



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Hematologia

A Relação entre Leucemia Linfoblástica Aguda e Crianças com Síndrome de Down

Catarina Sofia Madeira dos Santos

Orientado por:

Prof. Dr. João Forjaz de Lacerda

Co-Orientado por:

Dr.^a Maria João Costa

JUNHO'2021

RESUMO

A Leucemia Linfoblástica Aguda é uma entidade rara, com incidência de cerca de 107 casos por ano em Portugal. É a neoplasia maligna hematológica mais frequente em crianças, observando-se uma predisposição genética em crianças com Síndrome de Down. A trissomia 21 é a anomalia cromossómica mais frequente no mundo e as crianças com Síndrome de Down possuem um risco aumentado de 10 a 20 vezes de desenvolverem leucemia linfoblástica aguda comparativamente à população em geral. Estas crianças possuem um pior prognóstico e características genéticas que as distinguem das crianças sem Síndrome de Down, nomeadamente as alterações nos genes CRLF2, JAK2, PAX5 e IKZF1, entre outros, que contribuem para o desenvolvimento desta neoplasia hematológica. Estes doentes são clinicamente muito semelhantes aos doentes sem Síndrome de Down, sendo a maior diferença o facto de não se encontrar a apresentação de doença em crianças com Síndrome de Down com menos de 1 ano de idade. Observa-se um aumento da toxicidade relacionada com o esquema terapêutico, especialmente com metotrexato, evidenciando a importância de novas terapêuticas dirigidas às anormalidades genéticas presentes e às células leucémicas.

Este Trabalho Final de Mestrado tem como objetivo fazer uma revisão da relação entre a Leucemia Linfoblástica Aguda e crianças com Síndrome de Down. Para a realização do trabalho foi realizada a pesquisa no Pubmed utilizando como palavras-chaves: “Acute Lymphoblastic Leukaemia” “Down syndrome and leukemia”, “chromosome 21”, precedidas por “genetics”, “clinical presentation”, “treatment” e “outcome”. Foi dada preferência a artigos datados nos últimos 5 anos, contudo foram incluídos artigos anteriores dada a sua relevância para o tema.

Palavras-chave: Leucemia Linfoblástica Aguda; Síndrome de Down.

O trabalho final é da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à FMUL pelos seus conteúdos nele apresentados.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukaemia is a rare condition, with an incidence of around 107 cases per year in Portugal. It is the most common haematological malignancy in children, with there being a genetic predisposition in children with Down Syndrome. Trisomy 21 is the most common chromosomal abnormality in the world, and children with Down Syndrome have an increased risk of about 10 to 20-fold of developing acute lymphoblastic leukaemia compared to the general population. These children have a worse prognosis and different genetic characteristics that distinguish them from other children without Down Syndrome, namely the alterations in CRLF2, JAK2, PAX5 and IKZF1 genes, amongst others, which contributes to the development of this haematological malignancy. These patients are clinically very similar to patients without Down Syndrome, with the most notable difference being the absence of disease presentation in children with Down Syndrome who are under 1 year of age. There is an increase in toxicity related to the therapeutic regimen, especially with methotrexate, demonstrating the importance of new therapies aimed at the genetic abnormalities and leukemic cells.

This Final Master's Work aims to review the relationship between acute lymphoblastic leukaemia and children with Down Syndrome. To carry out the work, a search was executed on Pubmed using the keywords: "Acute Lymphoblastic Leukaemia" "Down syndrome and leukaemia", "chromosome 21", preceded by "genetics", "clinical presentation", "treatment" and "outcome". Preference was given to articles dated in the last 5 years; however previous articles were included due to their relevance to the topic.

Keywords: Acute Lymphoblastic Leukaemia; Down Syndrome.

This final work is the sole responsibility of the author, with no responsibility to FMUL for the content presented therein.

ÍNDICE

RESUMO	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE	4
SIGLAS E ABREVIATURAS	5
INTRODUÇÃO	7
METODOLOGIA	9
EPIDEMIOLOGIA	10
ALTERAÇÕES GENÉTICAS	12
Alterações CRLF2.....	16
Alterações JAK2.....	19
Mutações RAS	22
IKZF1.....	25
PAX5.....	27
Alterações do cromossoma 21	28
HMGN1.....	31
DYRK1A.....	33
INTERFERÃO (IFN)	37
CLÍNICA	38
TRATAMENTO	41
Fase de Indução	42
Fase de Consolidação	43
Fase de Manutenção	47
Transplante de Medula Óssea.....	48
Tratamento de Suporte	50
Perspetivas Futuras	52
PROGNÓSTICO	55
CONCLUSÃO	58
AGRADECIMENTOS	60
BIBLIOGRAFIA	61

SIGLAS E ABREVIATURAS

ALL – Leucemia Linfoblástica Aguda

B-ALL – Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B

BCP-ALL – Leucemia Linfoblástica Aguda de Células Precursoras B

CIR – Cumulative Incidence of Relapse (Incidência Cumulativa de Recidiva)

CR – Complete Remission (Remissão Completa)

CRLF2 – Cytokine Receptor-Like Factor 2

DEVH – Doença Enxerto-Versus-Hospedeiro

DFS – Disease Free Survival (Sobrevivência Livre de Doença)

DI – Delayed Intensification

DS – Síndrome de Down

DSCRs – Regiões Críticas do Síndrome de Down (Down Syndrome Critical Regions)

DS-ALL – Leucemia Linfoblástica Aguda e Síndrome de Down

DS-AML – Leucemia Mieloide Aguda e Síndrome de Down

DS-AMKL – Leucemia Megacarioblástica Aguda e Síndrome de Down

EFS – Event Free Survival (Sobrevivência Livre de Evento)

iAMP21 – Amplificação Intra-cromossômica do Cromossoma 21

IGH@ - *Locus* da Cadeia Pesada de Imunoglobulina

IM – Interim Maintenance

IV – Intravenoso

JAK2 – Janus Quinase 2

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

MTX – Metotrexato

Non-DS-ALL – Leucemia Linfoblástica Aguda sem Síndrome de Down

OS – Overall Survival (Sobrevivência Global)

pl:pC – polyI:polyC

PO – *Per Os*

SNC – Sistema Nervoso Central

T-ALL – Leucemia Linfoblástica Aguda de Células T

TMD – Doença Mieloproliferativa Transitória

TMO – Transplante de Medula Óssea

TRM – Treatment Related Mortality (Mortalidade Relacionada com o Tratamento)

TSLP – Linfopoiatina Tímica Estromal

Vs – Versus

6MP – 6-Mercaptopurina

INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL) é uma entidade rara, com uma incidência em Portugal de 107 casos por ano (APCL, n.d.). Constitui a neoplasia maligna hematológica mais frequente na idade pediátrica, com pico de incidência em crianças com idade entre os 2 e os 5 anos (Larson & Anastasi, 2008). Caracteriza-se por uma perturbação no desenvolvimento de células da linhagem linfoide e a disrupção do ciclo celular, com aumento na proliferação de blastos. Consoante a linhagem celular afetada, é possível identificar dois subtipos de leucemia linfoblástica aguda, nomeadamente leucemia linfoblástica aguda de células B, a mais frequente, e de células T (Malard & Mohty, 2020; Onciu, 2009).

A Síndrome de Down é a trissomia autossómica causada pela presença de uma terceira cópia do cromossoma 21, total ou parcial, e é caracterizada por diversas perturbações intelectuais, musculares e articulares, associada a dismorfismo facial e a diversas anomalias cardíacas, gastrointestinais, neuro sensoriais ou endócrinas. Estas crianças têm risco aumentado de desenvolver apneia obstrutiva do sono, epilepsia, hipotireoidismo, doença de Alzheimer com início mais precoce, doenças autoimunes, suscetibilidade a infeções e doenças hematológicas, nomeadamente o aumento do risco de desenvolver leucemia. Devido a estes fatores, a esperança média de vida em indivíduos com Síndrome de Down é cerca de 58 anos (Antonarakis et al., 2020). A doença mieloproliferativa transitória (TMD) é observada no momento do nascimento em cerca de 4% a 10% das crianças com Síndrome de Down. É caracterizada por megacarioblastos imaturos no sangue periférico e no fígado fetal, aumentando a probabilidade de desenvolvimento de leucemia. Cerca de 20% das crianças diagnosticadas com TMD irão desenvolver leucemia megacarioblástica aguda dentro de 4 anos. A probabilidade de desenvolver leucemia megacarioblástica aguda em crianças com Síndrome de Down (DS-AMKL) é de cerca de 500 vezes o risco comparando com a restante população pediátrica. (Antonarakis et al., 2020; Lam et al., 2016; Malinge et al., 2009) No caso da leucemia linfoblástica aguda em crianças com Síndrome de Down (DS-ALL), o risco de desenvolverem DS-ALL está aumentado em cerca de 10 a 20 vezes comparando com a restante população (Malinge et al., 2009; Whitlock, 2006).

Na DS-AMKL, para além da presença constitucional da trissomia do cromossoma 21, a mutação do gene GATA1 foi identificada como essencial para o desenvolvimento da leucemia megacarioblástica em crianças com Síndrome de Down. Em contraste, na leucemia linfoblástica aguda nas crianças com este síndrome, os mecanismos genéticos que contribuem para o desenvolvimento da doença ainda não são completamente conhecidos, com alguns indivíduos a apresentarem mutações nos genes CRLF2, JAK2, PAX5 e IKZF1, entre outros. Estas alterações não são identificadas em todas as amostras de pacientes DS-ALL, permanecendo também desconhecida a influência de fatores ambientais no desenvolvimento e progressão da doença (Antonarakis et al., 2020; Malinge et al., 2009).

Este Trabalho Final de Mestrado tem como objetivo fazer uma revisão da relação observada entre a Leucemia Linfoblástica Aguda e crianças com Síndrome de Down. Em particular, procura salientar os mecanismos genéticos que predisõem o aparecimento da leucemia linfoblástica aguda, as manifestações clínicas presentes nestas crianças, particularidades no tratamento e o prognóstico esperado nos doentes com Síndrome de Down e leucemia linfoblástica aguda.

METODOLOGIA

Para a realização do trabalho final de mestrado “A Relação entre a Leucemia Linfoblástica Aguda e Crianças com Síndrome de Down”, durante o período compreendido de Junho de 2020 até Maio de 2021, foi realizada uma pesquisa no Pubmed utilizando como palavras-chaves: “Acute Lymphoblastic Leukaemia”, “Down syndrome and leukemia” e “chromosome 21”, precedidas por “genetics”, “clinical presentation”, “treatment” e “outcome”. Foi dada preferência a artigos datados nos últimos cinco anos, contudo foram incluídos artigos anteriores dada a sua relevância para o tema. Para a redação deste trabalho final de mestrado, um total de noventa e sete artigos foram incluídos com base na relevância da informação para o assunto em análise, publicados entre os anos de 1995 e 2021. Para além destes artigos científicos, três livros em formato digital, um documento sobre características de produto farmacológico e um “site” eletrónico foram consultados e incluídos no trabalho dada a sua pertinência para o tema. Os artigos científicos e livros digitais consultados na composição deste trabalho final de mestrado estão escritos na língua inglesa. Por sua vez, a informação sobre o produto farmacológico e o sítio eletrónico consultado foram ambos redigidos em português.

EPIDEMIOLOGIA

A leucemia linfoblástica aguda (ALL) é a doença maligna mais frequente na infância, representando cerca de 75% de todas as leucemias agudas nas crianças, com um pico de incidência entre os 2 e 5 anos (Gurney et al., 1995). Na idade adulta, os casos de leucemia linfoblástica aguda correspondem apenas a 20% dos casos totais da doença. Contrariamente à população pediátrica, nos adultos observa-se uma maior prevalência de leucemia mielóide aguda (AML) e leucemias linfocíticas crónicas (Gurney et al., 1995), com aumento da incidência de ALL em pessoas com idade superior a 50 anos (Hoelzer & Gökbuget, 2000). Em Portugal, são apenas reportados em média cerca de 107 casos de leucemia linfoblástica aguda por ano (APCL, n.d.). A leucemia linfoblástica aguda raramente ocorre como uma manifestação de neoplasia secundária, sendo principalmente uma doença *de novo* (Onciu, 2009). Em termos de distribuição da doença por grupos étnicos, observa-se uma maior prevalência em caucasianos comparativamente com africanos e um aumento do risco de desenvolver a doença de cerca 1,6 vezes na população Latina (de Smith et al., 2019; Larson & Anastasi, 2008). Relativamente à distribuição geográfica, existem mais casos reportados de ALL em países industrializados e em áreas urbanas (Larson & Anastasi, 2008). No que diz respeito à distribuição entre sexos, existe uma ligeira preferência para o sexo masculino comparativamente com o sexo feminino (1.3 vs 1) (Buitenkamp et al., 2014).

A Síndrome de Down é atualmente a anomalia cromossómica mais frequente, com uma incidência de 6.7 casos por cada 10.000 nascimentos, com aumento da incidência nos últimos 70 anos de 3.3 casos por cada 10.000 habitantes (Antonarakis et al., 2020). Crianças com Síndrome de Down têm um risco aumentado de cerca de 10 a 20 vezes de desenvolverem leucemia linfoblástica aguda. A prevalência de leucemia linfoblástica aguda em crianças com Síndrome de Down é de 1 em cada 200 a 300 crianças diagnosticadas com DS-ALL, aproximadamente 1% a 3% dos casos, comparativamente com 1 em cada 2800 crianças na população em geral (Lange, 2000; Malinge et al., 2009; Whitlock, 2006). Em termos de idade de apresentação de doença, os doentes com leucemia linfoblástica aguda e Síndrome de Down são mais velhos que os doentes sem Síndrome de Down, com média de 5 anos de idade vs 4.7 anos de idade.

É também importante mencionar a raridade da apresentação de doença em crianças com menos de 1 ano de idade (Buitenkamp et al., 2014; Pennella et al., 2018). Para além do risco aumentado de leucemia na infância, os indivíduos com Síndrome de Down mantêm o risco aumentado de desenvolver DS-ALL até aos 30 anos de idade, comparativamente com indivíduos sem Síndrome de Down (Hasle et al., 2000).

ALTERAÇÕES GENÉTICAS

As alterações genéticas são a base do desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda, contribuindo para o aumento do risco de desenvolvimento de ALL, e influenciando a apresentação clínica, a resposta à terapêutica e o prognóstico do doente. Contudo, evidencia-se uma heterogeneidade genética importante na fisiopatologia da doença, com múltiplas alterações genéticas, levando a crer que o desenvolvimento de ALL resulta da interação de múltiplos fatores, entre eles componentes genéticos e ambientais (Greaves et al., 2003; Onciu, 2009).

Do ponto de vista ambiental, estudos previamente realizados sugerem que a fisiopatologia das leucemias em idade pediátrica tem início possivelmente ainda antes do nascimento (Greaves et al., 2003; Roberts & Mullighan, 2015), contribuindo significativamente a exposição a fatores de risco durante o desenvolvimento fetal e na infância. No entanto, conclui-se que a exposição a radiação ionizante foi o principal fator associado ao desenvolvimento de leucemias agudas (Belson et al., 2007). Concretamente em relação à leucemia linfoblástica aguda, a exposição pré-concepcional, durante a gravidez e após o nascimento a tintas no interior do domicílio provoca um aumento do risco para o desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda, especialmente para a forma de ALL t(12;21) [ETV6-RUNX1] (Bailey et al., 2015). A exposição a pesticidas e ao tabaco, especialmente no interior da residência, estão associadas ao aumento do risco de desenvolvimento de leucemia mieloide aguda, mas este risco não se verifica em relação ao desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda. Outros fatores ambientais como a presença de campos eletromagnéticos obtiveram uma associação mais fraca ou inconsistente como fatores de risco que contribuem para o aparecimento de leucemia na infância (Belson et al., 2007; Whitehead et al., 2016). Recentemente, a exposição a infeções, especialmente de etiologia viral, tem sido equacionada como um fator que predispõem para o desenvolvimento de leucemia em humanos. Esta teoria baseia-se no facto da leucemia linfoblástica aguda ser mais comum em crianças com idades mais novas e nas quais o sistema imunitário ainda está em desenvolvimento. Nesta teoria, a exposição infecciosa constitui um evento oncogénico que contribui para a promoção da doença. Contudo,

até à data, não existem dados definitivos que apontem para um agente específico ou qual o mecanismo fisiopatológico envolvido que leva ao desenvolvimento da leucemia (Greaves, 2018). Especificamente no caso da leucemia linfoblástica aguda em crianças com Síndrome de Down, não foi encontrada nenhuma implicação específica de fatores ambientais que contribuam para o desenvolvimento de ALL nestas crianças.

Em relação ao componente genético, as alterações genómicas mais frequentemente observadas diferem consoante estejamos na presença de B-ALL ou T-ALL. Contudo, independentemente do subtipo celular de ALL, as alterações genéticas identificadas nas células dos doentes são distintas entre os mesmos, e é necessária a presença de múltiplas alterações genómicas para o desenvolvimento da doença na maioria dos casos. No caso da leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL), são várias as alterações genéticas detetadas com maior prevalência. Primeiramente, a hiperdiploidia está presente em 27% a 29% dos casos de B-ALL em idade pediátrica, constituindo a alteração genética com maior incidência nos doentes diagnosticados com B-ALL. Esta alteração possui um prognóstico favorável nesta faixa etária e é caracterizada pelo ganho de entre 51 e 67 cromossomas, entre os quais os cromossomas X, 4, 10, 14, 17, 18 e 21 (Paulsson & Johansson, 2009). De seguida, a translocação t(12;21) [ETV6-RUNX1] é identificada em 22% a 25% dos casos de B-ALL em idade pediátrica, especificamente nos casos de pré-B-ALL, associada em 28% dos casos a deleções monoalélicas no gene PAX5. A translocação ETV6-RUNX1 envolve genes codificantes de fatores de transcrição necessários para o desenvolvimento de linfócitos B e T, conferindo um prognóstico favorável nestas crianças (Malard & Mohty, 2020; Onciu, 2009; Roberts & Mullighan, 2015; Zhou et al., 2012).

Com menor incidência, poderemos identificar no genoma do doente com ALL uma hipodiploidia cromossómica ou as translocações t(1;19) [TCF3-PBX1], t(v; 11q23), t(9;22) [BCR-ABL1] e raramente t(5;14 q31;q32). A hipodiploidia é identificada em cerca de 5% a 6% dos casos e caracteriza-se pela presença de menos de 46 cromossomas, conferindo um prognóstico pouco favorável aos doentes e um aumento na frequência de mutações nos genes RAS e IKAROS. A translocação t(1;19) [TCF3-PBX1] tem uma incidência de 3% a 6% nos doentes com B-ALL, geralmente associada a bom prognóstico

e com registo no aumento da sua prevalência em doentes afro-americanos. Os genes envolvidos nesta translocação codificam fatores de transcrição importantes no início do desenvolvimento e maturação de células B. A translocação (v; 11q23) que envolve o gene “Mixed Lineage Leukemia” (MLL) confere um fator de mau prognóstico, apresentando-se com maior incidência nos doentes de idade adulta comparativamente com doentes pediátricos, com prevalência de 5% a 7% vs 2% a 3%, respetivamente (Malard & Mohty, 2020; Onciu, 2009; Roberts & Mullighan, 2015; Zhou et al., 2012). A translocação t(9;22) [BCR-ABL1] tem uma incidência em 2% a 3% dos casos pediátricos de B-ALL, sendo também referida como “cromossoma *Philadelphia* positivo”, observando-se um aumento na sua prevalência para 20-30% nos casos de B-ALL em doentes adultos (Malard & Mohty, 2020; Onciu, 2009; Roberts & Mullighan, 2015; Zhou et al., 2012). A fusão BCR-ABL1 é suficiente para provocar a transformação maligna de células precursoras B nos modelos animais, não sendo necessário a existência de outras alterações genéticas (Huettner et al., 2000). Em cerca de 66%, a presença do “cromossoma *Philadelphia* positivo” é observada concomitantemente com mutações IKZF1 e em outros genes envolvidos no desenvolvimento de linfócitos B, como por exemplo os genes PAX5 e EBF1, sendo que a sua deteção confere um prognóstico desfavorável nestes doentes (Malard & Mohty, 2020; Onciu, 2009; Roberts & Mullighan, 2015; Zhou et al., 2012). Por fim, a translocação t(5;14 q31;q32) é raramente identificada em doentes com ALL, presente em menos de 1% dos casos, conferindo eosinofilia associada à doença (Malard & Mohty, 2020; Onciu, 2009; Roberts & Mullighan, 2015; Zhou et al., 2012).

