



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

CAROLINE BARBIERI BLUNCK

Caracterização dos padrões moleculares de pacientes com *RUNX1-ETV6* em leucemia  
linfoblástica aguda de células precursoras B

Orientadora: Dra. Mariana Emerenciano

Coorientadora: Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Rio de Janeiro

2019



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

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**  
Pós-Graduação em Oncologia

Caroline Barbieri Blunck

Caracterização dos padrões moleculares de pacientes com *RUNX1-ETV6* em leucemia  
linfoblástica aguda de células precursoras B

Tese de Doutorado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto  
Nacional de Câncer, como parte dos  
requisitos necessários à obtenção do título de  
Doutor em Oncologia.

Orientadora: Dra. Mariana Emerenciano

Coorientadora: Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Rio de Janeiro

2019

B659c Blunck, Caroline Barbieri

Caracterização dos padrões moleculares de pacientes com *RUNX1-ETV6* em leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B. / Caroline Barbieri Blunck. – Rio de Janeiro, 2019.

xviii, 70 f.: il. color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019.

Orientadora: Dra. Mariana Emerenciano

Co-orientador: Dr. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

1. Leucemia Aguda Bifenotípica. 2. Proteína 1 Parceira de Translocação de RUNX1.  
3. Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex. I. Emerenciano, Mariana (Orient.).  
II. Pombo de Oliveira, Maria do Socorro (Co-orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99419



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

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**  
**Pós-Graduação em Oncologia**

**CAROLINE BARBIERI BLUNCK**

Caracterização dos padrões moleculares de pacientes com *RUNX1-ETV6* em leucemia  
linfoblástica aguda de células precursoras B

**Orientadora:** Dra. Mariana Emerenciano

**Coorientadora:** Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

**EXAMINADORES:**

Prof. Dra. Cláudia Esther Alicia Rocio Hassan (INCA)

Prof. Dr. Leonardo Augusto Karam Teixeira (INCA)

Prof. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba (INCA)

Prof. Dr. Marcelo Gerardin Poirot Land (UFRJ)

Prof. Dr. Julio Cesar Madureira de Freitas Junior (INCA) - Suplente I

Prof. Dr. Ana Maria Rossini Teixeira (UERJ) - Suplente II

Rio de Janeiro

2019

*A estas crianças e a seus pais, ofereço meu empenho, gratidão e respeito.*

## AGRADECIMENTOS

A **Dra Mariana Emerenciano**, pela orientação, incentivo e amizade durante a realização deste e de outros trabalhos. Obrigada por sempre acreditar em seus alunos. Obrigada por ser a grande líder que é. Obrigada por saber gerir pessoas. Obrigada por sempre semear a unidade em seu grupo (*isso é singular, raro e nos faz querer fazer ciência e não competir entre nós mesmo*). Como brinco dizendo “a Mari mudou minha vida”.

A **Dra Maria do Socorro Pombo de Oliveira** por ter me dado à oportunidade de desenvolver parte deste trabalho em seu laboratório.

A **Dra Marcela Braga Mansur** por ter me ajudado, por ter me estimulado, por ter me orientado e por ter me acolhido como fosse sua aluna em todas às vezes a fui até você. Tenho amadurecido muito com nossas discussões científicas. *Muito obrigada por sempre trazer com você palavras de ânimo e de confiança! Eu não conhecia o tamanho desse coração! Obrigada!*

A **Dra e amiga Thayana Barbosa** pela nossa amizade, por toda troca que temos compartilhado nessa caminhada, seja cientificamente com sua experiência em MLPA, seja pela parceria que torna o dia a dia mais leve. Costumo dizer que: *Chay é fechamento sempre! Agora temos a Thalitinha para fechar junto, rs!*

Ao **Dr e amigo Bruno de Almeida Lopes** por toda amizade, leveza e por todo conhecimento compartilhado até aqui. *Você é um cara da paz! Te admiro muito e quando eu crescer quero ser igual a você, rs!*

Ao **MSc e amigo Júlio César** por ter ficado sempre do meu lado (no início) para eu não errar a pipetagem nos pocinhos da placa (*hahahah*). E também, por várias vezes ter sido minha companhia de volta pra casa quando tarde saía do laboratório. *Obrigada pela amizade e pelos bons vinhos!*

A todos os amigos MECS (Amanda, Alessandra, Ana Luiza, Bruno Lopes, Carol Poubel, Júlio César e Thayana) agradeço pela ajuda, pelos conhecimentos compartilhados (dentro do lab e em nossas reuniões científicas), pelas brincadeiras e pelo companheirismo. Agradeço em especial duas pessoas: a futura Mestre **Ana Luiza** por ter me ajudado na padronização das BACs e por ter dividido comigo essa agonia de reta final e defesa. *Nossas brincadeiras e competição (sobre quem acabava de escrever primeiro) tornaram os dias mais engraçados.* E a **Amanda** por ter dividido a rotina comigo nesses últimos dias! *Amandita, talvez não saiba, mas nossa parceria me aliviou muito nesses últimos meses onde minha vida se resumiu em uma única palavra: TESE, rs!*

A **Dra e amiga Elda Pereira Noronha** por todo conhecimento compartilhado em citometria de fluxo e por várias vezes ter discutido comigo sobre as análises estatísticas. Eu aprendi muito com nossas discussões. *Obrigada por sua amizade, paciência, pelos vinhos e por ter me ajudado a não desistir!*

A **Dra Eugênia Terra Granado** pelo conhecimento compartilhado em citometria de fluxo.

Ao **Msc Bruno Aguiar** e **Alessandra Faro** por toda ajuda na imunofenotipagem no início. *Em especial a Alê pelo carinho e amizade!*

A **Camilla Fernanda** (*Camiss*) e **Carolina Zampier** pelo apoio com as amostras direcionadas para bio mol.

A **Dra Maria Gabriela Vera Lozada** por toda paciência e conhecimento compartilhado em Real Time. *Gabi, você é massa!*

A **Dra Rocio** que após a qualificação ofereceu seu laboratório para eu finalizar meus experimentos em Real Time.

A **Dra Maria Luiza Macedo Silva** por ter me permitido utilizar o microscópio de fluorescência do seu laboratório para finalização das análises de FISH.

A **Divisão de Pesquisa Clínica e Desenvolvimento Tecnológico** por toda estrutura e suporte para finalização deste trabalho e de outros.

Aos novos amigos do lab (**Vanessa, Ana e Thiago**) por serem sempre solícitos e legais!

A todos os médicos e demais profissionais que cuidaram desses pacientes com todo carinho e ética profissional. Contando com a colaboração de vocês este trabalho pôde ser concretizado.

