito em crianças. Pior em adultos	Deleção <i>CDKN2B</i> e <i>PAX5</i> (todos localizados no Cr 9p)		Mais frequentes em LLA Ph + e LLA Ph like que LLA ETV6::RUNX e LLA hiperdiploidia
MYC, BCL2 and/or BCL6	Translocações	Genes de imunoglobulinas <i>IGH/I</i> <i>IGL/IGK</i>	Raro	Mau prognóstico			Associados com Linfomas não Hodgkin de células B
RB1	Deleção		2-4% crianças		iAMP Baixa hipodiploidia		(39% das LLA B com iAMP21e baixa hipodiploidia)
BTG1	Deleção		10% crianças		ETV6::RUNX1		
EBF1	Deleção		6% (15% das LLA Ph like)	Pior (maiores níveis de DRM)			Ausente em casos de rearranjo do KMT2A e fusão <i>TDC3::PVX1</i>

(Zhang, Habeebu, Li W, 2022 ; Inaba, Pui 2021; Lejman *Et Al*, 2022)



APÊNDICE B – COMPARAÇÃO DOS DADOS ENTRE DIFERENTES ESTUDOS COM LLA B

Tabela suplementar 1. Leucometria ao diagnóstico de crianças com LLA em diferentes estudos

Glóbulos Brancos/ mm ³	Total XVI 598 pacientes (Jeha et al, 2019)	ALLIC 2022 5060 pacientes (Sary et al, 2013)	HCB 156 pacientes*
<10.000	41,6%	49,8%	53,82%
10.000 a < 50.000	35,1%	29,8%	31,7%
50.000 a < 100.000	9,5%	9,1%	7,05%
>100.000	13,7%	11,2%	7,69%

*LLA B exclusivamente

Tabela suplementar 2. Distribuição de pacientes com LLA em diferentes grupos de risco

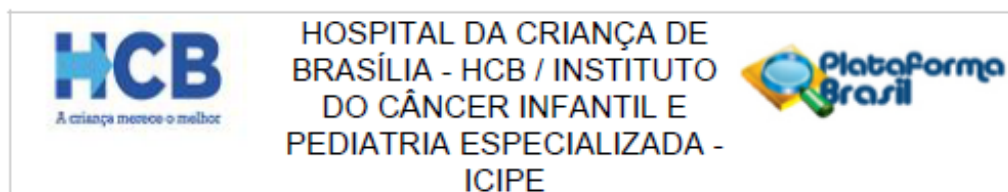
	ALL IC BFM 2002 LLA B e T (n=5060) Sary et al, 2013	Polônia ALL IC BFM 2009 LLA B e T (n=1376) Zawitkowska et al.	Índia ALL IC BFM 2009 (n=25) NATH et al	HCB LLA B ALL IC BFM 2009 modificado (n=122)
Baixo Risco	30%	14%	35%	20%
Risco Intermediário	52,3%	63,1%	35%	61%
Alto Risco	16.7%	23%	29%	17%

Tabela suplementar 3. Distribuição de pacientes com LLA em grupos de risco na admissão
(Total XVI, HCB GBTLI2021)

	Total XVI – LLA B n=494 (Jeha et al)	HCB GBTLI 2021 (n=26)
Baixo Risco	295 (59,7%)	18 (69,2%)
Alto Risco	199 (40,2%)	8 (30,7%)



ANEXO 1- DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA EM CRIANÇAS: CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E EVOLUÇÃO CLÍNICA

Pesquisador: ESTEFANIA RODRIGUES BIOJONE

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 3

CAAE: 44796221.9.0000.0144

Instituição Proponente: Hospital da Criança de Brasília José Alencar

Patrocinador Principal: DISTRITO FEDERAL SECRETARIA DE SAUDE
DISTRITO FEDERAL SECRETARIA DE SAUDE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.825.280

Apresentação do Projeto:

Trata-se da versão 2 de avaliação do projeto.

As informações descritas nos campos: "Apresentação do Projeto", "Objetivos da Pesquisa", "Hipótese", "Critérios de inclusão/exclusão" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1653650.pdf, datado de 26/05/2021).

Trata-se de Projeto de doutorado a ser desenvolvido a partir de dados de marcadores genético moleculares identificados em células leucêmicas de crianças e adolescentes de 1 a 18 anos, com Leucemia Linfoblástica Aguda de linhagem B, diagnosticadas e tratadas no Hospital da Criança de Brasília José Alencar. Estudo analítico na área de biologia molecular, prospectivo e retrospectivo.

O desenho do estudo é retrospectivo, uma vez que os dados serão analisados ao final. O caráter retrospectivo e prospectivo se referem à coleta de dados e das amostras.

Os dados clínicos e referentes aos testes laboratoriais serão coletados através de revisão de prontuário médico de forma retrospectiva (para pacientes com diagnóstico de LLA de julho de 2018 a junho de 2021) e prospectiva para os pacientes inseridos a partir de julho de 2021.

Endereço: AENW 3, lote A, Bloco II, Piso Inferior, Bloco de Ensino e Pesquisa, sala 1015 - Hospital da Criança de Brasília
Bairro: Setor Noroeste **CEP:** 70.684-831
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3025-8672 **E-mail:** cep@hcb.org.br



**HOSPITAL DA CRIANÇA DE
BRASÍLIA - HCB / INSTITUTO
DO CÂNCER INFANTIL E
PEDIATRIA ESPECIALIZADA -
ICIPE**



Continuação do Parecer: 4.825.280

Resumo:

INTRODUÇÃO : A Leucemia Linfóide Aguda é a neoplasia maligna mais comum na infância. O pico de incidência ocorre entre 1 e 4 anos de idade e as taxas de incidência anual variam amplamente ao redor mundo (4 a 50 casos/milhão). Atualmente, são descritas taxas de sobrevida superiores a 80%, chegando aos 95% em grandes centros de países desenvolvidos. Um princípio do tratamento das leucemias na infância, é a identificação de fatores prognósticos, estratificação de pacientes em diferentes grupos de risco e adaptação do tratamento de acordo com o risco de recidiva. Tem sido crescente a busca por uma maior compreensão de fatores biológicos envolvidos com a leucemogênese e com os mecanismos de resistência às drogas, a identificação de possíveis alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento. **OBJETIVOS:** Identificação de alterações genéticas e moleculares relacionadas à LLA e correlação das alterações mais frequentes com as taxas de resposta ao tratamento e evolução clínica dos pacientes. **METODOLOGIA:** Para caracterização biológica, as amostras de medula óssea sangue periférico dos pacientes serão submetidas a análises por citometria de fluxo, biologia molecular, bandamento G, PCR em tempo real, PCR, hibridização in situ (FISH), MLPA (Multiplex Ligation-dependent Amplification), sequenciamento de Nova Geração (NGS). Será estudada a presença de correlação entre as alterações genéticas e moleculares mais frequentes e a evolução clínica, definida pela resposta ao tratamento (mensurada pela presença de DRM no D15 e D78), presença de recaída e taxa de sobrevida livre de evento em 18 meses.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

Os clones de células leucêmicas expressam diferentes características genéticas e fenotípicas. Existem marcadores biológicos (genéticos e moleculares) que podem influenciar o comportamento clínico e as taxas de resposta ao tratamento de pacientes pediátricos com diagnóstico de LLA, mensuradas pelos níveis de detecção de DRM.

Objetivo Primário:

Identificar a associação (correlação) de diferentes marcadores biológicos com as taxas de resposta ao tratamento quimioterápico de indução, definidas pelos valores de doença residual mínima (DRM) nos décimo quinto (D15), trigésimo terceiro (D33) e septuagésimo dia de tratamento D78.

Objetivos Secundários:

1. Descrever características epidemiológicas e clínicas dos pacientes com diagnóstico de LLA

Endereço: AENW 3, lote A, Bloco II, Piso Inferior, Bloco de Ensino e Pesquisa, sala 1015 - Hospital da Criança de Brasília

Bairro: Setor Noroeste

CEP: 70.684-831

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3025-8672

E-mail: cep@hcb.org.br



HOSPITAL DA CRIANÇA DE
BRASÍLIA - HCB / INSTITUTO
DO CÂNCER INFANTIL E
PEDIATRIA ESPECIALIZADA -
ICIPE



Continuação do Parecer: 4.825.280

tratadas no HCB;

2. Caracterização biológica da LLA em crianças tratadas no Hospital da Criança de Brasília;
3. Comparar as frequências de alterações genéticas e moleculares encontradas em pacientes com diagnóstico de LLA em um centro de referência de tratamento oncológico do Distrito Federal com a frequência das mesmas alterações em outras localidades do mundo;
4. Determinar a frequência de LLA Ph like em pacientes com diagnóstico de LLA no Distrito Federal e comparar com a frequência desse subtipo de Leucemia encontrada em outros locais do mundo;
5. Avaliar a resposta ao tratamento dos pacientes com LLA Ph like (através da DRM) e comparar com a resposta apresentada pelos outros subtipos de LLA.
6. Identificar a presença de sobreposição de diferentes alterações genéticas e moleculares em um mesmo paciente e avaliar o impacto dessa associação sobre a evolução clínica, especialmente quando uma das alterações encontradas já tenha significado prognóstico documentado pela literatura.
7. Avaliar a correlação entre diferentes alterações genéticas e moleculares com a velocidade de resposta ao tratamento e com a intensidade da resposta.
8. Comparar o perfil de marcadores biológicos apresentados pelos pacientes com evoluções distintas (favorável x desfavorável).
9. Determinar as taxas de sobrevida para os pacientes diagnosticados e tratados como LLA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O estudo oferece mínimos riscos aos pacientes, uma vez que os mesmos não serão submetidos a procedimentos adicionais aos previstos para o diagnóstico e tratamento da LLA.

Os principais riscos oferecidos com o presente estudo estão relacionados à perda de sigilo de informações médicas e à fatores estressores gerados pelo processo de comunicação sobre inclusão em projeto de pesquisa, assinatura de termos e autorização de uso de material biológico, dificuldades de compreensão sobre o real destino do material biológico e criação de falsas expectativas aos familiares e pacientes em relação ao processo

terapêutico. O participante tem o direito de buscar indenização caso sofra danos decorrentes da participação na pesquisa.

Para preservação do sigilo médico, os pacientes receberão um código de identificação composto por número seguindo a ordem cronológica do diagnóstico e a sigla LLACBEC (LEUCEMIA LINFÓIDE

Endereço: AENW 3, lote A, Bloco II, Piso Inferior, Bloco de Ensino e Pesquisa, sala 1015 - Hospital da Criança de Brasília
Bairro: Setor Noroeste CEP: 70.684-831
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3025-8672 E-mail: cep@hcb.org.br



**HOSPITAL DA CRIANÇA DE
BRASÍLIA - HCB / INSTITUTO
DO CÂNCER INFANTIL E
PEDIATRIA ESPECIALIZADA -
ICIPE**



Continuação do Parecer: 4.825.280

AGUDA CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E EVOLUÇÃO CLÍNICA). Exemplo: 01LLACBEC.

Durante o processo de aplicação do Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) serão esclarecidos os objetivos do estudo, os dados clínicos que serão coletados e como será obtido, armazenado e manejado o material biológico. Também será explicado que a participação (ou a recusa de participação) na pesquisa não acarretará mudanças nos processos de diagnóstico e no tratamento preconizado. Além disso, o pesquisador ficará à disposição para esclarecimentos adicionais que se façam necessários

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- Projeto elaborado com clareza e objetividade, que facilita a compreensão do que está sendo proposto e a relevância do estudo
- Trata-se de um estudo transversal, observacional, descritivo retrospectivo e prospectivo
- Os dados serão coletados por meio de registros em prontuário eletrônico, prescrições médicas e relatórios de exames laboratoriais.
- Os instrumentos de coleta de dados foram apresentados e os pesquisadores se comprometem a não utilizar informações que possibilitem a identificação do participante da pesquisa, tomando todas as medidas necessárias, tendo optado pelo uso de codificações
- Foi solicitada a dispensa de apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, para os pacientes elegíveis para o estudo, porém que foram a óbito, tendo apresentado as justificativas em documento anexo na Plataforma Brasil e no Projeto Brochura, resumidamente com a seguinte justificativa: Dificuldade de contato com os responsáveis pelo paciente, pois não existe mais o vínculo com a instituição. Além disso, abordagem aos familiares para aplicação do TCLE poderá gerar desconforto e potencializar a dor e sofrimento trazidos pela perda de um filho.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: apresentada, assinada pelo Superintendente Executivo do Hospital da Criança de Brasília
Currículo lattes dos pesquisadores: apresentados e adequados
Carta de encaminhamento do projeto ao CEP: apresentado e adequado
Termo de compromisso do pesquisador: apresentado e adequado
Cronograma: apresentado e adequado

Endereço: AENW 3, lote A, Bloco II, Piso Inferior, Bloco de Ensino e Pesquisa, sala 1015 - Hospital da Criança de Brasília
Bairro: Setor Noroeste CEP: 70.684-831
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3025-8672 E-mail: cep@hcb.org.br



**HOSPITAL DA CRIANÇA DE
BRASÍLIA - HCB / INSTITUTO
DO CÂNCER INFANTIL E
PEDIATRIA ESPECIALIZADA -
ICIPE**



Continuação do Parecer: 4.825.280

Declaração de Instituição e Infraestrutura: apresentado e adequado

TCLE e termos de assentimentos apresentados e adequados

Planilha de orçamento: apresentada e adequada

Projeto brochura: apresentado e adequado

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considera-se que as pendências existentes, na primeira versão desta análise, foram atendidas e superadas, estando em condições de ser avaliado como aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1853650.pdf	26/05/2021 14:13:55		Aceito
Outros	carta_em_resposta_as_pendencias.pdf	24/05/2021 14:50:27	ESTEFANIA RODRIGUES BIOJONE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Assentimento_5_12.pdf	20/05/2021 17:45:58	ESTEFANIA RODRIGUES BIOJONE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Consentimento_responsaveis_.pdf	20/05/2021 17:44:52	ESTEFANIA RODRIGUES BIOJONE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Assentimento12_18anos.pdf	20/05/2021 17:41:23	ESTEFANIA RODRIGUES BIOJONE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_correcao_maio.pdf	19/05/2021 15:08:49	ESTEFANIA RODRIGUES BIOJONE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	requerimento_de_dispensa_de_tcle.pdf	19/05/2021 15:04:52	ESTEFANIA RODRIGUES BIOJONE	Aceito

Endereço: AENW 3, lote A, Bloco II, Piso Inferior, Bloco de Ensino e Pesquisa, sala 1015 - Hospital da Criança de Brasília
Bairro: Setor Noroeste CEP: 70.684-831
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3025-8672 E-mail: cep@hcb.org.br



**HOSPITAL DA CRIANÇA DE
BRASÍLIA - HCB / INSTITUTO
DO CÂNCER INFANTIL E
PEDIATRIA ESPECIALIZADA -
ICIPE**



Continuação do Parecer: 4.825.280

Cronograma	Cronograma.pdf	19/05/2021 15:02:27	ESTEFANIA RODRIGUES BIOJONE	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_correcao.pdf	19/05/2021 15:02:16	ESTEFANIA RODRIGUES BIOJONE	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	21/04/2021 22:00:36	ESTEFANIA RODRIGUES BIOJONE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_Anuencia_Coparticipaco_Inst itucional.pdf	19/03/2021 17:18:33	ESTEFANIA RODRIGUES BIOJONE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	COMPROMISSO_PESQUISADOR.pdf	17/03/2021 17:19:29	ESTEFANIA RODRIGUES BIOJONE	Aceito
Outros	Curriculo_DiegoMadureiradeOliveira.pdf	23/02/2021 22:59:28	ESTEFANIA RODRIGUES BIOJONE	Aceito
Outros	Curriculo_RicardoCamargo.pdf	23/02/2021 22:58:36	ESTEFANIA RODRIGUES BIOJONE	Aceito
Outros	Curriculo_EstefaniaRodriguesBiojone.pdf	23/02/2021 22:57:01	ESTEFANIA RODRIGUES BIOJONE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 04 de Julho de 2021