No subtipo de leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), a principal via de desenvolvimento da doença, identificada em 80% dos doentes, é caracterizada pela ativação da sinalização NOTCH1 como consequência de mutações ativadoras do gene NOTCH1 ou mutações “loss of function” do gene FBXW7. Em 70% dos casos de T-ALL, são identificadas mutações no gene CDKN2A devido à perda dos genes supressores de tumor *p16* (INK4A) e *p14* (ARF). A frequente identificação simultânea de alterações no gene CDKN2A e ativação da sinalização NOTCH1 na T-ALL sugere que ambas as alterações colaboram na fisiopatologia de T-ALL, promovendo a oncogénese. Em cerca de 50% dos doentes com T-ALL, são identificadas translocações recíprocas de genes

fatores de transcrição, conferindo alterações no crescimento celular, nomeadamente na diferenciação, proliferação e sobrevivência das mesmas. Estas translocações cromossômicas ocorrem devido a rearranjos nos genes recetores celulares T (TCR) α (TCR α , com *locus* 14q11.2), β (TCR β , com *locus* 7q35) e δ , importantes no desenvolvimento de células T. Outras alterações genómicas relevantes no desenvolvimento de T-ALL são: identificação de mutações ativadoras do gene TAL1/SCL (*locus* 1p32), em cerca de 50% dos doentes; sobre-expressão dos fator de transcrição oncogénico HOX11 (TLX1) em cerca de 30% dos casos, mais comum na população adulta que pediátrica; mutação LYL1, observada em 22% dos casos pediátricos de T-ALL; alterações com perda de função dos genes AZH2 e SUZ12, presentes em 25% dos casos de T-ALL; e alterações no gene PHF6, importante na regulação epigenética da expressão genómica, identificadas em 16% dos casos pediátricos de T-ALL e em 38% dos casos T-ALL em doentes adultos (Malard & Mohty, 2020; Onciu, 2009).

No caso das crianças com Síndrome de Down, ainda não é possível identificar todas as alterações genéticas que contribuem para o desenvolvimento de ALL, evidenciando uma heterogeneidade genética relevante. Em 40% dos casos de DS-ALL os doentes apresentam um cariótipo normal, com exceção da trissomia 21 constitutiva. Para além da trissomia do cromossoma 21, existe uma baixa frequência da expressão do fator de transcrição ETV6-RUNX1 (t(12;21) (p13;q22) em DS-ALL (8.3% vs 25.8% em *non-DS-ALL*) e de hiperdiploidia aumentada (HeH) (DS-ALL 9% vs 33% em *non-DS-ALL*) (Buitenkamp et al., 2014), com aumento da incidência nas amostras de ganho genómico de cromossoma X (DS-ALL em 38% vs 21% em *non-DS-ALL*) (Forestier et al., 2008). As alterações no genoma frequentemente observadas nesta subpopulação estão associadas a um fenótipo leucémico mais agressivo, nomeadamente os rearranjos no recetor de citocina *like* fator 2 (CRLF2). Outras mutações com maior prevalência nas crianças com Síndrome de Down são as mutações nos genes JAK2 e a deleção dos genes IKZF1 e PAX5. Em relação ao cromossoma 21, as alterações nos genes HMGN1 e DYRK1A foram identificadas como promotoras de B-ALL (Lee et al., 2016).

Contrariamente ao que é observado na leucemia linfoblástica aguda em crianças com Síndrome de Down, a alteração genómica implicada na patogénese da leucemia

mielóide aguda em indivíduos com Síndrome de Down já foi identificada como sendo a mutação do fator de transcriptase GATA1 (Gaikwad et al., 2009).

A complexidade genética de DS-ALL é uma conclusão alcançada em estudos com modelos animais, observando-se a necessidade de múltiplas mutações para o desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda em ratos com o equivalente genético de trissomia 21, nomeadamente de alterações dos genes JAK2, CRLF2, PAX5 e IKZF1 (Lane et al., 2014).

ALTERAÇÕES CRLF2

Cytokine receptor-like factor 2 (CRLF2) é uma proteína que, em associação com a IL-7R α , origina um recetor heterodimérico para a linfopietina tímica estromal (TSLP). A TSLP, implicada na sinalização JAK/STAT (Schwartzman et al., 2017), ativa as células dendríticas e tem um papel fundamental na angiogénese, inflamação e processos alérgicos, bem como na proliferação e sobrevivência de células B (Liu et al., 2007).

A mutação ou sobre-expressão deste recetor está documentada no subgrupo de doentes com Leucemia Linfoblástica Aguda “Philadelphia-like” e em cerca de 60% a 69% dos casos de Leucemia Linfoblástica Aguda em crianças com Síndrome de Down (Buitenkamp et al., 2014; Mullighan et al., 2009; Schwartzman et al., 2017). Considerando estes dados, é possível subdividir os casos de Leucemia Linfoblástica Aguda em crianças com Síndrome de Down em dois subtipos: CRLF2 positivo, onde existe um aumento da sinalização de JAK-STAT, evidenciando-se um aumento significativo na proliferação celular; e CRLF2 negativo, onde vamos observar um aumento na sinalização RAS e mutações nos genes remodeladores de cromatina CREBBP, semelhante nos casos de ALL hiperdiploide (Schwartzman et al., 2017).

Com recurso a análise genética, 37 amostras de crianças com DS-ALL foram analisadas e concluiu-se que a sobre-expressão de CRLF2 foi identificada em 62.1% destas (23 crianças) (Hertzberg et al., 2010). Uma possível causa pelo aumento da expressão deste recetor nas crianças com Síndrome de Down poderá ser a deleção focal

da região pseudossomal 1 (PAR1), que está adjacente ao gene CRLF2, localizada no cromossoma sexual X/Y (Xp22.3/Yp11.3). A deleção irá provocar um rearranjo da região codificante CRLF2, resultando na fusão com o exão não-codificante P2RY8 e consequentemente na sobre-expressão de CRLF2. A região P2RY8 codifica um recetor purinérgico identificado com grande expressão em múltiplos tecidos, nomeadamente células leucémicas (Fujiwara et al., 2007). O estudo do hospital de Saint Jude demonstra que esta fusão estava presente em 53% dos casos observados de ALL em crianças com Síndrome de Down, comparativamente com 7% em doentes sem DS (Mullighan et al., 2009). O estudo de Buitenkamp et al. (2014) verificou a presença da fusão P2RY8-CRLF2 em 87 de 93 doentes DS-ALL com sobre-expressão de CRLF2, cerca de 94.6%. Recentemente, Winer et al. (2020) verificou a presença de um alelo de risco CDKN2A rs3731249 (*locus* 9p21.3), já previamente implicado na leucemia linfoblástica aguda (Xu et al., 2015), em amostras de DS-ALL com fusão CRLF2, existindo aumento significativo na frequência do alelo de risco em doentes DS-ALL comparativamente com *non*-DS-ALL (21,1% vs 3,7%), sugerindo uma cooperação entre mutações somáticas e germinativas na DS-ALL (Winer et al., 2020). É de notar que a variação da expressão de IL-7R α não difere entre os doentes com leucemia linfoblástica aguda, com ou sem Síndrome de Down, concluindo-se que a expressão de IL-7R α é independente da expressão de CRLF2 (Hertzberg et al., 2010). Contudo, em doentes com B-ALL ou T-ALL onde existiam concomitantemente alterações no gene CRLF2 e mutações do gene IL-7R α , verificou-se que estas alterações genómicas providenciaram uma ativação constitucional de IL-7R α e um crescimento independente de citocinas às células linfoides progenitoras (Shochat et al., 2011).

Outra hipótese para o aumento da expressão do recetor CRLF2 são rearranjos do *locus* da cadeia pesada de imunoglobulina (IGH@), com localização 14q32.33. A fusão IGH@-CRLF2 resulta numa desregulação da expressão de CRLF2, uma vez que o rearranjo genómico estimula a expressão de CRLF2. Esta mutação é apontada como uma alteração primária nos eventos iniciais da patogénese da leucemia linfoblástica aguda, particularmente no subtipo precursor de células B (BCP-ALL), com uma incidência observada de 3% neste subgrupo (Russell et al., 2009). A presença da fusão em crianças com Síndrome de Down é rara, com incidência de 5.4% nos doentes DS-ALL com sobre-

expressão CRLF2 (6 em 93 doentes DS-ALL e mutação CRLF2) (Buitenkamp et al., 2014). A fusão IGH@-CRLF2 apresenta-se com maior prevalência em crianças mais velhas e adultos jovens com DS-ALL (Russell et al., 2009).

Os rearranjos do gene CRLF2 são eventos que ocorrem na fase inicial da evolução da leucemia linfoblástica aguda em indivíduos com Síndrome de Down, e geralmente estão presentes no momento entre o diagnóstico e a recidiva da doença sugerindo uma estabilidade na mutação CRLF2 (Schwartzman et al., 2017). As crianças que apresentam sobre-expressão de CRLF2 são diagnosticadas numa idade mais jovem comparativamente com crianças com expressão ausente ou baixa de CRLF2 (5.56 anos comparativamente com 9.87 anos) (Hertzberg et al., 2010). As conclusões de Buitenkamp et al. (2014) também apoiam este dado, uma vez que os doentes analisados com DS-ALL e mutações do gene CRLF2 foram diagnosticados com uma idade em média de 4.1 anos vs 7.7 anos em doentes com CRLF2 “wild-type” ($P < .001$). A sobre-expressão CRLF2 confere um pior prognóstico e resposta à terapêutica, com sobrevivência livre de doença de 61% vs 81% ($P = 0.003$) e taxa de recidivas de 31% vs 11% ($P = 0.006$) comparativamente com crianças sem sobre-expressão CRLF2. Buitenkamp et al. (2014) apontam para uma diminuição no tempo médio de recidiva dos doentes DS-ALL com mutações CRLF2, apresentando recidiva de doença em 29 meses vs 51 meses em doentes DS-ALL com “wild-type” CRLF2, contudo este dado não é evidenciado em todas as investigações realizadas (Cario et al., 2010).

O estudo realizado por Hertzberg et al. (2010) realça a importância de dois eventos adquiridos associados ao aumento de expressão de CRLF2 em DS-ALL. O primeiro era a presença da mutação somática JAK2 em todas as amostras de DS-ALL com expressão alterada de CRLF2. A segunda alteração identificada, descrita em 3 das 33 amostras de DS-ALL, foi uma mutação ativadora do próprio gene CRLF2 que resulta na substituição de fenilalanina por cisteína presente na posição 232. Devido a esta alteração genómica, as células BaF3 com transdução ectópica de JAK2 “wild-type” obtiveram um grande crescimento independente de citocinas, uma vez que a mutação provoca a fosforilação constitucional de STAT5.

A presença concomitante de mutações no gene JAK2 permite utilizar inibidores JAK como adjuvantes terapêuticos se estivermos perante um caso de alteração CRLF2. Em células CRLF2 sem alterações JAK, a terapêutica com Ruxolitinib apenas provoca um pequeno efeito na redução do “burden” tumoral. Recentemente, a terapêutica com Givinostat, um agente inibidor de histona deacetilase (HDAC), em células BCP-ALL com aumento da expressão de CRLF2 resultante da mutação P2RY8-CRLF2 permitiu induzir morte celular nas amostras sem afetar outras células, nomeadamente células T, eritrócitos ou células mieloides. Esta terapêutica permitiu também reduzir os níveis de expressão de CRLF2 expressos pelas células mutadas (Savino et al., 2017).

ALTERAÇÕES JAK2

O gene Janus quinase (JAK2), localizado no cromossoma 9p24, codifica uma tirosina quinase que juntamente com o sinal transdutor e ativador de transcrição proteica (STAT) leva à ativação da via JAK/STAT, importante no desenvolvimento precoce de células B (Dai et al., 2007).

A mutação do gene JAK2 já foi identificada em diversas doenças mieloproliferativas, sendo a alteração mais frequentemente a substituição de valina 617 (V617F), localizada num domínio inibitório da proteína. Como resposta à mutação, há uma ativação constitucional da proteína JAK2 que origina uma independência e aumento da resposta das células da linhagem Ba/F3 em relação ao fator de crescimento (Malinge et al., 2007). Esta alteração no genoma tem impacto na hematopoiese, uma vez que é identificada em 90% dos casos de policitemia vera e em cerca de metade dos casos de trombocitemia essencial (Bercovich et al., 2008; Gaikwad et al., 2009).

A primeira evidência da mutação do gene JAK2 num paciente com Síndrome de Down e Leucemia Linfoblástica Aguda com precursor de células-B (BCP-ALL) foi em 2007, quando Malinge et al. (2007) identificaram numa criança de 4 anos uma mutação no gene JAK2 que codificava uma proteína com menos 5 aminoácidos – JAK2 Δ IREEED. Fora esta alteração genómica, a única outra alteração observada foi a presença de trissomia 21, implicando uma relação entre a trissomia 21 e ativação JAK2. Comparando a nova

mutação JAK2 com a mutação V617F já identificada, ambas as mutações levaram à alteração da sinalização JAK/STAT nas células Ba/F3 (Malinge et al., 2007).

Posteriormente, Bercovich et al. (2008) realizaram um estudo com 88 doentes DS-ALL e foi identificada a mutação JAK2 R683G em 18% (16 doentes) das amostras de medula óssea, confirmada por clonagem subsequente e a sequenciação das mesmas. O estudo realizado por Buitenkamp et al. (2014) também confirma a presença da mutação JAK2 R683 em 30 (21%) de 141 doentes DS-ALL, 83% destes (25 doentes) com alterações também no gene CRLF2. Bercovich et al. (2008) não identificam outras mutações no exão 16 do gene JAK2 nos restantes 72 doentes sem ser a mutação referida anteriormente. A mutação mais prevalente foi a alteração 2541A→G, que resulta na substituição de R683 com glicina (R683G) em 8 doentes. Em 5 doentes observou-se a substituição de serina levando à mutação R683S, devido a uma transversão 2543A→T. Num caso, a transição 2542G→A levou a uma substituição de lisina (R683K). Foram também registados, em 15 dos 16 doentes, eventos de deleções e inserções que ocorreram simultaneamente com as mutações na região imediatamente anterior a R683. Estas mutações no gene JAK2 foram observadas no momento do diagnóstico e estavam ausentes em amostras de remissão dos doentes, concluindo-se que se tratam de mutações somáticas adquiridas. Com exceção de um doente, as mutações eram heterozigóticas. Uma das conclusões do estudo foi que os doentes com o alelo JAK2 mutado tinham o diagnóstico mais cedo que os doentes sem mutação JAK2, sendo que 15 dos 16 doentes com alterações JAK2 tinham idade inferior a 5 anos no momento do diagnóstico. Por sua vez, dos restantes 72 doentes, 38% tinham mais de 10 anos no momento do diagnóstico. Foi observado que a mutação JAK2 era mais estável quando comparada à “wild-type” e que esta alteração genómica conferia às células BaF3/EpoR e BaF3/TpoR a capacidade de proliferação independente de quinases e a fosforilação de tirosina constitucional de JAK2 e STAT5 (Bercovich et al., 2008). Esta afirmação é corroborada com um segundo estudo que afirma que a alteração R683G ao gene JAK2 permitiu às células Ba/F3 dependentes de IL-3 sobreviver e proliferar num ambiente em que a interleucina não estava presente (Kearney et al., 2009). Conclui-se assim que as mutações JAK2 são todas de ganho de função ao ativarem vias associadas com a sinalização JAK/STAT (Bercovich et al., 2008).

A análise estrutural de um modelo da proteína JAK2 revela que os resíduos R683 e V617 encontram-se conservados em diferentes locais da proteína, colocando a hipótese de que ao existir uma interação entre proteínas diferentes, pode ser possível originar diversos fenótipos. Esta afirmação é apoiada pelas diferentes associações das mutações do gene JAK2 com diversas patologias, nomeadamente a identificação da mutação R683 na leucemia linfoblástica aguda e da mutação V617 em neoplasias mieloproliferativas (Bercovich et al., 2008). As mutações nos genes JAK-STAT estavam sobretudo presentes no diagnóstico inicial, sendo que em casos de recidiva da doença a maioria não tinham as mutações previamente identificadas, colocando a hipótese de que as mutações nos genes JAK-STAT são eventos secundários na patogénese e que as células mutadas são pouco estáveis na maioria dos casos (Schwartzman et al., 2017).

A evidência da presença de mutação JAK2 concomitantemente com o aumento da expressão de CRLF2 está descrita em múltiplos artigos sobre DS-ALL, sugerindo que o rearranjo CRLF2 pode ser a causa da desregulação JAK e que a sinalização CRLF2-JAK-STAT é um fator “driver” importante na patogénese de DS-ALL. Num grupo de 53 amostras, os 10 doentes identificados com mutações somáticas no gene JAK2 apresentavam paralelamente uma expressão de CRLF2 aberrante, contudo a maioria das amostras com CRLF2 sobre-expresso não tinham mutação JAK2 presente. Células com a mutação CRLF2 e transdução de JAK2 expressavam repetidamente valores mais elevados de CRLF2 quando comparadas com células sem expressão JAK2, implicando um sinergismo entre as duas mutações e a possibilidade da existência de vias adicionais de sinalização importantes na patogénese da doença. O rearranjo CRLF2 vai ativar a via de proliferação de células B que, ao interagir com o JAK2 mutado, confere às células pro-B BaF3 a particularidade de uma ativação constitutiva da sinalização JAK-STAT e níveis mais elevados de crescimento independente de citocinas, contribuindo para uma vantagem adicional no crescimento e sobrevivência celular (Hertzberg et al., 2010; Mullighan et al., 2009). Estas células eram também mais resistentes ao tratamento com inibidor 1 de JAK, de modo que outras vias de sinalização ativadas pelo CRLF2 possam ser possíveis alvos terapêuticos ou, em alternativa, a introdução de terapêutica específica anticorpos anti-CRLF2 (Hertzberg et al., 2010).

Inibidores de JAK1/JAK2, como o Ruxolitinib, utilizados em neoplasias mieloproliferativas, podem ser usados no tratamento de DS-ALL com mutações CRLF2 e ativação da via de sinalização JAK-STAT, diminuindo a sobrevivência de células neoplásicas (Mullighan et al., 2009). Estudos *in vitro* demonstraram uma diminuição na proliferação das colônias celulares com mutações CRLF2 e JAK2 sob terapêutica com Ruxolitinib. Contudo, como mencionado anteriormente, a presença de alterações genômicas que cooperam entre si pode resultar na resistência à terapêutica dirigida devido a pequenas modificações no genoma, incluindo também a esta terapêutica (Page et al., 2018). No entanto, o efeito citotóxico nestas células apenas é possível quando administradas doses elevadas do fármaco, uma vez que doses baixas de Ruxolitinib conferem às células uma vantagem adicional no crescimento das mesmas (Schwartzman et al., 2017). A terapêutica com Givinostat, um inibidor de histona deacetilase (HDAC), inibe a proliferação e induz a apoptose em células com rearranjos CRLF2 e mutações JAK, permitindo contrariar as resistências a inibidores JAK e potenciar os efeitos da quimioterapia nos doentes com DS-ALL, constituindo uma alternativa à terapêutica com inibidores JAK (Savino et al., 2017).