A **Sirlene Barbieri Blunck, Rogério Blunck e Maelle Barbieri Blunck**, eu dedico mais esta etapa da minha vida. Vocês são minha base, meu bem maior e estão sendo essenciais para que esse trabalho seja concluído, mesmo que talvez nem saibam como. *Foi, é e sempre será por vocês!*

Ao **João Carlos Pinto Ferreira Júnior**, por todo carinho, incentivo, ternura e por estar me dando todo apoio familiar para continuar com a realização deste trabalho. Sou eternamente grata, meu amor. Agradeço também a sua família!

A **Deus** agradeço por seu amor, pela fé, pelo dom da vida e por me surpreender a cada dia com as suas misericórdias.

“A persistência é o menor caminho do êxito”. (Charles Chaplin)



## SÚMARIO

LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTAS DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE QUADROS .....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO .....	xvii
ABSTRACT .....	xviii
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Leucemias linfoblásticas agudas.....	1
1.1.1 Classificação imunofenotípica da leucemia linfoblástica de células precursoras B .....	3
1.2 Associação fenótipo - genótipo nas leucemias linfoblásticas agudas de células precursoras B .....	5
1.2.1 Alterações citogenético-moleculares em leucemias linfoblásticas agudas de células precursoras B .....	7
1.3 Translocação cromossômica t(12;21)(p13;q22) - <i>ETV6-RUNX1</i> .....	9
1.3.1. Relação genótipo-fenótipo em casos com <i>ETV6-RUNX1</i> .....	11
1.3.2. CD9 em LLA-CPB com <i>ETV6-RUNX1</i> .....	13
1.3.3. Translocação cromossômica t(12;21)(p13;q22) – <i>RUNX1-ETV6</i> .....	15
1.3.4. Alterações adicionais ou anormalidades genéticas secundárias .....	17
2 JUSTIFICATIVA .....	18
3 OBJETIVOS .....	19
3.1. Objetivo geral .....	19
3.2. Objetivos secundários .....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	20
4.1 Casuística .....	20
4.2 Ética em pesquisa .....	21
4.3 Imunofenotipagem .....	21
4.3.1. Painéis de anticorpos monoclonais (AcMo) utilizados na caracterização imunofenotípica dos casos .....	21
4.3.2. Técnica para marcação imunofenotípica .....	22
4.4. Extração de DNA .....	24
4.5. Extração de RNA total .....	25
4.6. Síntese de cDNA .....	25
4.7. Detecção das fusões direta ( <i>ETV6-RUNX1</i> ) e recíproca ( <i>RUNX1-ETV6</i> ) .....	26
4.7.1. Identificação qualitativa por RT-PCR .....	26

4.7.2.	Identificação das fusões direta e recíproca por citogenética-molecular .....	26
4.8	Quantificação da expressão gênica de <i>ETV6-RUNX1</i> e <i>RUNX1-ETV6</i> .....	30
4.9.	Detecção de alterações adicionais por MLPA .....	33
4.10.	Análise estatística .....	34
5	RESULTADOS .....	36
5.1	Características demográficas e laboratoriais .....	36
5.2	Caracterização clínico-laboratorial em relação ao status do transcrito recíproco .....	38
5.3	Identificação da fusão direta e recíproca por citogenética-molecular .....	39
5.4	Detecção de alterações adicionais por MLPA .....	41
5.5	Avaliação dos níveis de expressão dos transcritos direto e recíproco .....	42
5.5.1	Análise de correlação entre os níveis dos transcritos e os dados clínico-laboratoriais.	42
5.5.2	Análise de correlação entre os níveis dos transcritos e expressão de CD9 (Percentual e IMF).....	44
5.5.3.	Análise de comparação entre os níveis dos transcritos e as alterações vistas MLPA ..	45
5.5.4.	Avaliação da expressão celular de CD9 (percentual e IMF) e relação ao <i>status</i> de <i>CDKN2A/B</i> e <i>PAX5</i> .....	45
5.6.	Análise de Sobrevida .....	47
6	DISCUSSÃO .....	51
7	CONCLUSÕES .....	57
8	REFERÊNCIAS .....	58
9	ANEXO 1 .....	64
10	ANEXO 2 .....	66

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 5. 1.</b> Características demográficas e laboratoriais dos pacientes em relação à presença do transcrito recíproco.....	39
<b>Tabela 5. 2.</b> Análise de sobrevida global dos pacientes incluídos no estudo com informação de seguimento.....	48
<b>Tabela 5. 3.</b> Análise de sobrevida global dos pacientes em relação às alterações adicionais.	50

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Figura 1. 1.</b> Estágios de diferenciação para desenvolvimento normal de células B na MO. ....	5
<b>Figura 1. 2.</b> Frequência estimada das alterações mais comuns em LLA-CPB pediátrica. ....	8
<b>Figura 1. 3.</b> Representação esquemática da fusão entre <i>ETV6</i> e <i>RUNX1</i> . ....	10
<b>Figura 1. 4.</b> Representação esquemática de genes associados com a ontologia gênica. ....	12
<b>Figura 1. 5.</b> Níveis de transcrição <i>CD9</i> em pacientes diagnosticados com LLA-CPB. ....	13
<b>Figura 1. 6.</b> Representação esquemática de uma tetraspanina genérica. ....	14
<b>Figura 1. 7.</b> Representação esquemática das translocações envolvendo os cromossomos 12 e 21. ....	15
<b>Figura 1. 8.</b> Papel da expressão de <i>ETV6-RUNX1</i> e <i>RUNX1-ETV6</i> na sobrevida de pacientes com LLA-CPB. ....	16
<b>Figura 4. 1.</b> Desenho do estudo e esquema metodológico neste estudo. ....	20
<b>Figura 4. 2.</b> Esquema da análise do percentual e IMF do <i>CD9</i> por citometria de fluxo. ....	23
<b>Figura 4. 3.</b> Ilustração da localização da sonda comercial <i>TEL/AML1 (ETV6/RUNX1)</i> Translocation, Dual Fusion (Cytocell). ....	27
<b>Figura 4. 4.</b> Desenho esquemático das sondas BAC para a detecção da fusão gênica <i>RUNX1-ETV6</i> por FISH. ....	28
<b>Figura 4. 5.</b> Localização das sondas de FISH in-house em cromossomos metafásicos. ....	30
<b>Figura 4. 6.</b> Escolha dos genes de referência para as reações de RT-qPCR. ....	31
<b>Figura 4. 7.</b> Representação gráfica das curvas-padrão referentes aos oligonucleotídeos utilizados. ....	32
<b>Figura 5. 1.</b> Características demográficas e dados laboratoriais das LLAs-CPB <i>ETV6-RUNX1</i> . ....	38
<b>Figura 5. 2.</b> FISH de núcleos interfásicos usando sonda comercial de dupla fusão. ....	40
<b>Figura 5. 3.</b> FISH de núcleos interfásicos usando as sondas do tipo BACs. ....	41
<b>Figura 5. 4.</b> Frequência das deleções encontradas por MLPA. ....	42
<b>Figura 5. 5.</b> Análise de correlação entre os níveis dos transcritos direto/recíproco com a idade e a leucometria. ....	43
<b>Figura 5. 6.</b> Análise de correlação entre os níveis dos transcritos direto/recíproco e expressão celular de <i>CD9</i> (Percentual e IMF). ....	44
<b>Figura 5. 7.</b> Avaliação dos níveis de expressão dos transcritos direto e recíproco em pacientes de acordo com o status de <i>CDKN2A/B</i> e <i>PAX5</i> . ....	45
<b>Figura 5. 8.</b> Análise da avaliação da expressão celular de <i>CD9</i> em relação status de <i>CDKN2A/B</i> . ....	46
<b>Figura 5. 9.</b> Análise da avaliação da expressão celular de <i>CD9</i> em relação status de <i>PAX5</i> . ....	46
<b>Figura 5. 10.</b> Curva de Kaplan Meier mostrando a sobrevida global dos pacientes incluídos neste estudo. ....	47
<b>Figura 5. 11.</b> Curvas de Kaplan Meier mostrando diferenças da sobrevida global (SG) em relação às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes incluídos neste estudo com informação de seguimento. ....	49