Assinado por:
Luciana Santos Floriano
(Coordenador(a))

Endereço: AENW 3, lote A, Bloco II, Piso Inferior, Bloco de Ensino e Pesquisa, sala 1015 - Hospital da Criança de Brasília
Bairro: Setor Noroeste CEP: 70.684-831
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3025-8672 E-mail: cep@hcb.org.br



ANEXO 2- CÓPIA DE ARTIGO CIENTÍFICO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO



OPEN ACCESS

EDITED BY
Tomasz Szczepanski,
Medical University of Silesia, Poland

REVIEWED BY
Katarzyna Pawłowska-Wąsikowska,
University Children's Hospital in Krakow,
Poland
Vera Muench,
Ulm University Medical Center, Germany

*CORRESPONDENCE
Estefânia Rodrigues Biojone
✉ estefaniabiojone@gmail.com

RECEIVED 02 October 2024
ACCEPTED 19 November 2024
PUBLISHED xx xx 2024

CITATION
Biojone ER, Guido BC, Cavalcante LLM,
Santos Júnior AdCMd, Pontes RMd,
Furtado FM, Córdoba JC, Magalhães IMQ,
de Oliveira DM and Camargo R (2024)
Prevalence of *FLT3* gene mutation and its
expression in Brazilian pediatric B-ALL
patients: clinical implications.
Front. Pediatr. 12:1505060.
doi: 10.3389/fped.2024.1505060

COPYRIGHT
© 2024 Biojone, Guido, Cavalcante, Santos
Júnior, Pontes, Furtado, Córdoba, Magalhães,
de Oliveira and Camargo. This is an open-
access article distributed under the terms of
the [Creative Commons Attribution License](#)
(CC BY). The use, distribution or reproduction
in other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Prevalence of *FLT3* gene mutation and its expression in Brazilian pediatric B-ALL patients: clinical implications

Estefânia Rodrigues Biojone^{1*}, Bruna Cândido Guido²,
Larissa Lemos Mendanha Cavalcante²,
Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior²,
Robéria Mendonça de Pontes², Felipe Magalhães Furtado^{1,2,3},
José Carlos Córdoba^{1,2}, Isis Maria Quezado Magalhães^{1,2},
Diêgo Madureira de Oliveira⁴ and Ricardo Camargo²

¹Oncology and Hematology Division, Children's Hospital of Brasília, Brasília, Brazil, ²Laboratory of Translational Research, Children's Hospital of Brasília, Brasília, Brazil, ³Department of Hematology, Sabin Diagnóstico e Saúde, Brasília, Brazil, ⁴Multidisciplinary Health Laboratory, Faculty of Health Sciences and Technology, University of Brasília, Brasília, Brazil

Q1

Introduction: There is consistent evidence that *FLT3* may be a driver gene in B-ALL and that selected cases may benefit from the use of *FLT3* inhibitors. Our study was conducted to evaluate the frequency and types of *FLT3* mutations in pediatric patients with B-ALL, the relative expression of this gene, and their influence on clinical evolution.

Methods: We evaluated 156 children with B-ALL treated between July 2018 and September 2023. Screening for *FLT3* mutations was performed using RFLP and fragment analysis, while *FLT3* expression was assessed by qPCR.

Results: *FLT3*-TKD and/or *FLT3*-JM-INDEL mutations were found in 8 patients (5.1%). We did not identify any ITD-type mutations. None of the patients with identified *FLT3* mutations presented recurrent rearrangements in B-ALL or alterations in the *IKZF1*, *PAX5*, or *ERG* genes, suggesting that *FLT3* mutation may serve as the driving mechanism for leukemia in these cases. Two (2/8) patients with *FLT3* mutations experienced disease relapse. Although we did not observe *FLT3* overexpression among patients with *FLT3* mutations, *FLT3* expression levels were higher in these patients compared to WT patients. Four *FLT3*-WT patients presented *FLT3* overexpression, defined as RQ > 10. *FLT3* mutations or overexpression were not associated with relapses or survival rates.

Discussion: Our findings do not support the inclusion of *FLT3* as a routine marker in the risk stratification of B-ALL patients; nevertheless, *FLT3* alterations may be relevant for guiding personalized treatment approaches in specific clinical contexts.

KEYWORDS

precursor B-cell lymphoblastic leukemia-lymphoma, precision medicine, molecular biology, tumor biomarkers, child health

1 Introduction

B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) is the most common cancer in the pediatric population, accounting for approximately 25% of malignant neoplasms in patients up to 18 years of age (1, 2). Despite significant improvements in survival rates, relapsed or refractory disease remains a frequent cause of death among B-ALL patients

(3). Currently, the assessment of leukemic cells through molecular biology techniques and genetic evaluation, including next-generation sequencing (NGS), enables the identification of over thirty ALL subtypes characterized by specific gene expression profiles or biological markers (4). This characterization not only enhances diagnostic accuracy but also provides opportunities for treatment optimization, either by adjusting chemotherapy intensity or by introducing targeted therapies (5).

The *FLT3* (FMS-like tyrosine kinase 3) gene, located on chromosome 13q12, encodes a type III receptor tyrosine kinase predominantly expressed in the bone marrow, particularly in hematopoietic precursor cells. The protein consists of four distinct regions: an extracellular domain, a transmembrane region, a juxtamembrane region, and an intracellular portion containing a tyrosine kinase domain. Upon binding to the *FLT3* ligand (FL), the receptor is activated through dimerization and autophosphorylation, initiating a cascade of signaling pathways, including PI3K/AKT, RAS/MAPK, and STAT5 (6, 7). This signaling promotes cell proliferation and inhibits apoptosis. The *FLT3* gene plays a critical role in the survival, proliferation, and differentiation of hematopoietic cells across both myeloid and lymphoid lineages (6, 8–11).

Mutations in *FLT3*, occurring either in the juxtamembrane domain or within the tyrosine kinase domain, lead to constitutive activation of *FLT3* and are associated with leukemogenesis (12–20). There are four main types of activating mutations in the *FLT3* gene: internal tandem duplications in the juxtamembrane domain (*FLT3*-ITD), in-frame insertions or deletions in the juxtamembrane domain (*FLT3*-JM-INDEL), point mutations in the juxtamembrane domain (*FLT3* JM-PM), and mutations in the tyrosine kinase domain (*FLT3*-TKD) (21).

FLT3-activating mutations are commonly found in Acute Myeloid Leukemias (AML), accounting for approximately one-third of adult AML cases and 10%–15% of pediatric AML cases (19). Among AML patients, *FLT3*-ITD is a recurrent driver mutation (present in about 25% of all AML cases) and is associated with higher relapse rates and reduced overall survival (12–26). In contrast, TKD domain mutations are likely secondary events with uncertain prognostic impact (22, 23). *FLT3* inhibitor drugs are approved for AML patients with *FLT3* mutations, and their use has been associated with improved overall survival and event-free survival rates (26–30).

In B-ALL, *FLT3* mutations are less common, reported in 0.2%–12.5% of cases when evaluated by conventional techniques (RFLP and fragment analysis) (31–36) and in up to 25% when investigated using NGS (20). The prognostic impact of these alterations remains poorly defined (20, 30–36). ITD-type mutations are rare in this context, and recent studies have described in-frame indels in the juxtamembrane domain as the most common type of *FLT3* genetic variant in patients with B-ALL (21).

FLT3 overexpression, in addition to its activating mutations, has been documented in B-ALL, particularly in specific subtypes such as r-*KMT2A*, r-*ZNF384*, and high hyperdiploid ALL (20, 37–41). The mechanisms contributing to elevated *FLT3* expression in certain B-ALL subtypes are not yet fully

understood. Epigenetic modifications, such as enhancer hijacking due to deletions at 13q12.2, have been linked to higher expression levels in hyperdiploid patients and in cases of relapse (42). Although the surface expression of the *FLT3* receptor does not correlate with *FLT3* transcript levels, total cellular *FLT3* protein levels generally reflect transcript levels. Overexpressed wild-type *FLT3* proteins have been observed to undergo tyrosine phosphorylation (43). Some studies have associated elevated *FLT3* expression with poorer outcomes in B-ALL (20, 36–40, 44). Encouragingly, the autophosphorylation of wild-type *FLT3* induced by its overexpression was shown to be inhibited by a potent *FLT3* kinase inhibitor, with sensitivity comparable to that observed in mutant forms (43, 45). Additionally, evidence suggests therapeutic responsiveness to *FLT3* inhibitors in certain subsets of relapsed B-ALL patients exhibiting *FLT3* overexpression (46–48). Nevertheless, few studies have investigated therapeutic strategies involving *FLT3* inhibitors specifically for B-ALL (41, 49).

Given the current uncertainty regarding the prognostic value of *FLT3* alterations in pediatric B-ALL and considering recent reports of the therapeutic efficacy of *FLT3* inhibitors in patients with relapsed B-cell ALL (46–48), it is essential to deepen our understanding in this field of research. The objective of this study was to identify *FLT3* alterations in patients with B-ALL and to correlate these alterations with their clinical course to clarify whether *FLT3* is a molecular marker of clinical relevance in children with B-ALL.

2 Materials and methods

2.1 Study design

This is a retrospective, descriptive clinical study involving pediatric patients diagnosed with B-ALL at a public pediatric oncology referral hospital in Brasília, Brazil. A convenience sampling was performed, including patients admitted between July 2018 and September 2023. Data collected comprised clinical characteristics (age, gender, white blood cell count at diagnosis, and the presence of Central Nervous System—CNS—infiltration), biological characterization (cytogenetic alterations, recurrent rearrangements, and mutations in *IKZF1*, *PAX5*, and *ERG*), and treatment response measured by Minimal Residual Disease (MRD). Outcomes were categorized as remission, relapse or dead in remission.

2.2 Study population and treatment

Patients aged 1–18 years with a primary diagnosis of B-ALL and no prior treatment were included. Between July 2018 and September 2022, treatment was based on the BFM ALLIC 2009 protocol, locally adapted for B-ALL management at our institution. Since September 2022, the GBTLI 2021 protocol—a Brazilian multicenter research protocol in which our institution participates—has been used. As a result, patients in this study



followed two different protocols. The backbone strategy for both protocols is similar, though there are differences in the criteria used for risk classification. The GBTLI 2021 protocol reduces the intensity of induction therapy for patients classified as low and intermediate risk (Supplementary Frames S1, S2, and S3).

2.3 Sample collection

Bone marrow samples were collected via aspiration to confirm ALL diagnosis. Immediately after collection, smears were prepared for morphological evaluation. Bone marrow aspirate samples (or peripheral blood in cases of high white blood cell counts and patient severity) were sent to the Translational Research Laboratory for immunophenotyping by flow cytometry, cytogenetics (cell culture), and molecular biology analysis.

2.4 Minimal residual disease (MRD) assessment

MRD was evaluated by flow cytometry according to Euroflow Consortium guidelines (50). Cellular events were acquired using the FACS Canto II cytometer (BD), with data analysis performed using FACS Diva (BD) and Infinicyt (Cytognos, version 2.0) software. MRD values were measured at the mid-point and conclusion of the induction phase. For patients treated with the adapted ALLIC BFM 2009 protocol, MRD was assessed on days 15, 33, and 78. For patients following the GBTLI 2021 protocol, MRD quantification was conducted on days 19, 26 (for the low-risk subgroup), and 49.

2.5 Isolation of mononuclear cells and nucleic acid extraction

Mononuclear cells were isolated using a Ficoll gradient (GE Healthcare Life Sciences), washed in 1X PBS, and aliquoted into two aliquots. One tube was used for total RNA extraction via the Trizol® method (Invitrogen), and the other for DNA extraction. DNA was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) following manufacturer instructions. Samples were quantified via spectrophotometry and stored at -20°C (for DNA) and -80°C (for RNA) until assays were performed.

2.6 Analysis of *FLT3* mutations

Screening for genetic variants in the *FLT3* tyrosine kinase domain (D835) was conducted on all patients with available samples ($n=155/156$) via restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis (51). The PCR reaction included 1x PCR buffer, 200 nM each dNTP, 1.5 mM MgCl_2 , 0.75 U Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), and 0.2 mM of each primer (FWD-CCGCCAGGAACGTGCTTG, REV-CAGCCTCACATTGCCCC). PCR conditions were

as follows: 95°C for 3 min, 35 cycles of 95°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 5 min. PCR products were digested using the restriction enzyme EcoRV (NEB), and samples showing alterations by RFLP were subjected to Sanger sequencing.

Detection of genetic variants in the juxtamembrane domain was performed by fragment analysis (51) on the ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). PCR was performed under the same conditions described above, but with 27 cycles, using FWD-6-FAM-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC and REV-CTTTCAGCATTTTGAAGGCAACC primers. Fragment size was estimated using the GeneScan™ 500 LIZ size standard (Thermo Fisher Scientific).

For the classification of somatic variant pathogenicity in cancer (oncogenicity), we applied the Standard Operating Procedure developed in accordance with recommendations from the Clinical Genome Resource (ClinGen), the Cancer Genomics Consortium (CGC), and the Variant Interpretation for Cancer Consortium (VICC) (52).

2.7 Analysis of *FLT3* expression

FLT3 expression was analyzed in patients admitted between July 2018 and December 2022 with available samples ($n=112/130$) using real-time RT-PCR (RT-qPCR) on bone marrow samples collected at diagnosis. *FLT3* expression was also evaluated in 10 samples collected at relapse. One microgram of RNA was used for cDNA synthesis, followed by PCR with 200 nM primers and 2x PCR MasterMix containing SybrGreen®. Relative quantification was performed using the $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}}$ method, with HPRT1 and B2M as reference genes. The calibrator was the median ΔCq from all cases in the study, excluding relapses. Singleplex reactions were conducted on a QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) with primers for *FLT3* (FWD-AGGGACAGTGTACGAAGCTG; REV-GTCGTGCTTAAAGACCCAGAG), HPRT1 (FWD-TGACACTGGC AAAACAATGCA; REV-GGTCCTTTTACCAGCAAGCT), and B2M (FWD-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT; REV-TCTCTGCTCCCACTCTAAGT). Amplification conditions were: 2 min at 50°C , 10 min at 95°C for the holding stage, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Melt curve analysis was performed to assess amplicon specificity.

2.8 Statistical analysis

Data were tested for normal distribution, by the D'Agostino and Pearson normality test and analyses of skewness and kurtosis, when applicable. Data were expressed as average $\pm$ SD (qPCR), mean $\pm$ SEM or median and ranges according to the distribution. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). The statistical approach adopted for each analysis is described in the figure legends. Non-parametric tests were used for data with non-normal distribution and probability

values of $p < 0.05$ were accepted as indication of statistically significant difference.