MUTAÇÕES RAS

Mutações nos genes da via de sinalização RAS - recetores de tirosina quinase (RTK), nomeadamente os oncogenes NRAS (*locus* 1p13.2) e KRAS (*locus* 12p12.1), foram identificados em 35% dos casos de DS-ALL. Estas mutações foram observadas juntamente com mutações JAK2, ambas identificadas em amostras de doentes aquando o diagnóstico inicial de DS-ALL, e frequentemente (66% dos casos) estavam ausentes em amostras de recidiva de doença. Isto sugere que as mutações RAS e JAK2 são mutuamente exclusivas (Koschut et al., 2021; Nikolaev et al., 2014). Tal como acontece com mutações JAK2, a presença da mutação frequentemente ocorre concomitantemente com sobre-expressão de CRLF2 (Chisholm, 2018). No entanto, contrariamente à alteração CRLF2, estas mutações são o resultado de expansões celulares e não um evento inicial da patogénese (Bercovich et al., 2008).

A ativação da via RAS pode ser potenciada por outras vias. Nomeadamente, a presença de níveis elevados de CRLF2 nas populações celulares, concomitantemente com a ativação constitucional de JAK2, resulta na ativação de *wtRAS* (Koschut et al., 2021). Koschut et al. (2021) identificaram a ativação da via RAS em 65% a 82% de um conjunto de amostras de DS-ALL. Em 8 de 20 doentes, a ativação RAS era uma consequência da mutação ou hiperfosforilação do JAK2 (75% das 8 amostras), condicionando a sua ativação constitucional. Não foi observado nenhum caso com alteração na expressão de JAK2 que não resultasse no aumento da atividade da proteína RAS, assumindo-se que a ativação RAS é uma consequência da mutação e/ou hiperfosforilação JAK2 e *wtRAS* na DS-ALL (Koschut et al., 2021). Conclui-se assim que as mutações NRAS e KRAS são frequentemente mutuamente exclusivas com alterações JAK2. Contudo, também se observam mutações ativadoras noutros genes efetores de sinalização como KIT, FLT3 e PTPN11, que ao serem identificadas em conjunto com JAK2 mutado demonstram a importância da ativação de vias de sinalização na patogénese de DS-ALL (Laurent, Kotecha, et al., 2020).

A presença ativa do recetor para a linfopietina tímica estromal (TSLP) tem sido sugerida como um evento significativo que leva à ativação RAS, uma vez que a presença aumentada da expressão de CRLF2, em conjunto com a mutação JAK2, leva à ativação de STAT5 e da via PI3K/mTOR. A ativação desta via poderia teoricamente ativar a jusante constituintes da via RAS-MAPK, resultando numa ativação RAS. Todavia, os resultados demonstraram que o recetor TSLP tem por si só o potencial de ativar o *wtRAS*, independentemente da via PI3K/mTOR, e que a ativação de *wtRAS* possivelmente procede ou até promove a via de sinalização PI3K/mTOR e não o inverso (Koschut et al., 2021).

A ativação do gene PTPN11 (Protein Tyrosine Phosphatase *non*-receptor Type 11, *locus* 12q24.1) que codifica uma proteína implicada na regulação da sinalização intracelular é outra hipótese colocada nos processos de ativação RAS, uma vez que a sua ativação desfosforila a RAS, contribuindo para a sua ativação (Yamamoto et al., 2006). O complexo formado PTPN11-JAK2 tem sido implicado na indução de citocinas em células tumorais. Koschut et al. (2020) demonstraram que existe uma interação entre

PTPN11 e RAS que levam à ativação RAS, e que o bloqueio de PTPN11 através do inibidor de PTPN11 II-B08 diminui a atividade RAS tanto endógena como a induzida por TSLP nestas células sem diminuir os níveis de PTPN11.

Para compreender os efeitos da presença de RAS em células de ratos com trissomia 21 (Ts1Rhr), ao adicionar KRAS^{G12D} ectópico ou mutado na colônia de células verificaram que estas aumentam em número e em tamanho, bem como há uma aceleração na capacidade de auto-renovação celular. Adicionalmente, estas células têm um aumento da presença de genes desreguladores previamente indicados no desenvolvimento tumoral (LRRC32, USP36, LDLR e RFLNB) e aumento dos níveis constitucionais de fosforilação ERK1/2. O aumento da expressão de ERK1/2 potencia o crescimento das células pró-B em detrimento de outros tipos celulares, nomeadamente de células pré-pró-B, Pré-B e células B imaturas. Foi observado ainda a *up-regulation* de genes na região DSCR, presente no cromossoma 21 e implicados na patogénese de DS-ALL. Concluindo, a ativação da via RAS/MAPK e o ganho de mais uma cópia do cromossoma 21 resultam num aumento de transformação de células B ao potenciar a desregulação do controlo de proliferação, autorrenovação e diferenciação de células B (Laurent, Siret, et al., 2020).

A inibição RAS em casos onde existe uma ativação de RAS mutado ou *wtRAS* está diretamente relacionada com o prognóstico. Esta ativação RAS só consegue ser inibida com inibidores específicos para RAS, observando-se uma ausência de efeito significativo no bloqueio da atividade RAS decorrente de tratamentos com inibidores JAK e PI3K, evidente em casos de leucemia linfoblástica aguda em indivíduos com Síndrome de Down e *Ph-like/non-DS*. As amostras onde o TSLP consegue ativar o RAS são mais sensíveis ao tratamento com um inibidor do gene RAS comparativamente com amostras sem a ativação TSLP. Koschut et al. (2021) selecionaram o inibidor-RAS Rigosertib para testar o potencial de inativação da sinalização RAS, uma vez que há evidência de que interfere tanto o *wtRAS* como o RAS mutado. Passados 7 dias do início do tratamento, observaram uma redução significativa no número de células em quase todas as amostras, independente de ser RAS mutado ou “wild-type”. Somente em uma das amostras foi necessário adicionar um inibidor JAK ao tratamento para induzir a

diminuição do número de células (Koschut et al., 2021). Outra terapêutica possível nos casos de alteração RAS é o uso de inibidores MEK, que são mediadores presentes na via RAS/MAPK. Especificamente, o recurso a Selumetinib (inibidor MEK1) e Trametinib (inibidor MEK1/2) permitiram a diminuição da viabilidade celular e a diminuição da fosforilação ERK1/2. De modo a comparar os 2 fármacos, o tratamento com Trametinib foi 60 vezes mais citotóxico para as células humanas quando comparado com o Selumetinib. O tratamento com Trametinib permitiu também a diminuição do número de células CD45+ na medula óssea e baço dos animais após 4 semanas de tratamento, devido à diminuição dos níveis ERK1/2. O tratamento somente com Trametinib diminuiu significativamente a doença depois de 24 dias de tratamento, e a combinação Trametinib com vincristina (usado na quimioterapia de ALL) permitiu aos doentes o aumento da taxa de sobrevivência e melhoria do prognóstico (Laurent, Siret, et al., 2020). Especificamente no caso de mutações KRAS, o fármaco Deltarasin interfere na associação de membrana-KRAS, possibilitando o tratamento específico para a alteração genómica (Nikolaev et al., 2014).

Com estes resultados em mente, deve ser equacionado como futura estratégia terapêutica a adição de inibidores RAS ou inibidores MEK à quimioterapia *standard*, ou a sua combinação com inibidores PI3K/mTOR e/ou inibidores JAK/STAT, para aumentar a resposta clínica ao esquema terapêutico nas crianças com DS-ALL (Koschut et al., 2021; Laurent, Siret, et al., 2020).

IKZF1

O gene IKZF1, englobado na família IKAROS, codifica o fator de transcrição *zinc-finger 1*, importante na diferenciação de células B e T devido à modulação da expressão de complexos remodeladores de cromatina, importantes na regulação da diferenciação das células estaminais hematopoiéticas (HSCs). Assim sendo, a perda da expressão de proteínas pertencente a esta família causa um bloqueio completo na produção de linfócitos B e T (Kim et al., 1999). A ausência da expressão genómica de IKZF1 está associada a um subtipo mais severo da doença, com pior prognóstico nas crianças com

Síndrome de Down e leucemia linfoblástica aguda (Buitenkamp et al., 2012). A supressão da sua expressão nos linfócitos pré-B provoca uma paragem na diferenciação celular de células B e potência a sua expansão clonal devido à estimulação da capacidade de auto-renovação e proliferação celular (Joshi et al., 2014). A influência do bloqueio da expressão de IKZF1 na proliferação celular foi observada em amostras de ALL, contudo a taxa de proliferação celular era superior em amostras de células da linhagem com Síndrome de Down comparativamente com amostras sem DS (A. L. Brown et al., 2019). O estudo realizado por Buitenkamp et al. (2012) evidenciou que num grupo de 34 amostras de DS-ALL, 50% destas tinham mais que uma deleção em genes importantes para o desenvolvimento e diferenciação de linfócitos B. Os genes descritos incluíam os fatores de transcrição IKZF1 (35% das amostras), VPREB1 (18%) e PAX5 (12%). Aproximadamente 67% das amostras com alteração no gene IKZF1 tinham deleções focais no genoma de IKZF1, 16,6% tinham deleções focais do genoma incluindo a região flanco 3' e os restantes 16,6% evidenciaram uma deleção total do gene. Estas deleções não eram exclusivas do gene IKZF1 no genoma celular, observando-se em 4 casos a combinação com deleções VPREB1 ou PAX5, bem como deleções em conjunto com alterações nos genes CRLF2 e JAK2 (Buitenkamp et al., 2012). A identificação do “single-nucleotide polymorphism” (SNP) rs58923657 em amostras de DS-ALL, perto do genoma IKZF1, com *locus* no cromossoma 7, demonstrou que o haplótipo de risco rs58923657 potência uma via que permite o aumento da estimulação de células B. O SNP IKZF1 era mais frequente em indivíduos de descendência europeia e africana comparativamente com indivíduos hispânicos (A. L. Brown et al., 2019). Posteriormente, Gant et al. (2021) identificaram mais 5 SNP que poderiam provocar alterações da expressão linfocitária de IKZF1 em amostras celulares de DS-ALL e *non*-DS-ALL. Nas amostras de doentes sem Síndrome de Down, microdeleções em 4 das 5 regiões testadas demonstraram uma diminuição na expressão de miRNA IKZF1 nas células comparativamente com as células “wild-type” – redução de 37.1% no SNP Δ rs62445866, 31.7% no Δ rs6944602, 21.5% no Δ rs10264390 e 32.3% no Δ rs17133807. Nas amostras de doentes com Síndrome de Down, deleções em todos os SNPs, incluindo o alelo Δ rs6964969, resultaram na diminuição da expressão de miRNA IKZF1. Nomeadamente, o SNP Δ rs17133807 provocou uma redução de 46,1% nos níveis de IKZF1. Os efeitos dos 2 SNP mais

prevalente em cada uma das etiologias, Δ rs17133807 na DS-ALL e Δ rs62445866 na *non*-DS-ALL, resultaram num aumento significativo da proliferação celular em cada uma das amostras devido a esta deleção de IKZF1. Os restantes SNPs também demonstraram um aumento na proliferação celular, contudo o crescimento celular não foi consistente em todas as amostras avaliadas. Ao avaliar o equivalente à região que contém Δ rs17133807 no modelo animal, sugere-se que esta região seja um potenciador IKZF1 nas células hematopoiéticas, uma vez que a deleção genómica desta região resultou na redução dos níveis de mRNA IKZF1 nas células transduzidas. A deleção da região resultou também no aumento da proliferação de colónias de células B e na diminuição da diferenciação celular de linfócitos B, com aumento do número de células pró-B e uma diminuição em células pró-B numa fase mais tardia (Gant et al., 2021).

Contudo, somente a alteração da expressão de IKZF1 não é suficiente para o desenvolvimento de ALL. Lane et al. (2014) demonstraram que a transdução em placas de células “wild-type” com CRLF2/JAK2/PAX5 heterozigoto ($PAX5^{+/-}$) e IKZF1 dominante negativo permitiu o desenvolvimento de B-ALL positivo para CRLF2 dentro de 120 dias. Os ratos controlo sem CRLF2, JAK2 ou a heterozigotia PAX5 não desenvolveram B-ALL com a presença exclusiva de IKZF1 (Lane et al., 2014). Com base nesta informação, podemos supor que a alteração na expressão de IKZF1 é uma alteração secundária na leucemogénese, e não um evento primário que contribui para o desenvolvimento de malignidade.

PAX5

O gene PAX5, localizado no cromossoma 9, é um dos genes mutados frequentemente observados na leucemia de células B. Este gene codifica fatores de transcrição importantes e específicos da linhagem de células B, e a sua mutação devido a deleções ou mutações focais resulta frequentemente na perda parcial de função do fator de transcrição. Contudo, unicamente a mutação no genoma PAX5 não resulta no desenvolvimento de leucemia. Num estudo realizado em amostras de B-ALL, observaram que as mutações PAX5 estavam frequentemente associadas a mutações nos

genes IKZF1 e RUNX1, associados à formação da proteína de fusão ETV6-AML (Okuyama et al., 2019). Metade das amostras de doentes DS-ALL analisadas por Buitenkamp et al. (2012) evidenciavam mais do que uma deleção em genes importantes para o desenvolvimento e diferenciação de linfócitos B, nomeadamente os fatores de transcrição IKZF1 (35%), VPREB1 (18%) e PAX5 (12%). As deleções evidenciadas no genoma PAX5 incorporavam regiões genómicas mais extensas comparativamente com as deleções nos outros genes, sendo estas mais focais no genoma (Buitenkamp et al., 2012). Como anteriormente referido, Lane et al. (2014) verificaram que a transdução de células “wild-type” com células CRLF2/JAK2/PAX5 heterozigoto ($PAX5^{+/-}$) e IKZF1 dominante negativo permitiu o desenvolvimento de B-ALL positivo para CRLF2 dentro de 120 dias, assumindo que apenas a combinação de múltiplas alterações genómicas contribua para a leucemogénese (Lane et al., 2014). Em doentes com DS-ALL e com deleção PAX5, a taxa de sobrevivência global foi também substancialmente menor no subgrupo que evidenciava a deleção PAX5, comparativamente com as doentes PAX5 “wild-type”, devido a uma pior taxa de sobrevivência na recidiva de doença (Buitenkamp et al., 2012).

ALTERAÇÕES DO CROMOSSOMA 21

A trissomia constitucional do cromossoma 21 resulta em inúmeras alterações no desenvolvimento celular e origina mudanças no fenótipo do organismo como um todo. Nomeadamente, os indivíduos com Síndrome de Down possuem um risco aumentado de cerca de 20 vezes de desenvolverem leucemia linfoblástica aguda de células B (DS-ALL) (Mowery et al., 2018). Os mecanismos que explicam a relação entre a trissomia 21 e B-ALL ainda não são completamente conhecidos, colocando-se como hipóteses possíveis duas teorias: a presença constitucional da aneuploidia, conferindo uma cópia extra de material genético; ou o aumento da quantidade de material genético de genes específicos presentes no cromossoma 21, contribuindo para a mudança na expressão genómica. Contudo, ambas as teorias não são exclusivas, podendo coexistir para originar o fenótipo DS-ALL (Beach et al., 2017). A presença de uma cópia extra do cromossoma 21 é também uma das alterações somáticas adquiridas mais comuns em

células leucémicas em indivíduos sem Síndrome de Down e com ALL t(9;22), com rearranjo BCR-ABL1 (Heerema et al., 2007; Mowery et al., 2018), não sendo exclusiva dos doentes DS-ALL.

Cerca de 2% de ALL com precursores de células B apresentam a amplificação de material genético de uma região específica do cromossoma 21 – amplificação intracromossômica do cromossoma 21 (iAMP21). A amplificação intersticial de uma parte do braço longo do cromossoma 21 é observada num subtipo específico de B-ALL, como por exemplo em 15% dos casos de ETV6-RUNX1 B-ALL (Loncarevic et al., 1999), associado a um pior prognóstico nestes indivíduos. A análise genómica de iAMP21 realizada em doentes iAMP21 ALL é um exemplo da heterogeneidade genética na ALL, uma vez que revela um aumento de deleções dos genes IKZF, PAX, CDKN2A e ETV6, bem como fusões P2RY8-CRLF2 e as amplificação das regiões RUNX1, DYRK1A e ETS2. Embora algumas das alterações genéticas identificadas sejam idênticas às encontradas em DS-ALL, existem diferenças significativas, nomeadamente a ausência de mutações JAK nas amostras de iAMP21 ALL (Li et al., 2014; Rand et al., 2011). Em suma, encontram-se várias alterações genómicas presentes no subgrupo iAMP21 ALL que são também observadas em amostras de DS-ALL, nomeadamente o ganho do cromossoma X (20% em iAMP21 ALL vs 24% dos casos de DS-ALL) e a fusão P2RY8-CRLF2 (17% em iAMP21 ALL vs 22% em DS-ALL) (Li et al., 2014; Rand et al., 2011), embora existam algumas incoerências genómicas que ilustram a complexidade das alterações genéticas envolvidas nos diferentes tipos de leucemias de células B.

Para além dos genes presentes na região iAMP21, a triplicação de genes localizados em regiões críticas no cromossoma 21 (DSCRs) que correspondem, em parte, a alguns genes presentes no iAMP21, estão implicadas na patogénese de DS-ALL. Nomeadamente, os genes HMGN1 e DYRK1A têm um papel importante no desenvolvimento da linfopoiese e na evolução de ALL associada à Síndrome de Down (Mowery et al., 2018). Recentemente, o fator de transcrição hematopoiético ERG, com *locus* na região crítica do cromossoma 21 (21q22.2), demonstrou predispor o desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda ao atuar como um promotor da tumorigénese na presença de mutações somáticas. O alelo de risco rs2836371 está

associado ao aumento do risco de desenvolvimento de DS-ALL, com uma maior prevalência na etnia latina comparativamente com caucasianos não latinos. Face a esta disparidade entre etnias localizadas na mesma área geográfica, colocam-se questões sobre os fatores que predispõem à leucemogénese de DS-ALL, nomeadamente a interação de fatores ambientais com alterações germinativas ou somáticas (de Smith et al., 2019).

Com o objetivo de investigar as implicações da trissomia 21 no desenvolvimento de células B em ratos Ts1Rhr, Lane et al. (2014) analisaram células que possuem a triplicação de 31 genes e RNA não codificante presentes no cromossoma 16 do modelo animal, equivalente ao cromossoma 21 humano. A região genómica observada incorpora alguns genes pertencentes a uma região com recorrente amplificação intracromossómica no ch.21q22 (iAMP21). Ao sequenciar o RNA presente nas células Ts1Rhr, verificou-se um aumento de cerca 1.5 vezes superior da expressão de RNA comparativamente com células euplóides (Lane et al., 2014). Contudo, Mowery et al. (2018) constataram que o aumento da produção de RNA transcriptase nas células pró-B de ratos Ts1Rhr não é simétrico em todo o genoma. Os genes que já sofriam uma elevada transcrição nas células “wild-type” foram menos afetados com a mudança na transcriptase e os genes que eram silenciados mantiveram-se sem expressão. A diferença na expressão era sobretudo evidente nos genes que eram expressados a níveis baixos-intermédios e que passaram a ter uma elevada transcrição.