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1. 1.</b> Painel de marcadores que estabelece a classificação dos subtipos celulares nas LLA .....	4
<b>Quadro 1. 2.</b> Perfil imunofenotípico, frequência e perfil prognóstico das principais alterações em LLA-CPB.....	7
<b>Quadro 4. 1.</b> Painel para caracterização do subtipo de LLA-CPB.....	21
<b>Quadro 4. 2.</b> Iniciadores utilizados para amplificação do gene <i>GAPDH</i> .....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS

*ABL1* – *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*  
AcMo – Anticorpo Monoclonal  
AIEOP – *Associazione Italiana Ematologia Pediatrica*  
APC – *Allophycocyanin*  
BAC – *Bacterial Artificial Chromosome*  
BCR – *Breakpoint cluster region protein*  
BFM – *Berlin-Frankfurt-Münster*  
BTG1 – *BTG Anti-Proliferation Factor 1*  
CALLA – *Common acute lymphoblastic leukemia antigen*  
CDKN2A – *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A*  
CDKN2B – *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B*  
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa  
CRLF2 – *Cytokine Receptor Like Factor 2*  
CT – *Cycle Threshold*  
dCTs – *delta Cycle Threshold*  
CXCR-4 – *C-X-C chemokine receptor type 4*  
CXCL12 – *C-X-C motif chemokine 12*  
CSF2RA – *Colony Stimulating Factor 2 Receptor Alpha Subunit*  
DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole*  
DEPC – Dietilpirocarbonato  
DMSO – Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de dimetilo  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DNase – Desoxirribonuclease  
dNTP – Desoxinucleotídeos  
DRM – Doença Residual Mínima  
EBF1 – *Early B-cell factor 1*  
EGIL – *European Group for Immunophenotyping Leukemia*  
ETV6 – *Ets variant 6*  
FAB – *French-American-British group*  
FITC – Isotiocianato de fluoresceína  
FISH – Hibridização in situ por Fluorescência  
FSC – *Forward Scatter*

*GAPDH – Gliceraldeído – 3 – Fosfato Desidrogenase*  
*HLA-DR – Human Leucocitary Antigen-DR*  
*iAMP21 – Amplificação Intracromossomal do Cromossomo 21*  
*IKZF1 – Zinc Finger Protein, Subfamily 1A*  
*IL3RA – Interleukin 3 Receptor Subunit Alpha*  
*IMF – Intensidade mediana de fluorescência*  
*INCA – Instituto Nacional de Câncer*  
*JAK2 – Janus kinase 2*  
*KMT2A – Histone-lysine N-methyltransferase 2<sup>a</sup>*  
*KMT2A-r – Rearranjo de Histone-lysine N-methyltransferase 2<sup>a</sup>*  
*LA – Leucemia aguda*  
*LLA – Leucemia linfoblástica aguda*  
*LLA-c – Leucemia linfoblástica aguda comum*  
*LLA-CPB – Leucemia linfoblástica aguda de células precursora B*  
*LLA-T – Leucemia linfoblástica aguda de célula - T*  
*MLPA- Multiplex ligation probe amplification*  
*MO – Medula óssea*  
*MPO – Mieloperoxidase*  
*NCI – National Cancer Institute*  
*NG2 – New glue 2 Drosophila melanogaster*  
*OMS – Organização Mundial de Saúde*  
*PAX-5 - Paired box 5*  
*pb – Pares de base*  
*PBS – Phosphate buffered saline*  
*PBX1 – Pre-B-cell leukemia homeobox 1*  
*PCR – Polymerase chain reaction*  
*PE – Ficoeritina*  
*PHOP – Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricos*  
*qPCR – quantitative real-time PCR*  
*RNA – Ácido ribonucleico*  
*RAG – Recombination-activating gene*  
*RBI – RB transcriptional corepressor 1*  
*ROC – Receiver operating characteristic*  
*rpm – Rotações por minuto*  
*RPMI – Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR – *Reverse transcriptase polymerase chain reaction*  
RT-qPCR – *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*  
RUNX1 – *runt-related transcription factor 1*  
SFB – Soro fetal bovino  
SG – Sobrevida Global  
SHOX - *short stature homeobox*  
SNC – Sistema nervosa central  
SSC – *Side scatter*  
SP – Sangue periférico  
TCF3 – *Transcription factor 3*  
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido  
TdT – *Terminal deoxynucleotidyl transferase*  
WHO – *World Health Organization*





