

Wellington Fernandes da Silva Junior

**Leucemia linfoblástica aguda do adulto:
resultados da otimização da avaliação genética e
dos protocolos terapêuticos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do crescimento celular,
hemodinâmicos e da hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Vanderson Geraldo Rocha

São Paulo, 2022

Wellington Fernandes da Silva Junior

**Leucemia linfoblástica aguda do adulto:
resultados da otimização da avaliação genética e
dos protocolos terapêuticos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do crescimento celular,
hemodinâmicos e da hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Vanderson Geraldo Rocha

São Paulo, 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva Junior, Wellington Fernandes da
Leucemia linfoblástica aguda do adulto :
resultados da otimização da avaliação genética e dos
protocolos terapêuticos / Wellington Fernandes da
Silva Junior. -- São Paulo, 2022.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular,
Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Vanderson Geraldo Rocha.

Descritores: 1.Leucemia-linfoma linfoblástico de
células precursoras 2.Análise de sobrevida
3.Análise de regressão 4.Asparaginase 5.Cromossomo
Filadélfia 6.Transplante de medula óssea

USP/FM/DBD-065/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Wellington Fernandes da Silva Junior

**Adult acute lymphoblastic leukemia: outcomes
after optimization of genetic evaluation and
treatment regimens**

Dissertation presented to Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo to obtain the title of PhD in Sciences

Programa de Ciências Médicas

Concentration area: Distúrbios do crescimento celular,
hemodinâmicos e da hemostasia

Mentor: Prof. Dr. Vanderson Rocha

São Paulo, 2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha amiga Lidiane Inês da Rosa, colega hematologista que nos deixou tão precocemente no ano de 2020 e que, sem a qual, não poderia ter obtido parte dos dados deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, desde os pacientes, objetivo comum dos resultados deste projeto, aos professores contribuintes do mesmo – Prof Vanderson Rocha, Prof Eduardo Rego, Prof Elvira Velloso e Prof. Israel Bendit.

Aos pesquisadores dos centros participantes dos trabalhos multicêntricos (HC-Unicamp, HEMORIO, CEPON, HC – UFPR), os profissionais dos laboratórios da Hematologia (laboratório de Citogenética e de Biologia Tumoral) e aos colegas assistentes/residentes do serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, do qual orgulhosamente faço parte.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Regulamento da pós-graduação programa de Ciências Médicas para teses apresentadas na forma de compilação de artigos: Resolução CoPGr N° 7415, de 18 de outubro de 2017.

Normalização: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. LEUCEMIAS AGUDAS: UMA VISÃO GERAL	1
1.2. ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.....	2
1.3. TRATAMENTO DA LLA DO ADULTO.....	4
1.4. PROGNÓSTICO EM LLA DO ADULTO	5
1.5. NOVOS SUBTIPOS EM LLA-B	6
1.6. LLA NA AMÉRICA LATINA	8
2. PROJETO APROVADO NA COMITÊ DE ÉTICA (CAPPESQ-HC) E EMENDAS ASSOCIADAS	10
1.7. TÍTULO:	10
1.8. INTRODUÇÃO:.....	10
1.9. OBJETIVOS:	13
1.10. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	13
1.10.1. <i>Crítérios de Inclusão</i>	13
1.10.2. <i>Crítérios de Exclusão</i>	13
1.11. MATERIAIS E MÉTODOS	14
1.11.1. <i>Pacientes</i>	14
1.11.2. <i>Desenho do estudo</i>	14
1.11.3. <i>Coleta de amostras</i>	16
1.11.4. <i>MLPA (Amplificação Multiplex de sondas dependentes de ligação)</i> 16	
1.11.5. <i>FISH (Fluorescência por hibridação in situ)</i>	17
1.11.6. <i>Reação em cadeia de polimerase para painel pré-estabelecido</i> . 18	
1.11.7. <i>Coleta de dados clínicos</i>	18
1.11.8. <i>Análise Estatística</i>	18
1.11.9. <i>Centros Parceiros</i>	19
1.12. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	19
1.13. CRONOGRAMA	21
1.14. EMENDAS E PROJETOS ASSOCIADOS	21
3. ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS	22

1.15. TOXICITY PROFILE OF PEG-ASPARAGINASE IN ADULT PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN BRAZIL: A MULTICENTER CROSS-SECTIONAL STUDY	22
1.16. PHILADELPHIA-POSITIVE B-LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN A MIDDLE-INCOME COUNTRY - A REAL-WORLD MULTICENTER COHORT	22
1.17. ADULT ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN A RESOURCE-CONSTRAINED SETTING: OUTCOMES AFTER EXPANSION OF GENETIC EVALUATION (SUBMETIDO)...	23
4. DISCUSSÃO.....	24
5. CONCLUSÕES.....	28
6. REFERÊNCIAS	29

RESUMO

Fernandes da Silva Junior, W. *Leucemia linfoblástica aguda do adulto: resultados da otimização da avaliação genética e dos protocolos terapêuticos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Em adultos, a leucemia linfoblástica aguda (LLA) tem desfechos significativamente inferiores quando comparada com a população pediátrica, com cerca de 40-50% dos pacientes alcançando remissão a longo prazo. Na América Latina, levantamentos retrospectivos unicêntricos apontam que a sobrevida da população adulta é inferior à de países desenvolvidos. Diferenças clínicas e até mesmo genéticas nesta doença são descritas e o impacto de alterações genéticas já bem descritas mundo afora como deleção e/ou mutação do *IKZF1*, rearranjo do *CRLF2* e determinadas mutações em tirosino-quinases ainda não foram publicadas em coorte brasileira. O presente estudo tem como objetivo aprofundar a caracterização genética da LLA do adulto, utilizando a coorte de pacientes tratados em centro público com protocolo uniformizado de tratamento, visando também analisar os desfechos obtidos com a otimização da avaliação genética e terapêutica, além da toxicidade do tratamento, em particular da asparaginase. Pacientes diagnosticados com LLA ou leucemia de linhagem ambígua no Instituto do Câncer de São Paulo (ICESP) entre 2015 e 2020 foram o foco central da tese, embora parte dos achados tenham sido associados com coortes de outras instituições, visando aumentar o poder estatístico para determinados desfechos. Um total de 104 pacientes foram incluídos inicialmente, com mediana de 37,5 anos. Cromossomo Filadélfia (Ph) foi encontrado em 33 pacientes. Dentre 45 casos de LLA de linhagem B Ph-negativos, após a exclusão de casos com fusão envolvendo os genes *KMT2A* ou *TCF3/PBX1*, 9 casos com fusão Ph-*like* foram identificados. Sobrevida global (SG) e livre de eventos em 3 anos foram 42.8% e 30.8%, respectivamente. Para pacientes tratados com regime pediátrico, SG em 3 anos foi de 52.5%. Pacientes Ph-positivos foram analisados conjuntamente à coortes consecutivas de mais outros 4 centros públicos. Um total de 123 pacientes Ph+ com LLA foram analisados,

encontrando-se uma SG de 25% em 4 anos. A incidência de recaída foi de 29%, enquanto a mortalidade não-recaída foi de 42%. Somente idade foi independentemente associada com SG, e níveis de desidrogenase láctica e invasão de sistema nervoso central com recaída neste coorte. Os efeitos da asparaginase peguilada (PEG), aprovada no Brasil em 2017, foram avaliados em coorte envolvendo mais 2 centros. Neste estudo, 57 pacientes foram incluídos – a incidência de eventos tromboembólicos foi de 17.5%. Hepatotoxicidade grau 3 ou superior foi mais frequente em pacientes obesos. Os eventos associados à PEG em nosso meio foram igualmente relatados em estudos de países desenvolvidos.

Descritores: Leucemia-Linfoma Linfoblástico de Células Precursoras; Análise de sobrevida; Análise de regressão; Asparaginase; Cromossomo Filadélfia; Transplante de medula óssea.

ABSTRACT

Fernandes da Silva Junior, W. *Adult acute lymphoblastic leukemia: outcomes after optimization of genetic evaluation and treatment regimens* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

In adults, acute lymphoblastic leukemia (ALL) presents with significantly inferior outcomes when compared to the pediatric population, with a long-term survival rate of 40-50%. In Latin America, single center retrospective reports have pointed that the long-term survival for adults is even inferior to that reported by developed countries. Clinical and genetic differences are described in this setting and the impact of genetic lesions already reported worldwide, such as *IKZF1* deletion, *CRLF2* rearrangement and tyrosine-kinase mutations were not published in our setting. The present study aims to deepen the genetic characterization of adult ALL, using a local cohort of patients treated with a standardized treatment regimen. We also intend to analyze long-term outcomes of these patients, as well as its toxicity, especially of asparaginase. Patients newly diagnosed with ALL or ambiguous lineage at the Instituto do Cancer de São Paulo (ICESP) between 2015 and 2020 were the backbone of this project, although part of our analysis were added to cohorts from other centers, aiming at increasing the statistical power. A total of 104 patients was included, with a median age of 37.5 years. Philadelphia chromosome was detected in 33 cases of B-lineage. Among 45 Ph-negative B-lineage, after excluding *KMT2A* or *TCF3-PBX1* cases, we identified 9 cases with a Ph-like fusion. Three-year overall survival (OS) and 3-year event-free survival were 42.8% and 30.8%, respectively. For patients treated with a pediatric regimen, 3-year OS was 52.5%. Ph-positive patients were studied alongside cohorts from other 4 public centers. A total of 123 Ph+ ALL patients was included, with a 4-year OS of 25%. Cumulative relapse incidence was 29%, while non-relapse mortality was 42%. Only age was independently associated with OS, and lactate dehydrogenase level and central nervous disease at diagnosis were related to relapse in our cohort. Toxicity of pegylated-

asparaginase (PEG), approved in Brazil in 2017, was evaluated in a cohort encompassing more other 2 centers. In this study, 57 patients were included – incidence of thromboembolic events was 17.5%. In obese patients, grade 3 hepatotoxicity and hyperbilirubinemia were more common. PEG-related adverse events were reported in our setting in a similar frequency to that reported by developed countries.

Descriptors: Precursor Cell Lymphoblastic Leukemia-Lymphoma; Survival Analysis; Regression Analysis; Asparaginase; Philadelphia Chromosome; Bone marrow transplantation.

1. Introdução

1.1. Leucemias agudas: uma visão geral

A leucemia aguda é uma doença resultante de mutações adquiridas por células-tronco ou progenitoras normais da medula óssea, conferindo vantagem proliferativa clonal e subsequente capacidade de invadir tecidos (1). A percepção de que alterações genômicas estavam por trás do desenvolvimento desta doença datam do meio do século XX, no qual translocações cromossômicas recorrentes passaram a ser descritas por citogeneticistas (1). As leucemias agudas se caracterizam pelo acúmulo de células imaturas na medula óssea, tecidos e, quase sempre, no sangue periférico dos doentes, levando à falência da hematopoese normal (2). De modo geral, estas células podem ser de linhagem mieloide ou linfoide, de acordo com a expressão de antígenos de superfície detectados pelo exame de imunofenotipagem, exame considerado indispensável no diagnóstico desta enfermidade nos dias de hoje (2).

Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) categoriza os casos de leucemia aguda de acordo com a linhagem (mieloide, linfoide ou de linhagem ambígua) e com as alterações genéticas recorrentes encontradas, especialmente na leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia de células B precursoras (LLA-B) (3). As leucemias linfoblásticas agudas são classicamente subdivididas em leucemias de células precursoras B (LLA-B) e de células T (LLA-T). Um último e mais infrequente subgrupo, as leucemias de linhagem ambígua, são um grupo de doenças cuja imunofenotipagem não permite definitivamente concluir a que tipo de linhagem a célula leucêmica pertence.

LLA é a malignidade mais comum da infância e consideráveis avanços tem levado à cura da maior parte das crianças acometidas (4). A incidência anual de LLA nos Estados Unidos é de 1,7 casos/100000 pessoas (SEER, 2019). A distribuição de idade desta doença é bimodal, com um pico maior de incidência na infância e ao redor dos 60 anos (6). A incidência no Brasil

não é exatamente conhecida, porém dados no Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam que houveram 5.940 casos novos de leucemia em homens e 4.860 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019, não distinguindo especificamente o subtipo (INCA, 2018).

A progressiva implementação de modificações sequenciais nos protocolos multidroga tem demonstrado um consistente aumento da sobrevida ao longo das décadas em crianças (4). Historicamente, o desfecho de pacientes adultos com LLA não é tão bem sucedido – estima-se que 40-50% dos pacientes atualmente são curados da doença (8). A implementação de protocolos “pediátricos” na população adulta jovem parece aumentar as chances de sobrevivência e o uso de terapias alvo recentemente incorporadas no arsenal terapêutico tem ampliado ainda mais os horizontes de cura destes doentes (6,9).

1.2. Alterações genéticas em leucemia linfoblástica aguda

Além das clássicas translocações descritas em LLA-B definidas pela OMS (Quadro 1), a análise por técnicas de sequenciamento de próxima geração (*Next generation sequencing*, NGS) de genoma e exoma tem permitido encontrar múltiplas deleções e mutações em genes junto com as alterações previamente descritas (1). É hipotetizado que modificações cromossomais estruturais sejam as lesões genéticas iniciadoras, com alterações em número de cópias (*copy number alterations*, CNA) e mutações sequenciais somáticas sendo as alterações secundárias também elicitadoras da leucemogênese (10).

Quadro 1. Classificação das leucemias linfoblásticas e de linhagem ambígua (OMS, 2016)
Leucemias Agudas de Linhagem Ambígua
- Leucemia indiferenciada aguda
- Leucemia Aguda de Fenótipo Misto com t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
- Leucemia Aguda de Fenótipo Misto com t(v;11q23.3); rearranjo do KMT2A
- Leucemia Aguda de Fenótipo Misto B/mielóide, não especificada
- Leucemia Aguda de Fenótipo Misto T/mielóide, não especificada
Leucemia/Linfoma Linfoblástico B
- Leucemia/Linfoma Linfoblástico B não especificado

- Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
- Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com t(v;11q23.3); rearranjo do KMT2A
- Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1
- Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com hiperdiploidia
- Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com hipodiploidia
- Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com t(5;14)(q31.1;q32.3) IL3-IGH
- Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com t(1;19)(q23;p13.3) TCF3-PBX1
- Leucemia/Linfoma Linfoblástico B <i>BCR-ABL1-like</i>
- Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com iAMP21
Leucemia/Linfoma Linfoblástico T
- <i>Early-T cell precursor leukemia*</i>
Leucemia/Linfoma Linfoblástico de células NK

A translocação mais frequentemente encontrada em LLA-B do adulto é a t(9;22)(q34;q11) (cromossomo Filadélfia), gerando a proteína de fusão *BCR/ABL1* (11). Este subtipo particular de LLA compreende 25-35% dos casos novos no adulto e deve ser atualmente tratada com combinação de quimioterapia e inibidores de tirosino-quinase (ITK), o que parece proporcionar taxas de cura semelhantes às da população Filadélfia-negativo (12–14). Demais translocações frequentemente encontradas em LLA-B do adulto são os rearranjos do gene da histona-lisina N-metiltransferase 2A (*KMT2A*, antigo *MLL*) no cromossomo 11q23, que são considerados um marcador de prognóstico ruim com protocolos contemporâneos, e a t(1;19)(q23;p13), que gera a proteína de fusão *TCF3/PBX1* (10). Este último subtipo ocorre em 5-6% dos casos do adulto e é considerado um subgrupo de risco padrão se tratada com protocolos pediátricos otimizados (15).

Hiperdiploidia alta (>50 cromossomos) é rara em adultos, porém associada com bom prognóstico. Em contrapartida, hipodiploidia (<44 cromossomos), embora raramente encontrada em adultos, é associada à prognóstico sombrio, especialmente na baixa hipodiploidia (32 – 39 cromossomos) e quase haploidia (24 – 31 cromossomos), onde alterações colaterais parecem responsabilizar-se pelo péssimo prognóstico (10).

Alterações secundárias em fatores de transcrição linfóide como *PAX5*, *IKZF1*, *EBF1* e a descrição recente de pacientes com perfil de expressão gênica semelhante à LLA-B Filadélfia positivo (Ph+), conhecidos como “Ph-like” tem ampliado ainda mais este panorama (16). Isto tem permitido que um maior número de pacientes se beneficie de estratégias terapêuticas guiadas pelos achados genéticos, como transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) em primeira linha e drogas alvo (6).

Os casos de LLA-T correspondem a cerca de 15 a 25% dos casos de LLA do adulto e reconhecidamente possuem um panorama genético mais heterogêneo. Translocações envolvendo fatores de transcrição e mutações em genes importantes de diferenciação, sinalização e supressão tumoral, como *NOTCH1*, *FBXW7*, *BCL11B* são os mecanismos mais comuns (11). O subgrupo de fenótipo mais imaturo (“*early-T precursor*” – ETP), marcado pela ausência de expressão imunofenotípica de CD1a e CD8 com positividade para um ou mais marcadores mieloides guarda um prognóstico reservado e um perfil de expressão gênica semelhante ao da célula tronco hematopoiética, merecendo menção neste momento (11).

1.3. Tratamento da LLA do adulto

Com base no conhecimento científico acumulado ao longo das últimas décadas, se entende atualmente que o tratamento da LLA do adulto deve ser feito com combinação de múltiplas classes de quimioterápicos associada à quimioterapia por via intratecal e, em alguns protocolos, radioterapia (17). Os protocolos para tratamento de LLA, em geral, possuem uma primeira fase de indução de remissão, na qual uma combinação variável de antracíclicos, corticosteroides, asparaginase e ciclofosfamida visam restaurar a hematopoese normal do paciente. Embora altas taxas de resposta completa (RC) sejam alcançadas nesta primeira fase (85-95%), a doença no adulto é marcada por posterior altas taxas de recaída, comprometendo a sobrevida global da mesma (18).

A indução é seguida por ciclos subsequentes de consolidação, intensificação e, finalmente, 1 a 3 anos de manutenção (19). Notadamente, o

uso de protocolos pediátricos na população adulta, parecem proporcionar taxas de sobrevida a longo prazo mais altas (20).

Infelizmente, na América Latina, os poucos trabalhos avaliando os resultados obtidos em LLA do adulto evidenciam taxas de cura inferiores à de países desenvolvidos (21–24). Maiores taxas de neutropenia febril, toxicidade sistêmica e menor aplicabilidade dos protocolos no contexto hospitalar contribuem com estes resultados inferiores (22,25).

Nos pacientes com rearranjo *BCR/ABL1* detectado, a combinação de ITKs ao arsenal terapêutico aprofunda as taxas de RC e de sobrevida a longo prazo, sendo hoje considerada fundamental no tratamento (14). Diversas estratégias recentes tem priorizado o uso do ITK em detrimento à quimioterapia nos regimes de indução, reduzindo o perfil de toxicidade do tratamento deste subgrupo (26). Na LLA Ph+, o acompanhamento da resposta normalmente é realizado através da quantificação, por reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR), do transcrito *BCR/ABL1* em amostras de medula óssea seriadas ao longo do tratamento (27). O alcance de remissão molecular é considerado imprescindível para cura neste subgrupo (28).

1.4. Prognóstico em LLA do adulto

Diversos fatores prognósticos vêm sendo identificados ao longo das últimas 4 décadas pelos estudos dos grandes grupos cooperativos. Entretanto, estes fatores são heterogêneos e, por vezes, superponíveis e de impacto incerto na terapia da LLA, tornando seu poder prognóstico controverso quando analisados individualmente. Classicamente, os fatores prognósticos em LLA são divididos em fatores ao diagnóstico (clínicos, imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares) e de resposta à terapia (clearance de blastos e a aferição da Doença Residual Mensurável [DRM]) (17). A primeira categoria se encontra resumida no quadro 2.

Quadro 2. Fatores de mau prognóstico em LLA do adulto
Idade acima de 35 anos
Contagem leucocitária acima de 30 mil (LLA-B) ou 100 mil (LLA-T)
LLA-B com expressão de CD20
LLA pró-B na classificação EGIL
LLA pré-B na classificação EGIL com ausência de CD10
Early-T cell precursor ou LLA-T madura na classificação EGIL
LLA T com expressão de CD117
BCR-ABL1
Rearranjo envolvendo o gene KMT2A
Hipodiploidia (<40 cromossomos)
Cariótipo complexo (≥ 5 alterações cromossômicas)
Ausência de mutação NOTCH1/FBXW7 ou presença de mutação RAS/PTEN

Apesar dos inúmeros fatores estáticos acima mencionados, sabe-se hoje que o mais poderoso fator prognóstico em LLA é a aferição da DRM (29). A avaliação seriada da resposta ao tratamento ao longo dos ciclos de tratamento parece prever com mais segurança aqueles pacientes que alcançarão remissão a longo prazo ou recairão, permitindo a utilização precoce de estratégias como o TCTH e terapias alvo (30).

1.5. Novos subtipos em LLA-B

Nos últimos anos, a utilização de tecnologias de sequenciamento em larga escala (*next-generation sequencing*, NGS) das amostras de pacientes com LLA tem permitido refinar o entendimento das alterações genéticas envolvidas na patogênese e no prognóstico desta doença (31). Ainda assim, apesar do impacto estabelecido pelo achado das translocações, CNAs e mutações pontuais no prognóstico, a expressão gênica permitiu a identificação de novos subgrupos em LLA. Estes estudos de expressão foram realizados com *microarrays* de transcriptoma e, mais atualmente, utilizando sequenciamento em larga escala de RNA (RNA-seq) (31).

Estes estudos de expressão permitiram a descoberta da assinatura Ph-like em casos não caracterizados de LLA-B, com menor resposta à quimioterapia padrão e maior taxa de recaída (32). Este subgrupo é caracterizado por alterações envolvendo o gene *IKZF1* (gene codificador do fator de transcrição linfóide IKAROS), com deleções focais, frequentemente monoalélicas, como principal mecanismo lesional (33). Estas deleções podem envolver todo o gene ou somente parte dele, com as deleções afetando os éxons 4 a 7 capazes de gerar isoformas dominante-negativas que comprometem a função supressora tumoral normal deste gene (34). Neste subgrupo, o aumento da expressão de genes de célula-tronco foi o que permitiu a identificação e destacamento prognóstico subsequentemente (33).