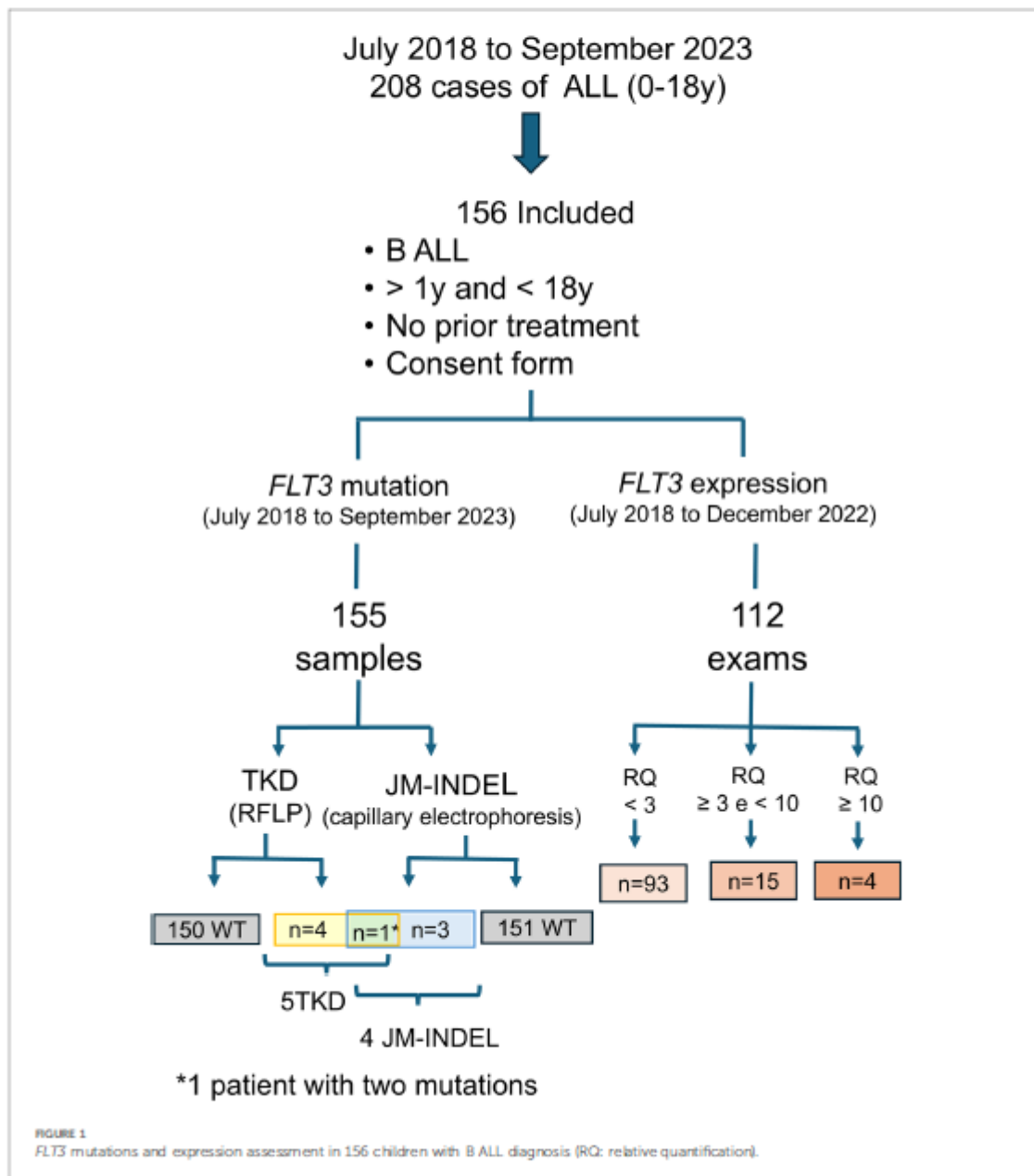
2.9 Ethics

The study was approved by the local research ethics committee (protocol code 44796221.9.0000.0144, July 04, 2021). Informed consent was obtained from guardians, and assent forms were signed by patients over 5 years old.

3 Results

3.1 Characterization of the study population

A total of 208 patients diagnosed with B-ALL were treated at our institution from July 2018–September 2023, with 156 meeting the inclusion criteria for this study (Figure 1). Patient characterization included age, sex, CNS status, treatment protocol applied, initial and post-induction risk classification, MRD values



at mid-induction and post-induction, disease progression and current clinical status, cytogenetic alterations, recurrent rearrangements, presence of *IAMP21*, *IKZF1* deletions (whether associated with the *IKZF1* Plus subtype or not), *PAX5* alterations, *P2RY8:CRLF2* rearrangement, *FLT3* mutations, and *FLT3* expression levels.

The patients' ages ranged from 1–17 years, with a peak incidence between ages 2 and 5, and a median age of 4 years and 5 months. Thirty-four patients (21.8%) were over 10 years old at admission, and the sex ratio was 1.05 (80 males to 76 females). Regarding white blood cell counts at admission, 133 patients (85.2%) presented counts below 50,000 leukocytes/mm³, while 33 patients had counts above 50,000/mm³, including 12 with counts exceeding 100,000/mm³.

Most children (122) received treatment following the ALLIC BFM 2009 protocol. In terms of risk classification at the end of induction, 25 patients (20.4%) were classified as low risk, 74 (60.6%) as intermediate risk, and 23 (18.8%) as high risk. Among those treated under the GBTLI 2021 protocol, risk classifications were as follows: 16 (47%) intermediate risk, 12 (33%) high risk, 4 low risk, and 2 very high risk (Supplementary Table S1). Differences in risk classification criteria and treatment intensity between the two protocols led to a higher frequency of "high-risk" patients under the GBTLI protocol; however, this difference does not imply greater disease aggressiveness in this group.

The 5-year overall survival (OS) and event-free survival (EFS) rates for this cohort were 87.5% and 78%, respectively, based on a minimum 5-year follow-up for 24 patients from the time of diagnosis. The clinical and laboratory data of the patients are presented in Figure 2.

3.2 *FLT3* mutations

FLT3 mutation screening was conducted in 155 patients (Figure 1), revealing nine mutations in eight patients (5.1%). One type of mutation in the tyrosine kinase domain (p.Ile836del) was identified in two patients. Four patients (2.58%) presented with *FLT3*-TKD mutations, three patients (1.93%) had in-frame insertions and deletions in the juxtamembrane domain (*FLT3*-JM-INDEL), and one patient (0.64%) had mutations in both the tyrosine kinase domain (*FLT3*-TKD) and the juxtamembrane domain (*FLT3*-JM-INDEL) (Figure 3). No *FLT3*-ITD variants were found in our cohort.

The four mutations identified in the tyrosine kinase domain had been previously documented. Among these, three mutations have been associated with gain of function and oncogenic potential, while one mutation is likely to exhibit oncogenic potential due to a probable gain of function. None of the four mutations identified in the juxtamembrane region had been reported prior to this study. These alterations demonstrated moderate oncogenic potential attributed to a possible gain of function (Table 1).

No association was found between *FLT3* mutations and age, gender, white blood cell (WBC) count at diagnosis, or minimal residual disease (MRD) values measured at the mid-point and at

the end of induction therapy. Table 2 presents the clinical features and detailed descriptions of the *FLT3* mutations.

FLT3 mutations were associated with high hyperdiploidy in 3 out of 8 patients (37.5%) (patients P19, P104, P112). All three cases had TKD-type mutations, and one patient presented with a JM-INDEL associated with a TKD mutation (P112). No *FLT3* mutations were identified in any patients with *ETV6:RUNX1* (*n* = 38), *BCR:ABL1* (*n* = 4), *TCF3:PBX1* (*n* = 9), or *r-KMT2A* (*n* = 2). Additionally, none of the patients with *P2RY8:CRLF2* (*n* = 7), *IKZF1* deletions (*n* = 21), including *IKZF1*plus (*n* = 11), *PAX5* alterations (*n* = 21), or *ERG* deletions (*n* = 9) presented with *FLT3* mutations (Table 2, Figure 2).

Among patients with *FLT3* mutations, a relapse rate of 25% (2/8) was observed, with both cases occurring in patients with the *FLT3*-TKD mutation and no associated high hyperdiploidy. Although this difference was not statistically significant compared to *FLT3* wild-type (WT) patients (*p* = 0.08), it is noteworthy given the rarity of the mutation. The relapse rate among *FLT3* WT patients was 5.4% (8/147) (Figure 4).

Follow-up of the two relapsed patients with *FLT3*-TKD mutations revealed that one experienced a very early relapse, failed to achieve remission, and died three months after the relapse diagnosis (*FLT3* mutation screening was not conducted on the relapse sample). The other patient achieved remission but experienced a second relapse with an orbital lesion. Treatment included chemotherapy and orbital radiotherapy (20 Gy). The mutation in *FLT3* identified in the initial diagnosis sample was also detected in the bone marrow sample collected at the time of relapse. This patient is currently alive, with a follow-up period of 55 months.

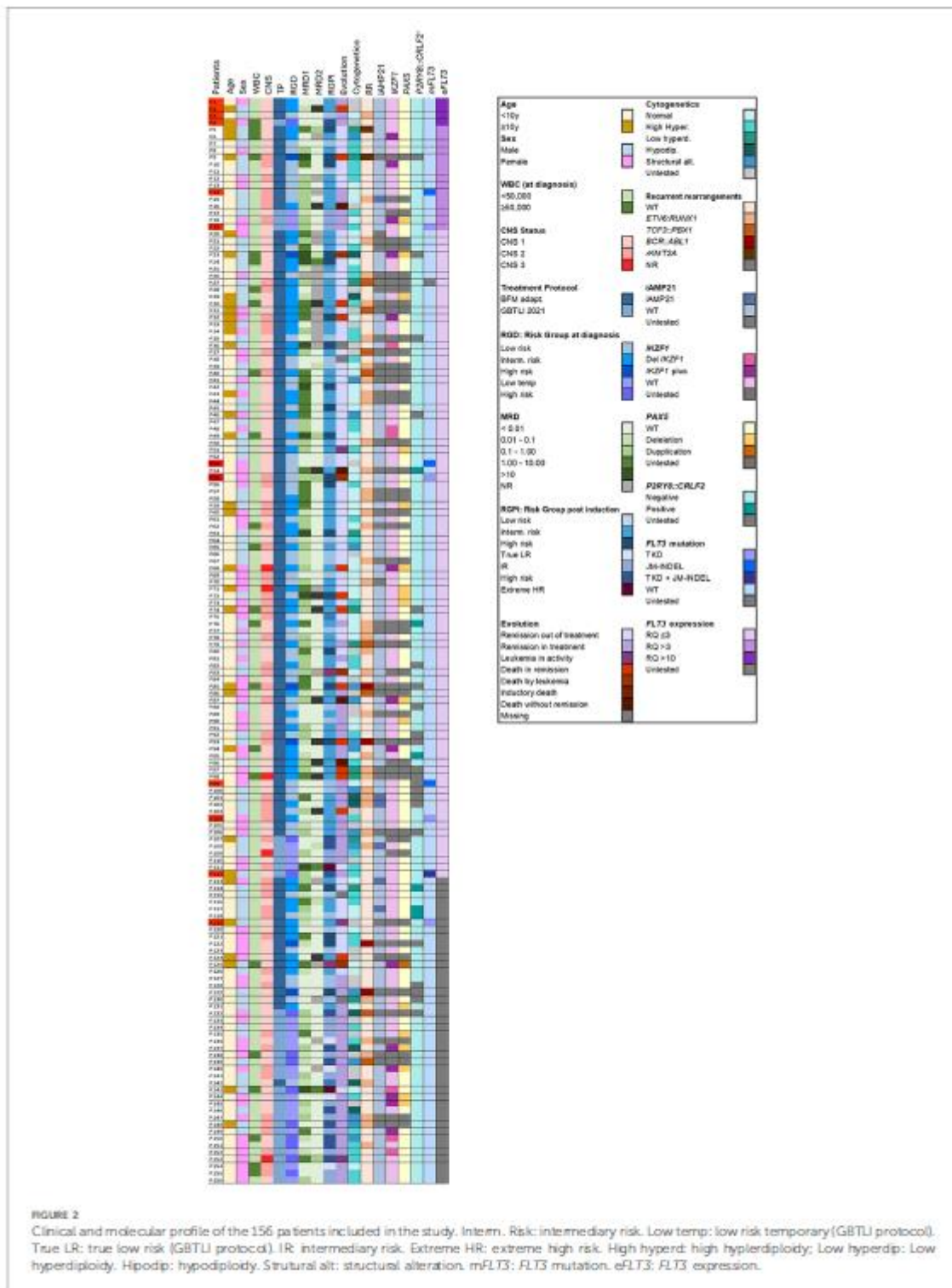
There was no difference in survival rates when comparing patients with *FLT3* mutations to those with *FLT3* WT (Figure 5).

3.3 *FLT3* expression

FLT3 expression was evaluated in RNA samples of 112 patients at diagnosis. Additionally, *FLT3* expression was assessed in 10 samples collected at relapse.

The distribution of relative *FLT3* expression in the samples showed a non-Gaussian pattern, with a strong rightward skew (Figure 6A), indicating high expression levels without correspondingly low levels, as would be expected for independent variables with a normal distribution. This pattern is typical of genes with biological significance in carcinogenesis, where elevated expression levels confer an advantage, and lower levels are incompatible with disease maintenance (54, 55).

In 93 patients, the expression ratio (RQ) ranged from 0.017–3. Fifteen patients had expression ratios between 3 and 6.13, and in four patients, the expression ratio exceeded 10, which we classified as "hyperexpression." These elevated RQ values were observed exclusively in four wild-type (WT) *FLT3* patients. We were unable to identify factors associated with *FLT3* hyperexpression in these four patients with RQ > 10 (see Table 3), but we observed that these individuals demonstrated a rapid response to treatment, as indicated by



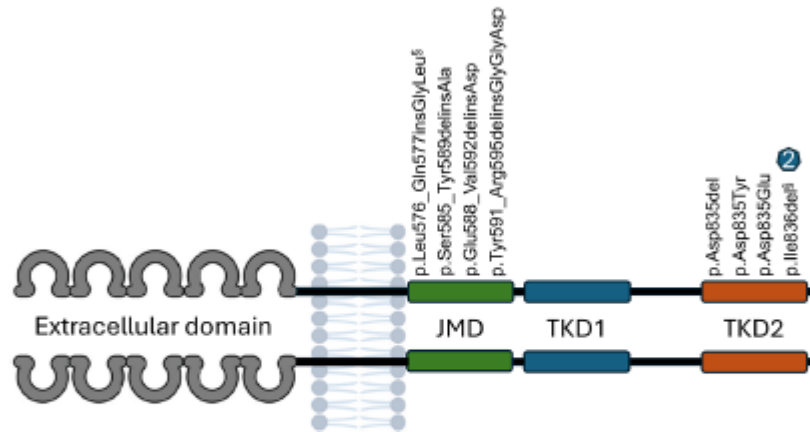


FIGURE 3

Description of eight distinct *FLT3* Gene Mutations in eight (8) patients with B-ALL (nine occurrences). *FLT3*-JM-INDEL mutations were identified in four patients. Five patients had mutations in the tyrosine kinase domain (*FLT3*-TKD). One patient exhibited two mutations: one in the juxtamembrane domain (B) and another in the tyrosine kinase domain (B2). Two patients presented the p.Ile836del mutation, with one patient having this mutation exclusively and the other having it in conjunction with a *FLT3*-JM-INDEL (S).

MRD values assessed during mid-induction (D15 or D19, depending on the protocol) (Figure 6B). Conversely, there was no statistically significant difference in MRD values at the end of induction between patients with hyperexpression and those without (Figure 6C).