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

**RESUMO**

As leucemias linfoblásticas agudas de células precursoras-B (LLA-CPB) são caracterizadas por translocações recorrentes, sendo t(12;21)(p13;q22) uma das mais comuns. Essa translocação gera as fusões gênicas *ETV6-RUNX1* (transcrito direto) e *RUNX1-ETV6* (transcrito recíproco) em 100% e 76% dos casos, respectivamente. Estudos mostraram que a alta expressão do *RUNX1-ETV6* confere um prognóstico desfavorável. Além disso, alterações moleculares adicionais foram descritas neste grupo de pacientes como importantes marcadores de estratificação de risco. Nossa hipótese é que pacientes com *RUNX1-ETV6* possam ter um perfil clínico-laboratorial único. Além disso, acreditamos que este perfil esteja associado com o desfecho clínico dos pacientes, em especial, com a ocorrência das recaídas. Um total de 114 pacientes pediátricos (<18 anos) com LLA-CPB-t(12;21) foram incluídos neste estudo. Análises qualitativa (percentagem) e quantitativa (IMF) de CD9, um marcador celular cuja baixa expressão está associada com *ETV6-RUNX1*, foram realizadas por citometria de fluxo. A presença do transcrito recíproco foi identificada por RT-PCR. RT-qPCR foi realizada para avaliar os níveis de expressão dos transcritos quiméricos direto e recíproco. A MLPA foi realizada para identificar alterações de número de cópias nos genes *PAX5*, *IKZF1*, *EBF1*, *CDKN2A/B*, *BTG1*, *JAK2*, *RBI*, *ETV6*, *ERG* e *PARI*. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significantes. A maioria dos pacientes incluídos era do sexo masculino (60%), <10 anos e tinha baixa leucometria. O transcrito recíproco foi encontrado em 46/70 casos (65,7%). A porcentagem de células marcadas e a IMF de CD9 foram altas na maioria dos pacientes com *RUNX1-ETV6* (78,2%). Em 34/114 casos (30%) foram observadas a deleção do alelo não-rearranjado do gene *ETV6* e *ETV6-RUNX1*, concomitantemente. Em 12/114 casos (10,5%) detectamos a co-ocorrência de um sinal adicional de *RUNX1* e de *ETV6-RUNX1*. Em 3/114 (2,6%) foi observada a presença de 3 sinais de *ETV6-RUNX1*. Para a identificação de alterações adicionais no der(12)t(12;21), realizamos análises de FISH com sondas customizadas. Em 6/16 casos (37,5%), identificamos um padrão de alteração caracterizado pela presença concomitante de *RUNX1-ETV6* e de um sinal extra de *RUNX1*. Em três casos (18%) observamos o padrão de alteração caracterizado pela duplicação da fusão *RUNX1-ETV6*. Pacientes com *RUNX1-ETV6* apresentaram deleção em *ETV6* (45%), *CDKN2A/B* (35%) e *PAX5* (30%). Em relação à análise de expressão, observamos uma correlação positiva ( $R=0,90$ ;  $P=0,02$ ) entre os níveis do transcrito direto e a leucometria. Observamos uma correlação positiva ( $R=0,92$ ;  $P=0,02$ ) entre transcrito recíproco e IMF de CD9. Além disso, observamos um aumento significativo na expressão de *RUNX1-ETV6* em pacientes com *PAX5* deletado ( $P=0,02$ ). Observamos um aumento da IMF de CD9 em pacientes com deleção em *PAX5* comparados aos pacientes com *PAX5* selvagem ( $P=0,01$ ). As análises de SG foram realizadas com dados de 42 pacientes acompanhados por um tempo médio de 60 meses e observamos uma SG média de 48,6 meses (IC95% 42,2 - 55,1). Na análise univariada para o *status* de *RUNX1-ETV6* (presença e ausência), os pacientes com o transcrito recíproco apresentaram uma SG média inferior. Há evidências substanciais da presença de múltiplos subclones ao diagnóstico, que podem resultar em diferentes perfis de resposta ao tratamento dos pacientes *ETV6-RUNX1*. Portanto, o prognóstico comumente favorável deste grupo de pacientes pode ser modificado com a presença de alterações secundárias. Como demonstrado em nosso estudo o grupo *RUNX1-ETV6* é um grupo molecularmente heterogêneo que apresenta deleções adicionais de genes relevantes para a leucemogênese. Por exemplo, pacientes com deleção no *PAX5* apresentaram um aumento dos níveis de expressão *RUNX1-ETV6*, o que poderia aumentar a probabilidade de recaídas neste pacientes.



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

**ABSTRACT**

B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) is characterized by recurrent translocations, with t(12;21)(p13;q22) being one of the most common abnormalities. This translocation generates the gene fusions *ETV6-RUNX1* (direct transcript) and *RUNX1-ETV6* (reciprocal transcript) in 100% and 76% of cases, respectively. Studies have shown that high expression of *RUNX1-ETV6* confers an unfavorable prognosis. In addition, secondary genetic alterations were described in this group of patients as important risk stratification markers. Our hypothesis is that patients with *RUNX1-ETV6* may have a unique clinical-laboratory profile. In addition, we believe that this profile is associated with the clinical outcome of those patients, especially with the occurrence of relapses. A total of 114 pediatric patients (<18 years) with t(12;21) were included in this study. The qualitative (percentage) and quantitative (MIF) analysis of CD9 were performed by flow cytometry to predict the presence of t(12;21)(p13;q22). The presence of the reciprocal transcript was identified by RT-PCR and FISH. RT-qPCR was performed to evaluate the expression levels of the direct and reciprocal transcripts. MLPA was performed to identify copy number alterations in *PAX5*, *IKZF1*, *EBF1*, *CDKN2A/B*, *BTG1*, *JAK2*, *RBI*, *ETV6*, *ERG* and *PARI*. *P*-values <0.05 were considered significant. The majority of patients were male (60%), <10 years-old and had a low white blood cell count. The reciprocal transcript was found in 46/70 cases (65.7%). The percentage of labeled cells and the CD9 IMF were increased in most patients with *RUNX1-ETV6* (78.2%). In 34/114 cases (30%), we found a deletion of the non-rearranged allele of *ETV6* and *ETV6-RUNX1*, concomitantly. In 12/114 cases (10.5%), we detected a co-occurrence of an additional *RUNX1* signal and *ETV6-RUNX1*. In 3/114 (2.6%), the presence of 3 *ETV6-RUNX1* signals was observed. In order to identify additional alterations in the der(12)t(12;21), we performed a FISH analysis using customized probes. In 6/16 cases (37.5%), we identified the concomitant presence of the reciprocal fusion and a *RUNX1* extra signal. In three cases (18%) we observed a duplication of the *RUNX1-ETV6* fusion. Patients with *RUNX1-ETV6* presented deletions in *ETV6* (45%), *CDKN2A/B* (35%) and *PAX5* (30%). We observed a positive correlation ( $R=0.90$ ,  $P=0.02$ ) between the direct transcript expression levels and white blood cell count. We also observed a positive correlation ( $R=0.92$ ,  $P=0.02$ ) between reciprocal transcript expression levels and CD9 MIF. In addition, we observed a significant increase in *RUNX1-ETV6* expression level in patients with *PAX5* deletion ( $P=0.02$ ). We observed an increase in CD9 MIF in patients with *PAX5* deletion compared to patients with *PAX5* wild-type ( $P=0.01$ ). The OS analyzes were performed with follow-up data from 42 patients during an average time of 60 months and we observed an average OS of 48.6 months for these patients (95% CI 42.2 - 55.1). In the univariate analysis for the *RUNX1-ETV6* status (presence or absence), the mean OS of patients who had the reciprocal transcript was lower. There is substantial evidence of the presence of multiple subclones at diagnosis, which may result in different treatment response profiles in *ETV6-RUNX1* patients. Therefore, the usually favorable prognosis of this group could be modified due to the presence of secondary alterations. As demonstrated in our study, the *RUNX1-ETV6* group is molecularly heterogeneous presenting additional deletions encompassing genes relevant to leukemogenesis. For example, patients with *PAX5* deletion had increased expression levels of *RUNX1-ETV6*, which could increase the probability of relapses in these patients.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. Leucemias linfoblásticas agudas