Na prática clínica, as tecnologias de NGS e *microarray* não são amplamente disponíveis, tornando o diagnóstico da LLA Ph-like desafiador. Estratégias envolvendo marcadores substitutivos para este subtipo tem sido adotadas em centros selecionados, como a expressão do gene *CRLF2* (*Cytokine receptor-like factor 2*) por imunofenotipagem, a identificação das translocações do *CRLF2* por FISH, das fusões envolvendo os genes *ABL* e *JAK-EPOR* por RT-PCR e o rastreamento das mutações ativadoras de tirosina-quinase (*JAK1*, *JAK2*, genes *RAS*, por exemplo (35,36). Estes subgrupos genéticos se distribuem de modo diferente entre as diferentes faixas etárias (Figura 1).

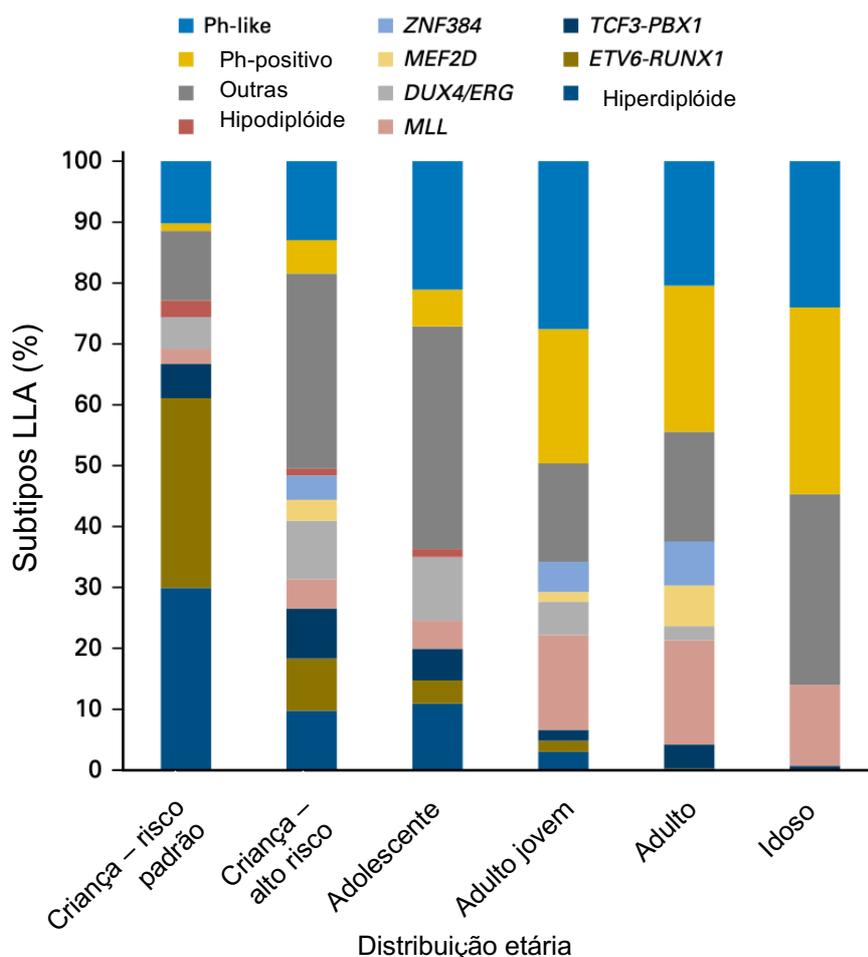


Figura 1. Distribuição de subgrupos genéticos de acordo com a idade. Retirado de: Iacobucci I and Mullighan C, 2017 (com permissão).

1.6. LLA na América Latina

Poucas iniciativas de pesquisa em LLA do adulto foram conduzidas na América Latina nos últimos anos. Levantamentos retrospectivos unicêntricos tem evidenciado que a sobrevida da população adulta é inferior à de países desenvolvidos (21–24,37–39). A estratificação genética destes casos é realizada de maneira heterogênea e não sistemática, sendo restrita a centros grandes e/ou acadêmicos. No Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), estudos retrospectivos prévios conduzidos na última década evidenciaram uma sobrevida global (SG) em 3 anos de 30,5% (n=102 pacientes) com estratégia

UCLA/BFM e 23,5% em 5 anos com uma adaptação do protocolo alemão (n=62 pacientes) para realidade local (21,22).

Evidências limitadas convergem para o fato de que diferenças biológicas também existem na América Latina – parece haver uma maior incidência de achados de maior risco, como o cromossomo Filadélfia e subtipo Ph-like nos trabalhos americanos envolvendo pacientes hispânicos (35,40).

2. Projeto aprovado na Comitê de Ética (CAPPesq- HC) e emendas associadas

1.7. Título:

Avaliação genética em leucemia linfoblástica e/ou bifenotípica do adulto (CAAE – Plataforma Brasil: 80534117.4.0000.0068).

1.8. Introdução:

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é uma neoplasia maligna invariavelmente agressiva, causada pelo acúmulo de células imaturas da linhagem linfoide B ou T no sangue, medula óssea ou tecidos (41,42). É uma rara entidade, representando menos de 1% de todas as neoplasias (21). Estima-se que cerca de 60% dos casos de LLA tenham diagnóstico antes dos 20 anos, de acordo com estatísticas internacionais (43). Estimativas do INCA afirmam que cerca de 10.070 casos novos de leucemia aguda seriam diagnosticados no Brasil no ano de 2016, sendo cerca de 2.014 casos de LLA se seguirmos as estatísticas mundiais de frequência desta doença (44).

A LLA que ocorre na infância possui prognóstico favorável e excelentes resultados com protocolos quimioterápicos de indução de remissão, com sobrevida livre de doença (SLD) de cerca de 80% em 5 anos (45). A LLA do adulto, pelo contrário, possui uma SLD marcadamente reduzida, tanto pela maior frequência de alterações genéticas reconhecidamente negativas como pela menor tolerância aos esquemas quimioterápicos intensificados. Estima-se uma SLD de 30-45% em 5 anos para a população adulta, sendo esta ainda inferior nos pacientes acima dos 40 anos (46–48).

A LLA manifesta-se tipicamente com sintomas constitucionais, dor óssea, sangramentos ou infecções, relacionados à ocupação medular pelas células blásticas patológicas. A identificação morfológica dos linfoblastos pela microscopia e avaliação imunofenotípica de linhagem e estágio do desenvolvimento por citometria de fluxo são essenciais para o diagnóstico(49). Em adultos, 75% dos casos de LLA são de linhagem B (42). Não existe ainda

um modelo prognóstico universalmente reconhecido e utilizado para determinação do prognóstico dos pacientes com esta enfermidade. Vários grupos tem estabelecido que idade (acima de 35 anos), contagem leucocitária (acima de 30000 leucócitos para LLA-B ou acima de 100000 leucócitos para LLA-T), cariótipo ao diagnóstico e o tempo necessário para atingir resposta completa (RC) como fatores prognósticos significativos (47,48,50–52). Uma ferramenta mais potente de estimar o prognóstico dos pacientes tem sido a avaliação da presença de Doença Residual Mínima (DRM), que reflete primariamente o comportamento da célula neoplásica diante dos esquemas quimioterápicos e fatores individuais do hospedeiro. Em geral, a redução da DRM acontece de forma mais lenta nos adultos, com uma menor proporção dos mesmos alcançando o status de negatização (30).

A heterogeneidade do panorama genético da LLA tem sido alvo de intensas pesquisas, especialmente na última década. Desde 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem classificado as LLAs de acordo com as principais alterações genéticas encontradas, destacadamente aquelas que determinam impacto prognóstico e/ou terapêutico (53). Estes subtipos são definidos por alterações cromossômicas estruturais iniciais, seguidas de alterações secundárias (alterações no número de cópias do DNA e mutações) que contribuem para leucemogênese. A completa avaliação genética dos novos casos de LLA, especialmente nos países subdesenvolvidos como o Brasil, é um grande desafio, visto que requer uma adequada integração de várias metodologias laboratoriais, como citometria de fluxo, cariótipo convencional, hibridação in situ por fluorescência (FISH) e técnicas de biologia molecular como reação em cadeia de polimerase (PCR), *multiplex-ligation dependent probe amplification* (MLPA), sequenciamento de próxima geração (*next-generation sequencing*, NGS) e *microarray*.

A OMS acrescentou, em 2016, além das LLAs com alterações cromossômicas estruturais clássicas [cromossomo Filadélfia (Ph), rearranjo do *KMT2A*, translocação *ETV6/RUNX1*, hiperdiploidia, hipodiploidia, translocações *IL3/IGH* e *TCF3/PBX1*, o reconhecimento da LLA B *BCR/ABL1*-like e com amplificação intracromossomal do 21 (iAMP21) sendo relevantes na classificação diagnóstica. No caso das LLAs de linhagem T, foi destacado o

negativo impacto prognóstico das chamadas *Early T-cell Leukemia* (ETP), identificadas facilmente através da imunofenotipagem ao diagnóstico. Alterações citogenéticas numéricas são menos frequentes neste grupo, marcado, em cerca de 60% dos casos por mutações envolvendo o gene NOTCH1 (11).

Em 2-5% das leucemias agudas, os pacientes são acometidos por subtipos específicos nos quais a definição de linhagem por imunofenotipagem não é possível – as denominadas Leucemias de Linhagem Ambígua (54). A maioria destes casos compartilha um fenótipo B/mielóide (59%) e são marcadas por uma incidência de cromossomo Filadélfia semelhante à população com LLA (15-20%) e rearranjo envolvendo o gene *KMT2A* (4-11%) (55). A caracterização das alterações cromossômicas primárias destes casos, a despeito do pequeno número de pacientes por publicação, já foi realizada. Entretanto, pouco se foi estudado a respeito das alterações cooperantes secundárias, envolvidas na leucemogênese e progressão destes casos (54,56–58).

No Brasil há uma grande escassez de estudos no que concerne às alterações genéticas em LLA no Brasil, especialmente, nos pacientes adolescentes e adultos. Diferenças clínicas e até mesmo genéticas nesta doença são descritas na América Latina, provavelmente relacionadas às diferenças nos fatores de suscetibilidade do hospedeiro entre diversos grupos étnicos (59,60). Primeiramente, o impacto de alterações genéticas já bem descritas mundo afora como deleção e/ou mutação do *IKZF1*, rearranjo do *CRLF2* e determinadas mutações em tirosino-quinases ainda não foram publicadas em coorte brasileira, dificultando a implementação destes testes e a padronização dos mesmos na rotina, especialmente no âmbito do SUS. O papel da epigenética, especialmente das vias de metilação e da interação com micro-RNA tem papel relevante, porém pouco estudado em LLA. Sabe-se hoje que muitas destas alterações são alvos genéticos que podem ser atingidos através do uso de drogas inibidoras como dasatinibe ou ruxolitinibe (61,62).