Although none of the patients with *FLT3* mutations exhibited hyperexpression of the gene ($RQ > 10$), *FLT3* expression values were higher among patients with *FLT3* mutations compared to wild-type patients (median 2.53 vs. 1.03, $p = 0.03$) (Figure 6D).

No significant differences in *FLT3* expression values were observed among patients across different risk groups (data not shown).

A noteworthy finding is that *FLT3* expression levels were significantly lower in relapse cases. Patients who relapsed had relative expression levels (at initial diagnosis) comparable to the group median (Figure 7A). However, these values decreased markedly after relapse (Figure 7B). This difference is even more pronounced when comparing paired expression values at diagnosis and at relapse for each patient (Figure 7C). Despite this, *FLT3* expression levels had no significant impact on survival rates (EFS and OS) (Figure 8, Supplementary Table S2).

4 Discussion

Limited studies have investigated the implications of the *FLT3* gene in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL), likely due to the infrequent occurrence of *FLT3* alterations. Nonetheless, in recent years, *FLT3* has emerged as a significant marker for enhancing the biological characterization of patients with ALL, particularly within specific subtypes such as Ph-like and r-KMT2A ALL (31, 32, 44, 53, 56). Furthermore, several

researchers have emphasized the need for additional studies to elucidate the role of *FLT3* in B-ALL patients (20, 31, 33). Although this study is based on data from a single institution, it complements and builds upon previous research. Moreover, it is notable for evaluating a population with a distinct genetic composition, characterized by a mixture of various ethnic backgrounds (indigenous, African, Caucasian).

4.1 *FLT3* mutations

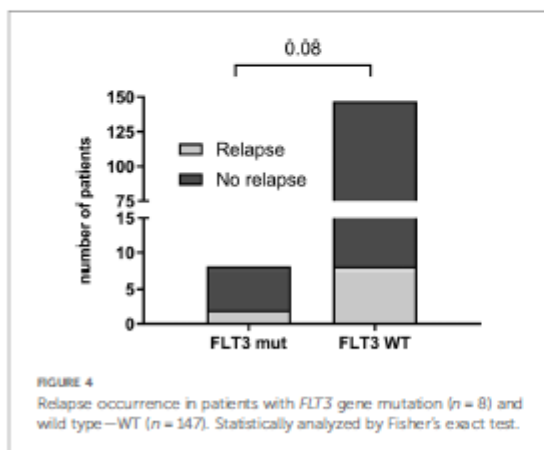
In our study, we found *FLT3* mutations in 5.1% of the samples (8/155), with 3.2% (5/155) of mutations occurring in the TKD domain (in one case, associated with JM-INDEL). Unlike acute myeloid leukemia (AML), the variants found in the juxtamembrane domain were indels rather than internal tandem duplications (ITDs).

These findings are consistent with those reported in previous studies regarding both the frequency of mutations and the different spectrum of *FLT3* mutations in B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) compared to AML (20, 21). Taketani *et al.* (2004) found *FLT3*-TKD mutations in 6 (5.4%) of 112 children with ALL older than 1 year and in 8 (16.0%) of 50 infants with ALL, but no *FLT3*-ITD mutations were detected (32). Zhang *et al.* (2020) reported a predominance of JM-INDELS in B-ALLs (21). In Saudi Arabia, 4.7% of children with B-ALL had *FLT3* mutations (2.4% ITD) (33), and in Brazil, Barbosa *et al.* found *FLT3* mutations in 6.7% of 134 B-ALL patients (34). Additionally, this frequency was reported to be 5.5% among Canadian children and adolescents with ALL, including 1.1% *FLT3*-ITD and 4.3% *FLT3*-TKD point mutations, with an observed association between *FLT3* mutations and hyperdiploidy (36).

TABLE 1 Description of *FLT3* mutations in patients with B-ALL.

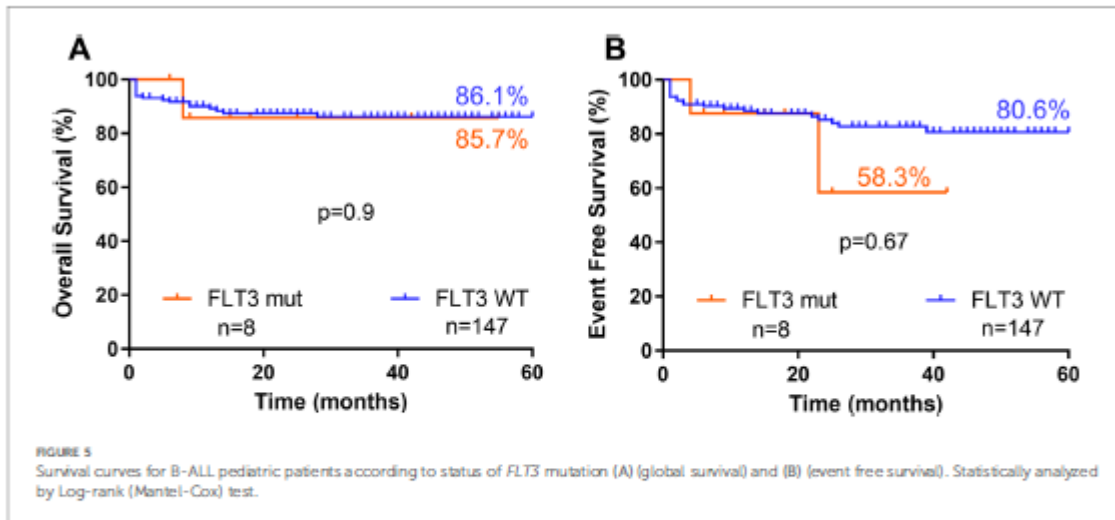
Variant	Domain	Oncogenicity	Effect	Experimental Evidence	Reported in pediatric B-ALL
Leu576_Gln577insGlyLeu	JM	Moderate Oncogenic	Inframe change with probable Gain-of-Function	No evidence reported	First time reported in this work
Se585_Tyr589delinsAla	JM	Moderate Oncogenic	Inframe change with probable Gain-of-Function	No evidence reported	First time reported in this work
Glu588_Val592delinsAsp	JM	Moderate Oncogenic	Inframe change with probable Gain-of-Function	No evidence reported	First time reported in this work
Tyr591_Arg595delinsGlyGlyAsp	JM	Moderate Oncogenic	Inframe change with probable Gain-of-Function	No evidence reported	First time reported in this work
Asp835del	TKD2	Oncogenic	Gain-of-Function	Clark, et al., Blood (64) (PMID:15256430)	Zhao, et al., J. Mol. Sci (20) (PMID:39273530).
Asp835Tyr	TKD2	Oncogenic	Gain-of-Function	Yamamoto, et al., Blood (13). (PMID:11290608)	Spinella et al., BMC Cancer (65). (PMID:26345285).
				Clark, et al., Blood (64) (PMID:15256430)	Zhang et al., Nat Genet (2). (PMID:2776115).
					Roberts et al., Engl J Med (53). (PMID:25207766).
					Zhang, et al., Cancer Gene Ther (21). (PMID:31285539).
					Gutierrez-Camino, et al., Br. J. Cancer (36). (PMID:38049355).
				Bailey, et al., PNAS (66) (PMID:24255108)	Zhao, et al., J. Mol. Sci (20). (PMID:39273530).
Asp835Glu	TKD2	Oncogenic	Gain-of-Function	Yamamoto, et al., Blood (13). (PMID:11290608).	Zhang, et al., Cancer Gene Ther (2) (PMID:31285539).
					Gutierrez-Camino, et al., Br. J. Cancer (36) (PMID:38049355).
				Clark, et al., Blood (64) (PMID:15256430).	Zhao, et al., J. Mol. Sci (20) (PMID:39273530).
Ile836del	TKD2	Likely Oncogenic	Likely Gain-of-Function	Grundler, et al., Blood (67) (PMID:12663439).	Ma, et al., Nature 2018 (PMID:29489755).
					Zhang, et al., Cancer Gene Ther (21) (PMID:31285539).
				Clark, et al., Blood (64) (PMID:15256430).	Newman, et al., Cancer Discov 2021 (PMID:34301788).
					Zhao, et al., J. Mol. Sci (20) (PMID:39273530).

JM, juxtamembrane domain; TKD, tyrosine kinase domain. Platforms used for search: COSMIC, HGMD, cBioPortal, OncoKB, NCBI, LOVD.



We recognize that broader horizontal coverage and the ability to simultaneously detect multiple genetic alterations [single nucleotide variants (SNVs), copy number variations (CNVs), fusions, and indels] using highly sensitive techniques like next-generation sequencing (NGS) allow for the identification of *FLT3* mutations at higher frequencies than restriction fragment length polymorphism (RFLP) and fragment analysis (20, 44). While NGS provides comprehensive genomic insights, it is time-consuming and may produce false negatives due to amplification issues or software limitations in detecting *FLT3* internal tandem duplications (*FLT3*-ITD). In contrast, PCR fragment analysis and PCR-RFLP targeting *FLT3*-TKD (D835/I836) mutations are robust, cost-effective methods that deliver faster results, making them a viable and efficient alternative to NGS (57, 58).

In a recently published study, Zhao *et al.* described a higher frequency of *FLT3* mutations in ALL patients when evaluated by



NGS (6.3% ITD and 18.8% TKD) and identified new non-canonical genetic variants, such as point mutations outside the TKD and insertion/deletion variants causing in-frame amino acid alterations. In the same study, a higher proportion of patients with negative minimal residual disease (MRD) at mid-induction (D19) was observed among patients with *FLT3* mutations compared to wild-type patients (20). In our sample, we did not identify differences in MRD levels between patients with or without *FLT3* mutations.

Regarding initial presentation, unlike what is well established in patients with AML, where *FLT3* mutations are associated with elevated leukocyte counts at diagnosis (22, 23, 59), none of the patients with *FLT3* mutations in our study presented with hyperleukocytosis. Furthermore, no patients with *FLT3* mutations had central nervous system (CNS) involvement at diagnosis.

In our sample, *FLT3* mutations were not detected in patients with recurrent genetic alterations commonly associated with B-ALL, including *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1*, *BCR::ABL1*, *r-KMT2A*, *P2RY8::CRLF2* rearrangements, *PAX5* alterations, or deletions involving *IKZF1*. This finding supports the hypothesis that, contrary to the prevailing concept of kinase alterations being secondary (31, 60), *FLT3* mutations may function as leukemogenic drivers in a small subset of B-ALL (5, 61). Further studies utilizing bone marrow samples collected during treatment monitoring or at relapse could clarify the role of *FLT3* mutations in disease progression. Preliminary studies suggest that *FLT3* mutations negatively impact prognosis in infants with *r-KMT2A* B-ALL (31, 49). However, in patients with hyperdiploidy, the presence of *FLT3* mutations did not affect the natural course of the disease in this subgroup, which generally has a favorable outcome (31–33). In our study, among the five patients with TKD mutations, three who also had hyperdiploidy achieved remission, while the other two without hyperdiploidy experienced relapse. In light of these results and based on evidence of an association between hyperdiploidy and

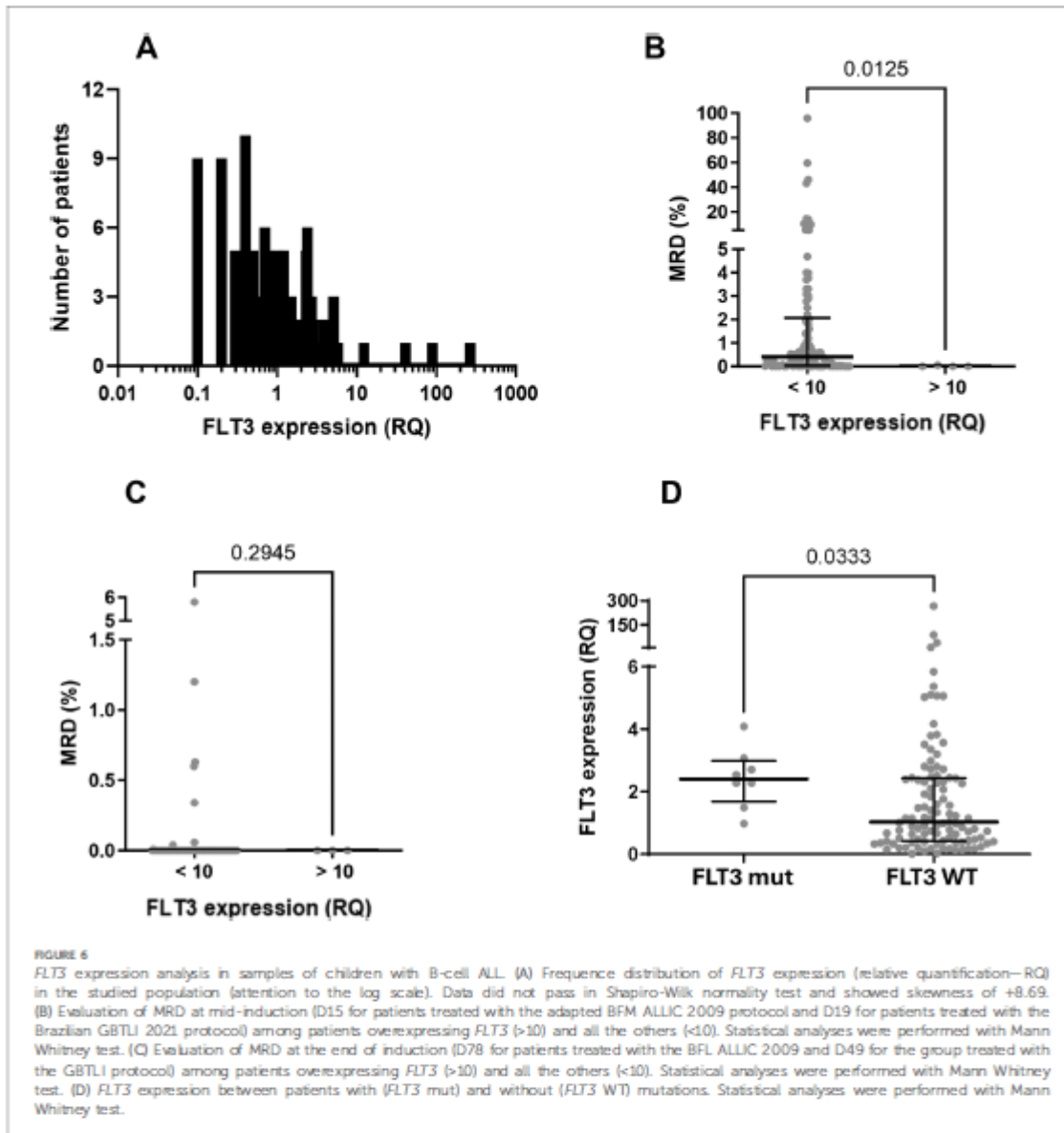
higher levels of *FLT3* expression, as well as previous studies linking elevated *FLT3* expression with certain subtypes of B-ALL (*r-KMT2A*, Ph-like), we decided to complement our research by evaluating *FLT3* expression levels.

4.2 *FLT3* expression

Higher *FLT3* expression levels are described and considered recurrent alterations in acute leukemias. The expression levels of this gene are higher in cells from patients with acute leukemias compared to normal bone marrow samples and other types of neoplasms (37–43). In the context of B-ALL, subgroups of patients with *r-KMT2A*, high hyperdiploidy, and *r-ZNF384* subtypes exhibit higher *FLT3* expression levels (5, 36, 37, 40, 42). In our study, which was limited to patients older than one year, only two patients had *r-KMT2A*, both with expression values above the 75th percentile of our cohort.