As amostras da diferenciação celular provenientes da medula óssea dos ratos Ts1Rhr com 6 semanas tinham sofrido modificações, com a presença de células progenitoras B e células pró-B (grupo Hardy B e C) em menor quantidade, enquanto que as células mais imaturas pré-pró-B não tinham sido afetadas (Hardy A). De seguida, para investigar se a triplicação de chr.21q.22 permitiria a transformação de fenótipos *in vitro*, foram originadas colónias de células B progenitoras provenientes da medula óssea de amostras Ts1Rhr e “wild-type”, com a adição de IL7. Em contraste com as colónias provenientes do “wild-type”, as amostras de medula óssea de ratos Ts1Rhr geraram mais colónias nas primeiras passagens para novas placas e permitiram serem “replated” indefinidamente, sugerindo uma capacidade de autorrenovação na presença dos 31

genes trissômicos. Por fim, uma vez que a polissomia 21 é a aneuploidia mais frequente observada nos casos de leucemia linfoblástica aguda em crianças sem trissomia 21 constitucional, foi adicionado às colônias de células de medula óssea dissômicas ou trissômicas (Ts1Rhr) o oncogene BCR-ABL. Observou-se nos ratos transplantados com as células com genótipo Ts1Rhr um aumento da mortalidade em menor tempo e com um aumento de penetrância comparativamente com os controlos euplóides. Os investigadores demonstraram assim, que a triplicação de chr.21q.22 permite a diferenciação autónoma celular e a transformação de fenótipos em células progenitoras B (Lane et al., 2014).

Outra alteração genómica identificada por Lane et al. (2014) nas células Ts1Rhr foi a alteração na expressão de genes PRC2/H3K27me3. Estes genes são responsáveis pela manutenção da supressão de genes necessários para o desenvolvimento celular. A expressão de “targets” de H3K27me3 em fibroblastos murinos embrionários permitiram a distinção de casos de leucemia linfoblástica aguda em indivíduos com e sem Síndrome de Down com base nesta alteração. Os genes que englobavam o conjunto genómico de PRC2/H3K27me3 estavam, na sua maioria, sobre-expressos nos casos de DS-ALL. Sugere-se como potencial alvo terapêutico a metilação de H3K27 na terapêutica farmacológica em DS-ALL através do uso de um inibidor da demetilase de H3K27me3 - GSK-J4²⁷ – o qual aumentaria os níveis de H3K27me3 celular e diminuiria a capacidade de formação de colônias de células B Ts1Rhr.

HMGN1

O gene HMGN1, com *locus* no cromossoma 21q22, codifica uma proteína *blinding* do nucleossoma com funções fundamentais na modulação da compactação da cromatina e na regulação epigenética global, importante na expressão genómica celular. Na Síndrome de Down, o aumento da expressão do mesmo contribui para alterações na transcrição necessárias para a aquisição do fenótipo de células B na DS-ALL, devido à triplicação da região crítica distal do cromossoma 21 (Mowery et al., 2018).

O aumento de HMGN1 nas células Ts1Rhr observado no estudo de Lim et al. (2005) origina mudanças na modificação de histona H3 e provoca alterações na expressão de genes, possivelmente através de alterações na compactação de cromatina. Deste modo, observou-se a amplificação genômica global transcripcional (Mowery et al., 2018) e a supressão dos níveis de H3K27me3 nas colônias de células Ba/F3. A expressão de HMGN1 de forma contínua poderá conferir a capacidade de auto-replicação celular, uma vez que a sua expressão manteve-se presente em várias replicações de células de Ts1Rhr, sendo este um de apenas sete genes que mantiveram mais de 70% do seu nível de expressão em colônias subsequentes. A expressão de HMGN1 foi também capaz de permitir um aumento na penetrância e uma latência mais curta nos casos de B-ALL induzidos por BCR-ABL (Lane et al., 2014; Lim et al., 2005).

Para tentar entender a relação entre os efeitos da expressão aumentada de HMGN1 ou a triplicação de chr21q22 com estádios de desenvolvimento ou vias de sinalização associadas com leucemia, Mowery et al. (2018) realizaram a indução de HMGN1 em células da linhagem pré-B e pró-B. Nas células pré-B, verificou-se que o aumento da expressão de HMGN1 resultava no aumento da expressão de genes associados com a via de sinalização BCR, no aumento da expressão genômica, na acetilação H3K27 e em ligações entre HMGN1 com genes importantes promotores de células B, nomeadamente PRDM1 e IRF4. Para além destas alterações, observou-se uma diminuição na expressão do fator de transcrição BCL6 nas células pré-B, com atividade supressora em genes importantes na via BCR. Em contraste, nas células pró-B constatou-se que a triplicação de 21q22 ou a sobre-expressão isolada de HMGN1 estava relacionada com um aumento de genes “target” STAT-5 associados a B-ALL, em genes presentes em regiões de cromatina marcadas pelas ligações STAT5 e no aumento de fatores de transcrição da linhagem de células B. Concluindo, as alterações da sobre-expressão de HMGN1 são específicas de acordo com o tipo de linhagem celular presente, alterando os genes de acordo com o tipo celular e os programas de maturação específicos de cada estadio de desenvolvimento celular, não dependendo somente do aumento global da transcriptase. Numa tentativa de reduzir para duas o número de cópias de HMGN1 obteve-se uma supressão dos efeitos já previamente mencionados, deixando de haver um aumento na atividade de formação de colônias de células B

progenitoras, uma diminuição global de acetilação H3K27 e uma diminuição na expressão gene-específica de RNA (Mowery et al., 2018).

Em suma, o gene HMGN1 surge como um potencial gene presente no cromossoma 21 que provoca a modificação nos fatores de transcrição celular, possivelmente com impacto significativo nas alterações identificadas na DS-ALL (Lane et al., 2014; Mowery et al., 2018). O aumento da expressão de HMGN1 contribui para o aumento da transcriptase genómica, inibe os níveis de expressão de H3K27me3 e incentiva o desenvolvimento de B-ALL *in vivo* (Lane et al., 2014). Contudo, nenhum dos ratos com Ts1Rhr ou com sobre-expressão de HMGN1 desenvolveram espontaneamente leucemia, sugerindo que seja necessário a cooperação com mais eventos epigenéticos de modo a originar uma transformação maligna (Mowery et al., 2018). Uma potencial área de investigação de modo a compreender as origens das alterações epigenéticas na DS-ALL são as implicações da transcrição induzida por HMGN1 nas atividades enzimáticas secundárias à ativação da transcrição por HMGN1.

DYRK1A

O gene DYRK1A (dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A) com *locus* na região crítica do cromossoma 21 (DSCR), é o gene mais estudado da família de quinases DYRK e constitui outro possível gene leucemogénico envolvido na patogénese de tumores hematopoiéticos, especialmente nas leucemias agudas (Bhansali et al., 2021; Laham et al., 2021). Contudo, diversos estudos apontam para este gene como pro-oncogénico enquanto outros caracterizam-no como um gene supressor de tumor (Laham et al., 2021). O gene DYRK1A é relevante na Síndrome de Down uma vez que está implicado na fisiopatologia das alterações neuronais presentes nestes indivíduos e na proliferação, diferenciação e apoptose celular, bem como no *splicing* de RNA (Lee et al., 2016). A triplicação genómica permite o aumento da sua expressão, fundamental para o desenvolvimento dos fenótipos observados em indivíduos com Síndrome de Down, nomeadamente alterações neurológicas como deficiência intelectual e o início precoce de doenças neurodegenerativas, bem como defeitos no desenvolvimento cardíaco (Laham et al., 2021).

O gene DYRK1A, em conjunto com um outro gene presente no cromossoma 21 - RCAN (Izraeli, 2016) - promove a tumorigênese através da fosforilação de fatores de transcrição NFATc (fator nuclear ativador de células T), suprimindo a sua expressão e potenciando a sua retenção no citoplasma celular (Laham et al., 2021). Uma vez que a via de sinalização NFAT é fundamental no desenvolvimento de células T, a sua supressão poderá ser um fator que contribui para a falta de efeitos imunológicos mediados pelas células T e a ausência do fenótipo T-ALL nos casos de DS-ALL. Para além disto, a supressão da via NFAT está implicada na leucemogênese de leucemia megacarioblástica aguda (AMKL) nestas crianças (DS-AMKL), verificando-se um aumento da incidência de DS-AMKL na presença de trissomia 21 (Malinge et al., 2012). Contudo, a inibição da via também está associada à diminuição da incidência de neoplasias em adultos com Síndrome de Down, sugerindo que este gene tem uma ambivalência como promotor, mas também como supressor do desenvolvimento de neoplasias (Bhansali et al., 2021; Laham et al., 2021). O papel de DYRK1A também é significativo na regulação do ciclo celular de outros tecidos, como por exemplo na fosforilação Lin52 e na composição do complexo regulador DREAM (Litovchick et al., 2011) ou na fosforilação e estabilização do p27 (Soppa et al., 2014). Nos linfócitos em desenvolvimento, DYRK1A fosforaliza ciclina D3 e esta degradação da cíclica D3 associa-se à inibição de genes alvo de fatores de transcrição E2F. Assim, a regulação negativa da estabilidade da ciclina D3 permite a modificação de fases linfocitárias, modificando de proliferação celular para a quiescência (Thompson et al., 2015).

Recentemente, uma relação entre o gene DYRK1A e FOXO1 foi descrita como um fator que promove um pior prognóstico. O gene FOXO1 é descrito como um gene supressor de tumor que está sobre-expresso nos casos de malignidades de células B, incluindo B-ALL, colocando a hipótese de que nestes doentes não atue como supressor da tumorigênese. A hiperativação da via de sinalização JAK nas células leucémicas pode ser explicada pela fosforilação STAT3 pelo gene DYRK1A, permitindo uma regulação do crescimento celular de células B e oferecendo mais um possível alvo terapêutico (Bhansali et al., 2021). Contudo, o papel específico da fosforilação STAT3 ainda não é conhecido, estando atualmente já correlacionado com a sinalização JAK/STAT, a regulação transcripcional e o ROS mitocondrial (Bhansali et al., 2021; Gough et al., 2009).

A perda de DYRK1A leva a uma redução da fosforilação Tyr750, evidenciando uma relação com a sinalização JAK/STAT, e da fosforilação STAT3 Ser727, resultando numa redução do nível ROS mitocondrial (Bhansali et al., 2021; Laham et al., 2021).

Bhansali et al. (2021) analisaram a relação entre a expressão anormal de DYRK1A e o desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda em indivíduos com polissomia do cromossoma 21. Primeiro, ao investigarem os níveis de expressão de DYRK1A em células de doentes com ALL e leucemia mielóide aguda (AML), verificaram que DYRK1A estava sobre-expresso nas células com alterações genómicas, nomeadamente hiperploidia, hipertetraploidia e na trissomia 21. Contudo, existia também a alteração na expressão de DYRK1A nas células sem ganho de HSA21. Este aumento na expressão de DYRK1A está relacionado com uma pior sobrevivência livre de doença em diversos subtipos de B-ALL (hiperdiploide (HeH) e Ph-like ALL). O estudo previamente realizado por Thompson et al. (2015) demonstrou a importância de DYRK1A na maturação e proliferação de células B uma vez que células B sem expressão DYRK1A não conseguiram entrar na quiescência, não conseguindo a maturação celular para além do estadió de células pré-B. Porém, somente o aumento da expressão de DYRK1A não é suficiente para aumentar a proliferação celular de precursores de células B nos modelos *in vitro*.

Para investigar o efeito da expressão DYRK1A no modelo animal, Bhansali et al. (2021) transplantam células da medula óssea murina com homozigotia ($Dyrk1a^{fl/fl}$) e heterozigotia ($Dyrk1a^{fl/+}$) DYRK1A, em adição com MIGR1-BCR/ABL, e verificaram o aumento na expressão celular de DYRK1A nestas células. De modo a entender se a alteração genómica DYRK1A poderia ter implicações na terapêutica no modelo animal, após a deteção de mais de 1% destas células no sangue periférico, os investigadores iniciaram o tratamento com polyI:polyC (pl:pC) para induzir a remoção de DYRK1A. Nas amostras celulares de medula óssea e baço analisadas após o tratamento, verificou-se uma redução do “burden” leucémico aquando a deleção de DYRK1A, conferindo uma vantagem na sobrevivência global dos modelos animais. Ao analisar as amostras celulares dos modelos animais que faleceram devido à leucemia verificou-se a presença de células B-ALL que não responderam ao tratamento com pl:pC, sugerindo que a presença de DYRK1A é necessária para a manutenção de B-ALL *in vivo*. De modo a

perceber se nas células pré-B e B-ALL dependentes de DYRK1A era necessário a ativação de quinases, ao introduzirem uma cópia de *Dyrk1a*^{K188R} mutado, verificaram que células pré-B tinham uma redução no número de divisões celulares, demonstrando que o seu papel na proliferação de células B depende da função de quinases (Bhansali et al., 2021). Outro possível tratamento farmacológico é o uso do inibidor EHT 1610 para inibir a expressão DYRK1A. O uso do inibidor levou à perda da capacidade de formação de colônias de células pré-B sem afetar a mielopoiese ou eritropoiese, demonstrando novamente as implicações da expressão de DYRK1A nas células B malignas (Bhansali et al., 2021; Thompson et al., 2015). O tratamento de células da linhagem B-ALL com EHT 1610 provocou a acumulação de células nas fases S-G₂-M, com menos células em G₀, e o aumento da inibição de atividades relacionadas com B-ALL, T-ALL e em especial DS-ALL, com melhor resposta comparativamente com outros inibidores de DYRK1A (harmine e INDY). A preferência do tratamento com inibidores DYRK1A para a inibição celular de amostras DS-ALL sugere o aumento dos níveis de DYRK1A presente nestas amostras, e demonstra o benefício dos mesmos, em especial EHT 1610, como adjuvantes do tratamento de DS-ALL. Ao conjugar EHT 1610 com os regimes de quimioterapia com dexametasona, citarabina e metotrexato, verificou-se que existia uma sinergia dos 3 agentes com o inibidor DYRK1A nas linhagens celulares de B-ALL. A mesma eficácia terapêutica em células leucêmicas foi observada num esquema terapêutico com EHT 1610 e AS1842856 (inibidor FOXO1), evidenciando uma dependência celular na regulação FOXO1 na reparação do DNA (Bhansali et al., 2021). Outra hipótese de um possível alvo terapêutico são miRNAs, que são pequenos RNA não-codificantes que regulam a expressão ao terem como um alvo um RNA ou gene específico e induzem quer a sua ativação, quer a inibição. No caso de tumores onde existe um aumento da expressão de DYRK1A, a aplicação de miR-199b pode resultar na “downregulation” do DYRK1A (Laham et al., 2021).

Em suma, a sobre-expressão de DYRK1A está implicada nos casos de B-ALL e é um possível alvo terapêutico através da sua inibição com pl:pC, mas também da inibição da quinases, inibição de FOXO1 e STAT3 ou através de miRNAs.

INTERFERÃO (IFN)

Para além do aumento do risco de neoplasias e aumento de incidência de doenças neurológicas, pessoas com Síndrome de Down têm também um aumento na prevalência de doenças autoimunes. Verifica-se nestes doentes uma desregulação imunológica global consistente com inflamação crónica em diversos sistemas, nomeadamente nos componentes celulares mieloide e linfoide (Waugh et al., 2019). A análise de amostras de pacientes com Síndrome de Down revelam um aumento da ativação e da hipersensibilidade na sinalização por interferão (IFN), presente na região iAMP21. Como resultado destas alterações observou-se o aumento da expressão dos genes IFNAR1, IFNAR2, IFNGR2 e IL10RB, com associações ao gene IFN e presentes no cromossoma 21, em amostras celulares trissómicas de progenitores hematopoiéticos de modelos animais e humanos e em células DS-ALL (O'Byrne et al., 2019). Devido ao aumento de infeções observadas nas crianças com Síndrome de Down, a resposta imunitária e inflamatória à sinalização IFN está implicada no desenvolvimento de DS-ALL, uma vez que é sugerido que as infeções sejam capazes de atuar como fator precursor no desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda (Martín-Lorenzo et al., 2015).

CLÍNICA

A apresentação clínica da Leucemia Linfoblástica Aguda consiste, na sua maioria, numa apresentação aguda de sinais e sintomas que sugerem a doença, raramente com evolução insidiosa ou diagnosticada somente com base em análises de rotina.

A sintomatologia mais comum nos doentes com ALL está relacionada com o efeito da leucemia nas células linfocitárias e na medula óssea, nomeadamente febre (60% dos casos), fadiga (50% dos casos), palidez (25% dos casos), diminuição do peso (26% dos casos) e suores noturnos. A infiltração de blastos na cavidade medular e periosteio pode estar presente e frequentemente leva a dor óssea (presente em 23% dos casos) e artralguas, levando à inibição da marcha nestas crianças e à disrupção da hematopoiese (Esparza & Sakamoto, 2005; Larson & Anastasi, 2008; Onciu, 2009). Em menos de 5% dos casos, podem estar presentes sinais e sintomas de aumento de pressão intracraniana, tais como cefaleias, papiledema, vômitos ou paralisia dos nervos cranianos (frequentemente o nervo ocular externo (6º par) e o nervo facial (7º par)). Nestes casos, a sintomatologia sugere um envolvimento do sistema nervoso central devido a infiltração meníngea e obstrução de LCR (Esparza & Sakamoto, 2005; Larson & Anastasi, 2008; Onciu, 2009). Outros locais que podem ter envolvimento de doença são nódulos linfáticos, fígado, baço, e testículos, sendo este último muito raro, presente em menos de 1% dos doentes (Buitenkamp et al., 2014; Onciu, 2009). A presença de massas mediastínicas é mais prevalente em doentes com T-ALL, potenciando sintomatologia do foro respiratório nestes doentes (Onciu, 2009).

No que diz respeito à avaliação analítica, a trombocitopenia, com contagem de plaquetas inferiores a 100 mil plaquetas no hemograma, é observada em cerca de 75% dos doentes, levando a um risco acrescido de hemorragias espontâneas. Outras alterações comuns no hemograma são a presença de anemia, com hemoglobina menor que 7g/dl, podendo originar sintomatologia compatível com letargia e fraqueza nos doentes; a presença de contagem leucocitária superior a 50.000/mm³, presente em 20% dos pacientes, que é um fator de pior prognóstico quando identificado e está associado com o aumento de recidiva da doença; a identificação de neutropenia que é comum à apresentação da doença, relacionando-se com um aumento da predisposição para

infecções; e por fim, em casos raros pode ser observada uma eosinofilia reativa nos doentes com ALL (Esparza & Sakamoto, 2005; Larson & Anastasi, 2008; Onciu, 2009; Zhou et al., 2012).

Os doentes com leucemia linfoblástica aguda e Síndrome de Down são clinicamente semelhantes aos doentes sem Síndrome de Down (Buitenkamp et al., 2014). Cerca de 10% das crianças com Síndrome de Down nascem com uma disfunção pré-leucémica denominada de doença mieloproliferativa transitória (TMD), descrita como um crescimento excessivo de megacariócitos imaturos (Lam et al., 2016; Lee et al., 2016). Uma das diferenças mais evidentes entre doentes com e sem Síndrome de Down na leucemia linfoblástica aguda é em relação à idade de apresentação da doença. O pico de prevalência de leucemia linfoblástica aguda é entre os 2 e 5 anos e nos doentes DS-ALL a idade da apresentação é ligeiramente superior do que os doentes sem Síndrome de Down, com uma média de 5 anos de idade na DS-ALL vs 4.7 anos de idade em doentes *non*-DS-ALL. Também é possível constatar a ausência da apresentação de doença em indivíduos com Síndrome de Down com idade menor que 1 ano de vida (Buitenkamp et al., 2014; Pennella et al., 2018). Outra diferença observada é em relação à apresentação extramedular da doença, visto que os doentes DS-ALL têm uma menor prevalência de apresentarem hepatomegalia quando comparados com *non*-DS-ALL (52.2% vs 71%) (Buitenkamp et al., 2014). É de salientar que no momento do diagnóstico, não parece haver diferença na incidência de doença com envolvimento do sistema nervoso central (Pennella et al., 2018) ou de massas mediastínicas quando comparados entre grupos com e sem Síndrome de Down (Maloney, 2011; Maloney et al., 2015). Em relação aos parâmetros laboratoriais, também não é possível evidenciar uma diferença nos valores dos leucócitos à apresentação da doença, sendo estes valores semelhantes entre os grupos de crianças com e sem Síndrome de Down, em média $10.2 \times 10^9/L$ e $8.9 \times 10^9/L$, respetivamente (Buitenkamp et al., 2014).