Considerando o exposto, propomos uma avaliação genética mais profunda dos casos de LLA, envolvendo o rastreio de deleções e mutações por painel de MLPA, associado à pesquisa de mutações por RT-PCR envolvendo tirosino-quinases com maior potencial “drogável”. O estudo da expressão de *MDR1* também serão realizados, buscando conhecer melhor o perfil genético

das LLAs na população brasileira e correlacioná-los com variáveis clínicas e prognósticas.

1.9. Objetivos:

Objetivo geral: Aprofundar a caracterização genética da LLA do adulto, buscando identificar aberrações secundárias cooperativas na leucemogênese.

Objetivos específicos:

- Delinear um perfil clínico-genético das LLAs atendidas no complexo HCFMUSP;
- Encontrar variáveis prognósticas ao diagnóstico que possam correlacionar-se com desfecho a longo prazo;
- Padronizar as metodologias de diagnóstico e caracterização genética em LLA.

1.10. Critérios de inclusão e exclusão

1.10.1. Critérios de Inclusão

- Diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda ou de linhagem ambígua pela classificação OMS em pacientes acima de 16 anos admitidos no complexo HCMFUSP (inclui o Hospital das Clínicas da FMUSP e o Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, ICESP).

1.10.2. Critérios de Exclusão

- Recusa em assinar termo de consentimento livre e esclarecido (exceto se paciente veio à óbito antes da possibilidade de aplicação do mesmo);
- Ausência ou baixa qualidade do material genético colhido ao diagnóstico.

1.11. Materiais e métodos

1.11.1. Pacientes

Serão selecionados cerca de 60 casos de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) com amostras de DNA excedente de análises clínicas genéticas rotineiras e que tenham sido obtidas no momento do diagnóstico. Pellets de citogenética previamente armazenados no Laboratório de Citogenética do Serviço de Hematologia do HCFMUSP também serão utilizados compreensivamente a fim de correlacionar alguns resultados obtidos por MLPA.

1.11.2. Desenho do estudo

Este é um estudo retrospectivo descritivo, com base na análise de amostras armazenadas. As amostras serão classificadas de acordo com a classificação da OMS em quatro subgrupos – fenótipo B Ph-negativo, fenótipo T, fenótipo ambíguo Ph-negativo e as leucemias agudas Ph-positivo. A classificação genética inicial é rotineiramente feita no serviço de Hematologia e, envolve, ao diagnóstico a realização dos seguintes exames:

Fenótipo B	Fenótipo T	Linhagem Ambígua
<ul style="list-style-type: none"> - Cariótipo convencional; - BCR-ABL p190 e p210 por RT-PCR; - ETV6-RUNX1 por RT-PCR; - TCF3-PBX1 por RT-PCR; - MLL-AF4 por RT-PCR. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cariótipo convencional. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cariótipo convencional; - Pesquisa de BCR-ABL p190 e p210 por RT-PCR; - MLL-AF4 por RT-PCR.

Após a classificação inicial por meio de testes rotineiramente realizados no serviço, pretendemos estudar estes três grupos através de um painel genético envolvendo vias relevantes e/ou não-estudadas comprometidas com cada subgrupo.

PAINEL GENÉTICO INICIAL PROPOSTO			
B Ph-negativo	T	Ambíguo Ph-negativo	Ph-positivo
MLPA para IKAROS1, 2 e 3, CDKN2A e CDKN2B, MIR31 e status 14q32;	MLPA para IKAROS1, 2 e 3, CDKN2A e CDKN2B, MIR31 e status 14q32;	MLPA para IKAROS1, 2 e 3, CDKN2A e CDKN2B, MIR31 e status 14q32;	MLPA para IKAROS1, 2 e 3, CDKN2A e CDKN2B, MIR31 e status 14q32;
MLPA para CRLF2, CSF2RA e IL3RA;	Mutação dos domínios NOTCH1;	MLPA para CRLF2, CSF2RA e IL3RA;	MLPA para CRLF2, CSF2RA e IL3RA;
FISH para amplificação intracromossômica do 21;	Painel mutacional envolvendo os genes ETV6, ABL1, ABL2, RCSD1-ABL1, ZMZ1, FOXP1, SNX2, NUP214, SFPQ, RANBP2, NRAS ¹ ;	FISH para amplificação intracromossômica do 21;	Painel mutacional envolvendo os genes ETV6, ABL1, ABL2, RCSD1-ABL1, ZMZ1, FOXP1, SNX2, NUP214, SFPQ, RANBP2, NRAS ¹ ;
FISH para CRLF2 nos casos com MLPA positivo ou duvidoso;	Painel complementar pesquisando PAX5, IL7R, KRAS, JAK2, IKZF1, TTN, SH2B3, FLT3, MUC16, LTBP1,	FISH para CRLF2 nos casos com MLPA positivo ou duvidoso;	Painel complementar pesquisando PAX5, IL7R, KRAS, JAK2, IKZF1, TTN, SH2B3, FLT3, MUC16, LTBP1,

	KIF2B e BSN ² .		KIF2B e BSN ² .
Painel mutacional envolvendo os genes ETV6, ABL1, ABL2, RCSD1-ABL1, ZMZ1, FOXP1, SNX2, NUP214, SFPQ, RANBP2, NRAS ¹ ;		Painel mutacional envolvendo os genes ETV6, ABL1, ABL2, RCSD1-ABL1, ZMZ1, FOXP1, SNX2, NUP214, SFPQ, RANBP2, NRAS; ¹	Mutação do domínio quinase do ABL1 por Sanger.
Painel complementar pesquisando PAX5, IL7R, KRAS, JAK2, IKZF1, TTN, SH2B3, FLT3, MUC16, LTBP1, KIF2B e BSN ² .		Painel complementar pesquisando PAX5, IL7R, KRAS, JAK2, IKZF1, TTN, SH2B3, FLT3, MUC16, LTBP1, KIF2B e BSN ² .	

¹. Painel desenvolvido baseado nas mutações com maior potencial “drogável” (35,61,63).

² Mutações mais frequentemente encontradas em LLA Ph-like (64).

1.11.3. Coleta de amostras

O estudo será realizado em amostras de sangue e/ou medula óssea que são colhidos rotineiramente ao diagnóstico dos pacientes com LLA ou Leucemia de Linhagem Ambígua. Os pacientes que forem admitidos na instituição preenchendo os critérios de inclusão poderão ter suas amostras incluídas no projeto, conforme cronograma e aplicação de TCLE nestes casos novos. As amostras de sangue e/ou medula óssea que serão utilizadas são rotineiramente colhidas ao diagnóstico de qualquer leucemia aguda para estratificação de risco, conforme protocolo do serviço.

1.11.4. MLPA (Amplificação Multiplex de sondas dependentes de ligação)

A técnica de MLPA permite a detecção de alterações no número de cópias em segmentos de DNA, sendo uma metodologia prática e de rápido uso na rotina clínica. As amostras de DNA serão extraídas usando Blood genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare™, UK) da fração de células granulocíticas (DNA germinativo) e da medula óssea ao diagnóstico (de biobanco/biorrepositório ou material genético excedente de análise laboratorial de rotina) serão quantificadas através de espectrofotometria utilizando Nanodrop ND 1000 (NanoDrop, UNISCIENCE, USA). Usaremos uma quantidade total de 50-250 ng (preferivelmente 50-100 ng) de DNA em um volume de 5 µl volume para cada reação (65).

Neste estudo serão utilizados os kits SALSA MLPA probemix P202-B2 e P329 A2 (*MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands*), já utilizados previamente por pesquisadores para rastreamento das alterações de interesse (66–70). O kit P202-B2 contém sondas para cada éxon do gene *IKZF1*. Além disso, contém três sondas para *IKZF2* (2q34) e o *IKZF3* (17q21.1), que também possuem papel na diferenciação e proliferação linfocitária B. Os genes *CDKN2A*, *CDKN2B-MIR31* e a região 14q32.33 também são contempladas neste kit. O kit P329-A2 possuem sondas para as regiões do *CLRF2*, *CSF2RA* e *IL3RA*. A validação dos kits está descrita no site do fabricante (www.mrc-holland.com). Os dados serão gerados por sequenciador automático ABI 3500 (Life Technologies) e análise dos resultados da reação de MLPA será realizada utilizando os programas *GeneMarker* (*Softgenetics, LLC, State College, PA - www.softgenetics.com*) e *Coffalyser.Net*. (www.mlpa.com.br). Os resultados serão normalizados contra os controles normais e considerados alterados quando o tamanho do pico relativo for menor do que 0,65 (deleção) ou maior que 1,20 (duplicação) em comparação às amostras normais.

As análises serão realizadas no Laboratório de Biologia Tumoral do Serviço de Hematologia do HCFMUSP.

1.11.5. FISH (Fluorescência por hibridação in situ)

A utilização do FISH em casos com ausência de metáfases ou com alterações flagradas (deleções) no MLPA se faz necessária a fim de se confirmar

a alteração encontrada. Esta técnica também é considerada o padrão-ouro na detecção da amplificação do cromossomo 21 (iAMP21), alteração reconhecidamente prognóstica pela OMS (53,71). Para tal, a pesquisa será feita através do uso de sonda para detecção da t(12;21), conforme já descrito previamente (72). A confirmação do rearranjo envolvendo o CRLF2 também deverá ser realizada, nos casos com amostra disponível.

As sondas a serem utilizadas serão: *TEL/AML1 (ETV6/RUNX1)* Translocation, Dual Fusion (LPH 012-A, Cytocell) e *CRLF2 Proximal* (LPH 512-A, Cytocell) (maiores informações em <http://www.cytocell-us.com/>).

A validação das sondas e sua análise seguirão procedimentos já estabelecidos no Laboratório de Citogenética do Serviço de Hematologia do HCFMUSP (73).

1.11.6. Reação em cadeia de polimerase para painel pré-estabelecido

Reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) e sequenciamento por Sanger de DNA neoplásico e de controle saudável será realizado para detectar mutações no painel acima. Primers seguem validação interna e as recomendações do fabricante (Invitrogen, mais informações em <https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/invitrogen.html>).

1.11.7. Coleta de dados clínicos

Dados a respeito de informações clínicas, resposta ao tratamento, sobrevida global e recidiva serão extraídos de prontuários e bancos de dados. Os dados serão coletados utilizando o sistema RedCap (redcap.hc.fm.usp.br) e, posteriormente, transferidos para planilha do Microsoft Excel para análise estatística.

1.11.8. Análise Estatística

Análise estatística será feita com os softwares SPSS (v22.0, Chicago, IL) e R v3.0.2. A análise de qui-quadrado será utilizada para comparar características clínicas dos pacientes e taxa de resposta ao tratamento por estado mutacional. Devido à múltiplas comparações, consideraremos como estatisticamente significativa um p-valor <0.001 apenas. A sobrevida será estimada pelo método de Kaplan-Meier, e recidiva será estimada pelo método de incidência cumulativa considerando morte não-leucêmica como um risco competidor. O teste de logrank e o teste de Grey serão utilizados para comparação de sobrevida global e analisar incidência cumulativa de recidiva, respectivamente. Um modelo de regressão logística multivariado será utilizado para definir associações entre múltiplas características clínicas e resposta ao tratamento. Um modelo de Cox será usado para definir variáveis associadas com sobrevida global. O modelo de Grey será usado para definir variáveis associadas com incidência cumulativa de recidiva.