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é o tipo de câncer mais comum na infância entre 0 a 15 anos de idade, correspondendo em torno de 25-35% dos cânceres dentro desta faixa etária. Embora possa ocorrer em qualquer idade, a LLA é mais prevalente entre as crianças, particularmente aquelas com idades entre 3-6 anos, sendo mais frequente no sexo masculino. Trata-se de uma doença heterogênea em termos demográficos, clínicos, genéticos, especificidade terapêutica e evolução (DE CAMARGO *et al.*, 2010; MOORMAN, 2016; PIETERS; CARROLL, 2010). A LLA é uma neoplasia de precursores linfoides, caracterizada pelo acúmulo clonal destas células na medula óssea (MO). Estes precursores hematopoéticos sofrem uma parada maturativa no estágio de linfoblasto da via normal de diferenciação celular. O descontrole dos processos de maturação/diferenciação e proliferação se deve principalmente a ocorrência de alterações genético-moleculares em genes mestre que regulam estas vias (MULLIGHAN, C. G., 2012). Em resumo, estes eventos culminam no bloqueio da hematopoese normal, o que, na maioria das vezes, resulta em anemia, neutropenia, trombocitopenia e/ou infiltração de células leucêmicas em outros tecidos. Os pacientes podem apresentar infiltração de células blásticas no sistema nervoso central (SNC), adenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia e/ou infiltrações tumorais em pele, testículos ou ovários (FARHI; ROSENTHAL, 2000; KEBRIAIEI; ANASTASI; LARSON, 2002).

As alterações genéticas que caracterizam as LLAs podem ser consideradas como eventos primários ou secundários. As anormalidades primárias são responsáveis pelo surgimento de um clone pré-leucêmico e, subsequentemente, a aquisição e o acúmulo de alterações secundárias promovem o estabelecimento e o desenvolvimento da leucemia propriamente dita. Estudos clássicos demonstraram que um clone pré-leucêmico pode permanecer latente durante anos até o diagnóstico da LLA (GREAVES, M., 2006). Por exemplo, estudos de leucemia em gêmeos monozigóticos demonstraram a origem intrauterina de algumas LLAs infantis através do rastreamento e, subsequente, identificação de fusões gênicas específicas, de alta-hiperdiploidia e de rearranjos clonotípicos de imunoglobulina (Ig) e/ou de receptores de célula - T (TCR) em cartões de filtro neonatais (testes do pezinho) (GREAVES, M., 2006; HONG *et al.*, 2008). A hipótese de Greaves para o desenvolvimento da leucemia mais comum da infância, a LLA comum (CD10+), consiste na ideia de que clones pré-leucêmicos surgem ainda na fase intrauterina e que a exposição tardia às infecções comuns da infância, causaria à aquisição de alterações secundárias nos clones pré-leucêmicos (GREAVES, M., 2006;2018). Anormalidades primárias na LLA são, muitas vezes,

translocações cromossômicas que resultam em genes de fusão quiméricos, ou aneuploidias (ganho ou perda de múltiplos cromossomos inteiros), enquanto anormalidades secundárias são geralmente alterações de número de cópias (CNA) ou mutações pontuais. As anormalidades primárias estão, por definição, presentes em todas as células do clone leucêmico e são cruciais para o desenvolvimento da LLA. Por outro lado, as anormalidades secundárias estão presentes apenas em um subconjunto das células leucêmicas e podem dar origem a uma arquitetura de ramificação sub-clonal mais complexa. Além disso, as alterações primárias estão frequentemente associadas com o risco prognóstico enquanto o valor prognóstico das alterações secundárias é, muitas vezes, contexto-dependente (por exemplo, depende da presença de alterações primárias, tipo de tratamento, idade do paciente) (ANDERSON *et al.*, 2011).

Aproximadamente 85% dos casos pediátricos de LLA são de células precursoras B (LLA-CPB) e ~15% de célula - T (LLA-T). De modo geral, a subclassificação das LLA-CPB inclui a detecção das alterações primárias (cromossômicas e moleculares) que são capazes de estratificar pacientes em diferentes grupos de risco. Esta detecção pode ser feita através da combinação de citogenética convencional/clássica, hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e da reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Além disso, técnicas como amplificação dependente da ligação de sondas múltiplas (MLPA), microarranjos para a detecção do número de cópias de DNA e sequenciamentos de próxima geração são cada vez mais utilizados para detectar biomarcadores moleculares novos (MOORMAN, 2016).

Estes biomarcadores moleculares podem ser utilizadas para monitorizar a resposta do paciente à terapia, juntamente com o regime de tratamento, idade, contagem de leucócitos (WBC) e monitoramento de doença residual mínima (DRM); o perfil genético da LLA é um dos principais fatores determinantes para desfecho clínico, especialmente para o risco de recaída (PUI; EVANS, 2006). Melhorias na concepção e execução de protocolos de primeira linha para LLA pediátrica aumentaram significativamente a sobrevida dos pacientes ao longo das últimas quatro décadas. Apesar destes avanços, 15-20% das crianças com LLA apresentam recidiva da doença (MITCHELL *et al.*, 2009). Diversos grupos de estudos clínicos propuseram classificações de risco prognóstico. Por exemplo, de acordo com os critérios de classificação de risco proposto pelo NCI (*National Cancer Institute*), pacientes com idade  $\leq 12$  meses e/ou  $\geq 120$  meses com leucometria  $> 50.000$  céls/mm<sup>3</sup> ao diagnóstico são classificados como alto risco e pacientes com idade de 13-120 meses com leucometria  $\leq 50.000$  céls/mm<sup>3</sup> são classificadas como risco padrão (SMITH *et al.*, 1996).

### 1.1.1 Classificação imunofenotípica da leucemia linfoblástica de células precursoras B

A LLA é classificada a partir do aspecto morfológico, imunofenotípico, citogenético e genético-molecular dos blastos. Estes parâmetros permitem a estratificação de risco prognóstico, asseguram a escolha da terapia mais adequada e auxiliam no monitoramento da DRM. Do ponto de vista cito-morfológico e imunofenotípico, as células da LLA correspondem aos diferentes estágios de maturação dos precursores das linhagens linfoides B e T.

A imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) é de extrema importância no diagnóstico das LLAs porque permite elucidar se a população de células predominante na amostra é normal ou anômala; a qual linhagem pertence (B ou T), se as células são imaturas ou maduras. Além disso, permite a investigação de DRM em diferentes estágios do tratamento dos pacientes. Para tais abordagens, a utilização de amostras de MO é mais informativa quando comparada às investigações em sangue periférico (SP), uma vez que a MO apresenta uma melhor representação de múltiplas linhagens hematopoéticas com vários estágios maturativos (BENE *et al.*, 1999; BENE *et al.*, 1995; NOORDZIJ *et al.*, 2002).