Although the association between hyperdiploidy and higher levels of *FLT3* expression has been documented in some studies (44, 61, 62), we did not find differences in *FLT3* expression in this group. Similarly, there was no correlation between *FLT3* expression and indicators of aggressiveness in B-ALL, such as white blood cell count at diagnosis or CNS involvement. This lack of association may be specific to our study population; however, expanding the sample size is necessary to confirm these findings.

Additionally, we were unable to identify any common characteristics among the four patients with extremely high expression levels ($RQ > 10$). Yang and colleagues demonstrated that epigenetic alterations with enhancer hijacking secondary to the deletion of the *PAN3* gene (13q12.2) explain elevated *FLT3* expression in B-ALL patients, particularly among those with hyperdiploidy or those who experienced relapse. Although none of the four patients with $RQ > 10$ had associated



hyperdiploidy or experienced disease relapse, this could be a possible mechanism to explore in these cases (42).

The implications of FLT3 expression levels on prognosis remain uncertain and controversial. Among patients with r-KMT2A B-ALL, high FLT3 expression levels have been associated with poorer outcomes (38, 40, 49). However, in 2017, Fedders and colleagues found an opposite association (63). In our study, we were unable to identify any influence on survival rates in patients with B-ALL and FLT3 overexpression detected in bone marrow samples at diagnosis. The majority of authors also did not find an association between FLT3 expression levels at

diagnosis and survival or relapse rates (20, 36). On the other hand, Garza Veloz reported that high FLT3 expression levels at the end of induction were associated with higher relapse and mortality rates (40).

We identified evidence that FLT3 may be a marker influencing the biological behavior of B-ALL, reinforcing the need for more in-depth studies to better elucidate FLT3's relationship with mechanisms involved in the genesis, survival, or resistance of leukemic cells to chemotherapeutic effects: 1. the frequency distribution of relative FLT3 expression (Figure 6); 2. the low MRD values observed during mid-induction in patients with



TABLE 2 Characteristics of patients with FLT3 mutations.

No	Age (years)	Gender	CNS	WBC	Protocol	MRD D15 or D19	MRD D33	MRD D78 or D49	Risk Group	Event	Current Status	Association	Mutation	Expression (RQ)	Description
P14	2	M	CNS 2	<5,000	Adapted BFM	>0.1–<1.0	0	NR	IR	0	RIT	–	JM-INDJEL	3.077	c.177L_178Sdel;lineGCTGGGAC
P19	5	F	CNS 1	<5,000	GITLI 2021	>0.1–<1.0	NR	0	IR	0	RIT	HHD	TKD	4.062	p.Tyr591_Ang595del;lineGCTGlyAsp
P53	2	F	CNS 1	10,000–50,000	Adapted BFM	0	0	0	LR	0	ROT	–	JM-INDJEL	1.401	c.2505T>G
P55	3	F	CNS 2	5,000–10,000	Adapted BFM	>0.1–<1.0	>0.01–<0.1	>0.1–<1.0	HR	Rel	DL	–	TKD	2.333	p.Asp835Glu
P99	1	F	CNS 1	5,000–10,000	Adapted BFM	<0.01	0	0	LR	0	RIT	–	JM-INDJEL	2.847	p.Glu588_Val592del;lineAsp
P104	9	F	CNS 2	<5,000	Adapted BFM	0	0	0	IR	0	RIT	HHD	TKD	0.981	c.2508_2510del
P112	17	M	CNS 1	10,000–50,000	GITLI 2021	>0.1–<1.0	NR	0	HR	0	RIT	HHD	TKD/JM-INDJEL	2.276	p.Asp835del
P119	11	M	CNS 1	<5,000	Adapted BFM	>0.01–<0.1	0	0	IR	Rel	2nd relapse	Unstated	TKD	NR	p.Leu576_Glu577insGlyLeu

CNS, central nervous system; WBC, white blood cells; MRD, minimal residual disease; AMP, Association for Molecular Pathology; IR, intermediate risk; LR, Low risk; HR, High risk; Rel, relapse; ROT, remission out of treatment; DL, death for leukemia; RIT, remission in remission; HHD, High hyperdiploidy.

TABLE 3 Characteristics of patients with FLT3 overexpression.

Age (years)	Gender	CNS	WBC	Protocol	MRD D15/D19	MRD D33	MRD D78/D49	Risk Group	Event	Current Status	Association	Mutation	Expression (RQ)
P1	4	F	CNS1	10,000–50,000	Adapted BFM	<0.01	0	IR	0	RIT	–	WT	266.6
P2	17	M	CNS1	<5,000	Adapted BFM	>0.01–<0.1	0	NR	Death in remission	DR	DJEL	WT	89.3
P3	3	M	CNS1	<5,000	Adapted BFM	<0.01	0	LR	0	RIT	CDKN2A 2B	WT	40.8
P4	13	F	CNS1	>1,000,000	GITLI 2021	<0.01	NR	0	HR	0	–	WT	12.3

CNS, central nervous system; WBC, white blood cells; MRD, minimal residual disease; IR, intermediate risk; LR, Low risk; HR, High risk; DR, death in remission; RIT, remission in remission.

high *FLT3* expression (Figure 6); and 3. significantly lower *FLT3* expression levels in samples from relapsed patients (Figure 7).

Given these results, the detailed biological effects and prognostic impact of *FLT3* expression levels should be further investigated, particularly in the context of the potential use of *FLT3* inhibitors. Additionally, it is important to not only focus on transcript expression levels but also evaluate the true functional impact of *FLT3* by assessing receptor saturation or activation.

4.3 Limitations

The small sample size, particularly given the low frequency of *FLT3* mutations, along with the limited follow-up time for the patients, constrains the interpretation of our findings and underscores the necessity for continued research in this area. We

acknowledge the inherent limitations of Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and fragment analysis in detecting low-frequency *FLT3* mutations, especially when compared to the enhanced sensitivity of Next-Generation Sequencing (NGS).

Nevertheless, considering the potential for direct and short-term benefits for selected patients, we believe it is crucial to disseminate our findings, even with the limited follow-up period. In light of these limitations, we assert that our findings contribute meaningfully to the understanding of *FLT3* mutation prevalence and advocate for further research and investment in comprehensive molecular diagnostics in similar contexts.

4.4 Perspectives

Preliminary studies and case reports provide evidence supporting the use of *FLT3* inhibitors in specific subgroups of

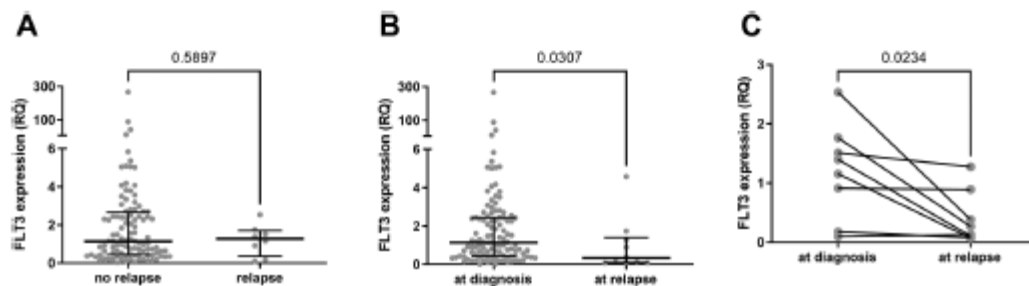


FIGURE 7
FLT3 expression levels analysis in relapsed patients vs. patients in remission. (A) Comparison between *FLT3* expression values of samples from 103 patients initially diagnosed with B-cell ALL who did not experience relapse until last data assessment and *FLT3* expression values in BM samples collected at the initial diagnosis from 8 patients who relapsed. Statistically analyzed by Mann-Whitney test. (B) Comparison between *FLT3* expression values of samples from 112 patients initially diagnosed with B-cell ALL and *FLT3* expression values of BM samples collected at the time of relapse from 10 patients. Statistically analyzed by Mann-Whitney test. (C) *FLT3* expression levels of 8 samples from patients at the initial diagnosis and at the time of relapse. The patient with the highest RQ value (2.5) at diagnosis is the only one in the group with *FLT3* mutation. Statistically analyzed by Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

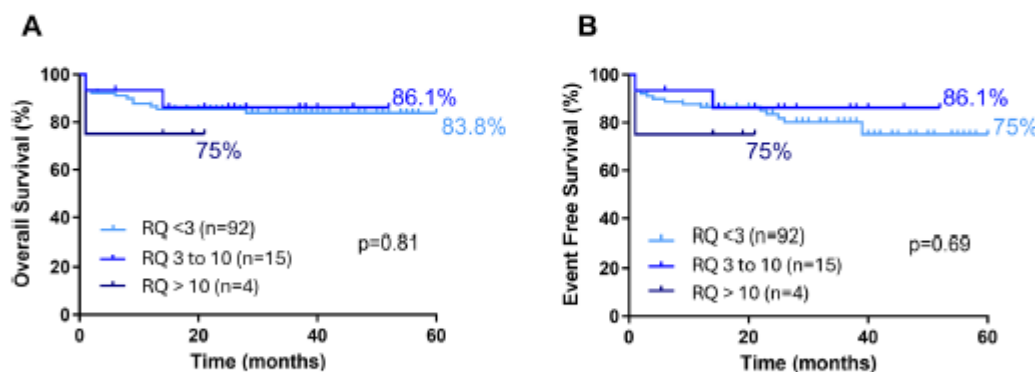


FIGURE 8
Survival curves for B ALL pediatric patients according to *FLT3* expression status. (A) Overall Survival and (B) Event free survival. Statistically analyzed by Log-rank (Mantel-Cox) test.



B-ALL patients (3, 45, 46, 56). However, although the use of FLT3 inhibitors has been suggested as a therapeutic option for B-ALL patients for nearly two decades, studies exploring this approach remain scarce (46, 56).

We propose that in selected cases, alongside MRD assessment, evaluating *FLT3* status (mutation or expression) may serve as an additional tool in guiding treatment strategies. For instance, in patients with persistent MRD following induction or in relapse cases with *FLT3* mutations or increased expression, FLT3 inhibitors could be considered as salvage treatment. Another option is to use *FLT3* inhibitors in combination with conventional chemotherapy to reduce the required doses in patients with a favorable prognosis. FLT3 inhibitors may also be beneficial for patients with *FLT3* mutation or overexpression where high-dose chemotherapy is contraindicated, such as in cases of infection or toxicity.

5 Conclusion

In conclusion, although we did not find consistent data regarding the impact of *FLT3* mutations or elevated *FLT3* expression levels on patient response (measured by MRD values after induction) or relapse rates, our findings suggest that *FLT3* alterations — whether genetic or expression-related — exert a biological influence on the behavior of leukemic cells and may complement traditional tools used to enhance B-ALL characterization. Moreover, these alterations may help guide therapeutic strategies for selected B-ALL patients by utilizing FLT3 inhibitors.

Currently, there is no evidence supporting the inclusion of FLT3 inhibitors as a first-line therapeutic approach for B-ALL patients with *FLT3* alterations. However, we believe that in cases of persistent MRD positivity following induction therapy or in instances of relapse, the use of FLT3 inhibitors should be considered as salvage therapy for patients with *FLT3* mutations or elevated *FLT3* expression. An additional, somewhat more ambitious possibility worth exploring is the combination of FLT3 inhibitors with conventional treatment to reduce chemotherapy doses.

This hypothesis requires validation in larger cohorts and through studies utilizing samples collected at different stages of leukemia treatment. Despite these limitations, our study highlights a relatively unexplored aspect of B-ALL with promising translational potential, paving the way for more personalized treatment approaches.

Data availability statement

The authors acknowledge that the data presented in this study must be deposited and made publicly available in an acceptable repository, prior to publication. Frontiers cannot accept a manuscript that does not adhere to our open data policies.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by Local research ethics committee of Children's Hospital of Brasília. Protocol code

44796221.9.0000.0144 (July 04, 2021). The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. Written informed consent for participation in this study was provided by the participants' legal guardians/next of kin.

Author contributions

EB: Writing – review & editing, Writing – original draft, Investigation, Formal Analysis, Data curation, Conceptualization. BG: Writing – original draft, Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Formal Analysis, Data curation. LC: Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization, Investigation, Formal Analysis, Data curation. AS: Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization, Methodology, Formal Analysis. RP: Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization, Formal Analysis. FF: Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization, Investigation, Formal Analysis. JC: Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision, Investigation, Funding acquisition. IM: Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision, Investigation. DO: Writing – review & editing, Writing – original draft, Methodology, Formal Analysis, Conceptualization. RC: Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Formal Analysis.

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This research was funded by FUNDAÇÃO DE APOIO À PESQUISA DO DISTRITO FEDERAL (FAPDF) and FUNDAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE (FEPECS).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Generative AI statement

The author(s) declare that no Gen AI was used in the creation of this manuscript.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated



organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

- Inaba H, Pui CH. Advances in the diagnosis and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Med*. (2021) 10(9):1926. doi: 10.3390/jcm10091926
- Zhang L, Habeebu SSM, Li W. Chapter 10. Prognostic and predictive biomarkers in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. In: Li W, editor. *Leukemia*. Brisbane, AU: Exon Publications (2022). p. 165–93.
- Mullighan CG. How advanced are we in targeting novel subtypes of ALL? *Best Pract Res Clin Haematol*. (2019) 32(4):101095. doi: 10.1016/j.bjha.2019.101095
- Iacobucci I, Kimura S, Mullighan CG. Biologic and therapeutic implications of genomic alterations in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Med*. (2021) 10(17):3792. doi: 10.3390/jcm10173792
- Peters R, Mullighan CG, Hunger SP. Advancing diagnostics and therapy to reach universal cure in childhood ALL. *J Clin Oncol*. (2023) 41(36):5579–91. doi: 10.1200/JCO.23.01286
- Rosnet O, Schiff C, Pélissier MJ, Marchetto S, Tonnel C, Toiron Y, et al. Human FLT3/FLT3L gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood*. (1993) 82(4):1110–9. doi: 10.1182/blood.V82.4.1110.1110
- Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* (2010) 141(7):1117–34. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011
- Mathews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell*. (1998) 65(7):1143–52. doi: 10.1016/S0092-8674(98)00101-0
- Lyman SD, James L, Vanden Bos T, de Vries P, Brasel K, Gliniak B, et al. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell*. (1993) 75(6):1157–67. doi: 10.1016/0092-8674(93)90325-K
- Lyman SD, James L, Johnson L, Brasel K, de Vries P, Jacobson SS, et al. Cloning of the human homologue of the murine FLT3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood*. (1994) 83(10):2795–801. doi: 10.1182/blood.V83.10.2795.2795
- Lyman SD. Biology of FLT3 ligand and receptor. *Int J Hematol*. (1995) 62(2):63–73. doi: 10.1016/0925-5710(95)00389-4
- Stewart DL, Radich JP. The role of FLT3 in hematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer*. (2003) 3(9):650–65. doi: 10.1038/nrc1369
- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodan Y, Miyawaki S, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. (2001) 97(8):2434–9. doi: 10.1182/blood.V97.8.2434
- Vu HA, Xinh PT, Masuda M, Motoji T, Toyoda A, Sakaki Y, et al. FLT3 is fused to ETV6 in a myeloproliferative disorder with hyper eosinophilia and a t(12;13)(p13;q12) translocation. *Leukemia*. (2006) 20(8):1414–21. doi: 10.1038/sj.leu.2404266
- Spitzer B, Dela Cruz FS, Ibanez Sanchez GD, Zhang Y, Xiao W, Benayed R, et al. ETV6-FLT3-positive myeloid/lymphoid neoplasm with eosinophilia presenting in an infant: an entity distinct from JMML. *Blood Adv*. (2021) 5(7):1899–902. doi: 10.1182/bloodadvances.202009699
- Reilly JT. Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis. *Br J Haematol*. (2002) 116(4):744–57. doi: 10.1046/j.0007-1048.2001.03294.x
- Huang K, Yang M, Pan Z, Heide FH, Scherr M, Eder M, et al. Leukemogenic potency of the novel FLT3-N676K mutant. *Ann Hematol*. (2016) 95(5):783–91. doi: 10.1007/s00277-016-2616-z
- Ge SS, Qiu QC, Dai HP, Shen XD, Wu TM, Du JH, et al. Mutation spectrum of FLT3 and significance of non-canonical FLT3 mutations in hematological malignancy. *Br J Haematol*. (2023) 202(3):539–49. doi: 10.1111/bjh.18877
- Annesley CE, Brown P. The biology and targeting of FLT3 in pediatric leukemia. *Front Oncol*. (2024) 4:263. doi: 10.3389/fonc.2024.00263
- Zhao L, Chen H, Fan F, Hao J, Zhang W, Li Y, et al. Distinct FLT3 pathway gene expression profiles in pediatric de novo acute lymphoblastic and myeloid leukemia with FLT3 mutations: implications for targeted therapy. *Int J Mol Sci*. (2024) 25(17):9581. doi: 10.3390/ijms25179581
- Zhang Y, Zhang Y, Wang F, Wang M, Liu H, Chen X, et al. The mutational spectrum of FLT3 gene in acute lymphoblastic leukemia is different from acute myeloid leukemia. *Cancer Gene Ther*. (2020) 27(1–2):81–8. doi: 10.1038/s41417-019-0120-z