1.11.9. Centros Parceiros

O HCFMUSP será a instituição coordenadora do estudo e o ICESP e o Instituto Sírio-Libanês de Ensino e Pesquisa (IEP-HSL) como instituições coparticipantes. Pesquisador responsável: Prof. Dr. Vanderson Rocha. Dr. Israel Bendit é o responsável pelo Laboratório de Biologia Tumoral e Dra. Elvira Velloso é a responsável pelo Laboratório de Citogenética do Serviço de Hematologia do HCFMUSP e a Dra. Mariane Amino é a responsável pelo Laboratório de Oncologia Molecular do IEP-HSL.

1.12. Considerações éticas

Antes da coleta de amostras a partir do início do estudo, os pacientes assinarão um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (vide anexo B) concordando com a extração de DNA de material biológico armazenado e a utilização de seus dados clínicos e laboratoriais no estudo. A participação dos pacientes no estudo é voluntária; dados que possam identificar os pacientes serão mantidos confidenciais. Serão cumpridos os princípios enunciados na

Declaração de Helsinque emendada em Hong-Kong, em 1989. Cada paciente incluído no estudo receberá um número individual para identificação. Informações sobre os resultados de sequenciamento genético poderão ser compartilhados em parte com bancos públicos existentes de dados genômicos (ex.:SRA-Sequence Read Archive- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>). Não serão compartilhados dados com instituições financeiras, e ou terceiros. A qualquer momento, o paciente pode desistir de participar do estudo. Caso isso ocorra, seus dados não serão mais analisados, o material genético será desprezado e os dados de sequenciamento que foram eventualmente depositados em bancos públicos de dados genômicos serão retirados.

Será solicitado a dispensa de obtenção do TCLE dos pacientes já falecidos no momento do estudo e cuja amostra já havia sido colhida previamente ao início do estudo em razão desta pesquisa apresentar caráter retrospectivo, por tratar de levantamento de dados junto à prontuários e testes em amostras colhidas rotineiramente e não ser possível o contato com os sujeitos de pesquisa selecionados, visto que boa parte dos pacientes veio à óbito ou tiveram perda de seguimento. A análise estatística irá buscar associação das mutações com sobrevida, e para isso é essencial. Todos os dados serão conduzidos e analisados de forma anônima, e os resultados decorrentes do estudo não permitirá a identificação individual dos participantes. Será realizada análise de DNA apenas para sequenciamento de genes específicos com o objetivo único e isolado de buscar alterações somáticas que possam estar relacionadas com a patogênese da doença. Não será realizado cultivo de células desses pacientes em meio de cultura.

Todos os pesquisadores envolvidos no estudo acima se comprometem, a utilizar os dados provenientes deste, apenas para os fins descritos no protocolo e a cumprir todas as diretrizes e normas regulamentadoras descritas na Res. CNS Nº 466/12, e suas complementares, no que diz respeito ao sigilo e confidencialidade dos dados coletados.

O projeto encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq – número do parecer 2.497.397) e com aprovação concomitante do núcleo de pesquisa do ICESP (Registro NP: 1228/17).

1.13. Cronograma

O projeto será desenvolvido em quatro etapas distintas em um período de dois anos. A primeira fase, com doze meses de duração, será destinada à aprovação no comitê de ética, inclusão dos pacientes e das variáveis na base de dados e à extração de DNA/RNA dos materiais armazenados. Neste período, novos pacientes poderão ser incluídos no estudo. Na segunda fase, com duração de 10 meses, serão concluídos os experimentos e se iniciará a análise dos dados. A terceira fase será destinada à análise computacional dos resultados obtidos e se iniciará tão logo termine o primeiro sequenciamento. Sua duração prevista é de 4 meses. Na quarta e última fase será realizado a análise estatística dos dados obtidos e comparação com análise de mutações. Sua duração aproximada é de dois meses.

1.14. Emendas e projetos associados

- 1.14.1. Inclusão do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês como instituição coparticipante (Parecer 2.827.153, Agosto/2018)
- 1.14.2. Inclusão de centros participantes em projeto retrospectivo multicêntrico em LLA/Leucemia de linhagem ambígua do adulto (CAAE: 16697119.5.1001.0065, Julho/2019).
- 1.14.3. Avaliação multicêntrica dos desfechos após transplante alogênico de medula óssea em LLA do adulto (CAAE: 01901718.7.1001.0068, Outubro/2018).

3. Artigos publicados e submetidos

- 1.15. Toxicity Profile of PEG-Asparaginase in Adult Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia in Brazil: A Multicenter Cross-Sectional Study

Silva WFD, Massaut IHB, Bendlin RM, Rosa LI, Velloso EDRP, Rego EM, Rocha V. Toxicity Profile of PEG-Asparaginase in Adult Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia in Brazil: A Multicenter Cross-Sectional Study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2020 Aug;20(8):e523-e528. doi: 10.1016/j.clml.2020.04.001. Epub 2020 Apr 13. PMID: 32389674.

Jornal: Clinical Lymphoma Myeloma Leukemia

Fator de Impacto (JCR): 3,23

- 1.16. Philadelphia-positive B-lymphoblastic leukemia in a middle-income country - A real-world multicenter cohort

Silva WF, Silverio A, Duarte BKL, Aguiar TF, Bendlin RM, Massaut IHB, Pagnano KBB, Velloso EDRP, Rocha V, Rego EM. Philadelphia-positive B-lymphoblastic leukemia in a middle-income country - A real-world multicenter cohort. *Leuk Res.* 2021 Nov;110:106666. doi: 10.1016/j.leukres.2021.106666. Epub 2021 Jul 13. PMID: 34274856.

Jornal: Leukemia Research

Fator de Impacto (JCR): 3,16

- 1.17. Adult acute lymphoblastic leukemia in a resource-constrained setting: outcomes after expansion of genetic evaluation (submetido)

Silva WF, Amano MT, Perruso LL, Cordeiro MG, Kishimoto RK, Leal AM, Nardinelli L, Bendit I, Velloso EDRP, Rego EM, Rocha V.

Jornal: Hematology

Fator de Impacto (JCR): 2,269

4. Discussão

In this work, we were able to build a retrospective registry of acute lymphoblastic leukemia (ALL) at our service (Ambulatório de Leucemias Agudas, Institute do Cancer do Estado de Sao Paulo) as well as implementing a systematic genetic evaluation of such cases. The starting point was reviewing our outcomes after the German protocol (adaptation of GMALL 07/2003) in our center, which was reported before this study (22). From that point onwards, we started to gather and report our data on ALL, through above mentioned publications.

In the first publication (Toxicity Profile of PEG-Asparaginase in Adult Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia in Brazil: A Multicenter Cross-Sectional Study), after collecting all clinical data from ALL and ambiguous lineage leukemia, we decided to specifically look at the toxicity data of peg-asparaginase after its incorporation in the ALL therapy in Brazil. Across the world, the long-acting pegylated form of the drug has been used more often than the short-acting native *Escherichia coli* derived form (native asparaginase), even though peg-asparaginase was late approved in Brazil in 2017, after a central shortage of the native drug (74). This fact immediately posed a problem to clinicians – adapting their current treatment protocols and dealing with major toxicities from this drug. While it is widely recognized that using asparaginase-based regimens is associated with improved outcomes in adolescents and adults, its toxicity is not negligible and must be monitored (75). The toxicity of peg-asparaginase in adults from Latin America was unknown, even though there was a suggestion that pharmacogenetic differences make Hispanics more prone to liver toxicity.

Data from three reference centers were included, all incorporating peg-asparaginase in their treatment backbone. We collected clinical data focused on thromboembolic events and liver toxicity – two major toxicities of asparaginase in adults, within 60 days after the drug administration. Fifty-seven patients were included, and baseline features, route of administration and number of doses were reported. We found an incidence of thromboembolic event of 17.5% (95% confidence interval [CI], 9.2-30.3), with no fatal case related to the drug. This

incidence was similar to that reported in larger studies (76,77). I consider this finding relevant as it highlights the lack of evidence of prior practices such as cryoprecipitate or antithrombin replacement and prophylactic anticoagulation. In ICESP, we have given prophylactic enoxaparin during induction if feasible, while a strategy of no cryoprecipitate replacement was established.

Few mild infusion reactions were reported by centers (2/57), corroborating the safety of intravenous route in adults in our setting. Traditionally, native asparaginase was frequently administered by intramuscular route in adults for fear of severe allergic reactions.

Regarding liver toxicity, it was found that minor liver enzyme alterations can be seen in 77% of cases, with grade 3 or higher hyperbilirubinemia being reported in 28%. The latter can be problematic during induction as it might prevent the administration of other important drugs such as anthracyclines and vincristine. In this report, we could emphasize the high incidence of liver toxicity in our cohort, which is in line with other reports suggesting that Hispanic patients might experience greater liver toxicity (78).

In the second paper (Philadelphia-positive B-lymphoblastic leukemia in a middle-income country - A real-world multicenter cohort), we decided to focus our clinical analysis on the Philadelphia-positive (Ph+) cases. Prior publications from our group had not analyzed this subgroup apart, (21,22) even though this subset has several particularities. Ph+ ALL is no longer considered a prominently poor prognostic subgroup within ALL cases since the incorporation of tyrosine-kinase inhibitors (TKI) into the frontline treatment (13,79). The role of upfront allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation (alloHCT) has also been questioned since a fraction of patients can achieve deep remissions with chemotherapy plus TKI. In our setting, availability of alloHCT and higher toxicity with this procedure aggregate challenges to Ph+ ALL management. In this work, we developed a multicenter retrospective cohort analysis, acknowledging all differences and gaps inherent in this sort of study.

A total of 477 patients were diagnosed with ALL in all five participant centers, being 123 Ph+ ALL. This population was mostly treated with chemotherapy plus imatinib, the only TKI approved for first-line therapy in Brazil. By analyzing our findings, we found a high early mortality (14.6%), statistically

associated with age at the diagnosis. Philadelphia-chromosome has an increasing incidence with age, being the toxicity of induction regimens a major issue in this disease (80). Patients continued to experience noticeable toxicity during consolidation courses, with a 42% of non-relapse mortality (NRM) throughout the follow-up. Less than 30% of patients proceeded alloHCT, with 36% of NRM after the procedure.

In a 4-year period, the relapse-free survival was 24.2% (95 % CI 17.3–34), while the relapse incidence was 29.5%. Lactate dehydrogenase levels and central nervous disease were related to relapse in this cohort. Age was the only variable independently associated with overall survival, even with the inclusion of alloHCT as a time-dependent variable. Our results demonstrate that we still struggle to adapt external protocols for treating ALL in our country, as we detected that most deaths in our cohort are associated with toxicity than treatment failure itself. Later line TKIs are heterogeneously available in Brazil, which might have impacted on the salvage strategies after first relapse or suboptimal response to imatinib.