O grupo *European Group for Immunological Characterization of Leukemias* (EGIL) propôs em 1995 uma classificação para as LLAs de acordo com a expressão de antígenos celulares. Essa classificação se baseia em critérios imunofenotípicos, a partir de painéis de marcadores monoclonais (BENE *et al.*, 1995). Anualmente, tomando como base a proposta do grupo EGIL, o consórcio *Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica* (AIEOP) e o grupo *Berlin-Frankfurt-Münster* (BFM) – AIEOP-BFM realiza um extenso esforço de padronização e validação entre nove laboratórios de referência que colaboraram na caracterização imunofenotípica da LLA pediátrica (DWORZAK *et al.*, 2017). Além disso, Organização Mundial de Saúde (OMS) incorporou a identificação de alterações citogenético-moleculares na subclassificação das LLAs (ARBER *et al.*, 2016). O Quadro 1.1 mostra a classificação das LLAs de linhagem B em subtipos de acordo com seu estágio de maturação. A LLA-CPB pode ser agrupada em quatro subtipos que correspondem a diferentes níveis de maturação: (1) o subtipo LLA pró-B é menos comum e tem como característica imunofenotípica a ausência de CD10, apresentando um nível de maturação mais precoce; (2) o subtipo LLA comum é o subtipo mais frequente, apresentando marcadores imunofenotípicos específicos de células - B, tais como CD19, CD22, TdT, CD79a, CD34, CD10 (CALLA) e expressão negativa da imunoglobulina (IgM) de superfície e/ou citoplasmática; e o subtipo LLA pré-B apresenta um maior nível de maturação e é

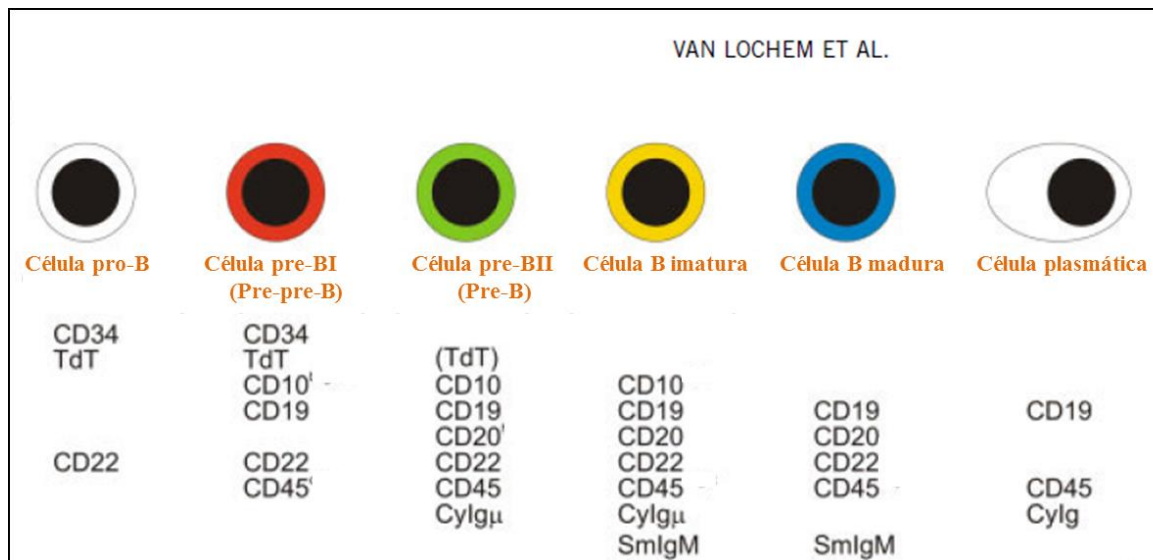
caracterizado pela expressão de IgM citoplasmática (BENE, 2005; SWERDLOW et al., 2008) (Figura 1.1).

**Quadro 1. 1.** Painel de marcadores que estabelece a classificação dos subtipos celulares nas LLA

Classificação	Imunofenotipagem	Frequência	
		Adultos*	Crianças**
LLA de linhagem B	CD19+ e/ou CD79a+ e/ou CD22+		
BI (Pró-B)	Sem expressão de outros antígenos	11%	5-9%
BII (B comum)	CD10+	49%	53-65%
BIII (pré-B)	IgM citoplasmático	12%	14-20%
BIV (B madura)	Cadeia $\kappa+$ ou $\lambda+$ (citoplasma ou superfície)	2-4%	2-3%

\*Gökbuget *et al* 2000., \*\*Yamamoto *et al.*, Rego, EM *et al.* 1996; Ludwig, W *et al.* 1993.

O antígeno pan-hematopoético CD45 pode apresentar expressão de intensidade bastante variável e o perfil da sua expressão auxilia na discriminação entre células leucêmicas e não leucêmicas. Geralmente, nos blastos, o CD45 é expresso com intensidade diminuída, sendo negativo em cerca de 20% dos casos de LLA-CPB. Na imunofenotipagem por CFM, quando CD45 é usado em combinação com as características de dispersão de luz SSC (complexidade interna, citoplasmática e nuclear) e FSC (tamanho celular), permite a identificação de várias populações (BOROWITZ *et al.*, 1993). A expressão do CD45 é usada para o diagnóstico diferencial da maioria das outras neoplasias não-hematológicas, como neuroblastoma, carcinoma ou sarcoma (BENE, 2005; BENE *et al.*, 1995).



**Figura 1. 1.** Estágios de diferenciação para desenvolvimento normal de células B na MO. Presença dos principais marcadores imunofenotípicos em cada estágio. (Adaptado de Van Lochem *et al.*, 2004).

## 1.2 Associação fenótipo - genótipo nas leucemias linfoblásticas agudas de células precursoras B

As aberrações cromossômicas são de grande importância para a classificação de risco e prognóstica em LLAs-CPB. Embora existam diversas evidências que o genótipo se reflete no imunofenótipo das LLAs-CPB, não há concordância absoluta entre estas duas categorias (HRUSAK; PORWIT-MACDONALD, 2002; SECKER-WALKER *et al.*, 1997).

Em vários estudos é possível observar a implementação de testes otimizados que levam em consideração o nível de expressão de várias moléculas avaliadas por CFM. Considerando que a expressão de uma única molécula raramente pode prever um subtipo genético molecular, esses algoritmos usam a correlação de determinados antígenos para prever a presença de determinado marcador molecular resultando em potenciais ferramentas de diagnóstico. Dentro deste contexto, a imunofenotipagem leva em consideração vários parâmetros que descrevem a expressão de uma determinada molécula. Os parâmetros mais utilizados são os percentuais de células positivas juntamente com a intensidade e/ou a homogeneidade da expressão do antígeno e isso é possível através das técnicas de conjugação dos anticorpos aos fluorocromos (DE ZEN *et al.*, 2000; TABERNERO *et al.*, 2001).