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2024.1505060/full#supplementary-material>

- Kennedy VE, Smith CC. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: key concepts and emerging controversies. *Front Oncol*. (2020) 10:612880. doi: 10.3389/fonc.2020.612880
- Knight TE, Edwards H, Meshinchi S, Taub JW, Ge Y. “Flipping” the story: FLT3-mutated acute myeloid leukemia and the evolving role of FLT3 inhibitors. *Cancers*. (2022) 14(14):3398. doi: 10.3390/cancers14143398
- Fedorov K, Maiti A, Konopleva M. Targeting FLT3 mutation in acute myeloid leukemia: current strategies and future directions. *Cancers*. (2023) 15(8):2312. doi: 10.3390/cancers15082312
- Kotlaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom medical research council AML 10 and 12 trials. *Blood*. (2001) 98(6):1752–9. doi: 10.1182/blood.V98.6.1752
- Ge SS, Liu SB, Xue SL. Developments and challenges of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Front Oncol*. (2022) 12:964338. doi: 10.3389/fonc.2022.964338
- Pollard JA, Alonso TA, Gerbing R, Brown P, Fox E, Choi J, et al. Sorafenib in combination with standard chemotherapy for children with high allelic ratio FLT3/ITD+ acute myeloid leukemia: a report from the children's oncology group protocol AAML1031. *J Clin Oncol*. (2022) 40(18):2023–35. doi: 10.1200/JCO.21.01612
- Negotici C, Colita A, Mitu I, Lupu AR, Lapadat ME, Popovici CE, et al. A review of FLT3 kinase inhibitors in AML. *J Clin Med*. (2023) 12(20):6429. doi: 10.3390/jcm12206429
- Kantarjian H, Borthakur G, Daver N, DiNardo CD, Issa G, Jabbour E, et al. Current status and research directions in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. (2024) 14(1):163. doi: 10.1038/s41408-024-01143-2
- Stone RM, Mandrekas SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation. *N Engl J Med*. (2017) 377(5):454–64. doi: 10.1056/NEJMoa1614359
- Armstrong SA, Mabon ME, Silverman LB, Li A, Gibben JG, Fox EA, et al. FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. (2004) 103(9):3544–6. doi: 10.1182/blood-2003-07-2441
- Takemitsu T, Takai T, Sugita K, Furutachi Y, Ishii E, Hanada R, et al. FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood*. (2003) 103(3):1085–8. doi: 10.1182/blood-2003-02-0418
- Hyamany G, Awad M, Alsuhaibani O, Fadalla K, Al Sharif O, Al Shahrani M, et al. FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in patients with acute lymphoblastic leukemia and its clinical significance. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. (2014) 6(1):e2014038. doi: 10.4084/MJHID2014038
- Barbosa TC, Andrade FG, Lopes BA, de Andrade CF, Mansur MB, Emerenciano M, et al. Impact of mutations in FLT3, PTPN11 and RAS genes on the overall survival of pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Brazil. *Leuk Lymphoma*. (2014) 55(7):1501–9. doi: 10.3109/10428194.2013.847934
- Alhazayn N, Elborai Y, Al Sharif O, Al Shahrani M, Alsuhaibani O, Awad M, et al. Cytogenetic profile and FLT3 gene mutations of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Med Insights Oncol*. (2017) 11:1179554917721710. doi: 10.1177/1179554917721710
- Gutierrez-Camino A, Richer C, Outmet M, Fuchs C, Langlois S, Khater E, et al. Characterisation of FLT3 alterations in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer*. (2024) 130(2):317–26. doi: 10.1038/s41416-023-02511-8
- Stam RW, Schneider P, de Lorenzo P, Valocchi MG, den Boer ML, Pieters R. Prognostic significance of high-level FLT3 expression in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. (2007) 110(7):2774–5. doi: 10.1182/blood-2007-05-091934
- Chillon MC, Gómez-Casares MT, López-Jorge CE, Rodríguez-Medina C, Molines A, Sarasquete ME, et al. Prognostic significance of FLT3 mutational status and expression levels in MLL-AF4 and MLL-germline acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. (2012) 26(11):2360–6. doi: 10.1038/leu.2012.161
- Kang H, Wilson CS, Harvey RC, Chen IM, Murphy MH, Atlas SR, et al. Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic

- leukemia: a children's oncology group study. *Blood*. (2012) 119(8):1872–81. doi: 10.1182/blood-2011-10-382861
40. Gama-Veloz I, Martinez-Pierro ML, Jaime-Perez JC, Carrillo-Sanchez K, Ramos-Del Hoyo MG, Lugo-Trampe A, et al. Identification of differentially expressed genes associated with prognosis of B acute lymphoblastic leukemia. *Dis Markers*. (2015) 2015:828145. doi: 10.1155/2015/828145
41. Poubel CP, Mansur MB, Boroni M, Emerenciano M. FLT3 Overexpression in acute leukaemias: new insights into the search for molecular mechanisms. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. (2019) 1872(1):80–8. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.06.001
42. Yang M, Sefiani S, Woodward EL, Duployez N, Olsson-Arvidsson L, Ungerback J, et al. 13q12.2 deletions in acute lymphoblastic leukemia lead to upregulation of FLT3 through enhancer hijacking. *Blood*. (2020) 136(8):946–56. doi: 10.1182/blood.2019004684
43. Onoki K, Kiyoi H, Hirose Y, Iwai M, Ninomiya M, Kodera Y, et al. Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood*. (2004) 103(5):1901–8. doi: 10.1182/blood-2003-06-1845
44. Brady SW, Roberts KG, Gu Z, Shi L, Pounds S, Pei D, et al. The genomic landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. (2022) 54(9):1376–89. doi: 10.1038/s41588-022-01159-z
45. Armstrong SA, Kung AL, Mabon ME, Silverman LB, Stam RW, Den Boer ML, et al. Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell*. (2003) 3(2):173–83. doi: 10.1016/s1535-6080(03)00003-5
46. Rinella SP, Bell HC, Hess NI, Huang NM, Nguyen TT, Turicok DP, et al. Combination fedratinib and venetoclax has activity against human B-ALL with high FLT3 expression. *bioRxiv [Preprint]*. 2023.06.07.544058 (2023). doi: 10.1101/2023.06.07.544058
47. Hu M, Li W, Li P, Tan J, Wang Y. A case report of secondary B-cell acute lymphoblastic leukemia treated with a combination of FLT3 inhibitor and decitabine. *Front Oncol*. (2024) 14:1329279. doi: 10.3389/fonc.2024.1329279
48. Madero-Marroquin R, DuVall AS, Saygin C, Wang P, Gurbuzani S, Larson RA, et al. Durable responses in acute lymphoblastic leukaemia with the use of FLT3 and IDH inhibitors. *Br J Haematol*. (2024) 204(4):1238–42. doi: 10.1111/bjh.19250
49. Brown PA, Kairalla JA, Hilden JM, Dreyer ZE, Carroll AJ, Heerema NA, et al. FLT3 Inhibitor lestaurtinib plus chemotherapy for newly diagnosed KMT2A-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia: children's oncology group trial AALL0631. *Leukemia*. (2021) 35(5):1279–90. doi: 10.1038/s41375-021-01177-6 Erratum in: *Leukemia*. 2021 May;35(5):1527. doi: 10.1038/s41375-021-01245-x
50. Theunissen P, Meijstrikova E, Sedek I, van der Sluis-Gelling AJ, Galpa G, Bartels M, et al. Euroflow consortium: standardised flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. (2017) 129(3):347–57. doi: 10.1182/blood-2016-07-726307
51. Murphy KM, Lewis M, Hafn MJ, Geiger T, Cooper LC, Smith BD, et al. Detection of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay. *J Mol Diagn*. (2003) 5(2):96–102. doi: 10.1016/s1525-1578(10)60458-8
52. Horak P, Griffith M, Danos AM, Piel BA, Madhavan S, Liu X, et al. Standards for the classification of pathogenicity of somatic variants in cancer (oncogenicity): joint recommendations of clinical genome resource (ClinGen), cancer genomics consortium (CGC), and variant interpretation for cancer consortium (VICC). *Genet Med*. (2022) 24(5):966–98. doi: 10.1016/j.jgm.2022.01.001 Erratum in: *Genet Med*. 2022 Sep;24(9):1991. doi: 10.1016/j.jgm.2022.07.001
53. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC, Yang YL, Pei D, et al. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *New Engl J Med*. (2014) 371:1005–15. doi: 10.1056/NEJMoa1403088
54. Feinberg AP, Lerchenko A. Epigenetics as a mediator of plasticity in cancer. *Science*. (2023) 379(6632):eaw3835. doi: 10.1126/science.aw3835
55. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. (2011) 144(5):646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.003
56. Brown P, Lewis M, Shurtleff S, Campana D, Downing J, Small D. FLT3 Inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression. *Blood*. (2005) 105(2):812–20. doi: 10.1182/blood-2004-06-2498
57. Sakaguchi M, Nakajima N, Yamaguchi H, Najima Y, Shono K, Marumo A, et al. The sensitivity of the FLT3-ITD detection method is an important consideration when diagnosing acute myeloid leukemia. *Leuk Res Rep*. (2020) 13:100198. doi: 10.1016/j.lrr.2020.100198
58. Bergeron J, Capo-Chichi JM, Tsui H, Mahe E, Berardi P, Minden MD, et al. The clinical utility of FLT3 mutation testing in acute leukemia: a Canadian consensus. *Curr Oncol*. (2023) 30(12):10410–36. doi: 10.3390/cancers30120759
59. Kiyoi H, Kawashima N, Ishikawa Y. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: therapeutic paradigm beyond inhibitor development. *Cancer Sci*. (2020) 111(2):312–22. doi: 10.1111/cas.14274
60. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. (2020) 395(10230):1146–62. doi: 10.1016/S0140-6736(19)33018-1
61. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*. (2002) 1(2):133–43. doi: 10.1016/s1535-6080(02)00032-6
62. Yang M, Vesterlund M, Slavakis I, Moura-Castro LH, Castor A, Fioeris T, et al. Proteogenomics and Hi-C reveal transcriptional dysregulation in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Commun*. (2019) 10(1):1519. doi: 10.1038/s41467-019-09469-3
63. Fedders H, Alsaadeq A, Schmah J, Vogiatzi F, Zimmermann M, Moricke A, et al. The role of constitutive activation of FMS-related tyrosine kinase-3 and Nras/Kras mutational status in infants with KMT2A-rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. (2017) 102:e438–e42. doi: 10.3324/haematol.2017.169870
64. Clark JJ, Cools J, Curley DP, Yu JC, Lokker NA, Giese NA, et al. Variable sensitivity of FLT3 activation loop mutations to the small molecule tyrosine kinase inhibitor MLN518. *Blood*. (2004) 104(9):2867–72. doi: 10.1182/blood-2003-12-4446
65. Spinella JE, Cassart P, Garnier N, Rousseau P, Drullion C, Richer C, et al. A novel somatic mutation in ACD induces telomere lengthening and apoptosis resistance in leukemia cells. *BMC Cancer*. (2015) 15:621. doi: 10.1186/s12885-015-1639-5
66. Bailey E, Li L, Duffield AS, Ma HS, Huo DL, Small D. FLT3/D835Y mutation knock-in mice display less aggressive disease compared with FLT3/internal tandem duplication (ITD) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2013) 110(52):21113–8. doi: 10.1073/pnas.1310591110
67. Grundler R, Thiede C, Miething C, Steudel C, Peschel C, Dreyer J. Sensitivity toward tyrosine kinase inhibitors varies between different activating mutations of the FLT3 receptor. *Blood*. (2003) 102(2):646–51. doi: 10.1182/blood-2002-11-3441



ANEXO 3 – TRABALHO PARA APRESENTAÇÃO EM CONGRESSO (POSTER)



SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO DETECTA NOVA FUSÃO GENÉTICA EM CRIANÇA COM LEUCEMIA AGUDA RECIDIVADA, REFRATARIEDADE E USO DE TERAPIAS DE RESGATE: RELATO DE CASO



Sanches CS (1,2), Blojone ER (1), Franco SCR (1), Magalhães IMQS (1), Camargo R (1)

1 Hospital da Criança de Brasília José de Alencar (HCB), DF, Brasil

2 Escola Superior de Ciências da Saúde (ESCS), DF, Brasil

Introdução

Apesar das elevadas taxas de sobrevida das Leucemias Linfóides Agudas de células B (LLA-B) na infância, o manejo de pacientes com recidiva ou refratariedade à terapia ainda é um desafio. A elucidação da leucemogênese por meio do sequenciamento de nova geração (NGS) tem sido promissora e pode direcionar condutas que modifiquem a evolução dos pacientes.