Regarding prognostic variables raised by this study, we found that only age influenced our survival outcomes. This finding was confronted in the manuscript with other cohorts, bringing the question that we still need prospective registry studies on Ph+ ALL in order to surely define baseline risk factors which allow patients to be spared more intensive approaches. Although some limitations can be pointed in this work, mostly due to its retrospective nature, we can still draw valuable pieces of information – our survival is disappointing; we need to optimize treatment regimens to decrease toxicity; to deepen the genetic stratification and measurable residual disease (MRD) assessment throughout protocols, ideally under a prospective trial.

The third manuscript (Adult acute lymphoblastic leukemia in a resource-constrained setting: expansion of genetic evaluation and optimization of regimens) was developed from a single-center survival analysis of ALL cases over the last 5 years. Changes described in the treatment regimens stem from prior experience of the medical team, and also from previous analysis conducted by the group (21,22). We considerably focused on the genetic classification of our cases, which has gained remarkable importance over the last few years.

Although classic baseline prognostic factors were raised over past decades (e.g., high white blood cell counts, pro-B phenotype, CNS disease) for B-lineage ALL, this disease has been classically considered to have an unpredictable clinical course (4). While the recognition of Philadelphia chromosome is pivotal to properly treat such cases, assessing other genetic subgroups remained elusive in our country. In this work, we set up the database to gather our cases consecutively and organize our genetic findings by combining molecular biology and cytogenetic methodologies.

Characteristics and outcomes of 104 patients newly diagnosed with ALL at ICESP were reported, along with their genetic findings. Firstly, main translocations within the B-cell subset were discarded (*BCR-ABL1*, *TCF3-PBX1*, *KMT2A-AFF4*, and *ETV6-RUNX1*), aiming to investigate the 'not otherwise specified' cases (NOS). By combining fluorescence in situ hybridization (FISH) and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques, we were able to detect a subset of cases with a 'Ph-like' alteration. This is the first cohort from our country describing *CRLF2*, *ABL1* and *PDGFRB* alterations in B-lineage ALL.

Maciel et al. has just published a multicenter cohort from 6 centers, focusing their analysis on *IKZF1* and *CRLF2* genes in a mostly pediatric cohort (81). Interestingly, only 18% of patients with *CRLF2* hyperexpression displayed translocation by FISH or F232C mutation in this gene, raising the question whether the assessment of *CRLF2* expression would be enough for adults in terms of prognostic classification. In our cohort, we performed FISH in all eligible samples, instead of using *CRLF2* expression as screening. As this publication also found a negative prognostic impact of *CRLF2* expression regardless of whether a fusion or mutation is characterized, one may argue that only its expression by quantitative RT-PCR is reasonable.

In this cohort, although we observed an improvement in survival rates, especially in the Philadelphia-negative subset compared to the GMALL protocol, we still must handle this unacceptable toxicity at our center. Delays in alloHCT, the fact that the MRD was not fully standardized over the study period, and the unavailability of new agents for B-lineage leukemia surely impacted on our survival rates.

5. Conclusões

The main objective of this work was to characterize a consecutive cohort of adults newly diagnosed with ALL, aiming to deepen their genetic characterization. Although I have partially deviated from proposed methodologies (see “Adendo”), I can consider that I succeeded at gathering our data on this disease and at implementing prognostic algorithms in our service. These publications are crucial to work as a starting point of a cooperative group on ALL, a much-needed initiative in our country.

6. Referências*

1. Thompson MA, Davé UP. Molecular Genetics of Acute Leukemia. In: Greer JP, Arber DA, Glader B, List AF, Robert T. Means J, Paraskevas F, et al., editors. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 13th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health Pharma Solutions (Europe) Ltd; 2014.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th edition)*. 4th ed. Lyon: IARC: Lyon 2017; 2017. 330–334 p.
3. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* [Internet]. 2016 May 19;127(20):2391–405. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/127/20/2391/35255/The-2016-revision-to-the-World-Health-Organization>
4. Pui C-H, Evans WE. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 Jan 12;354(2):166–78. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra052603>
5. SEER. SEER cancer stat facts: acute lymphocytic leukemia [Internet]. National Cancer Institute. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/aly1.html>
6. Richard-Carpentier G, Kantarjian H, Jabbour E. Recent Advances in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* [Internet]. 2019 Apr 16;14(2):106–18. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11899-019-00503-1>
7. INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. ESTIMATIVA | 2018 - Incidência de Câncer no Brasil [Internet]. 2018. Available from: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>
8. Jabbour E, Pui C-H, Kantarjian H. Progress and Innovations in the Management of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *JAMA Oncol* [Internet]. 2018 Oct 1;4(10):1413. Available from:

- <http://oncology.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaoncol.2018.1915>
9. Bassan R, Bourquin J-P, DeAngelo DJ, Chiaretti S. New Approaches to the Management of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol* [Internet]. 2018 Dec 10;36(35):3504–19. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2017.77.3648>
 10. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol* [Internet]. 2017 Mar 20;35(9):975–83. Available from: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2016.70.7836>
 11. Hunger SP, Mullighan CG. Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. *Blood*. 2015;125(26):3977–88.
 12. Jabbour E, Short NJ, Ravandi F, Huang X, Daver N, DiNardo CD, et al. 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* [Internet]. 2018 Dec;5(12):e618–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352302618301765>
 13. Byun JM, Koh Y, Shin D-Y, Kim I, Yoon S-S, Lee J-O, et al. BCR-ABL translocation as a favorable prognostic factor in elderly patients with acute lymphoblastic leukemia in the era of potent tyrosine kinase inhibitors. *Haematologica* [Internet]. 2017 May;102(5):e187–90. Available from: <http://www.haematologica.org/lookup/doi/10.3324/haematol.2016.159988>
 14. Saini L, Brandwein J. New Treatment Strategies for Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Hematol Malign Rep* [Internet]. 2017 Apr 27;12(2):136–42. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11899-017-0372-3>
 15. Burmeister T, Gökbuğut N, Schwartz S, Fischer L, Hubert D, Sindram A, et al. Clinical features and prognostic implications of TCF3-PBX1 and ETV6-RUNX1 in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2010;95(2):241–6.
 16. Moorman A V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.

- Haematologica [Internet]. 2016 Apr;101(4):407–16. Available from: <http://www.haematologica.org/lookup/doi/10.3324/haematol.2015.141101>
17. Pui C-H, Evans WE. A 50-Year Journey to Cure Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Semin Hematol* [Internet]. 2013 Jul;50(3):185–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0037196313000905>
 18. Papadantonakis N, Advani AS. Recent advances and novel treatment paradigms in acute lymphocytic leukemia. *Ther Adv Hematol* [Internet]. 2016 Oct 31;7(5):252–69. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2040620716652289>
 19. Gökbuget N, Hoelzer D. Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *YSHEM* [Internet]. 2009;46(1):64–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminhematol.2008.09.003>
 20. Beck J, Brandt K, Brüggemann M, Burmeister T, Diedrich H, Faul C, et al. Significant Improvement Of Outcome In Adolescents and Young adults (AYAs) Aged 15-35 Years With Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) With a Pediatric Derived Adult ALL Protocol; Results Of 1529 AYAs In 2 Consecutive Trials Of The German Multicenter Study Gr. Gökbuget N, editor. *Blood* [Internet]. 2013 Nov 15;122(21):839 LP – 839. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/122/21/839.abstract>
 21. Diogenes E, Junior P, Pracchia LF, Mauriño BB De, Martinez GA, Dorlhiac-Ilacer PE, et al. Prognostic Factors in Adolescent and Adult Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia With Two Protocols of Chemotherapy : A Cross-Sectional Study. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* [Internet]. 2015;15(1):e7–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clml.2014.07.006>
 22. Fernandes da Silva Junior W, Medina AB, Yamakawa PE, Buccheri V, Velloso EDRP, Rocha V. Treating Adult Acute Lymphoblastic Leukemia in Brazil—Increased Early Mortality Using a German Multicenter Acute Lymphoblastic Leukemia-based regimen. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2018;18(6).
 23. Portugal RD, Loureiro MM, Garnica M, Pulcheri W, Nucci M. Feasibility and Outcome of the Hyper-CVAD Regimen in Patients With Adult Acute

- Lymphoblastic Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* [Internet]. 2015 Jan;15(1):52–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2152265014001426>
24. Gurgel LA, Oliveira DD, Sousa, Leitão JPV, Barroso KSN, Pitombeira BSG de S, Duarte IA, et al. Overall survival in patients with acute lymphoblastic leukemia treated with CALGB 8811 protocol in low income country. *J BONE MARROW Transplant Cell Ther* [Internet]. 2021 Jul 17;2(2):p95. Available from: <https://www.jbmtct.com.br/seer/index.php/jbmtct/article/view/95>
 25. Ferreira AM, Moreira F, Guimaraes T, Spadão F, Ramos JF, Batista MV, et al. Epidemiology, risk factors and outcomes of multi-drug resistant bloodstream infections in hematopoietic stem cell transplant recipients: importance of previous gut colonisation. *J Hosp Infect* [Internet]. 2018 Mar; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670118301427>
 26. Chalandon Y, Thomas X, Hayette S, Cayuela JM, Abbal C, Huguet F, et al. Randomized study of reduced-intensity chemotherapy combined with imatinib in adults with Ph-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;125(24):3711–9.
 27. Mitterbauer G, Nemeth P, Wacha S, Cross NCP, Schwarzingger I, Jaeger U, et al. Quantification of minimal residual disease in patients with BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukaemia using quantitative competitive polymerase chain reaction. *Br J Haematol* [Internet]. 1999/09/01. 1999 Sep;106(3):634–43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2141.1999.01605.x>
 28. Ravandi F, Jorgensen JL, Thomas DA, O'Brien S, Garris R, Faderl S, et al. Detection of MRD may predict the outcome of patients with Philadelphia chromosome-positive ALL treated with tyrosine kinase inhibitors plus chemotherapy. *Blood* [Internet]. 2013 Aug 15;122(7):1214–21. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/122/7/1214/32461/Detection-of-MRD-may-predict-the-outcome-of>
 29. Berry DA, Zhou S, Higley H, Mukundan L, Fu S, Reaman GH, et al.