O diagnóstico definitivo de ALL é confirmado através da avaliação de uma amostra de medula óssea obtida por aspiração ou biópsia, onde se observa a presença de 25% de linfoblastos, ou superior, nessa mesma amostra. Após a confirmação de leucemia linfoblástica aguda é possível identificar o imunofenótipo com recurso a

citometria de fluxo para uma melhor caracterização do tipo de ALL (Esparza & Sakamoto, 2005; Pizzo PA, Poplack DG, 2001). Nos casos de ALL sem Síndrome de Down, 80% dos casos de ALL são compatíveis com ALL de células B (B-ALL), sendo que apenas 1 a 2% expressam um fenótipo de células B maduras, e os restantes 15 a 20% estão associados com ALL de células T (T-ALL) (Pizzo PA, Poplack DG, 2001). O imunofenótipo observado nos doentes com DS-ALL difere em termos de prevalência com o fenótipo observado nos casos de leucemia linfoblástica aguda sem Síndrome de Down. O fenótipo mais observado nas crianças com ALL e Síndrome de Down é leucemia de “Precusores de células B” (BCP-ALL, ou simplesmente denominada de B-ALL), positivas para CD10, CD19 e CD79a (Malinge et al., 2009). Os casos de ALL de células T (T-ALL) ou de células B maduras são raros nas crianças com DS-ALL (Lange, 2000; Maloney et al., 2015). Em 2014, Bitenkamp et al. evidenciaram que em 708 doentes com DS-ALL, 5 tinham características clínicas e citogenéticas compatíveis com T-ALL, sendo que os restantes doentes estudados apresentavam o fenótipo BCP-ALL.

TRATAMENTO

Atualmente, têm sido investigados novos alvos terapêuticos para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda, nomeadamente fármacos que tenham como alvo as alterações genéticas que contribuem para o desenvolvimento da doença ou, mais especificamente, as células leucémicas. Para além dos fármacos e alvos genéticos previamente mencionados importantes para o tratamento dirigido às alterações genéticas, o tratamento convencional com recurso a quimioterapia, corticoides e o transplante de medula óssea são ainda essenciais no tratamento de ALL.

O tratamento com quimioterapia e o tratamento de suporte nos doentes com leucemia linfoblástica aguda permitiram atingir taxas de remissão atualmente por volta de 98% nos casos pediátricos e 85% nos casos em adultos de ALL. O tratamento específico *standard* tem por base 3 fases de tratamento: a fase de indução, a fase de consolidação e a fase de manutenção, ajustadas de acordo o risco específico do doente e a resposta individualizada ao esquema de tratamento (P. Brown et al., 2020; Inaba & Mullighan, 2020). O objetivo desta terapêutica no caso da ALL é a interrupção do ciclo celular das células leucémicas, provocando a sua apoptose, diminuindo deste modo o número de blastos presentes na medula óssea. O estado de remissão é então atingido quando ao analisar uma amostra de medula óssea do doente encontramos menos de 5% de blastos na mesma. Estamos perante uma resposta completa ao tratamento quando para além da diminuição de linfoblastos na medula óssea, são observados outros 5 parâmetros: contagem de neutrófilos inferior ou igual a 1.000/ μL ; contagem de plaquetas é igual ou superior a 100.000/ μL ; ausência de linfoblastos detetáveis nas amostras de sangue periférico; ausência de outros de sinais ou sintomas de doença extramedular; e por fim, neoplasia indetetável após 4 semanas da evidência de resolução da mesma (P. Brown et al., 2020; Inaba & Mullighan, 2020; Onciu, 2009; Pui & Evans, 2006).

Todos os esquemas de tratamento de ALL incluem o tratamento ou profilaxia do sistema nervoso central (SNC) através da terapêutica com quimioterapia intratecal, com recurso a metotrexato ou uma combinação de metotrexato, citarabina e hidrocortisona, administrada ao longo do esquema terapêutico adotado de acordo com o risco do

doente. Após o tratamento intratecal com metotrexato pode ser realizado o resgate com ácido folínico (ou leucovorina) intratecal em alguns esquemas terapêuticos. Em doentes com um risco aumentado de recidiva da doença, evidenciado pela presença de leucemia no SNC, alguns estudos recomendam adicionar radioterapia à quimioterapia sistémica. A radioterapia deve também ser equacionada na doença com envolvimento testicular, contudo alguns estudos apontam para que, caso se verifique uma resposta adequada ao tratamento sistémico, a radioterapia possa ser dispensada (P. Brown et al., 2020; Inaba & Mullighan, 2020; Onciu, 2009; Pui & Evans, 2006).

FASE DE INDUÇÃO

A fase de indução é a primeira fase do tratamento de ALL, constituindo um regime de quimioterapia intensiva num curto período de tempo, com administração de doses aumentadas de um esquema terapêutico que engloba múltiplos fármacos. É associado um corticosteroide a um esquema de quimioterapia individualizada de acordo com o risco do doente, com vincristina, pegaspargase ou asparaginase com ou sem a junção de antraciclinas ou de ciclofosfomida. Esta primeira fase tem como objetivo diminuir o “burden” tumoral ao eliminar o máximo de células leucemogénicas presentes na medula óssea do doente, de modo a recuperar o bom funcionamento da hematopoiese. Na amostra de medula óssea do doente, o objetivo é a presença de menos de 0.01% de blastos na medula óssea na fase final da tratamento de indução (P. Brown et al., 2020; Inaba & Mullighan, 2020; Pui & Evans, 2006). O uso de corticoides no tratamento de tumores linfoides, incluindo ALL, é devido ao seu efeito benéfico na indução seletiva da apoptose em determinados tecidos celulares, particularmente nas células linfoides (J. A. Brown & Ferrando, 2018). Em relação à escolha de glucocorticoides, alguns estudos apontam para o uso preferencial de dexametasona à prednisona ou prednisolona, uma vez que a primeira aparenta diminuir o risco de recidiva de doença no SNC para 2.5% vs 5% em 5 anos (comparativamente com prednisolona), e aumentar a taxa de outcome EFS em 5 anos para 84.2% vs 75.6%. Os resultados alcançados pela terapêutica com a dexametasona podem ser explicados devido a uma maior semivida do fármaco e melhor penetração deste no SNC

comparativamente com a prednisona ou prednisolona. Porém, os riscos de toxicidade são superiores com os esquemas de tratamento com dexametasona comparativamente com prednisolona (11% vs 5%, respetivamente). Os efeitos da toxicidade mais prevalentes foram alterações comportamentais (no sexo feminino verificou-se uma prevalência na depressão e no sexo masculino um predomínio da agressividade), infeções, osteopénia e miopatia, entre outros, tendo sido necessário a alteração da terapêutica para prednisolona em 6% dos doentes (P. Brown et al., 2020; Mitchell et al., 2005; Pui & Evans, 2006). O objetivo do tratamento é a resposta completa ao mesmo, porém, em alguns doentes pode resultar num estado de doença mínima residual (MRD), em que a leucemia linfoblástica aguda aparenta estar em remissão, contudo podem ainda ser detetadas células leucémicas na medula óssea do paciente em testes mais sensíveis, como a citometria de fluxo. Nestes casos, quando não há resposta completa podemos equacionar a possibilidade de prolongar a quimioterapia nesta fase e proceder à alteração de alguns dos fármacos em esquema, podendo posteriormente ser considerado o transplante de medula óssea alogénico (Inaba & Mullighan, 2020). A resposta à terapêutica inicial é semelhante entre doentes com DS-ALL e sem DS-ALL, sendo a taxa de remissão clínica (CR) no fim da fase de indução de 96 a 99%. Contudo, verifica-se uma maior prevalência na falência na indução de remissão e um aumento da taxa de mortalidade nesta fase no grupo de doentes DS-ALL (Maloney et al., 2015).

FASE DE CONSOLIDAÇÃO

A segunda fase da terapêutica tem como objetivo eliminar quaisquer células leucémicas que ainda estejam presentes no doente e é essencial para permitir o melhor prognóstico individual. Esta fase tem duração variável, normalmente entre 6 a 9 meses, e tem em consideração o risco de cada doente, optando-se por um tratamento mais ou menos intensivo consoante o risco individualizado. O esquema terapêutico nesta fase tem por base combinações de múltiplos fármacos, nomeadamente elevadas doses de metotrexato, citarabina, 6-mercaptopurina (6MP), ciclofosfomicina, vincristina, asparaginase e corticosteroides. O metotrexato (MTX) é um antagonista de folatos que perturba a síntese de nucleótidos *de novo* em células proliferativas, com vários alvos

enzimáticos na via dos folatos. Assim sendo, a terapêutica com metotrexato induz a diminuição da concentração de folato no sangue e nos eritrócitos e permite a acumulação celular de agentes anti-inflamatórios, sendo por vezes necessária a suplementação de folato nos doentes durante a terapêutica com MTX. A dose de metotrexato no esquema terapêutico tem em consideração qual o subtipo de ALL e quais as alterações genómicas que estamos perante, sendo necessárias doses mais elevadas de metotrexato em doentes com T-ALL e com fusões TEL-AML1 e E2A-PBX1 (P. Brown et al., 2020; Mitchell et al., 2005; Pui & Evans, 2006). Os doentes com ALL e Síndrome de Down apresentam uma maior sensibilidade ao metotrexato e, como consequência do tratamento, um aumento da toxicidade hepática, nefrológica, neurológica, gastrointestinal e hematológica, bem como o aumento de infeções. O aumento da toxicidade relacionada ao MTX é devido ao uptake de metotrexato em alguns tecidos, devido em parte, à alteração do número de cópias do gene SLC19A1 (RFC1), que codifica uma proteína transmembranar envolvida no transporte intracelular de ácido fólico e de metotrexato, localizado no cromossoma 21. Num indivíduo com ALL e trissomia 21 a expressão do gene SLC19A1 está alterada, observando-se um aumento da sua expressão, potenciando a acumulação de metotrexato devido ao aumento do transporte intracelular do mesmo via SLC19A1. Fora o gene SLC19A1, outros genes que codificam enzimas importantes para o folato estão presentes no cromossoma 21, nomeadamente a cistationina beta-sintase e fosforibosilglicinamida transformilase, também implicados na alteração de folato em doentes com Síndrome de Down (Funk et al., 2020; Kroll et al., 2020; Maloney et al., 2015; Østergaard et al., 2021). Kroll et al., (2020) demonstraram que se doentes com DS-ALL receberem na fase de consolidação 5g/m² de MTX, igual à dose administrada em doentes sem DS-ALL, estes doentes tinham um aumento da incidência de leucopenia, trombocitopenia, infeções e estomatite comparados com os doentes *non*-DS-ALL. A redução da dose de MTX (0.5g/m²) no grupo DS-ALL permitiu reduzir a incidência das complicações anteriormente mencionadas e diminuir o risco de toxicidade sem aumentar o risco de recidiva de doença, sendo a taxa de incidência de recidiva cumulativa a 5 anos de 0.09 vs 0.10 em doentes com dose *standard* de MTX (5g/m²) (p=0.51) (Funk et al., 2020; Kroll et al., 2020; Maloney et al., 2015; Østergaard et al., 2021). A introdução de asparaginase em doses elevadas no

esquema da terapêutica de consolidação ou intensificação permitiu uma melhoria do prognóstico dos doentes e diminuição de morbilidades associadas ao tratamento. Por vezes é realizado nesta fase a repetição do processo inicial da fase de indução – tratamento de reindução – que permite a melhoria da resposta à terapêutica em doentes com risco intermédio de ALL (P. Brown et al., 2020; Mitchell et al., 2005; Pui & Evans, 2006).

Podemos considerar nesta etapa do esquema terapêutico adicionalmente outras duas fases englobadas no tratamento de ALL. A fase de *interim maintenance* (IM) tem como finalidade permitir a manutenção da remissão e potenciar a recuperação da função normal da medula óssea. A base do tratamento da fase IM é um regime de quimioterapia não mielo-supressora como por exemplo vincristina, metotrexato, 6-MP e dexametasona. A segunda fase é a fase de intensificação tardia (*delayed intensification* (DI)), englobada dentro da fase de consolidação, apenas reservada para casos de ALL de risco elevado e muito elevado. Consiste na repetição do tratamento inicial de quimioterapia da fase de indução e consolidação (esquema terapêutico dos primeiros 2 meses de terapêutica), com dexametasona administrada de forma descontínua. O intuito deste tratamento é eliminar possíveis células resistentes aos agentes terapêuticos já administrados nas fases anteriores e que ainda possam estar presentes no doente, alcançado devido à introdução de novos agentes como a substituição de dexametasona por prednisolona, doxorubicina por daunorubicina e 6-tioguanina por Mercaptopurina (6MP), com repetição de outros fármacos (Kanwar et al., 2015; Maloney et al., 2015; Matloub et al., 2019).

Com isto em mente, o estudo realizado por Matloub et al., (2019) pretendia comparar dois esquemas terapêuticos distintos para a fase de *interim maintenance* (IM) e questionar o benefício de uma segunda fase de *delayed intensification* (DI) em doentes submetidos a terapêutica prévia com dexametasona. A distinção entre os dois regimes terapêuticos em estudo consistia na modificação do esquema terapêutico de metotrexato. O primeiro esquema terapêutico baseava em metotrexato oral 20mg/m², semanalmente, durante 8 semanas, em adição com MTX intratecal no vigésimo oitavo dia, vincristina (1.5 mg/m², no 1º dia de tratamento (D0) e no vigésimo oitavo (D28)),

dexametasona (6 mg/m²/d, PO, de D0-D4 e posteriormente de D28-D32), 6MP (75 mg/m²/d, PO, desde D0-D49). O segundo esquema terapêutico consistia em MTX IV com uma dose inicial de 100 mg/m², escalado em 50 mg/m² a cada 10 dias de acordo com parâmetros de toxicidade, complementado com MTX intratecal no trigésimo dia e vincristina 1.5 mg/m² a cada 10 dias. Neste estudo, não foi realizado posteriormente à terapêutica intratecal o resgate com ácido folínico (ou leucovorina). O tempo de tratamento dos doentes analisados desde o início da fase IM era em média dois anos no sexo feminino e cerca de 3 anos no sexo masculino. Em relação à terapêutica com metotrexato, verificou-se que os doentes DS-ALL não conseguiam escalar a terapêutica com metotrexato intravenoso a cada 10 dias na mesma frequência observada por doentes sem DS, obtendo uma média da dose máxima tolerada de 70% em relação aos restantes doentes. Verificou-se que os doentes com DS-ALL tinham uma taxa “Event Free Survival” (EFS) a 10 anos de 84.9% vs 87.5% (p=0.44) nos restantes doentes, e uma taxa de “Overall Survival” (OS) a 10 anos de 89.4% vs 94.1% (p=0.017). Especificamente nos doentes com DS-ALL, as taxas de EFS e OS diferem de acordo com o esquema terapêutico adotado, sendo que a EFS e OS dos doentes que receberam o tratamento com o MTX IV escalado foi de 100% até 9 anos e após 10 anos de 94.4%, enquanto que doentes que receberam o regime com MTX PO, a EFS e OS aos 10 anos era de 81.5% e 88.4%, respetivamente. Embora pareça haver uma vantagem no uso metotrexato escalado por via intravenosa, esta diferença no estudo apresentado não foi estatisticamente significativa (p=0.17). Em termos de toxicidade da terapêutica, durante o tratamento com MTX IV não existiram diferenças clínicas significativas entre doentes com e sem Síndrome de Down em relação a neurotoxicidade, hepatotoxicidade ou infeções sistémicas. Porém, doentes com DS apresentavam maior incidência de mucosite em todas as fases do tratamento comparativamente com doentes sem DS. No grupo de doentes sem Síndrome de Down, existia uma maior incidência de mucosite nos doentes submetidos ao regime terapêutico com MTX intravenoso. Adicionalmente, verificou-se que as doentes do sexo feminino submetidas ao regime com MTX IV não apresentaram recidiva da doença no SNC e os doentes do sexo masculino submetidos ao mesmo regime não apresentaram recidivas testiculares. Em relação ao benefício de uma segunda fase de *delayed intensification* (DI), as taxas de EFS e OS foram iguais

quando comparadas com o grupo que realizou apenas 1 período de DI, não ficando comprovando a vantagem de uma segunda fase DI neste estudo.

FASE DE MANUTENÇÃO

Por fim, a fase de manutenção tem duração entre 2 a 3 anos e tem como objetivo diminuir o risco de recidiva de doença. Tentativas anteriores de reduzir a duração de quimioterapia nos doentes pediátricos e adultos com ALL para 12 a 18 meses demonstraram piores resultados quando comparados com doentes que completaram o regime farmacológico da fase de manutenção. O regime terapêutico consiste na combinação de metotrexato (MTX), administrado semanalmente, e 6-mercaptopurina (6MP) de toma diária (mais efetivo quando administrado ao fim do dia), tipicamente com a administração periódica de vincristina e corticosteroides. A administração simultânea de ambos os fármacos permite uma maior biodisponibilidade de 6MP no organismo e aumenta a incorporação do seu metabolito (6TGN) no DNA celular, promovendo o efeito citotóxico do mesmo (P. Brown et al., 2020; Matloub et al., 2019; Østergaard et al., 2021; Pui & Evans, 2006). O estudo realizado por Østergaard et al., (2021) comparou doentes DS-ALL diagnosticados entre 2008 e 2016 com doentes sem Síndrome de Down diagnosticados no mesmo período, ambos tratados sob o mesmo protocolo. O começo da fase 1 da terapêutica de manutenção divergia consoante o risco do doente, com início às 20 semanas se o risco do doente era *standard* e às 22 semanas se o risco do doente era classificado como intermédio. Caso não existisse evidência de risco elevado, as crianças com Síndrome de Down eram consideradas como de risco intermédio. As doses iniciais de MTX e 6MP eram iguais em ambos os grupos, de 20mg/m²/semana e 75mg/m²/dia *per os*, respetivamente, em adição a terapêuticas cíclicas de doses elevadas de MTX ou vincristina/dexametasona a cada 4 semanas. A segunda fase da terapêutica de manutenção tinha uma duração até 2.5 anos após o diagnóstico e consistia na continuação da terapêutica com MTX e 6MP em doses ajustadas de acordo com os glóbulos branco do doente, com alvo de leucócitos entre 1.5 e 3.0x10⁹/L, adicionando terapêutica intratecal a cada 8 semanas nos doentes com risco intermédio. Verificaram que após um período de seguimento médico de 5.7 anos

em média, os doentes com DS-ALL tinham um aumento na incidência cumulativa de 60 dias de falência de indução de 2.0% vs 0.9% nos doentes sem DS-ALL. Durante a fase 2 do tratamento de manutenção, os doentes com DS-ALL receberam uma menor dose da terapêutica com MTX e 6MP do que os doentes *non*-DS-ALL, com a média de MTX 8.3 vs 17.8mg/m²/semana e a média de 6MP 32.1 vs 67.1mg/m²/dia, respetivamente. Contudo, mesmo com a diferença na dose farmacológica, os valores dos metabolitos do MTX nos eritrócitos dos doentes eram semelhantes entre os dois grupos, contrariamente aos resultados do modelo linear que demonstravam que estes doentes tinham níveis 40% superiores de metabolitos de MTX comparativamente com doentes sem Síndrome de Down. O prognóstico dos doentes com Síndrome de Down também diverge do grupo sem DS, observando-se um aumento na incidência de recidiva cumulativa em 5 anos de 15% nas crianças com DS-ALL vs 7.1% nos restantes, uma maior incidência cumulativa de 5 anos de morte na primeira remissão clínica de 4.4% vs 1.1%, e uma menor sobrevivência event-free a 5 anos (EFS5yr) e Overall Survival a 5 anos (OS5yr), com a EFS5yr de 73% em DS-ALL vs 87%, e OS5yr de 76% em DS-ALL vs 93%.

TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

O transplante de medula óssea (TMO) alogénico, em que as células são provenientes de um dador, idealmente um irmão, é uma opção terapêutica a considerar nos casos pediátricos de leucemia linfoblástica aguda quando ocorre a falência do primeiro tratamento de indução (menos de 2% dos casos de ALL), na existência de um elevado risco de recidiva da doença devido a características citogenéticas ou moleculares e nos casos de recidivas da doença (mais de 50% dos TMO). Antes do transplante, é necessário o “condicionamento” da medula óssea com quimioterapia intensa de modo a destruir as células remanescentes na medula óssea, potenciando o benefício terapêutico do transplante. O transplante resulta numa diminuição da taxa de recidiva de doença, contudo observa-se um aumento na morbilidade e mortalidade relacionada com o tratamento. Os efeitos secundários mais frequentemente observados nos doentes transplantados são a elevada ocorrência de infeções, recidivas da ALL e doença enxerto-versus-hospedeiro (DEVH). A taxa de sobrevivência livre de doença

(DFS) nos doentes com ALL está por volta dos 40% a 50% com o recurso ao transplante de medula óssea. Contudo, existem poucos estudos focados no benefício do transplante de medula óssea nos doentes DS-ALL, possivelmente como consequência da limitação do número de doentes DS-ALL. O transplante deve ser equacionado no tratamento de doentes DS-ALL em conjunto com as limitações existentes, nomeadamente comorbilidades pré-existentes do doente e o aumento potencial da toxicidade relacionada com transplante, levando ao aumento da taxa de mortalidade relacionada com o mesmo (TRM). As consequências da toxicidade mais frequentemente observadas nos casos de DS-ALL são as complicações respiratórias, nomeadamente infeções, hemorragias pulmonares e mucosite severa (que leva à limitação das vias aéreas superiores), uma vez que existe um aumento da prevalência de condições respiratórias pré-existentes nas crianças com Síndrome de Down (Hitzler et al., 2014; Inaba & Mullighan, 2020; Merli et al., 2019; Saadeh & Litzow, 2018). A taxa de transplantes de medula óssea (TMO) realizada nos doentes com Síndrome de Down e ALL no estudo de Hitzler et al., (2014) foi menos de 1%, num total de 27 doentes. Metade dos TMO nos doentes DS-ALL ocorreram durante a segunda remissão da doença e menos de 20% na recidiva ou doença refratária. Todos os doentes com transplante após a primeira recidiva tinham recidiva da doença na medula óssea, e todos os doentes estudados tinham recebido profilaxia para DEVH com ciclosporina ou tacrolimus. Contudo, a causa mais frequente de falência e mortalidade relacionada com o transplante de medula óssea foi a recidiva da doença e não a mortalidade relacionada com o transplante (TRM), uma vez que os doentes DS-ALL têm uma probabilidade de recidiva da doença pós-transplante aos 3 anos de cerca de 54% (Hitzler et al., 2014). Esta conclusão foi também evidenciada num estudo em que a taxa de recidiva leucémica foi de 55% e a TRM foi de 18% (Meissner et al., 2007). A taxa de DFS e OS no grupo DS-ALL foi inferior ao grupo de doentes *non*-DS-ALL devido à sobrevivência livre de doença de apenas 9 dos 27 doentes que englobaram o estudo (Hitzler et al., 2014). O estudo realizado pelo grupo Ponte di Legno apoia estas conclusões, visto que nos 18 doentes que foram candidatos ao transplante de medula óssea (2.8% dos doentes com DS-ALL estudados), 12 faleceram e em 9 dos 12 doentes, a causa de morte foi a recidiva de doença (Buitenkamp et al., 2014). Contudo, Goto et al. (2015) relata que a mortalidade relacionada com o

tratamento foi superior à taxa de recidiva de leucemia, sendo que apenas 2 dos 7 doentes tinham como causa de morte recidiva de ALL (num total de 11 doentes).

TRATAMENTO DE SUPORTE

O tratamento de suporte é essencial nos cuidados de uma criança com leucemia linfoblástica aguda uma vez que estes doentes têm uma alteração do funcionamento normal da hematopoiese e são submetidos a um esquema de quimioterapia intensiva (Pehlivan et al., 2018). Em especial, a mucosite é a toxicidade relacionada com o tratamento mais comum nas crianças com DS-ALL e DS-AML, presente em 62.5% e 73.3% dos casos respetivamente, com resposta positiva ao tratamento de suporte (Lam et al., 2016).

O estudo de Salazar et al. (2016) compilou dados referentes a doentes diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda entre 1999 e 2011 em hospitais associados a Child Health Corporation of America, concentrando-se no tratamento de suporte nas crianças com Síndrome de Down que constituíram 2.8% da amostra do estudo (298 doentes). As crianças com DS-ALL eram na sua maioria caucasianas (87%), do sexo feminino (52%), e 26% apresentavam um defeito cardíaco congénito. As crianças com DS-ALL tinham um aumento da toxicidade e mortalidade relacionada com o tratamento (TRM), observando-se o aumento da taxa de disfunção de órgão superior neste grupo de doentes e o aumento da incidência de sépsis, presente em 29% dos doentes DS-ALL comparativamente com 18% de doentes *non*-DS-ALL (Salazar et al., 2016). Os doentes com Síndrome de Down tinham uma probabilidade de cerca de 33% de desenvolverem disfunção do sistema cardiovascular vs 19% *non*-DS-ALL e de 23% de probabilidade de disfunção respiratória vs 12% em *non*-DS-ALL, observando-se um aumento do risco de 1.5 vezes de disfunção cardiovascular e respiratória se o doente tiver um defeito cardíaco congénito. A probabilidade de disfunção neurológica era de 5% em DS-ALL comparativamente com 2% *non*-DS-ALL e 21% de disfunção hepática vs 16% em doentes *non*-DA-ALL (Salazar et al., 2016). Os resultados do estudo realizado por Lam et al. (2016) apoiam a prevalência elevada de infeções nos doentes DS-ALL, uma

vez que foram identificadas a presença de infecções bacterianas ou fúngicas em 62.5% das culturas colhidas de um grupo de 10 doentes com DS-ALL.

Em resposta ao aumento da toxicidade e TRM, em 2006 os protocolos do tratamento de suporte de doentes DS-ALL sofreram modificações pelo Children's Oncology Group: a recomendação de antibioterapia profilática em crianças com DS-ALL, devido ao aumento da incidência de infecções e sépsis; em caso de neutropenia febril, era sugerida a hospitalização do doente para melhor monitorização e controlo terapêutico; após o tratamento com metotrexato intratecal, realizar a profilaxia do SNC com leucovorina; é proposto um alvo de hemoglobina nos doentes DS-ALL de 5g/dl; em caso de doença severa, considerar iniciar o tratamento com esteroides em complementação ou alternativa a filgrastim (Salazar et al., 2016), um fármaco que promove a redução da duração de neutropenia e a incidência de neutropenia febril em doentes com esquema de quimioterapia citotóxica (EMA, 2010).

As alterações previamente mencionadas ao esquema terapêutico resultaram numa diminuição do risco de disfunção de órgão e de sépsis nos doentes DS-ALL, culminando na diminuição da taxa de mortalidade nas crianças diagnosticadas com ALL após 2006 de 7.1% para 2.7% no caso de DS-ALL e de 4.6% para 2.0% no grupo de doentes diagnosticados com ALL sem Síndrome de Down. Porém, estes dados não foram estatisticamente significativos, possivelmente devido à pouca amostragem de doentes DS-ALL incluídos no estudo. No período de observação de 3 anos, conclui-se que as crianças com Síndrome de Down apresentavam um aumento no número de dias de hospitalização, numa média de 55 dias vs 43.9 dias em doentes sem Síndrome de Down. Observou-se uma maior utilização de certos recursos em meio hospitalar pelos doentes com Síndrome de Down, nomeadamente a oxigenoterapia suplementar, ventilação mecânica e radiografias ao tórax, presumivelmente devido ao aumento da disfunção respiratória observada neste grupo. Constatou-se também um aumento da terapêutica com antibióticos, antifúngicos e antivirais nos doentes com DS-ALL, bem como um aumento do recurso à insulinoterapia. As crianças com DS-ALL foram submetidas a menos ecografias abdominais e prescritas menos terapêutica antiemética e analgésica do que as crianças sem Síndrome de Down. Em relação à analgesia, as crianças com

Síndrome de Down têm uma tolerância à dor semelhante às crianças sem trissomia 21, sendo necessário investigar a razão da discordância entre grupos no recurso a analgesia opioide, não opioide e controlada pelos doentes DS-ALL (Salazar et al., 2016).

PERSPETIVAS FUTURAS

Para além dos novos fármacos que têm como alvo as alterações genéticas que potenciam o desenvolvimento de ALL, outras terapêuticas como os anticorpos monoclonais, especificamente CD19 identificado em células de doentes DS-ALL, a terapêutica com linfócitos T com recetor antigénico quimérico (células T CAR) com alvo CD19 e inibidores de tirosina quinase, como o Ruxolitinib (inibidor JAK). Estas terapêuticas são particularmente significativas no tratamento de doença refratária ao tratamento ou recidivas de ALL. Isto é especialmente importante no que diz respeito aos doentes com DS-ALL uma vez que os mesmos apresentam um aumento da prevalência de recidiva de doença associada a um mau prognóstico, com sobrevivência aos 3 anos após recidiva de cerca de 10-25% (Hucks & Rheingold, 2019). Contudo, estudos com doentes DS-ALL são escassos para estas terapêuticas em específico, possivelmente devido à fraca percentagem de doentes DS-ALL e ao receio de inclusão destes doentes devido ao aumento da incidência de toxicidade relacionado com a terapêutica.

Os inibidores de tirosina quinase constituem os fármacos de primeira linha no esquema terapêutico de ALL com alterações BCR-ABL1. No caso dos doentes com DS-ALL, a terapêutica com Ruxolitinib, um inibidor JAK, pode ser útil caso se verifique alterações no genoma de JAK2 e CRLF2, promovendo a ativação da via de sinalização JAK-STAT e conseqüentemente diminuindo a sobrevivências de células com leucemia (Mullighan et al., 2009).

Os anticorpos monoclonais podem ser incluídos nos regimes terapêuticos *standard* devido à sua atividade contra antigénios de superfície. O antigénio de superfície CD19 está presente nas células de doentes com linfoma não-Hodgkin de células B e BCP-ALL, nomeadamente na DS-ALL (Pui & Evans, 2006; Teachey et al., 2013; Viardot et al., 2020). A terapêutica com blinatumomab, por exemplo, um anticorpo de

cadeia única específico para CD19/CD3, permite a orientação das células T citotóxicas para células que expressam CD19. Esta terapêutica está aprovada para o tratamento de doença refratária, recidiva ou doença mínima residual de BCP-ALL (Viardot et al., 2020). Doentes submetidos a terapêuticas ativadoras de células T (como blinatumomab e células T CAR) apresentam um aumento do risco de desenvolver síndrome de libertação de citocinas (CRS) (Teachey et al., 2013). As IL-6, IL-10 e INF- γ estão aumentadas na terapêutica com blinatumomab, mas também são encontradas na síndrome de ativação de macrófaga (MAS), podendo ambos os síndromes estar relacionados. O artigo de Teachey et al. (2013) relata o caso clínico de um doente com DS-ALL que desenvolveu um síndrome de ativação macrófagico como intercorrência a um esquema terapêutico com blinatumomab após recidiva isolada de doença na medula óssea, com deterioração hemodinâmica e diminuição dos glóbulos brancos. Foi iniciada a terapêutica com tocilizumab, um inibidor de IL-6, permitindo a melhoria hemodinâmica do doente e elevando o valor analítico dos leucócitos. Apesar de apenas ter realizado 36 horas de terapêutica com blinatumomab, o doente obteve uma resposta parcial ao tratamento, com ausência de blastos no sangue periférico no 2º dia de tratamento (previamente 78% de blastos na amostra) e identificação de 20% de blastos na amostra de medula óssea após 18 dias de descontinuação da terapêutica, inicialmente quase completamente substituída por linfoblastos (Teachey et al., 2013).

A terapêutica com linfócitos T autólogos geneticamente modificados para expressar um recetor antigénico quimérico (células T CAR) é uma possível ferramenta para o tratamento de DS-ALL. O marcador de superfície CD19 é o marcador mais expresso na leucemia de células B, permitindo às células T modificadas reconhecerem um antígeno tumoral extracelular e assim sendo, terem como alvo um antígeno específico para os linfoblastos presentes na leucemia linfoblástica aguda. Uma vez que a origem dos linfócitos T é o próprio doente, é possível evitar o desenvolvimento de uma doença enxerto-versus-hospedeiro (DEVH) e permitir a instituição da terapêutica em doentes que são considerados maus candidatos para um transplante de medula óssea alogénico (P. Brown et al., 2020; Hucks & Rheingold, 2019; Inaba & Mullighan, 2020; June & Sadelain, 2018; Pehlivan et al., 2018). A potencialidade terapêutica das células T CAR já foi demonstrada em modelos animais, onde se verificou que uma única infusão

de células T CAR permitiu a eliminação de linfomas e leucemias (June & Sadelain, 2018). Em 2017, a FDA aprovou os tratamentos com células T CAR para doentes com leucemia linfoblástica aguda refratária ou recidivante em idade inferior a 25 anos (Pehlivan et al., 2018). Ensaios clínicos realizados em doentes com leucemia linfoblástica aguda apontam para uma taxa de remissão entre os 70% a 90% (P. Brown et al., 2020; Hucks & Rheingold, 2019; Inaba & Mullighan, 2020; June & Sadelain, 2018; Pehlivan et al., 2018).

O artigo de Hucks & Rheingold (2019) demonstra o sucesso da terapêutica com células T CAR em doentes de risco elevado e com DS-ALL recidivante. O doente era uma criança de 14 anos, submetida ao tratamento *standard* para ALL após o seu diagnóstico inicial de ALL aos 9 anos de idade, com boa resposta à terapêutica inicial. Porém, 4 anos após completar o esquema terapêutico, o doente sofreu uma recidiva da doença e foi submetido a tratamento *standard* com boa resposta inicial, contudo observou-se posteriormente uma segunda recidiva. Optou-se pelo tratamento com as células T CAR uma vez que foi admitido que um novo esquema com quimioterapia iria provocar uma toxicidade inevitável no doente. Assim sendo, no esquema de tratamento do doente na segunda recidiva, juntamente com uma dose diminuída da quimioterapia, foi administrada terapêutica com células T modificadas do próprio doente. Como já anteriormente referido, os doentes submetidos a terapêuticas mobilizadoras de linfócitos T apresentam um aumento do risco de toxicidade relacionada com o tratamento, nomeadamente o desenvolvimento de síndrome de libertação de citocinas (CRS). No quinto dia após a infusão com as células T modificadas, o doente desenvolveu a síndrome de libertação de citocinas, porém as complicações relacionadas com a terapêutica com células T CAR conseguem ser revertidas com o tratamento antecipado das mesmas. Dito isto, verificou-se que o desenvolvimento de complicações relacionadas com o tratamento não influenciou o resultado do mesmo, verificando-se que o doente estaria em remissão sem doença residual mínima ao vigésimo oitavo dia após a infusão com células T CAR.

PROGNÓSTICO

Os doentes diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda têm uma sobrevivência a 5 anos de cerca de 80% a 90%. Esta taxa de sobrevivência diminui para uma sobrevivência a 5 anos de 30% a 50% após a primeira recidiva do doente, algo que ocorre em cerca de 15% a 20% dos doentes com ALL. Em subseqüentes recidivas da doença, a taxa de sobrevivência diminui para menos de 20% (Hoffbrand & Moss, 2015).

No caso particular das crianças com Síndrome de Down, estas têm um aumento da taxa de recidiva de doença e da taxa de mortalidade relacionada com o tratamento (TRM), com uma diminuição na taxa de sobrevivência livre de evento (EFS) e sobrevivência (OS) a 8 anos. O estudo realizado pelo grupo Ponte di Legno (Buitenkamp et al., 2014) é um dos estudos de referência no que diz respeito ao prognóstico das crianças com Síndrome de Down e leucemia linfoblástica aguda. O estudo engloba 653 doentes com DS-ALL, permitindo uma melhor avaliação das características e variáveis particulares a este subgrupo de doentes. Nos doentes com DS-ALL, a taxa de remissão completa (CR) ao tratamento era inferior comparativamente com doentes sem DS, de 96.7% em DS-ALL vs 99% nos doentes *non*-DS-ALL ($P<.001$). Deste modo, observou-se que a taxa de falência do tratamento de indução era superior nestes doentes em relação aos doentes sem Síndrome de Down, consistindo cerca de 3% vs 1% respetivamente ($P<.001$). A mortalidade relacionada com o tratamento a 2 anos foi também superior no grupo de doentes DS-ALL (7% vs 2%, $P<.001$), bem como a incidência cumulativa de recidiva a 8 anos, com 26% dos doentes DS-ALL a recidivarem vs 15% dos doentes em geral ($P<.001$). Contudo, os doentes DS-ALL demoravam mais tempo a recidivar depois do estado de remissão que o grupo controlo, conclusão também verificada por Meyr et al., (2013), sendo que a recidiva precoce da doença era menos frequente no grupo DS-ALL, com 10% em DS-ALL vs 25% em *non*-DS-ALL ($P=.009$). O tempo médio de recidiva era de 12.1 meses em crianças com DS-ALL vs 5 meses em doentes *non*-DS-ALL. Em caso de recidiva, a sobrevivência a 3 anos nos doentes DS-ALL era entre 10% a 25% (Hitzler et al., 2014). O estudo realizado por Lam et al. (2016), documentou a morte de 4 dos 10 doentes DS-ALL observados, com 3 destes a falecerem por recidiva da doença. Buitenkamp et al. (2014) verificam que a mortalidade associada a outras causas para

além da recidiva ou doença refratária era superior (7.7%) no grupo DS-ALL comparativamente com o grupo de doentes *non*-DS-ALL (2.3%). A causa mais frequente desta mortalidade era o aumento da incidência de infecções nestas crianças, com maior prevalência para as infecções bacterianas e do trato respiratório. A incidências de novas malignidades nos doentes com DS-ALL era inferior em comparação com o grupo sem Síndrome de Down, uma vez que apenas 2 doentes DS-ALL (0.3%) morreram devido a uma segunda malignidade comparativamente com 1.3% nos doentes *non*-DS-ALL (Buitenkamp et al., 2014).

No que diz respeito a alterações genómicas, os investigadores concluíram que as alterações ETV6-RUNX1 e elevada hiperdiploidia (HeH), identificadas nas amostras dos doentes ALL, conferiram vantagens na sobrevivência dos doentes. Os doentes com alterações ETV6-RUNX1 tiveram um prognóstico mais favorável, com uma EFS a 8 anos de 95% comparativamente a 63% nos restantes doentes DS-ALL ($P=.001$). A incidências cumulativa de recidiva (CIR) nestes doentes foi de 3% vs 26% ($P=.004$) e a mortalidade relacionada com o tratamento a 2 anos (TRM) foi de 3% vs 8% nos doentes com DS-ALL sem as alterações genómicas ($P=.2$). Os valores destes parâmetros no grupo DS-ALL com alterações ETV6-RUNX1 foram semelhantes aos doentes ALL sem Síndrome de Down com alterações no genoma ETV6-RUNX1. Nos doentes DS-ALL com elevada hiperdiploidia, verificou-se uma redução na CIR de 8% (vs 26%, $P=.02$) mas um aumento da TRM a 2 anos de 13% em comparação com 7% nos restantes doentes com DS-ALL ($P=.2$). Nestes casos, observou-se também uma diminuição da sobrevivência dos doentes DS-ALL em comparação com doentes *non*-DS-ALL com a mesma alteração genética (Buitenkamp et al., 2014).