Caso clínico

Paciente de 26 meses, sexo feminino, sem comorbidades, admitida por dor abdominal e em membros inferiores. Ao exame físico: palidez e adenomegalias submandibular e inguinal. Ao hemograma: anemia (Hb 9,1 mg/dl; Ht 29,5%), sem alterações numéricas de leucócitos e plaquetas. Todavia, com blastos em lâmina de sangue periférico. Mielograma: 74% de blastos e imunofenotipagem de medula óssea compatível com diagnóstico de LLA-B; Líquor sem evidências de infiltração em SNC. Apresentou cariótipo (46,XX) e pesquisa de translocações por RT-PCR com a fusão *ETV6::RUNX1*. No NGS, confirmou-se a t(12;21) e identificou-se a fusão *RUNX1::CTC1*. Foi iniciado o tratamento pelo protocolo *ALL IC BFM 2009* adaptado. Evoluiu com boa resposta, apresentando valores de DRM no D15=0,11% e D33=0,006%, sendo, portanto, classificada como **risco intermediário**. No D78 (DRM indetectável), mas na 90ª semana do tratamento, apresentou leucocitose com blastos em sangue periférico. O AMO confirmou a recidiva medular, isolada e precoce, 23 meses após o primeiro diagnóstico com DRM=81,8%. **A avaliação da recidiva por NGS evidenciou as mesmas alterações do diagnóstico anterior.** Iniciou o tratamento pelo protocolo *BFM* para LLA recidiva de 2002 (**grupo de alto risco, S3**). A paciente apresentou refratariedade ao tratamento, com valor de DRM pós-ciclo F2=20%. Foi indicado uso de **blinatumomabe**, após o qual, a paciente ainda se mantinha refratária (DRM=84,7%). Foi instituído outro resgate contendo um **inibidor de proteassomo**, em 2 ciclos, possibilitando o controle da doença, pós-2º ciclo, com redução da DRM a 0,03%. A criança realizou outro ciclo de blinatumomabe, resultando em negatização da DRM, possibilitando o TMO com doador aparentado, 10 meses após a recidiva. A paciente exibiu DRM indetectável em D+30, D+60, D+90, +4 e +6 meses no pós-TMO, com tempo de sobrevida de 42 meses.

Discussão

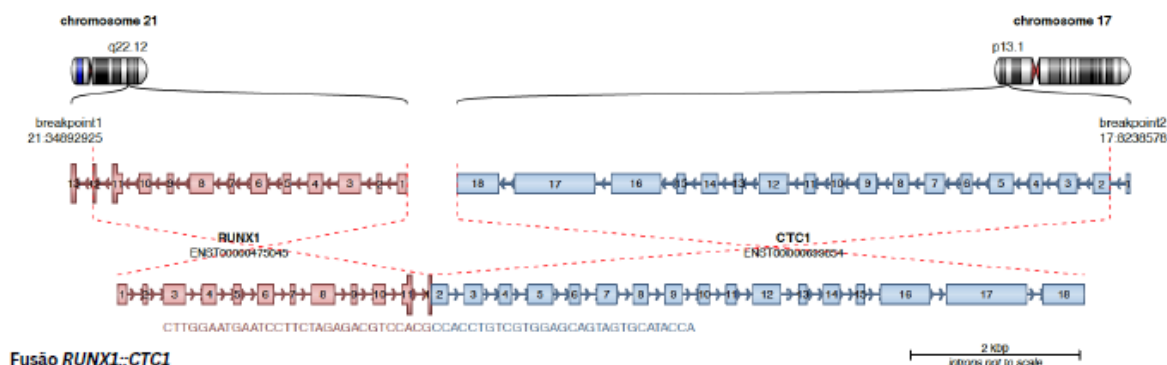
A fusão *ETV6::RUNX1* é associada ao bom prognóstico nas LLA-B(1). Contudo, outras formas de mutações somáticas do gene *RUNX1* remetem a neoplasias de pior prognóstico (2). O gene componente do complexo de replicação do telômero *CTC1* (*CTC1*) garante o alongamento e a proteção contra a degradação telomérica (3). Existe uma correlação positiva entre comprimento telomérico e leucemogênese (*OR*=1.07; 95% *CI*=1.00-1.14; *p*=0.044) (3), também evidente em casos de recidiva (*OR*=1.19; 95% *CI*=1.01-1.40; *p*=0.043) (3). Há associação entre a presença de blastos de LLA-B e o gene *CTC1* (*p*=0.002)(4), indicando que o gene *CTC1* pode ser utilizado como biomarcador para as LLA (4).

Conclusão

No caso descrito, os métodos diagnósticos tradicionais foram insuficientes para justificar a agressividade da doença, enquanto o NGS ampliou o potencial diagnóstico, revelando uma nova fusão que pode explicar o comportamento fora dos padrões esperados.

Referências

- Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*. 1995;9(12):1985-1989.
- Sood R, Kamikubo Y, Liu P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood*. 2017;129(15):2070-2082. doi:10.1182/blood-2016-10-687830.
- Zia S, Khan N, Tehreem K, Rehman N, Sami R, Baty RS, et al. Transcriptomic analysis of conserved telomere maintenance component 1 (CTC1) and its association with leukemia. *J Clin Med*. 2022;11(19):5780. doi:10.3390/jcm11195780.
- Walsh KM, Whitehead TP, de Smith AJ, Smirnov IV, Park M, Endicott AA, et al. Common genetic variants associated with telomere length confer risk for neuroblastoma and other childhood cancers. *Carcinogenesis*. 2016 Jun;37(6):576-582. doi:10.1093/carcin/bgw037.





ANEXO 4 – TRABALHO PARA APRESENTAÇÃO EM CONGRESSO (POSTER)



Avaliação de DRM durante a indução de pacientes pediátricos com diagnóstico de LLA B e correlação com as taxas de sobrevida global



Altoé SRM(1), Biojone ER (1), Magalhães IMQS (1), Córdoba JCM (1), Furtado FM (1,2),
Camargo R (1), Pontes RM (1), Toscano RA (1), Dias ACS (1)

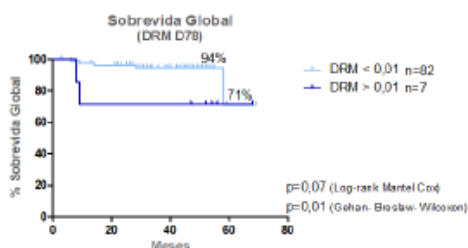
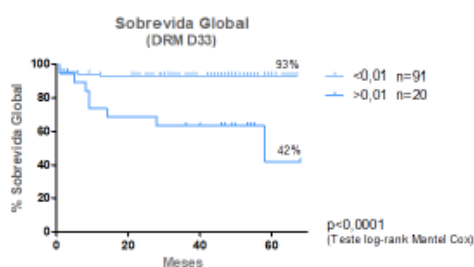
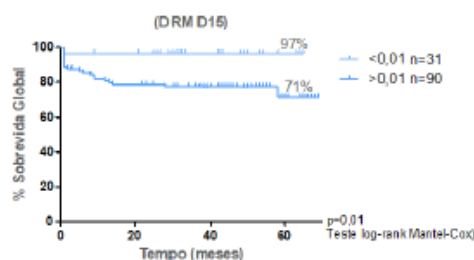
1 Hospital da Criança de Brasília José de Alencar (HCB), DF, Brasil
2 SABIN Medicina diagnóstica

Introdução

Desde a sua incorporação como ferramenta para avaliação de resposta ao tratamento, a DRM se consolidou como o principal fator prognóstico na Leucemia Linfóide Aguda (LLA). O trabalho foi desenvolvido para avaliar a correlação entre valores de DRM em diferentes momentos e as taxas de sobrevida global (SG) dos pacientes tratados em uma instituição pública de referência no Brasil.

Objetivos

O objetivo do estudo foi avaliar se os valores de DRM aferidos durante e após a quimioterapia de indução de crianças com diagnóstico de LLA B interferem nas taxas de sobrevida global dos pacientes tratados em instituição pública de referência no Brasil.



Metodologia

Foram avaliados 122 pacientes com idade entre 1 e 18 anos com diagnóstico de LLA B admitidos no HCB de julho de 2018 a setembro de 2022, tratados pelo protocolo BFM ALLIC 2009 adaptado. A DRM, realizada por citometria de fluxo (8 cores) foi aferida nos dias D15, D33 e D78. Foram avaliadas curvas de SG considerando dois grupos distintos de pacientes de acordo com a positividade da DRM aferida em três diferentes momentos: D15, D33 e D78. Valores de DRM superiores a 0,01 foram considerados como positivos.

Resultados

As taxas de SG dos pacientes com DRM negativa foram marcadamente superiores às taxas de SG dos pacientes com DRM positiva, especialmente quando considerados os valores aferidos no D15 (97% X 71%; $p=0,01$) e D33 (93% X 42%; $p<0,0001$). Quando consideramos o D78, embora a SG dos pacientes com DRM negativa tenha se mostrado superior, o achado não foi estatisticamente significativo ($p>0,05$). Acreditamos que possivelmente essa diferença se mostre evidente com a ampliação do número amostral.

Conclusão

Nossos achados apontam para o valor da avaliação da DRM no D33, não preconizado pelo BFM, mas adotado em protocolo adaptado na instituição. Além disso, os dados confirmam a relevância da DRM como ferramenta para avaliação de resposta ao tratamento e sua importância como fator preditivo de prognóstico em crianças com LLA B.

Referências

1. RADU IE, COLITA A, PASCA S, TOMULEASA C, POPA C, SERBAN C, GHEORGHE A, SERBANICA A, JERCAN C, MARCU A, BICA A, TEODORESCU P, CONSTANTINESCU C, PETRUSHEV B, ASAN M, JARDAN C, DRAGOMIR M, TANASE A, COLITA A. Day 15 and Day 33 Minimal Residual Disease Assessment for Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Treated According to the BFM ALL IC 2009 Protocol: Single-Center Experience of 133 Cases. Front Oncol. 2020 Jun 30;10:923. doi: 10.3389/fonc.2020.00923. PMID: 32695667; PMCID: PMC7338564.
2. BRISCO MJ, SYKES PJ, HUGHES E, DOLMAN G, NEOH SH, PENG LM, TOOGOOD I, MORLEY AA. Monitoring minimal residual disease in peripheral blood in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol. 1997 Nov;99(2):314-319. doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.3723186.x. PMID: 9375747.
3. COUSTAN-SMITH E, SANCHO J, HANCOCK ML, RAZZOUK BI, RIBEIRO RC, RIVERA GK, RUBINIZ JE, SANDLUND JT, PUI CH, CAMPANA D. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2002 Oct 1;100(7):2399-402. doi: 10.1182/blood-2002-04-1130. PMID: 12239148.
4. VERBEEK MWC, VAN DER VELDEN VHJ. The Evolving Landscape of Flowcytometric Minimal Residual Disease Monitoring in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. Int J Mol Sci. 2024 Apr 30;25(9):4881. doi: 10.3390/ijms25094881. PMID: 38732101; PMCID: PMC11084622.
5. VAN DER VELDEN VH, JACOBS DC, WIJKHUIS AJ, COMANS-BITTER WM, WILLEMSE MJ, HÄHLEN K, KAMPS WA, VAN WERING ER, VAN DONGEN JJ. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), but not in precursor-B-ALL. Leukemia. 2002 Aug;16(8):1432-6. doi: 10.1038/sj.leu.2402636. PMID: 12145681.



ANEXO 5 - IMUNOFENOTIPAGEM PARA DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS AGUDAS POR CITOMETRIA DE FLUXO NO HCB

Procedimento para marcação de anticorpos monoclonais e análise para o exame de imunofenotipagem para diagnóstico de leucemias agudas por citometria de fluxo de pacientes da onco-hematologia do HCB

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

Amostras

Tipo: Aspirado de medula óssea ou sangue periférico.

Coleta: Dois mililitros (2 mL) de aspirado de medula óssea ou sangue periférico coletados em tubo estéril com anticoagulante EDTA ou heparina.

Temperatura: Temperatura ambiente até o processamento.

Estabilidade: até 48 horas após a coleta.

Armazenamento: Temperatura ambiente até o processamento. Após o processamento as amostras são armazenadas sob refrigeração de 4°C a 8°C por sete dias.

Descarte: Os frascos são descartados em saco branco leitoso, próprio para a destinação de resíduos infectantes. Ao final do dia, este resíduo é recolhido pela equipe de limpeza do HCB.

Horário de recebimento de amostras: As amostras devem ser entregues ao LPT imediatamente após a coleta. De segunda a quinta das 07:00 as 18:00h, as sextas e vésperas de feriados das 07:00 as 16:00h.

Materiais e Equipamentos

Tubos de poliestireno de 5 mL 75 mm x 12 mm, compatíveis com o citômetro FACS Canto II;

Estante para tubos de citometria;

Pipetas automáticas (P10, P200 e P1000);

Ponteiras estéreis (10 µL, 200 µL e 1000 µL);

Pipeta Pasteur;

Centrífuga;

Agitador de tubos tipo vórtex;

Geladeira com temperatura de 4°C a 8°C;

Descarte com solução de hipoclorito de sódio a 1%;

Local escuro para incubação em temperatura ambiente;

Cronômetro;

Citômetro de fluxo (BD FACS Canto II).



Reagentes

Solução de lise de hemácias;
Kit de fixação e permeabilização celular;
Anticorpos monoclonais;
Solução isotônica FACSFlow;
Hipoclotiro de sódio a 1%.

EPI'S

Luvas descartáveis não estéreis / Óculos / Jaleco

Protocolos de Marcação de Leucócitos

Quando a suspeita é leucemia aguda, primeiramente é avaliado o esfregaço sanguíneo para verificar se há presença de células leucêmicas (blastos). Uma vez confirmado a presença de blastos, é necessário fazer o processamento primeiramente de um tubo de triagem de leucemia aguda para definir a distinção entre LMA, LLA-B ou LLA-T. Após a confirmação do tipo de leucemia aguda, será realizado o processamento de tubos adicionais para definição de estágio de maturação, presença de anticorpos aberrantes e alterações imunofenotípicas, que serão importantes para a avaliação de Doença Residual Mínima posteriormente. No anexo 1, são mostrados os painéis de anticorpos monoclonais que são usados de acordo com protocolos estabelecidos pelo laboratório.

Marcação de tubo de triagem para leucemia Aguda

Pipetar os anticorpos em tubo compatível com o citômetro de fluxo de acordo com painel de imunofenotipagem estabelecido pelo laboratório, respeitando a titulação de cada anticorpo.

Adicionar o volume de sangue equivalente a 10^6 leucócitos. Caso o volume de sangue pipetado seja menor que $100\ \mu\text{L}$, completar o volume para $100\ \mu\text{L}$ com *FACSFlow*.

Homogeneizar e incubar por 15 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente (gaveta).

Adicionar $100\ \mu\text{L}$ de solução estabilizante (etapa necessária para fixar as células).

Homogeneizar e incubar por 15 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

Adicionar 2 mL de *FACSFlow* e centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm.



Desprezar o sobrenadante vertendo todo o tubo.

Adicionar 100 µL de solução para permeabilizar a membrana celular (etapa necessária para que o anticorpo intracitoplasmático chegue ao citoplasma da célula).

Incubar durante 5 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

Pipetar os anticorpos intracitoplasmáticos de acordo com painel de imunofenotipagem estabelecido pelo laboratório, respeitando a titulação de cada anticorpo.

Incubar durante 15 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

Adicionar 2 mL de FACSFlow e centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm.

Desprezar o sobrenadante vertendo todo o tubo.

Adicionar 2 mL de FACSFlow e centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm.

Desprezar o sobrenadante vertendo todo o tubo.

Ressuspender o pellet com 300-500 µL de FACSFlow.

Adquirir 100.000 eventos ou todo o líquido contido no tubo no citômetro FACSCanto II.

As células fixadas com o kit de fixação e permeabilização celular podem ser armazenadas entre 2° a 8°C, ao abrigo da luz por até 24 horas.

Expansão de painéis – Protocolo de superfície (anticorpos de membrana) (Anexo 1)

O protocolo de superfície é realizado nos tubos: Tubo 1 de LLA-B, Tubo 4 de LLA-T e tubos de 1 a 6 de LMA.

Pipetar os anticorpos em tubo compatível com o citômetro de fluxo de acordo com painel de imunofenotipagem estabelecido pelo laboratório, respeitando a titulação de cada anticorpo.