- Association of Minimal Residual Disease With Clinical Outcome in Pediatric and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *JAMA Oncol* [Internet]. 2017;1402:e170580. Available from: <http://oncology.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaoncol.2017.0580>
30. Short NJ, Jabbour E. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: How to Recognize and Treat It. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 2017 Jan 16;19(1):6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11912-017-0565-x>
 31. Coccaro N, Anelli L, Zagaria A, Specchia G, Albano F. Next-Generation Sequencing in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jun 15;20(12):2929. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/12/2929>
 32. Roberts KG, Morin RD, Zhang J, Hirst M, Zhao Y, Su X, et al. Genetic Alterations Activating Kinase and Cytokine Receptor Signaling in High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* [Internet]. 2012 Aug;22(2):153–66. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610812002541>
 33. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LAA, Miller CB, et al. Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Jan 29;360(5):470–80. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0808253>
 34. Stanulla M, Cavé H, Moorman A V. IKZF1 deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia: still a poor prognostic marker? *Blood* [Internet]. 2020 Jan 23;135(4):252–60. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/135/4/252/429640/IKZF1-deletions-in-pediatric-acute-lymphoblastic>
 35. Jain N, Roberts KG, Jabbour E, Patel K, Eterovic AK, Chen K, et al. Ph-like acute lymphoblastic leukemia: a high-risk subtype in adults. 2017;129(5):572–82.
 36. Totadri S, Singh M, Trehan A, Varma N, Bhatia P. Keeping PACE with Ph Positive to Ph-Like Detection in B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia: A Practical and Cost Effective (PACE) Approach in a Resource

- Constrained Setting. *Indian J Hematol Blood Transfus* [Internet]. 2018 Oct 1;34(4):595–601. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12288-018-0997-y>
37. Fogliatto L, Bittencourt H, Nunes AS, Salenave PR, Silva GS, Daudt LE, et al. Outcome of Treatment in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia in Southern Brazil Using a Modified German Multicenter Acute Lymphoblastic Leukemia Protocol. *Acta Haematol* [Internet]. 2002;107(4):203–7. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/58315>
 38. de França Azevedo I, da Silva Júnior RMP, de Vasconcelos AVM, das Neves WB, de Barros Correia Melo FC, Melo RAM. Frequency of p190 and p210 BCR-ABL rearrangements and survival in Brazilian adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2014 Sep;36(5):351–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1516848414000899>
 39. Crespo-Solis E, Espinosa-Bautista K, Alvarado-Ibarra M, Rozen-Fuller E, Perez-Rocha F, Nava-Gomez C, et al. Retrospective Study of Adults With Acute Lymphoid Leukemia in Mexico City: First Report of the Working Group for Acute Leukemia (GTLA). *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* [Internet]. 2017 Sep;17:S252. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2152265017310182>
 40. Quiroz E, Aldoss I, Pullarkat V, Rego E, Marcucci G, Douer D. The emerging story of acute lymphoblastic leukemia among the Latin American population – biological and clinical implications. *Blood Rev* [Internet]. 2019 Jan;33:98–105. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268960X18300420>
 41. Paul S, Bcop P, Kantarjian H, Jabbour EJ. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2016;91(11):1645–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.09.010>
 42. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* [Internet]. 2017 Jun 30;7(6):e577–e577. Available from: <http://www.nature.com/articles/bcj201753>
 43. Pulte D, Gondos A, Brenner H. Improvement in survival in younger patients

- with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21st century. *Blood* [Internet]. 2008 Sep 12;113(7):1408–11. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2008-06-164863>
44. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015. 2016 [cited 2017 Sep 7]. p. 122 p. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>
 45. Möricke A, Zimmermann M, Reiter A, Henze G, Schrauder A, Gadner H, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* [Internet]. 2010;24(2):265–84. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/leu.2009.257>
 46. Al O, Gupta N, Bakhribah H, Griffiths E, Wang E, Wetzler M. Clinical updates in adult acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev Oncol / Hematol* [Internet]. 2016;1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.12.007>
 47. Ustwani O Al, Gupta N, Bakhribah H, Griffiths E, Wang E, Wetzler M. Clinical updates in adult acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2016 Mar;99:189–99. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842815300950>
 48. Moorman A V., Harrison CJ, Buck GAN, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, et al. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): Analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 2007;109(8):3189–97.
 49. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* [Internet]. 2013;381(9881):1943–55. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62187-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62187-4)
 50. Jabbour E, O'Brien S, Konopleva M, Kantarjian H. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* [Internet]. 2015 Aug 1;121(15):2517–28. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.29383>

51. Lazarus HM. Central nervous system involvement in adult acute lymphoblastic leukemia at diagnosis: results from the international ALL trial MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood* [Internet]. 2006 Jul 15;108(2):465–72. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2005-11-4666>
52. Hoelzer D, Thiel E, Löffler H, Büchner T, Ganser A, Heil G, et al. Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* [Internet]. 1988 Jan;71(1):123–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3422030>
53. Wang S, He G. 2016 Revision to the WHO classification of acute lymphoblastic leukemia. *J Transl Intern Med* [Internet]. 2016 Dec 30;4(4):147–9. Available from: <https://www.sciendo.com/article/10.1515/jtim-2016-0040>
54. Yan L, Ping N, Zhu M, Sun A, Xue Y, Ruan C, et al. Clinical, immunophenotypic, cytogenetic, and molecular genetic features in 117 adult patients with mixed-phenotype acute leukemia defined by WHO-2008 classification. *Haematologica* [Internet]. 2012 Nov 1;97(11):1708–12. Available from: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2012.064485>
55. Cernan M, Szotkowski T, Pikalova Z. Mixed-phenotype acute leukemia: state-of-the-art of the diagnosis, classification and treatment. *Biomed Pap* [Internet]. 2017 Sep 26;161(3):234–41. Available from: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2017.013.html>
56. Munker R, Brazauskas R, Wang HL, Lima M De, Khoury HJ, Gale RP, et al. Biology of Blood and Marrow Transplantation Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Patients with Mixed Phenotype Acute Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2016;22(6):1024–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.02.013>
57. Matutes E, Pickl WF, van't Veer M, Morilla R, Swansbury J, Strobl H, et al. Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. *Blood* [Internet]. 2011 Mar 17;117(11):3163–71. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-10-314682>

58. Weinberg OK, Seetharam M, Ren L, Alizadeh A, Arber DA. Mixed Phenotype Acute Leukemia: A Study of 61 Cases Using World Health Organization and European Group for the Immunological Classification of Leukaemias Criteria. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2014 Dec 1;142(6):803–8. Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1309/AJCPPVUPOTUVOIB5>
59. Gomez-Almaguer D, Marcos-Ramírez ER, Montaña-Figueroa EH, Ruiz-Arguelles GJ, Best-Aguilera CR, López-Sánchez M del C, et al. Acute Leukemia Characteristics are Different Around the World: the Mexican Perspective. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2017;17(1):46–51.
60. Swords R, Sznol J, Elias R, Watts J, Zelent A, Martin E, et al. Acute leukemia in adult Hispanic Americans: a large-population study. *Blood Cancer J* [Internet]. 2016 Oct 14;6(10):e484. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/bcj.2016.94>
61. Tran TH, Loh ML. Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* [Internet]. 2016 Dec 2;2016(1):561–6. Available from: <https://ashpublications.org/hematology/article/2016/1/561/20981/Phlike-acute-lymphoblastic-leukemia>
62. Ofran Y, Izraeli S. BCR-ABL (Ph)-like acute leukemia - pathogenesis, diagnosis and therapeutic options. *YBLRE* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2016.09.001>
63. Deboer R, Koval G, Mulkey F, Wetzler M, Devine S, Marcucci G, et al. Clinical impact of ABL1 kinase domain mutations and IKZF1 deletion in adults under age 60 with Philadelphia chromosome-positive (Ph +) acute lymphoblastic leukemia (ALL): molecular analysis of CALGB (Alliance) 10001 and 9665. 2016;8194(February).
64. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC, Yang Y-L, Pei D, et al. Targetable Kinase-Activating Lesions in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Sep 11;371(11):1005–15. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1403088>
65. Hömig-Hölzel C, Savola S. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) in Tumor Diagnostics and Prognostics. *Diagnostic Mol Pathol* [Internet]. 2012 Dec;21(4):189–206. Available from:

- <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00019606-201212000-00001>
66. Öfverholm I, Tran AN, Heyman M, Zachariadis V, Nordenskjöld M, Nordgren A, et al. Impact of IKZF1 deletions and PAX5 amplifications in pediatric B-cell precursor ALL treated according to NOPHO protocols. *Leukemia* [Internet]. 2013 Sep 29;27(9):1936–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/leu.2013.92>
 67. Kim M, Park J, Kim D-W, Kim Y-J, Jeon Y-W, Yoon J-H, et al. Impact of IKZF1 deletions on long-term outcomes of allo-SCT following imatinib-based chemotherapy in adult Philadelphia chromosome-positive ALL. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2015 Mar 15;50(3):354–62. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/bmt.2014.281>
 68. Buitenkamp TD, Pieters R, Gallimore NE, van der Veer A, Meijerink JPP, Beverloo HB, et al. Outcome in children with Down's syndrome and acute lymphoblastic leukemia: role of IKZF1 deletions and CRLF2 aberrations. *Leukemia* [Internet]. 2012 Oct 22;26(10):2204–11. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/leu.2012.84>
 69. van der Veer A, Waanders E, Pieters R, Willemse ME, Van Reijmersdal S V., Russell LJ, et al. Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. *Blood* [Internet]. 2013 Oct 10;122(15):2622–9. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2012-10-462358>
 70. Boer JM, Koenders JE, van der Holt B, Exalto C, Sanders MA, Cornelissen JJ, et al. Expression profiling of adult acute lymphoblastic leukemia identifies a BCR-ABL1-like subgroup characterized by high non-response and relapse rates. *Haematologica* [Internet]. 2015 Jul 1;100(7):e261–4. Available from: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2014.117424>
 71. Harrison CJ, Moorman A V, Schwab C, Carroll AJ, Raetz EA, Devidas M, et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia* [Internet]. 2014 May 29;28(5):1015–21. Available from:

- <http://www.nature.com/doi/10.1038/leu.2013.317>
72. Garcia DRN, Arancibia AM, Ribeiro RC, Land MGP, Silva MLM. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) detected by ETV6/RUNX1 FISH screening in childhood acute lymphoblastic leukemia: a case report. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2013;35(5). Available from: <http://www.rbhh.org/?doi=10.5581/1516-8484.20130111>
 73. Tanizawa RS da S, Kumeda CA, Azevedo Neto RS de, Leal A de M, Ferreira P de B, Velloso EDRP. Karyotypic and fluorescent in situ hybridization study of the centromere of chromosome 7 in secondary myeloid neoplasms. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2011;33(6):425–31. Available from: <http://www.rbhh.org/?doi=10.5581/1516-8484.20110117>
 74. Cecconello DK, Werlang ICR, Alegretti AP, Hahn MC, de Magalhães MR, Battistel AP, et al. Monitoring asparaginase activity in middle-income countries. *Lancet Oncol* [Internet]. 2018 Sep;19(9):1149–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204518305849>
 75. Burke PW, Hoelzer D, Park JH, Schmiegelow K, Douer D. Managing toxicities with asparaginase-based therapies in adult ALL: summary of an ESMO Open–Cancer Horizons roundtable discussion. *ESMO Open* [Internet]. 2020;5(5):e000858. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2059702920327022>
 76. Rank CU, Toft N, Tuckuviene R, Grell K, Nielsen OJ, Frandsen TL, et al. Thromboembolism in acute lymphoblastic leukemia: results of NOPHO ALL2008 protocol treatment in patients aged 1 to 45 years. *Blood* [Internet]. 2018 May 31;131(22):2475–84. Available from: <http://www.bloodjournal.org/lookup/doi/10.1182/blood-2018-01-827949>
 77. Orvain C, Balsat M, Tavernier E, Marolleau J-P, Pabst T, Chevallier P, et al. Thromboembolism Prophylaxis in Adult Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia Treated in the GRAALL-2005 Study. *Blood* [Internet]. 2020 Apr 22; Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/doi/10.1182/blood.2020004919/454452/Thromboembolism-Prophylaxis-in-Adult-Patients-with>
 78. Alachkar H, Fulton N, Sanford B, Malnassy G, Mutonga M, Larson RA, et