A idade dos doentes com DS-ALL é também relevante para o prognóstico da doença. As crianças com DS-ALL e com idade inferior a 6 anos (379 de 651 doentes DS-ALL) apresentam melhores taxas de mortalidade relacionada com tratamento cumulativa a 2 anos (7% vs 8%, $P=.33$), incidências cumulativa de recidiva (21% vs 34%, $P<.001$), sobrevivência livre de evento (70% vs 54%, $P<.001$) e sobrevivência global (OS) (78% vs 67%, $P=.002$) em comparação com crianças com DS-ALL e idade superior a 6 anos. Por sua vez, crianças com idades compreendidas entre os 6 e 9 anos (126 de 651

doentes DS-ALL) obtiveram um pior prognóstico, com uma sobrevivência livre de evento aos 8 anos de 51% e sobrevivência global (OS) de 70%. O pior prognóstico nestas crianças era devido à elevada incidência de recidivas de doença (CIR de 41%) neste intervalo de idades. Contudo, não foi possível identificar fatores de risco que contribuíssem para o aumento da recidiva de doença (Buitenkamp et al., 2014).

Analiticamente, doentes com valores laboratoriais de leucócitos inferiores a $10 \times 10^9/L$ obtiveram uma diminuição da taxa de mortalidade relacionada com o tratamento (TRM) a 8 anos de 4% vs 11% ($P=.0003$) e diminuição da taxa de recidiva de doença a 8 anos de 21% vs 30% ($P=.03$) comparativamente aos doentes com valores analíticos de leucócitos iguais ou superiores a $10 \times 10^9/L$. A combinação das características “idade inferior a 6 anos” e “leucócitos inferiores a $10 \times 10^9/L$ ” contribui para um prognóstico mais favorável neste subtipo de doentes, com uma EFS a 8 anos de 78% vs 58% e OS de 87% vs 68% ($P<.0001$) (Buitenkamp et al., 2014).

Em suma, a combinação de todos os dados previamente mencionados tem implicações nas taxas de EFS e OS nos doentes com Síndrome de Down e leucemia linfoblástica aguda. Nomeadamente, nos doentes DS-ALL a taxa de sobrevivência livre de doença a 8 anos é de 64% vs 81% em *non*-DS-ALL e a sobrevivência global em doentes DS-ALL de 74% vs 89% *non*-DS-ALL ($P<.001$). Possivelmente devido ao aumento da mortalidade nestes doentes, os doentes com DS-ALL apresentavam um menor tempo de seguimento, com cerca de 6.8 anos de seguimento comparativamente com 8.4 anos dos doentes *non*-DS-ALL ($P<.001$) (Buitenkamp et al., 2014).

CONCLUSÃO

A leucemia linfoblástica aguda constitui a neoplasia hematológica mais frequente na idade pediátrica, e as crianças com Síndrome de Down têm um risco aumentado de desenvolverem leucemia. Estas crianças têm alterações genéticas que as distinguem dos restantes doentes com leucemia linfoblástica aguda, observando-se uma heterogeneidade genética específica à DS-ALL. As alterações no genoma das crianças potenciam o desenvolvimento da doença, contudo a identificação de uma mutação não implica o desenvolvimento de ALL, apontando para uma combinação de fator intrínsecos e extrínsecos ao doente, muitos deles ainda desconhecidos. Atualmente, o esquema de tratamento é semelhante aos restantes doentes com leucemia linfoblástica aguda, não tendo como alvo terapêutico as alterações genéticas identificadas na amostra celular de cada doente. A identificação individualizada das mutações que promovem a DS-ALL e a aplicação de terapêutica específica para as mesmas poderão permitir a adoção de um esquema terapêutico mais dirigido, com maior eficácia e segurança nestas crianças. Os tratamentos mobilizadores de linfócitos T como as células T CAR e anticorpos monoclonais com o blinatumomab são também estratégias a considerar para serem incluídas nos protocolos terapêuticos destas crianças, uma vez que isto poderia permitir a diminuição da mortalidade relacionada com o tratamento, especialmente o aumento do risco de toxicidade e de infeções. Contudo, existem limitações evidentes à inclusão desta subpopulação nos ensaios clínicos, nomeadamente devido à fraca prevalência de doentes DS-ALL, limitando a amostra do estudo, e a não inclusão dos doentes nas investigações das novas terapêuticas disponíveis devido ao receio relacionado com a mortalidade relacionada com o tratamento e o aumento da toxicidade.

Em suma, as crianças com Síndrome de Down são um grupo de doentes com características muito específicas, geneticamente e clinicamente, que levam a que estes doentes tenham uma pior resposta ao tratamento e conseqüentemente, um pior prognóstico. A introdução das terapêuticas recentes no esquema terapêutico de DS-ALL, como as terapêuticas dirigidas às alterações genéticas identificadas na amostra do doente, as células T CAR e anticorpos monoclonais, permitirá o desenvolvimento de um

esquema terapêutico dirigido às crianças DS-ALL e às alterações genéticas que contribuem para o desenvolvimento da doença.

AGRADECIMENTOS

À Dr^a Maria João Costa e ao Prof. Dr. João Forjaz de Lacerda por toda a disponibilidade demonstrada neste trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais, avós e irmã, por todo o apoio que demonstraram ao longo do meu percurso universitário.

Aos meus amigos, por toda a motivação e suporte nestes 6 anos.

BIBLIOGRAFIA

- Antonarakis, S. E., Skotko, B. G., Rafii, M. S., Strydom, A., Pape, S. E., Bianchi, D. W., Sherman, S. L., & Reeves, R. H. (2020). Down syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1), 9. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0143-7>
- APCL. (n.d.). *Leucemias agudas*. Retrieved April 19, 2021, from <https://www.apcl.pt/pt/doencas-do-sangue/leucemias/leucemias-agudas>
- Bailey, H. D., Metayer, C., Milne, E., Petridou, E. Th., Infante-Rivard, C., Spector, L. G., Clavel, J., Dockerty, J. D., Zhang, L., Armstrong, B. K., Rudant, J., Fritschi, L., Amigou, A., Hatzipantelis, E., Kang, A. Y., Stiakaki, E., & Schüz, J. (2015). Home paint exposures and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: findings from the Childhood Leukemia International Consortium. *Cancer Causes & Control*, 26(9), 1257–1270. <https://doi.org/10.1007/s10552-015-0618-0>
- Beach, R. R., Ricci-Tam, C., Brennan, C. M., Moomau, C. A., Hsu, P. hsin, Hua, B., Silberman, R. E., Springer, M., & Amon, A. (2017). Aneuploidy Causes Non-genetic Individuality. *Cell*, 169(2), 229-242.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.021>
- Belson, M., Kingsley, B., & Holmes, A. (2007). Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. *Environmental Health Perspectives*, 115(1), 138–145. <https://doi.org/10.1289/ehp.9023>
- Bercovich, D., Ganmore, I., Scott, L. M., Wainreb, G., Birger, Y., Elimelech, A., Shochat, C., Cazzaniga, G., Biondi, A., Basso, G., Cario, G., Schrappe, M., Stanulla, M., Strehl, S., Haas, O. A., Mann, G., Binder, V., Borkhardt, A., Kempfski, H., ... Izraeli, S. (2008). Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. *The Lancet*, 372(9648), 1484–1492. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61341-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61341-0)
- Bhansali, R. S., Rammohan, M., Lee, P., Laurent, A. P., Wen, Q., Suraneni, P., Yip, B. H., Tsai, Y. C., Jenni, S., Bornhauser, B., Siret, A., Fruit, C., Pacheco-Benichou, A., Harris, E., Besson, T., Thompson, B. J., Goo, Y. A., Hijjiya, N., Vilenchik, M., ... Crispino, J. D. (2021). DYRK1A regulates B cell acute lymphoblastic leukemia through phosphorylation of FOXO1 and STAT3. *Journal of Clinical Investigation*, 131(1), 1–18. <https://doi.org/10.1172/JCI135937>
- Brown, A. L., de Smith, A. J., Gant, V. U., Yang, W., Scheurer, M. E., Walsh, K. M., Chernus, J. M., Kallsen, N. A., Peyton, S. A., Davies, G. E., Ehli, E. A., Winick, N., Heerema, N. A., Carroll, A. J., Borowitz, M. J., Wood, B. L., Carroll, W. L., Raetz, E. A., Feingold, E., ... Rabin, K. R. (2019). Inherited genetic susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome. *Blood*, 134(15), 1227–1237. <https://doi.org/10.1182/blood.2018890764>
- Brown, J. A., & Ferrando, A. (2018). Glucocorticoid Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia: BIM Finally. *Cancer Cell*, 34(6), 869–871. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.11.011>
- Brown, P., Inaba, H., Annesley, C., Beck, J., Colace, S., Dallas, M., DeSantes, K., Kelly, K., Kitko, C., Lacayo, N., Larrier, N., Maese, L., Mahadeo, K., Nanda, R., Nardi, V., Rodriguez, V., Rossoff, J., Schuettelpelz, L., Silverman, L., ... Ogba, N. (2020). Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 18(1), 81–112. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2020.0001>
- Buitenkamp, T. D., Izraeli, S., Zimmermann, M., Forestier, E., Heerema, N. A., van den Heuvel-Eibrink, M. M., Pieters, R., Korbijn, C. M., Silverman, L. B., Schmiegelow, K., Liang, D.-C., Horibe, K., Arico, M.,

- Biondi, A., Basso, G., Rabin, K. R., Schrappe, M., Cario, G., Mann, G., ... Zwaan, C. M. (2014). Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. *Blood*, *123*(1), 70–77. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-509463>
- Buitenkamp, T. D., Pieters, R., Gallimore, N. E., van der Veer, A., Meijerink, J. P. P., Beverloo, H. B., Zimmermann, M., de Haas, V., Richards, S. M., Vora, A. J., Mitchell, C. D., Russell, L. J., Schwab, C., Harrison, C. J., Moorman, A. v., van den Heuvel-Eibrink, M. M., den Boer, M. L., & Zwaan, C. M. (2012). Outcome in children with Down's syndrome and acute lymphoblastic leukemia: role of IKZF1 deletions and CRLF2 aberrations. *Leukemia*, *26*(10), 2204–2211. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.84>
- Cario, G., Zimmermann, M., Romey, R., Gesk, S., Vater, I., Harbott, J., Schrauder, A., Moericke, A., Izraeli, S., Akasaka, T., Dyer, M. J. S., Siebert, R., Schrappe, M., & Stanulla, M. (2010). Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Blood*, *115*(26), 5393–5397. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-256131>
- Chisholm, K. M. (2018). Acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, *22*(8), 341–345. <https://doi.org/10.4267/2042/68933>
- Dai, X., Chen, Y., Di, L., Podd, A., Li, G., Bunting, K. D., Hennighausen, L., Wen, R., & Wang, D. (2007). Stat5 is essential for early B cell development but not for B cell maturation and function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *179*(2), 1068–1079. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.1068>
- de Smith, A. J., Walsh, K. M., Morimoto, L. M., Francis, S. S., Hansen, H. M., Jeon, S., Gonseth, S., Chen, M., Sun, H., Luna-Fineman, S., Antillón, F., Girón, V., Kang, A. Y., Smirnov, I., Shao, X., Whitehead, T. P., Barcellos, L. F., Jolly, K. W., Healy, J., ... Wiemels, J. L. (2019). Heritable variation at the chromosome 21 gene ERG is associated with acute lymphoblastic leukemia risk in children with and without Down syndrome. *Leukemia*, *33*(11), 2746–2751. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0514-9>
- EMA. (2010). *Características do medicamento - Dabigatran*. 1–29. http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000829/WC500041059.pdf
- Esparza, S. D., & Sakamoto, K. M. (2005). Topics in pediatric leukemia - acute lymphoblastic leukemia. *MedGenMed : Medscape General Medicine*, *7*(1), 23.
- Forestier, E., Izraeli, S., Beverloo, B., Haas, O., Pession, A., Michalová, K., Stark, B., Harrison, C. J., Teigler-Schlegel, A., & Johansson, B. (2008). Cytogenetic features of acute lymphoblastic and myeloid leukemias in pediatric patients with Down syndrome: An iBFM-SG study. *Blood*, *111*(3), 1575–1583. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-114231>
- Fujiwara, S.-I., Yamashita, Y., Choi, Y. L., Watanabe, H., Kurashina, K., Soda, M., Enomoto, M., Hatanaka, H., Takada, S., Ozawa, K., & Mano, H. (2007). Transforming activity of purinergic receptor P2Y₈ protein coupled, 8 revealed by retroviral expression screening. *Leukemia & Lymphoma*, *48*(5), 978–986. <https://doi.org/10.1080/10428190701225882>
- Funk, R. S., Talib, N. J., Zimmerman, K. O., van Haandel, L., & Becker, M. L. (2020). Altered Folate Homeostasis in Children with Down Syndrome: A Potential Basis for Enhanced Methotrexate Toxicity. *Journal of Pediatrics*, *221*, 235–239. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2020.01.032>

- Gaikwad, A., Rye, C. L., Devidas, M., Heerema, N. A., Carroll, A. J., Izraeli, S., Plon, S. E., Basso, G., Pession, A., & Rabin, K. R. (2009). Prevalence and clinical correlates of JAK2 mutations in Down syndrome acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, *144*(6), 930–932. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07552.x>
- Gant, V. U., Junco, J. J., Terrell, M., Rashid, R., & Rabin, K. R. (2021). Enhancer polymorphisms at the IKZF1 susceptibility locus for acute lymphoblastic leukemia impact B-cell proliferation and differentiation in both down syndrome and non-Down syndrome genetic backgrounds. *PLoS ONE*, *16*(1 January), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244863>
- Goto, H., Kaneko, T., Shioda, Y., Kajiwara, M., Sakashita, K., Kitoh, T., Hayakawa, A., Miki, M., Kato, K., Ogawa, A., Hashii, Y., Inukai, T., Kato, C., Sakamaki, H., Yabe, H., Suzuki, R., & Kato, K. (2015). Hematopoietic stem cell transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia and Down syndrome. *Pediatric Blood & Cancer*, *62*(1), 148–152. <https://doi.org/10.1002/pbc.25245>
- Gough, D. J., Corlett, A., Schlessinger, K., Wegrzyn, J., Larner, A. C., & Levy, D. E. (2009). Mitochondrial STAT3 Supports Ras-Dependent Oncogenic Transformation. *Science*, *324*(5935), 1713–1716. <https://doi.org/10.1126/science.1171721>
- Greaves, M. (2018). A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 18, Issue 8, pp. 471–484). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0015-6>
- Greaves, M., Maia, A. T., Wiemels, J. L., & Ford, A. M. (2003). Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood*, *102*(7), 2321–2333. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-12-3817>
- Gurney, J. G., Severson, R. K., Davis, S., & Robison, L. L. (1995). Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. *Cancer*, *75*(8), 2186–2195. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19950415\)75:8<2186::aid-cnrc2820750825>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19950415)75:8<2186::aid-cnrc2820750825>3.0.co;2-f)
- Hasle, H., Haunstrup Clemmensen, I., & Mikkelsen, M. (2000). Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet*, *355*(9199), 165–169. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)05264-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)05264-2)
- Heerema, N. A., Raimondi, S. C., Anderson, J. R., Biegel, J., Camitta, B. M., Cooley, L. D., Gaynon, P. S., Hirsch, B., Magenis, R. E., McGavran, L., Patil, S., Pettenati, M. J., Pullen, J., Rao, K., Roulston, D., Schneider, N. R., Shuster, J. J., Sanger, W., Sutcliffe, M. J., ... Carroll, A. J. (2007). Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *46*(7), 684–693. <https://doi.org/10.1002/gcc.20451>
- 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, L. J., Harrison, C. J., Bornhauser, B., Yoda, A., Rechavi, G., Bercovich, D., ... Izraeli, S. (2010). 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*, *115*(5), 1006–1017. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-235408>
- Hitzler, J. K., He, W., Doyle, J., Cairo, M., Camitta, B. M., Chan, K. W., Perez, M. A. D., Fraser, C., Gross, T. G., Horan, J. T., Kennedy-Nasser, A. A., Kitko, C., Kurtzberg, J., Lehmann, L., O'Brien, T., Pulsipher, M. A., Smith, F. O., Zhang, M. J., Eapen, M., & Carpenter, P. A. (2014). Outcome of transplantation

- for acute lymphoblastic leukemia in children with down syndrome. *Pediatric Blood and Cancer*, 61(6), 1126–1128. <https://doi.org/10.1002/xbc.24918>
- Hoelzer, D., & Gökbuget, N. (2000). Recent approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 36(1), 49–58. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(00\)00097-4](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(00)00097-4)
- Hoffbrand, A., & Moss, P. (2015). *Hoffbrand's Essential Haematology* (7th Editio).
- Hucks, G., & Rheingold, S. R. (2019). The journey to CAR T cell therapy: the pediatric and young adult experience with relapsed or refractory B-ALL. *Blood Cancer Journal*, 9(2). <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0164-6>
- Huettner, C. S., Zhang, P., van Etten, R. A., & Tenen, D. G. (2000). Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nature Genetics*, 24(1), 57–60. <https://doi.org/10.1038/71691>
- Inaba, H., & Mullighan, C. G. (2020). Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 105(11), 2524–2539. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.247031>
- Izraeli, S. (2016). The acute lymphoblastic leukemia of Down Syndrome - Genetics and pathogenesis. *European Journal of Medical Genetics*, 59(3), 158–161. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2015.11.010>
- Joshi, I., Yoshida, T., Jena, N., Qi, X., Zhang, J., van Etten, R. A., & Georgopoulos, K. (2014). Loss of Ikaros DNA-binding function confers integrin-dependent survival on pre-B cells and progression to acute lymphoblastic leukemia. *Nature Immunology*, 15(3), 294–304. <https://doi.org/10.1038/ni.2821>
- June, C. H., & Sadelain, M. (2018). Chimeric Antigen Receptor Therapy. *New England Journal of Medicine*, 379(1), 64–73. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1706169>
- Kanwar, A. V. S., Chief, M. B. A., Jennifer, E., & Willert, R. (2015). *Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment & Management*. 1–7. <http://emedicine.medscape.com/article/990113-treatment>
- Kearney, L., Castro, D. G. de, Yeung, J., Procter, J., Horsley, S. W., Minenori, E. I., Bateman, C. M., Anderson, K., Chaplin, T., Young, B. D., Harrison, C. J., Kempster, H., So, C. W. E., Ford, A. M., & Greaves, M. (2009). Specific JAK2 mutation (JAK2R683) and multiple gene deletions in down syndrome acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 113(3), 646–648. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-170928>
- Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., Kingston, R., & Georgopoulos, K. (1999). Ikaros DNA-Binding Proteins Direct Formation of Chromatin Remodeling Complexes in Lymphocytes. *Immunity*, 10(3), 345–355. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80034-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80034-5)
- Koschut, D., Ray, D., Li, Z., Giarin, E., Groet, J., Alić, I., Kham, S. K. Y., Chng, W. J., Ariffin, H., Weinstock, D. M., Yeoh, A. E. J., Basso, G., & Nižetić, D. (2021). RAS-protein activation but not mutation status is an outcome predictor and unifying therapeutic target for high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*, 40(4), 746–762. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01567-7>
- Kroll, M., Kaupat-Bleckmann, K., Mörickel, A., Altenl, J., Schewel, D. M., Stanullal, M., Zimmermann, M., Schrappe, M., & Cario, G. (2020). Methotrexate-associated toxicity in children with down syndrome and acute lymphoblastic leukemia during consolidation therapy with high dose methotrexate according to ALL-BFM treatment regimen. *Haematologica*, 105(4), 1013–1020. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.224774>