Rotineiramente, dentro dos laboratórios de diagnóstico e pesquisa, existem duas estratégias de marcação, a primeira consiste na marcação intracitoplasmática com marcadores mais específicos das linhagens que são expressos prematuramente e/ou somente no citoplasma e a segunda estratégia consiste na combinação de marcadores presentes na membrana celular

que são responsáveis tanto pela classificação do subtipo como para as categorias genótípicas (BENE, 2005; BENE *et al.*, 1995).

Por outro lado, as técnicas moleculares também auxiliam na classificação das LLAs-CPB (MACINTYRE; DELABESSE, 1999). Na medida em que os marcadores moleculares são identificados, associações com idade, prognóstico, subtipo leucêmico e expressão antigênica se consolidam (HRUSAK; PORWIT-MACDONALD, 2002). Isso pode ser visto, por exemplo, nos dados gerados por Hrusak e colaboradores que nos permite estabelecer associações entre categorias genótípicas das LLAs e suas características imunofenótípicas. Um clássico exemplo é o dos casos com alterações no gene *KMT2A* (*MLL*), onde se observa células tipicamente CD9 positivas, CD34 positivas, TdT positivas, CD10 negativas e em alguns casos, observa-se a expressão aberrante de antígenos associados à linhagem mieloide, tais como CD15 e/ou CD65, e CD13 e/ou CD33 (LUDWIG *et al.*, 1998). Além disso, já é um consenso à correlação entre a presença de rearranjos do *KMT2A* e a expressão de NG2, uma molécula homóloga ao sulfato de condroitina reconhecida pelo anticorpo monoclonal 7.1, o qual pode ser detectado por CF (EMERENCIANO *et al.*, 2011; MAUVIEUX *et al.*, 1999).

O conhecimento destas associações entre genótipo e imunofenótipo se reflete em aplicações práticas que já são realidade em muitos laboratórios. É possível, por exemplo, monitorar pacientes com LLA durante e depois do tratamento, para a detecção de DRM, tanto para a identificação de marcadores aberrantes por CF como por técnicas de PCR e RT-PCR (MACINTYRE; DELABESSE, 1999; VAN DONGEN *et al.*, 1999).

No quadro abaixo (Quadro 1.2) proposto por Hrusak e colaboradores em 2002 podem ser vistas as categorias genótípicas de acordo com o status de diferenciação do imunofenótipo, frequência e perfil prognóstico.



**Quadro 1. 2.** Perfil imunofenotípico, frequência e perfil prognóstico das principais alterações em LLA-CPB

Alteração cromossômica	Lesão molecular	Características imunofenotípicas	Frequencia (%)	Perfil prognóstico
Hiperdiploidia	Maior dosagem gênica	Positivos: CD19, CD34, CD22, CD24, CD20 (fraco), TdT, CD66c, CD10 Negativos: CD45, cyt IgM, CD15, CD65, CD13, CD33, NG2	~25 (LLA-CPB)	Favorável
t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6-RUNX1</i>	Positivos: CD45, CD19, CD34, CD22, CD24, TdT, CD10, frequentemente CD13/ CD33 Negativos: CD20, cyt IgM, CD15, CD65, CD66c, NG2, CD135, CD9	~20 (LLA-CPB)	Favorável
Translocações na região 11q23	<i>KMT2A-r</i>	Positivos: CD45, CD19, CD34, TdT, CD15/CD65 (fraco), NG2, CD9 Negativos: CD22 (ou fraco), CD20, CD24, CD10, cyt IgM, CD13, CD33, cCD66	~85 (LLA de lactente) ~5 (LLA em geral)	Desfavorável
t(1;19)(q23;p13)	<i>TCF3-PBX1</i>	Positivos: CD45, CD19, TdT, CD20 (fraco), CD22, CD24, IgM CD9 Negativos: CD15, CD65, CD34, (ou fraco), cCD66, CD10 (ou fraco), cyt IgM, CD13, CD33, CD66c, NG2	~5 (LLA-CPB)	Desfavorável ou intermediário
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i>	Positivos: CD45, CD19, TdT, CD20 (fraco), CD22 (fraco), CD24, CD9, CD10, CD33, CD25, CD38 (fraco), cCD66 Negativos: IgM, CD15, CD65, CD10 (ou fraco), cyt IgM, CD13, CD33, NG2	~5 (LLA-CPB)	Desfavorável

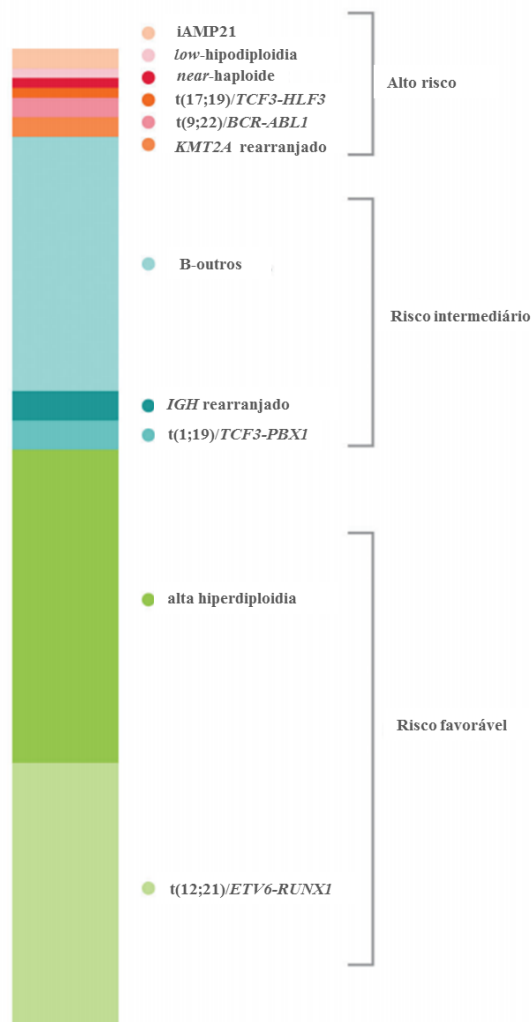
Adaptado de (HRUSAK; PORWIT-MACDONALD, 2002)(GREAVES, M. F.; WIEMELS, 2003).