- al. Expression and polymorphism (rs4880) of mitochondrial superoxide dismutase (SOD2) and asparaginase induced hepatotoxicity in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2017 Jun 29;17(3):274–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/tpj20167>
79. Moorman A V., Barretta E, Butler ER, Ward EJ, Twentyman K, Kirkwood AA, et al. Prognostic impact of chromosomal abnormalities and copy number alterations in adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: a UKALL14 study. *Leukemia* [Internet]. 2021 Oct 16; Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-021-01448-2>
80. Ravandi F. How I treat Philadelphia chromosome–positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* [Internet]. 2019 Jan 10;133(2):130–6. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/133/2/130/39555/How-I-treat-Philadelphia-chromosomepositive-acute>
81. Maciel ALT, Barbosa T da C, Blunck CB, Wolch K, Machado A de AL, da Costa ES, et al. IKZF1 deletions associate with CRLF2 overexpression leading to a poor prognosis in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Transl Oncol* [Internet]. 2022 Jan;15(1):101291. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1936523321002825>

* De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Adendo

Com relação ao projeto originalmente proposto, alguns desafios prontamente se impuseram à sua execução. Parte das amostras armazenadas e remanescentes no laboratório de Biologia Tumoral não estavam disponíveis e não havia DNA guardado para a maioria delas, impedindo a análise do gene *IKZF1*, por exemplo, através da metodologia padrão-ouro (MLPA). Embora esta metodologia esteja atualmente disponível e padronizada no laboratório, ela não pode ser retrospectivamente realizada nas amostras pertinentes à coorte original do projeto. Demais análises por RT-PCR propostas originalmente não puderam ser realizadas por falta de amostra.

Durante este tempo, tentei analisar o grupo de pacientes com LLA Ph+, especificamente no que concerne à expressão de genes relacionados à leucemogênese, visando desenvolver um escore prognóstico diferencial relacionado à resposta molecular neste subgrupo de pacientes. Resumidamente, 16 amostras foram analisadas e a análise diferencial de expressão foi realizada, porém não tive tempo hábil para validar estes dados em uma coorte estendida. Esta próxima etapa é fundamental para corroborar nossos achados e permitir sua divulgação científica. Estamos trabalhando neste momento para validar através de uma base pública de expressão gênica em concomitância com a extensão da nossa coorte interna de LLA Ph+, na qual o RNA necessário está sendo armazenado no biobanco da instituição.

Nos últimos anos, venho trabalhando, baseado nos dados levantados e demonstrados nesta tese, em um projeto prospectivo multicêntrico em LLA do adulto, visto que nossos maiores desafios ainda são a uniformização dos protocolos de tratamento, profilaxia, seguimento de doença residual mensurável e avaliação genética centralizada. Estamos realizando reuniões periódicas com o grupo visando alinhar pontos finais do protocolo e pretendemos iniciar a aprovação ética e recrutamento para o mesmo ainda neste ano.

Apêndices

Apêndice A. Outros artigos publicados

Aqui, cito outros artigos publicados como primeiro autor que estão relacionados ao assunto da tese em questão (leucemia linfoblástica aguda).

- I. **Silva WF**, Cordeiro MG, Kishimoto RK, Velloso EDRP. TCRAD rearrangement in B-cell precursor leukemia: An unexpected finding. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2021 May 7. doi: 10.1016/j.htct.2021.02.006. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 34001465.
- II. **Silva WF**, Medina AB, Yamakawa PE, Buccheri V, Velloso EDRP, Rocha V. Treating Adult Acute Lymphoblastic Leukemia in Brazil- Increased Early Mortality Using a German Multicenter Acute Lymphoblastic Leukemia-based regimen. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2018 Jun;18(6):e255-e259. doi: 10.1016/j.clml.2018.03.001. Epub 2018 Mar 14. PubMed PMID: 29605423.
- III. **Silva WF**, Marquez GL, Salim RC, Rocha V. Primary refractory B-cell lymphoblastic leukemia with extramedullary disease - a distinctive response to blinatumomab and inotuzumab ozogamicin. *Hematol Transfus Cell Ther.* (in press). doi: 10.1016/j.htct.2018.11.004. Epub 2019 Mar 21. PubMed PMID: 31582343.

Aqui, cito os artigos publicados no período do curso de Doutorado direto, não diretamente relacionados ao tema estudado.

- I. Mendes FR*, **Silva WF***, da Costa Bandeira de Melo R, Silveira DRA, Velloso EDRP, Rocha V, Rego EM. Predictive factors associated with induction-related death in acute myeloid leukemia in a resource-constrained setting. *Ann Hematol.* 2021 Oct 21;. doi: 10.1007/s00277-021-04687-6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 34676435.
**Authors equally contributed to the manuscript.*
- II. RS Azevedo, C Belli, LBassolli, LFerri, MAPerusini, AEnrico, TDM Pereira, **Silva WF**, V Buccheri, RF Pinheiro, SM Magalhaes, S Schuster, JB Castelli, F Traina, V Rocha, EDRP Velloso. Age, Blasts, Performance Status and Lenalidomide Therapy Influence the Outcome of Myelodysplastic Syndrome With Isolated Del(5q): A Study of 58 South American Patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* doi: 10.1016/j.clml.2021.07.026. [Epub ahead of print] Epub 2021 Jul 25. PubMed PMID: 29605423.
- III. Silveira DRA, Coelho-Silva JL, **Silva WF**, Vallance G, Pereira-Martins DA, Madeira MIA, Figueredo-Pontes LL, Velloso EDRP, Simões BP, Peniket A, Danby R, Rego EM, Vyas P, Traina F, Bendit I, Quek L, Rocha V. A multicenter comparative acute myeloid leukemia study: can we explain the differences in the outcomes in resource-constrained settings? *Leuk Lymphoma.* 2021 Jan;62(1):147-157. doi: 10.1080/10428194.2020.1827252. Epub 2020 Sep 30. PMID: 32996373.
- IV. Silveira DRA, Quek L, Santos IS, Corby A, Coelho-Silva JL, Pereira-Martins DA, Vallance G, Brown B, Nardinelli L, **Silva WF**, Velloso EDRP, Lucena-Araujo AR, Traina F, Peniket A, Vyas P, Rego EM, Bendit I, Rocha V. Integrating clinical features with genetic factors enhances survival prediction for adults with acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2020 May 26;4(10):2339-2350. doi:

10.1182/bloodadvances.2019001419. PMID: 32453839; PMCID: PMC7252562.

- V. **Silva WF**, Rosa LID, Seguro FS, Silveira DRA, Bendit I, Buccheri V, Velloso EDRP, Rocha V, Rego EM. Salvage treatment for refractory or relapsed acute myeloid leukemia: a 10-year single-center experience. Clinics (Sao Paulo). 2020;75:e1566. doi: 10.6061/clinics/2020/e1566. eCollection 2020. PubMed PMID: 32294670; PubMed Central PMCID: PMC7134553.
- VI. Seguro FS, Teixeira LLC, da Rosa LI, **Silva WF**, Nardinelli L, Bendit I, Rocha V. Risk factors and incidence of thrombosis in a Brazilian cohort of patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. J Thromb Thrombolysis. 2020 May;49(4):667-672. doi: 10.1007/s11239-019-02029-y. PubMed PMID: 31898273.
- VII. **Silva WF**, Garibaldi, PMM, Rosa LI, Bellesso M, Cle DV, Delamain MT, Rego EM, Pereira J, Rocha V. Outcomes of HIV-associated Burkitt Lymphoma in Brazil: high treatment toxicity and refractoriness rates – a multicenter cohort study. Leuk Res. 2019 (in press), doi: 10.1016/j.leukres.2019.106287. PubMed PMID: 31864677.
- VIII. **Silva WF**, Neto AC, Rosa LI, Siqueira IA, Amarante GD, Velloso EDRP, Rego EM, Rocha V, Buccheri V. Outcomes and second neoplasms in hairy cell leukemia: A retrospective cohort. Leuk Res. 2019 Jun 4. pii: 83:106165. doi: 10.1016/j.leukres.2019.06.001. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31200147.
- IX. **Silva WF**, Rosa LI, Marquez GL, Bassoli L, Tucunduva L, Silveira D, Buccheri V, Bendit I, Rego EM, Rocha V, Velloso EDRP. Real-life outcomes on acute promyelocytic leukemia in Brazil – early deaths are still a problem. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2019 Feb. pii:

19(2):e116-e122. doi: 10.1016/j.clml.2018.11.004. PubMed PMID: 30509780.

- X. **Silva WF**, Rosa LI, Bellesso M, Lage LAPC, Rocha V, Pereira J. Treatment outcomes of adult Burkitt Lymphoma: results with a modified LMB protocol in Brazil and feasibility of outpatient administration. J Chemother 2018 Jan;19(30):6-8,375-379, doi: 10.1080/1120009X.2018.1535771. PubMed PMID: 30663548.
- XI. **Silva WF**, Pinho LL, Farias CLG, Torres V, Costalonga E, Filho GC, Testagrossa L, Rocha V, Buccheri V. Renal infiltration presenting as acute kidney injury in Hodgkin Lymphoma - a case report and review of the literature. Leuk Res Rep. 2018 Aug 29;10:41-43. doi: 10.1016/j.lrr.2018.07.003. Epub 2018 Aug 29. PubMed PMID: 30225192.
- XII. **Silva WF**, Teixeira LLC, Rocha V, Buccheri V. Current role of interferon in hairy cell leukemia therapy: a timely decision. Hematol Transfus Cell Ther. 2019 Jan-Mar;41(1):88-90. doi: 10.1016/j.htct.2018.04.004. Epub 2018 Jun 11. PubMed PMID: 30793110.

Apêndice B. Trabalhos reportados em congressos relacionados ao tema da dissertação

- I. **Wellington F Silva**, Dalila Cysne, Mariana Nassif Kerbauy, Iago Colturato, Ana Carolina Arrais Maia, Luciana Tucunduva, George Barros, Vergilio Rensi Colturato, Nelson Hamerschlak, Vanderson Rocha; Predictive Factors and Outcomes after Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia in Brazil. *Blood* 2021; 138 (Supplement 1): 2926. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2021-153547>. ASH 2021
- II. Ana Carolina Arrais Maia, **Wellington F Silva**, Elvira Velloso, Eduardo M Rego, Juliana Pereira, Vanderson Rocha; Long Term Outcomes of Adult Lymphoblastic Lymphoma Patients Treated with Pediatric Regimen in Brazil. *Blood* 2021; 138 (Supplement 1): 4582. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2021-154270>. ASH 2021.
- III. Peruso, LL, **Silva WF**, Velloso EDRP, Rocha V, Rego Eduardo. Patterns and prognostic impact of CNS infiltration in adults with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. HEMOPLAY 2021, Oct 2021.
- IV. **WF Silva**, V Rocha, Eduardo Rego, Elvira DRP Velloso. Use of nilotinib frontline in an adult with B-lymphoblastic leukemia case harboring a postulated SNX2-ABL1 fusion. ESH Translational Research E-Conference ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA. Abr 2021.