Adicionar o volume de sangue equivalente a 10⁶ leucócitos. Caso o volume de sangue pipetado seja menor que 100 µL, completar o volume para 100 µL com FACSFlow.

Homogeneizar e incubar por 15 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente (gaveta).

Adicionar 2 mL de solução de lise 1 X. Homogeneizar em vórtex. Incubar por 10 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.



OBS: O preparo e a quantidade de solução de lise a ser adicionada no tubo pode variar de acordo com o fabricante da solução. Antes de usar, leia o procedimento técnico para definir o protocolo a ser usado.

Centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm.

Desprezar sobrenadante. Verter o tubo no descarte de resíduos biológicos.

Adicionar 2 mL de FACSFlow, homogeneizar e centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm.

Desprezar sobrenadante. Verter o tubo no descarte de resíduos biológicos.

Ressuspender o pellet com 300 a 500 μ L de FACSFlow.

Adquirir 100.000 eventos no citometro *FACSCanto II*.

Expansão de painéis – Protocolo intra-citoplasmático (anticorpos destacados em vermelho nos painéis)

O protocolo intra-citoplasmático é realizado nos tubos: Tubo 2 de LLA-B, Tubos 1, 2 e 3 de LLA-T e tubo 7 de LMA/SMD.

É necessário usar um kit de reagentes de fixação e permeabilização para que os anticorpos intra-citoplasmáticos cheguem até o citoplasma das células.

Pipetar os anticorpos de superfície em tubo compatível com o citômetro de fluxo de acordo com painel de imunofenotipagem estabelecido pelo laboratório, respeitando a titulação de cada anticorpo.

Adicionar o volume de sangue equivalente a 10^6 leucócitos. Caso o volume de sangue pipetado seja menor que 100 μ L, completar o volume para 100 μ L com FACSFlow.

Homogeneizar e incubar por 15 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente (gaveta).

Adicionar 100 μ L de solução estabilizante (etapa necessária para fixar as células).

Homogeneizar e incubar por 15 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

Adicionar 2 mL de FACSFlow e centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm.

Desprezar o sobrenadante vertendo todo o tubo.

Adicionar 100 μ L de solução para permeabilizar a membrana celular (etapa necessária para que o anticorpo intracitoplasmático chegue ao citoplasma da célula).



Homogeneizar até desgrudar o botão de hemácias do fundo do tubo e pipetar os anticorpos intra-citoplasmáticos de acordo com painel de imunofenotipagem estabelecido pelo laboratório, respeitando a titulação de cada anticorpo.

Incubar durante 15 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

Adicionar 2 mL de FACSFlow e centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm.

Desprezar o sobrenadante vertendo todo o tubo.

Adicionar 2 mL de FACSFlow e centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm.

Desprezar o sobrenadante vertendo todo o tubo.

Ressuspender o pellet com 300-500 µL de FACSFlow.

Adquirir 100.000 eventos ou todo o líquido contido no tubo no citometro FACSCanto II.

As células fixadas com o kit de fixação e permeabilização celular podem ser armazenadas entre 2° a 8°C, ao abrigo da luz por até 24 horas.

Análise da aquisição

Os dados da aquisição poderão ser analisados posteriormente através dos softwares para análise FACSDiva, Infinicity ou Kaluza.

Para analisar os eventos adquiridos no citômetro é utilizada a estratégia de análise definida pelo laboratório (Anexo 2).

Na estratégia de análise retirar os doublets (partículas duplas ou grumos celulares) através da seleção de regiões (gates).

Retirar os debris, selecionando apenas as células viáveis. Os debris são restos celulares que podem na análise das populações celulares.

Identificar todas as populações celulares presente na amostra.

Avaliar a presença ou ausência de expressão para todos os anticorpos monoclonais utilizados para definir o fenótipo das células leucêmicas.

A classificação das leucemias segue a classificação da WHO,2022.

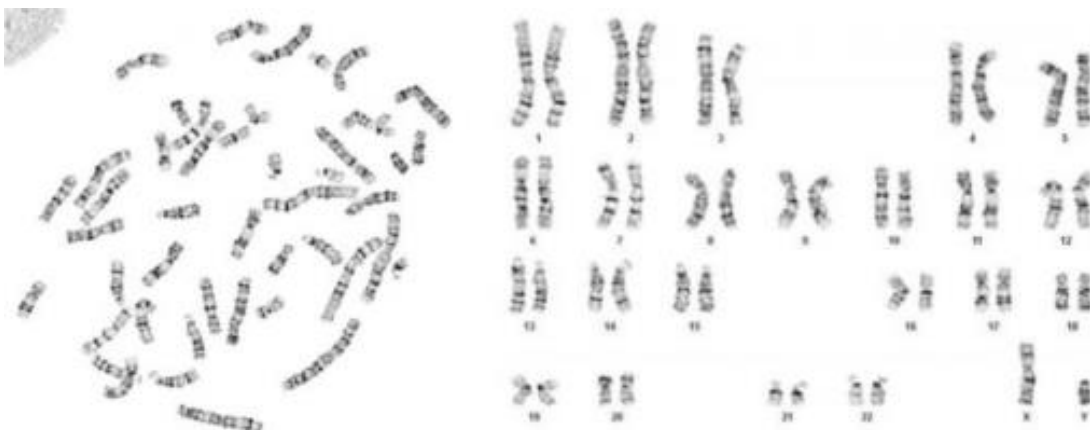
Emissão de Laudos

Os laudos são liberados no sistema hospitalar MV de forma descritiva, onde são reportados todos os anticorpos utilizados, o número de eventos adquiridos e o percentual de cada população celular encontrada na amostra com a descrição das expressões dos anticorpos monoclonais.

A conclusão diagnóstica se baseia no imunofenótipo encontrada nas células leucêmicas.

ANEXO 6 - TÉCNICA DE CITOGENÉTICA POR BANDAMENTO G

1. Preparações cromossômicas feitas a partir de culturas de curto prazo de medula óssea por um procedimento convencional de secagem ao ar.
2. Meio hipotônico: 0-075M KCl por 3-4 minutos a 37°C.
3. Fixação: 3 partes de metanol/1 parte de ácido acético glacial. Fixador é trocado 3 vezes.
4. Células suspensas em fixador são secas ao ar em lâminas limpas e secas.
5. Lâminas selecionadas são colocadas em posição horizontal
6. Adiciona-se 0-25% de tripsina (Difco) em solução salina isotônica por 10-15 segundos e enxaguada duas vezes com solução salina isotônica.
7. A preparação pode ser examinada, úmido, por microscopia de contraste de fase para avaliar o ação da enzima nos cromossomos e, se considerado necessário, exposto a mais um breve período de digestão enzimática.
8. Coloração com Leishman (B.D.H.) diluído 1/4 com tampão pH 6-8 (G. T. Gurr) por 3-5 minutos. Enxaguar em pH 6-8 amortecedor.
9. Se a mancha for muito intensa, pode ser reduzida, através de lavagem em tampão e se a mancha for fraca: Coloração adicional com Leishman.
10. Secagem da lâmina, enxague em xilol, e colocação em meio de montagem neutro.
11. Os padrões de faixas são muito semelhantes em cromossomos homólogos e as faixas se estendem por ambas as cromátides de uma maneira regular e uniforme



1. Propagação de metáfises.

2. Cariótipo.



ANEXO 7 - PESQUISA DE REARRANJOS GÊNICOS EM LEUCEMIAS INFANTIS POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE APÓS TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

a. Amostra

Tipo: cDNA a partir de RNA extraído de leucócitos de sangue periférico ou aspirado de medula óssea.

Coleta: 3-4 mL de sangue periférico ou aspirado de medula óssea em um tubo estéril contendo 0,5 mL de anticoagulante EDTA.

Preparo: homogeneizar gentilmente.

b. Materiais e Equipamentos

Capela de fluxo laminar

Estante para microtubos de 0,2 e 1,5 mL

Pipetas automáticas (p2, p10, p200 e p1000)

Ponteiras estéreis com filtro (10 µL, 200 µL e 1000 µL)

Microtubos de 0,2 mL estéreis

Geladeira a 4°C

Freezer a -80°C

Termociclador

c. Reagentes

Kit para PCR contendo TaqDNA polimerase, dNTPs, tampão e MgCl₂;

Oligonucleotídeos iniciadores (Primers).

d. EPI'S

Avental / Luvas descartáveis para procedimento não-cirúrgico.

e. Preparação

Descongelar os cDNAs, reagentes para PCR e primers, homogeneizar e colocar em banho de gelo.

Materiais e bancada: Qualquer material utilizado deve ser previamente autoclavado e as superfícies das bancadas, suportes e pipetas limpas com etanol 70%, seguido de RNase AWAY.



f. Protocolo

O procedimento foi adaptado do artigo de Van Dongen *et al.*, (1999). A pesquisa de translocações é feita com o uso de primers para detecção dos híbridos *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *KMT2A-AF4*, *BCR-ABL1* e *SIL-TAL*, para leucemias linfoides agudas, e *AML1-ETO*, *PML-RARA*, *CBFB-MYH11* e *BCR-ABL1*, para leucemias mieloides agudas.

As reações de PCR devem ser confeccionadas de acordo com o imunofenótipo da leucemia. Se linfóide, utilizam-se pares de primers para detecção de *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *KMT2A-AF4*, *BCR-ABL1p190* e *BCR-ABL1p210* e *SIL-TAL*. Se Mieloide, são utilizados primers para *AML1-ETO*, *PML-RARA*, *CBFB-MYH11* e *BCR-ABL1p190* e *BCR-ABL1p210*. Além dos híbridos, nos testes são incorporados um controle positivo para teste de qualidade da amostra por paciente (gene da beta-microglobulina – $\beta 2m$) e controles negativos de cada par de primer.

Preparar os tubos de 0,2 mL, identificar com o código do paciente e tipo de híbrido pesquisado. Pipetar os reagentes de PCR, variando apenas os pares de primers, conforme concentração final indicada na tabela a seguir:

	[]estoque	[]final	volume (uL)
H ₂ O	N/A	N/A	11,0 uL
Tp10X	10X	1X	1,5 uL
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,45 uL
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,3 uL
Taq	5U/uL	0,75 U	0,15 uL
PR Fwd	10 uM	0,2 uM	0,3 uL
PR Rev	10 uM	0,2 uM	0,3 uL
cDNA	N/A	N/A	1,0 uL
		TOTAL	15,0 uL



Os testes são feitos em um volume final de 15 µL, contendo primers para pesquisa dos híbridos de maneira separada (e.g, um híbrido ou ponto de quebra por reação). Após finalização dos mixes, os tubos devem ser colocados no termociclador conforme ciclagem abaixo:

95°C	3 min	1x
95°C	30 s	35x
65°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1x
4°C	∞	

Após a ciclagem, os produtos de PCR são analisados em gel de agarose 1,5 % em tampão SB1X (NaOH 10 mM; ácido bórico 65,75 mM; pH 8,0), o gel é corado com SYBR Green (Invitrogen) e fotodocumentado no sistema LPIX (Loccus).

Os pacientes cujas reações de PCR forem todas negativas e os controles positivo e negativo funcionarem, o resultado é liberado como negativo. Para aqueles pacientes em que a RT-PCR for positiva, é feito um teste confirmatório por gene híbrido utilizando mais dois pares de primers, um flanqueando mais externamente o ponto de quebra (shifted) e o outro mais internamente (nested). Se positivo, o resultado está confirmado e é liberado como positivo para o gene híbrido em questão.

Os resultados são digitados, revisados em forma de dupla-verificação e liberados no sistema MV Soul.



ANEXO 8 - PESQUISA DE *P2RY8::CRLF2*

Tipo de PCR: RT-PCR convencional

Material utilizado no ensaio: cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de leucócitos de aspirado de medula óssea.

Método de Purificação: Purificação pelo método do Trizol.

Primers utilizados:

Código LPT	Nome do oligo	Sequência
PR055	PR 055	CACGAACACCTTCTCAAGCA
PR056	PR 056	AGCCTCCCAGCAGAAAGAC

Kit de PCR utilizado: Platinum Taq DNA Polymerase, Brasil (Invitrogen)

Protocolo:

1- **Quantidade de material analisado:** 1 ul de cDNA sintetizado a partir de 2 ug de RNA total.

2- **Reação:**

Reagente	Concentração Estoque	Concentração final	Volume (uL)
H ₂ O	N/A	N/A	11,0
Tampão	10X	1X	1,5
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,45
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,3
Taq Polimerase	5 U/uL	0,75 U	0,15
Primer FWD	10 uM	0,2 uM	0,3
Primer REV	10 uM	0,2 uM	0,3
cDNA	N/A	N/A	1,0
		Volume final	15,0

3- **Ciclagem:**

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	95	3 min
Desnaturação	95	30 s
Anelamento	68	30 s
Extensão	72	60 s
Extensão final	72	5 min

} 35X



Conservação	4	<i>Hold</i>
-------------	---	-------------

Nome do programa no termociclador: CRLF2

4- Análise:

Método: Gel de agarose 1,5% com Brometo de Etídeo. Corrida de 30 minutos a 90 V (Cuba mini).

Bandas esperadas:

Genótipo	Banda	Tamanho esperado
Mutado	Mutado	290



ANEXO 9 - AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DO *FLT3* POR PCR EM TEMPO REAL

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

Reagentes e Equipamentos:

Sistema de PCR em Tempo Real QuantStudio 5

Mistura Master de PCR SYBR™ Green 2x (ThermoFisher Scientific)

Primers:

FLT3:

- Forward (FWD): AGGGACAGTGTACGAAGCTG
- Reverse (REV): GTCGTGCTTAAAGACCCAGAG

Genes de referência:

HPRT1:

- Forward (FWD): TGACACTGGCAAAACAATGCA
- Reverse (REV): GGTCTTTTTCACCAGCAAGCT

B2M:

- Forward (FWD): TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT
- Reverse (REV): TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT

Condições de Amplificação:

Estágio de manutenção:

- 2 minutos a 50°C
- 10 minutos a 95°C

Ciclos (40 vezes):

- 95°C por 15 segundos
- 60°C por 1 minuto

Análise da curva de fusão foi realizada para avaliar a especificidade do amplicon.

Análise de Dados:

Para determinar a quantificação relativa (RQ) da expressão gênica, os dados foram analisados usando o método de quantificação comparativa Ct ($\Delta\Delta C_t$).

A quantidade de cada mRNA, normalizada para os genes de referência endógenos (HPRT1 e B2M) e relativa ao valor mediano como calibrador, foi convertida em quantificação relativa pela fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$.



ANEXO 10 – CRITÉRIOS DA ASSOCIAÇÃO DE PATOLOGIA MOLECULAR (AMP) PARA CATEGORIZAÇÃO DE VARIANTES BASEADA EM EVIDÊNCIAS

	Significado Clínico	Nível de Evidência
Tier 1	Forte significado clínico	Nível A Tratamento aprovado pelo FDA incluído em “guidelines” profissionais Nível B Estudos bem fundamentados com consenso de especialistas na área
Tier 2	Significado clínico potencial	Nível C Tratamento aprovado pelo FDA para diferentes tipos de tumor ou tratamentos em investigação. Vários pequenos estudos publicados com alguns consensos Nível D Estudos pré-clínicos ou relatos de poucos casos sem consenso estabelecido.
Tier 3	Significado clínico desconhecido	Ausência de publicação com evidências convincentes de associação com câncer
Tier 4	Variantes benignas ou provavelmente benignas	Ausência de evidências de associação com câncer publicadas

Li *et al*, 2017