- Laham, A. J., Saber-Ayad, M., & El-Awady, R. (2021). DYRK1A: a down syndrome-related dual protein kinase with a versatile role in tumorigenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(2), 603–619. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03626-4>
- Lam, G. K. S., Leung, A. W. K., Ha, S. Y., Luk, C. W., Li, C. H., Ling, S. C., Chiang, A. K. S., & Li, C. K. (2016). Acute leukemia in down syndrome children in Hong Kong retrospective review. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 38(2), 102–106. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000000500>
- Lane, A. A., Chapuy, B., Lin, C. Y., Tivey, T., Li, H., Townsend, E. C., van Bodegom, D., Day, T. A., Wu, S.-C., Liu, H., Yoda, A., Alexe, G., Schinzel, A. C., Sullivan, T. J., Malinge, S., Taylor, J. E., Stegmaier, K., Jaffe, J. D., Bustin, M., ... Weinstock, D. M. (2014). Triplication of a 21q22 region contributes to B cell transformation through HMGN1 overexpression and loss of histone H3 Lys27 trimethylation. *Nature Genetics*, 46(6), 618–623. <https://doi.org/10.1038/ng.2949>
- Lange, B. (2000). The management of neoplastic disorders of haematopoiesis in children with Down's syndrome. *British Journal of Haematology*, 110(3), 512–524. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.02027.x>
- Larson, R. A., & Anastasi, J. (2008). Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Presentation, Diagnosis, and Classification. In *Acute Leukemias* (pp. 109–118). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-72304-2_7
- Laurent, A. P., Kotecha, R. S., & Malinge, S. (2020). Gain of chromosome 21 in hematological malignancies: lessons from studying leukemia in children with Down syndrome. *Leukemia*, 34(8), 1984–1999. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0854-5>
- Laurent, A. P., Siret, A., Ignacimoutou, C., Panchal, K., Diop, M., Jenni, S., Tsai, Y. C., Roos-Weil, D., Aid, Z., Prade, N., Lagarde, S., Plassard, D., Pierron, G., Daudigeos, E., Lecluse, Y., Droin, N., Bornhauser, B. C., Cheung, L. C., Crispino, J. D., ... Malinge, S. (2020). Constitutive activation of RAS/MAPK pathway cooperates with trisomy 21 and is therapeutically exploitable in down syndrome b-cell leukemia. *Clinical Cancer Research*, 26(13), 3307–3318. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-3519>
- Lee, P., Bhansali, R., Izraeli, S., Hijiya, N., & Crispino, J. D. (2016). The biology, pathogenesis and clinical aspects of acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome. *Leukemia*, 30(9), 1816–1823. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.164>
- Li, Y., Schwab, C., Ryan, S. L., Papaemmanuil, E., Robinson, H. M., Jacobs, P., Moorman, A. v., Dyer, S., Borrow, J., Griffiths, M., Heerema, N. A., Carroll, A. J., Talley, P., Bown, N., Telford, N., Ross, F. M., Gaunt, L., McNally, R. J. Q., Young, B. D., ... Harrison, C. J. (2014). Constitutional and somatic rearrangement of chromosome 21 in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 508(7494), 98–102. <https://doi.org/10.1038/nature13115>
- Lim, J.-H., West, K. L., Rubinstein, Y., Bergel, M., Postnikov, Y. v., & Bustin, M. (2005). Chromosomal protein HMGN1 enhances the acetylation of lysine 14 in histone H3. *The EMBO Journal*, 24(17), 3038–3048. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600768>
- Litovchick, L., Florens, L. A., Swanson, S. K., Washburn, M. P., & DeCaprio, J. A. (2011). DYRK1A protein kinase promotes quiescence and senescence through DREAM complex assembly. *Genes & Development*, 25(8), 801–813. <https://doi.org/10.1101/gad.2034211>
- Liu, Y.-J., Soumelis, V., Watanabe, N., Ito, T., Wang, Y.-H., de Waal Malefyt, R., Omori, M., Zhou, B., & Ziegler, S. F. (2007). TSLP: An Epithelial Cell Cytokine that Regulates T Cell Differentiation by

- Conditioning Dendritic Cell Maturation. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 193–219. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141718>
- Loncarevic, I. F., Roitzheim, B., Ritterbach, J., Viehmann, S., Borkhardt, A., Lampert, F., & Harbott, J. (1999). Trisomy 21 is a recurrent secondary aberration in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL/AML1 gene fusion. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 24(3), 272–277.
- Malard, F., & Mohty, M. (2020). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 395(10230), 1146–1162. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33018-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33018-1)
- Malinge, S., Ben-Abdelali, R., Settegrana, C., Radford-Weiss, I., Debre, M., Beldjord, K., Macintyre, E. A., Villeval, J.-L., Vainchenker, W., Berger, R., Bernard, O. A., Delabesse, E., & Penard-Lacronique, V. (2007). Novel activating JAK2 mutation in a patient with Down syndrome and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 109(5), 2202–2204. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-045963>
- Malinge, S., Bliss-Moreau, M., Kirsammer, G., Diebold, L., Chlon, T., Gurbuxani, S., & Crispino, J. D. (2012). Increased dosage of the chromosome 21 ortholog Dyrk1a promotes megakaryoblastic leukemia in a murine model of Down syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 122(3), 948–962. <https://doi.org/10.1172/JCI60455>
- Malinge, S., Izraeli, S., & Crispino, J. D. (2009). Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. *Blood*, 113(12), 2619–2628. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-11-163501>
- Maloney, K. W. (2011). Acute lymphoblastic leukaemia in children with Down syndrome: An updated review. *British Journal of Haematology*, 155(4), 420–425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08846.x>
- Maloney, K. W., Taub, J. W., Ravindranath, Y., Roberts, I., & Vyas, P. (2015). Down syndrome preleukemia and leukemia. In *Pediatric Clinics of North America* (Vol. 62, Issue 1, pp. 121–137). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2014.09.009>
- Martín-Lorenzo, A., Hauer, J., Vicente-Dueñas, C., Auer, F., González-Herrero, I., García-Ramírez, I., Ginzler, S., Thiele, R., Constantinescu, S. N., Bartenhagen, C., Dugas, M., Gombert, M., Schäfer, D., Blanco, O., Mayado, A., Orfao, A., Alonso-López, D., de Las Rivas, J., Cobaleda, C., ... Borkhardt, A. (2015). Infection exposure is a causal factor in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia as a result of Pax5-inherited susceptibility. *Cancer Discovery*, 5(12), 1328–1343. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0892>
- Matloub, Y., Rabin, K. R., Ji, L., Devidas, M., Hitzler, J., Xu, X., Bostrom, B. C., Stork, L. C., Winick, N., Gastier-Foster, J. M., Heerema, N. A., Stonerock, E., Carroll, W. L., Hunger, S. P., & Gaynon, P. S. (2019). Excellent long-term survival of children with Down syndrome and standard-risk ALL: A report from the Children's Oncology Group. *Blood Advances*, 3(11), 1647–1656. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019032094>
- Meissner, B., Borkhardt, A., Dilloo, D., Fuchs, D., Friedrich, W., Handgretinger, R., Peters, C., Schrauder, A., Schuster, F. R., Vormoor, J., Maecker, B., Sykora, K. W., Zintl, F., Welte, K., & Sauer, M. (2007). Relapse, not regimen-related toxicity, was the major cause of treatment failure in 11 children with Down syndrome undergoing haematopoietic stem cell transplantation for acute leukaemia. *Bone Marrow Transplantation*, 40(10), 945–949. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705844>

- Merli, P., Algeri, M., del Bufalo, F., & Locatelli, F. (2019). Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 14(2), 94–105. <https://doi.org/10.1007/s11899-019-00502-2>
- Meyr, F., Escherich, G., Mann, G., Klingebiel, T., Kulozik, A., Rossig, C., Schrappe, M., Henze, G., von Stackelberg, A., & Hitzler, J. (2013). Outcomes of treatment for relapsed acute lymphoblastic leukaemia in children with Down syndrome. *British Journal of Haematology*, 162(1), 98–106. <https://doi.org/10.1111/bjh.12348>
- Mitchell, C. D., Richards, S. M., Kinsey, S. E., Lilleyman, J., Vora, A., & Eden, T. O. B. (2005). Benefit of dexamethasone compared with prednisolone for childhood acute lymphoblastic leukaemia: Results of the UK Medical Research Council ALL97 randomized trial. *British Journal of Haematology*, 129(6), 734–745. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05509.x>
- Mowery, C. T., Reyes, J. M., Cabal-Hierro, L., Higby, K. J., Karlin, K. L., Wang, J. H., Kimmerling, R. J., Cejas, P., Lim, K., Li, H., Furusawa, T., Long, H. W., Pellman, D., Chapuy, B., Bustin, M., Manalis, S. R., Westbrook, T. F., Lin, C. Y., & Lane, A. A. (2018). Trisomy of a Down Syndrome Critical Region Globally Amplifies Transcription via HMGN1 Overexpression. *Cell Reports*, 25(7), 1898-1911.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.061>
- Mullighan, C. G., Collins-Underwood, J. R., Phillips, L. A. A., Loudin, M. G., Liu, W., Zhang, J., Ma, J., Coustan-Smith, E., Harvey, R. C., Willman, C. L., Mikhail, F. M., Meyer, J., Carroll, A. J., Williams, R. T., Cheng, J., Heerema, N. A., Basso, G., Pession, A., Pui, C. H., ... Rabin, K. R. (2009). Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor-and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, 41(11), 1243–1246. <https://doi.org/10.1038/ng.469>
- Nikolaev, S. I., Garieri, M., Santoni, F., Falconnet, E., Ribaux, P., Guipponi, M., Murray, A., Groet, J., Giarin, E., Basso, G., Nizetic, D., & Antonarakis, S. E. (2014). Frequent cases of RAS-mutated Down syndrome acute lymphoblastic leukaemia lack JAK2 mutations. *Nature Communications*, 5, 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms5654>
- O’Byrne, S. I., Elliott, N., Buck, G., Rice, S., O’Connor, D., Oswald, J., Fuchs, H., Labbett, E.-M., Fordham, N. J., Roy, A., & Roberts, I. (2019). Trisomy 21 Driven Pro-Inflammatory Signalling in Fetal Bone Marrow May Play a Role in Perturbed B-Lymphopoiesis and Acute Lymphoblastic Leukemia of Down Syndrome. *Blood*, 134(Supplement_1), 1206–1206. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-130180>
- Okuyama, K., Strid, T., Kuruvilla, J., Somasundaram, R., Cristobal, S., Smith, E., Prasad, M., Fioretos, T., Lilljebjörn, H., Soneji, S., Lang, S., Ungerback, J., & Sigvardsson, M. (2019). PAX5 is part of a functional transcription factor network targeted in lymphoid leukemia. *PLoS Genetics*, 15(8), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008280>
- Onciu, M. (2009). Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 23(4), 655–674. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.04.009>
- Østergaard, A., Bohnstedt, C., Grell, K., Degn, M., Zeller, B., Taskinen, M., Hafsteinsdottir, S., Björgvinsdóttir, H., Heyman, M., Hoogerbrugge, P., & Schmiegelow, K. (2021). Acute lymphoblastic leukemia and down syndrome: 6-mercaptopurine and methotrexate metabolites during maintenance therapy. *Leukemia*, 35(3), 863–866. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0946-2>

- Page, E. C., Heatley, S. L., Yeung, D. T., Thomas, P. Q., & White, D. L. (2018). Precision medicine approaches may be the future for CRLF2 rearranged Down Syndrome Acute Lymphoblastic Leukaemia patients. *Cancer Letters*, *432*, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.05.045>
- Paulsson, K., & Johansson, B. (2009). High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer*, *48*(8), 637–660. <https://doi.org/10.1002/gcc.20671>
- Pehlivan, K. C., Duncan, B. B., & Lee, D. W. (2018). CAR-T Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia: Transforming the Treatment of Relapsed and Refractory Disease. *Current Hematologic Malignancy Reports*, *13*(5), 396–406. <https://doi.org/10.1007/s11899-018-0470-x>
- Pennella, C. L., Rossi, J. G., Baialardo, E. M., Alonso, C. N., Gutter, M. R., la Rosa, C. G. S., Millán, N. C., Alfaro, E. M., Zubizarreta, P. A., & Felice, M. S. (2018). Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: Comparative analysis versus Patients without Down syndrome. *Archivos Argentinos de Pediatría*, *116*(4), e500–e507. <https://doi.org/10.5546/aap.2018.eng.e500>
- Pizzo PA, Poplack DG, Editors. (2001). *Principles and practice of pediatric oncology* (4th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Pui, C., & Evans, W. E. (2006). Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *354*(2), 166–178. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052603>
- Rand, V., Parker, H., Russell, L. J., Schwab, C., Ensor, H., Irving, J., Jones, L., Masic, D., Minto, L., Morrison, H., Ryan, S., Robinson, H., Sinclair, P., Moorman, A. v., Strefford, J. C., & Harrison, C. J. (2011). Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *117*(25), 6848–6855. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-329961>
- Roberts, K. G., & Mullighan, C. G. (2015). Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: Insights and treatment implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *12*(6), 344–357. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.38>
- Russell, L. J., Capasso, M., Vater, I., Akasaka, T., Bernard, O. A., Calasanz, M. J., Chandrasekaran, T., Chapiro, E., Gesk, S., Griffiths, M., Guttery, D. S., Haferlach, C., Harder, L., Heidenreich, O., Irving, J., Kearney, L., Nguyen-Khac, F., Machado, L., Minto, L., ... Harrison, C. J. (2009). Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *114*(13), 2688–2698. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-208397>
- Saadeh, S. S., & Litzow, M. R. (2018). Hematopoietic stem cell transplant in adults with acute lymphoblastic leukemia: the present state. *Expert Review of Hematology*, *11*(3), 195–207. <https://doi.org/10.1080/17474086.2018.1433030>
- Salazar, E. G., Li, Y., Fisher, B. T., Rheingold, S. R., Fitzgerald, J., Seif, A. E., Huang, Y. S., Bagatell, R., & Aplenc, R. (2016). Supportive care utilization and treatment toxicity in children with Down syndrome and acute lymphoid leukaemia at free-standing paediatric hospitals in the United States. *British Journal of Haematology*, *174*(4), 591–599. <https://doi.org/10.1111/bjh.14085>
- Savino, A. M., Sarno, J., Trentin, L., Vieri, M., Fazio, G., Bardini, M., Bugarin, C., Fossati, G., Davis, K. L., Gaipa, G., Izraeli, S., Meyer, L. H., Nolan, G. P., Biondi, A., te Kronnie, G., Palmi, C., & Cazzaniga, G. (2017). The histone deacetylase inhibitor givinostat (ITF2357) exhibits potent anti-tumor activity

against CRLF2-rearranged BCP-ALL. *Leukemia*, 31(11), 2365–2375.
<https://doi.org/10.1038/leu.2017.93>

Schwartzman, O., Savino, A. M., Gombert, M., Palmi, C., Cario, G., Schrappe, M., Eckert, C., Stackelberg, A. von, Huang, J. Y., Hameiri-Grossman, M., Avigad, S., Kronnie, G. te, Geron, I., Birger, Y., Rein, A., Zarfati, G., Fischer, U., Mukamel, Z., Stanulla, M., ... Izraeli, S. (2017). Suppressors and activators of JAK-STAT signaling at diagnosis and relapse of acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(20), E4030–E4039. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702489114>

Shochat, C., Tal, N., Bandapalli, O. R., Palmi, C., Ganmore, I., te Kronnie, G., Cario, G., Cazzaniga, G., Kulozik, A. E., Stanulla, M., Schrappe, M., Biondi, A., Basso, G., Bercovich, D., Muckenthaler, M. U., & Izraeli, S. (2011). Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *Journal of Experimental Medicine*, 208(5), 901–908. <https://doi.org/10.1084/jem.20110580>

Soppa, U., Schumacher, J., Florencio Ortiz, V., Pasqualon, T., Tejedor, F., & Becker, W. (2014). The Down syndrome-related protein kinase DYRK1A phosphorylates p27 Kip1 and Cyclin D1 and induces cell cycle exit and neuronal differentiation. *Cell Cycle*, 13(13), 2084–2100. <https://doi.org/10.4161/cc.29104>

Teachey, D. T., Rheingold, S. R., Maude, S. L., Zugmaier, G., Barrett, D. M., Seif, A. E., Nichols, K. E., Suppa, E. K., Kalos, M., Berg, R. A., Fitzgerald, J. C., Aplenc, R., Gore, L., & Grupp, S. A. (2013). Cytokine release syndrome after blinatumomab treatment related to abnormal macrophage activation and ameliorated with cytokine-directed therapy. *Blood*, 121(26), 5154–5157. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-485623>

Thompson, B. J., Bhansali, R., Diebold, L., Cook, D. E., Stolzenburg, L., Casagrande, A.-S., Besson, T., Leblond, B., Désiré, L., Malinge, S., & Crispino, J. D. (2015). DYRK1A controls the transition from proliferation to quiescence during lymphoid development by destabilizing Cyclin D3. *Journal of Experimental Medicine*, 212(6), 953–970. <https://doi.org/10.1084/jem.20150002>

Viardot, A., Locatelli, F., Stieglmaier, J., Zaman, F., & Jabbour, E. (2020). Concepts in immuno-oncology: tackling B cell malignancies with CD19-directed bispecific T cell engager therapies. *Annals of Hematology*, 99(10), 2215–2229. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-04221-0>

Waugh, K. A., Araya, P., Pandey, A., Jordan, K. R., Smith, K. P., Granrath, R. E., Khanal, S., Butcher, E. T., Estrada, B. E., Rachubinski, A. L., McWilliams, J. A., Minter, R., Dimasi, T., Colvin, K. L., Baturin, D., Pham, A. T., Galbraith, M. D., Bartsch, K. W., Yeager, M. E., ... Espinosa, J. M. (2019). Mass Cytometry Reveals Global Immune Remodeling with Multi-lineage Hypersensitivity to Type I Interferon in Down Syndrome. *Cell Reports*, 29(7), 1893-1908.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.038>

Whitehead, T. P., Metayer, C., Wiemels, J. L., Singer, A. W., & Miller, M. D. (2016). Childhood Leukemia and Primary Prevention. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 46(10), 317–352. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2016.08.004>

Whitlock, J. A. (2006). Down syndrome and acute lymphoblastic leukaemia. In *British Journal of Haematology* (Vol. 135, Issue 5, pp. 595–602). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06337.x>

Winer, P., Muskens, I. S., Walsh, K. M., Vora, A., Moorman, A. v., Wiemels, J. L., Roberts, I., Roy, A., & de Smith, A. J. (2020). Germline variants in predisposition genes in children with down syndrome and

acute lymphoblastic leukemia. *Blood Advances*, 4(4), 672–675.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001216>

Xu, H., Zhang, H., Yang, W., Yadav, R., Morrison, A. C., Qian, M., Devidas, M., Liu, Y., Perez-Andreu, V., Zhao, X., Gastier-Foster, J. M., Lupo, P. J., Neale, G., Raetz, E., Larsen, E., Bowman, W. P., Carroll, W. L., Winick, N., Williams, R., ... Yang, J. J. (2015). Inherited coding variants at the CDKN2A locus influence susceptibility to acute lymphoblastic leukaemia in children. *Nature Communications*, 6(1), 7553. <https://doi.org/10.1038/ncomms8553>

Yamamoto, T., Isomura, M., Xu, Y., Liang, J., Yagasaki, H., Kamachi, Y., Kudo, K., Kiyoi, H., Naoe, T., & Kojima, S. (2006). PTPN11, RAS and FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research*, 30(9), 1085–1089. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2006.02.004>

Zhou, Y., You, M. J., Young, K. H., Lin, P., Lu, G., Medeiros, L. J., & Bueso-Ramos, C. E. (2012). Advances in the molecular pathobiology of B-lymphoblastic leukemia. *Human Pathology*, 43(9), 1347–1362. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.02.004>