### 1.2.1 Alterações citogenético-moleculares em leucemias linfoblásticas agudas de células precursoras B

Como descrito anteriormente, os clones leucêmicos são resultado do acúmulo de anomalias genético-moleculares em células pluripotentes ou progenitoras. Estas alterações desregulam o ciclo celular, promovem evasão da apoptose, bloqueio na diferenciação celular e contribuem para a expansão clonal de blastos leucêmicos. As anormalidades cromossômicas que correspondem biologicamente e clinicamente a diferentes subtipos de LLA-CPB podem ser divididas em duas categorias: (1) translocações cromossômicas que resultam na geração de fusões gênicas quiméricas, que por sua vez codificam proteínas com potencial leucemogênico ou modificam o nível de expressão de genes importantes no processo hematopoético; e (2) subgrupos de ploidia caracterizados por ganho ou perda de

múltiplos cromossomos de forma não-randômica. Além de desempenharem um importante papel na leucemogênese, as principais anormalidades somáticas primárias possuem implicações terapêuticas e prognósticas (MOORMAN, 2012;2016).

Aproximadamente 75% dos casos de LLA pediátrica apresentam alterações cromossômicas recorrentes que são relevantes tanto para a definição do diagnóstico da LLA como para a estratificação de risco terapêutico. A atual classificação da OMS de LLA-CPB define os seguintes subtipos citogenético-moleculares: *ETV6-RUNX1*, alta hiperdiploidia, *TCF3-PBX1*, *IGH* rearranjado, B-outros, *BCR-ABL1*, *KMT2A* rearranjado (*KMT2A-r*), *iAMP21*, alta hiperdiploidia e hipodiploidia (MOORMAN, 2016). Estes subtipos são categorizados de acordo com seu risco prognóstico como: risco padrão/favorável, risco intermediário e alto risco. A frequência das alterações mais comuns e a categorização de acordo com o risco prognóstico de cada grupo são mostradas na Figura 1.3.



**Figura 1. 2.** Frequência estimada das alterações mais comuns em LLA-CPB pediátrica. Além das frequências de cada alteração, a figura mostra também no esquema da direita quais grupos de risco prognóstico cada alteração pertencem. Risco favorável (*ETV6-RUNX1*, alta

hiperdiploidia); Risco intermediário (*TRCF3-PBX1*, Rearranjos em *IGH*, *B-others*); Alto risco (*KMT2A-r*, *BCR-ABL1*, *TCF3-HLF*, *near-hiperdiploidia*, *low-hipodiploidia*, *iAMP21* e Cariótipos complexos). Adaptado de (MOORMAN, 2016).

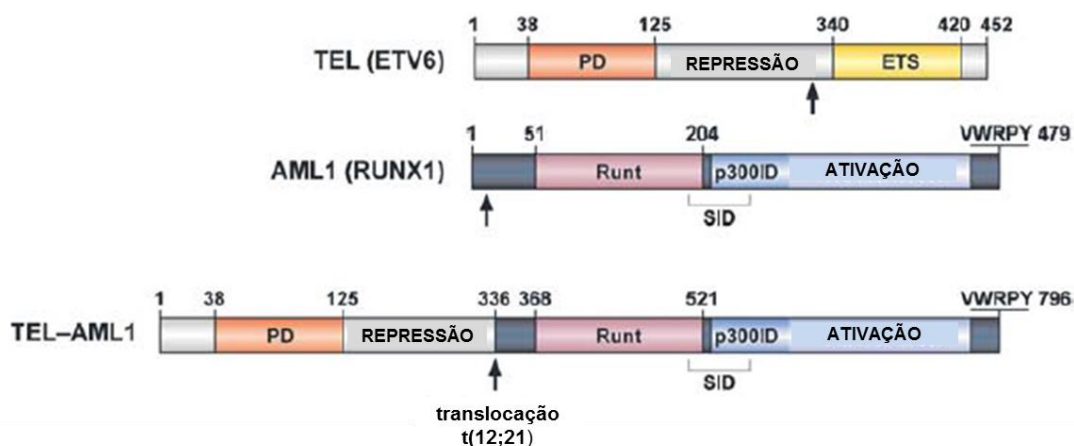
### **1.3 Translocação cromossômica t(12;21)(p13;q22) - *ETV6-RUNX1* (Transcrito direto)**

A translocação cromossômica t(12;21)(p13;q22) resulta no produto de fusão gênica que inclui a porção 5' do *ETV6* e quase toda a região codificante do fator de transcrição codificado pelo gene *RUNX1* (Figura 1.4) (GOLUB *et al.*, 1996; NORTH *et al.*, 2002). Quando constituído pelos éxons de 1 a 5 de *ETV6* com os éxons 2 a 8 de *RUNX1*, o transcrito de fusão apresenta uma sequência de aproximadamente 164 pares de base (pb), já quando constituído pelos éxons 1 a 5 de *ETV6* com os éxons 3 a 8 de *RUNX1*, 115 pb. A proteína quimérica ETV6-RUNX1 associada à leucemia consiste nas sequências TEL situadas na região amino-terminal do ETS DBD e todas as regiões funcionais conhecidas de AML1, incluindo a região RUNT DBD.

O fator de transcrição quimérico ETV6-RUNX1 conserva um domínio de interação essencial proteína-proteína do ETV6 e as sequências de ligação ao DNA e de regulação transcricional do RUNX1, também chamado de CBF ( $\alpha$ ) (GOLUB *et al.*, 1996). O fator de transcrição ETV6 é necessário para o retorno das células hematopoéticas progenitoras para seu local de origem na MO (AMOR *et al.*, 1998), enquanto o RUNX1 é o componente de ligação ao DNA do fator de transcrição heterodimérico - CBF( $\alpha$ )- mais CBF( $\beta$ ) chamado de fator de ligação ao núcleo, que exerce um papel central na regulação da hematopoese (LORSBACH; DOWNING, 2001; NORTH *et al.*, 2002).

ETV6 e RUNX1 são ambos necessários para a regulação da hematopoese normal e a proteína de fusão ETV6-RUNX1 pode desregular a expressão de *RUNX1* de forma a convertê-lo a um repressor transcricional. Um papel importante de ETV6-RUNX1 é a inibição da atividade transcricional que é normalmente iniciada quando RUNX1 se liga a regiões “*enhancers*” do DNA no núcleo (MELNICK *et al.*, 2000). Em condições fisiológicas, a ligação do RUNX1 a estes “*enhancers*” recruta outros fatores de transcrição e co-ativadores para esta região, e o complexo proteico resultante regula positivamente a transcrição. Este complexo inclui histonas acetilases, que adicionam grupos acetil às histonas ligadas ao DNA, causando assim mudanças na conformação da cromatina que intensificam a transcrição dos genes-alvo. Assim como RUNX1, a fusão leucêmica ETV6-RUNX1 é capaz de se ligar a sequências “*enhancers*”, mas ao invés de ativar a transcrição, ela recruta histonas desacetilases, que induzem o fechamento da estrutura da cromatina e, conseqüentemente, a

inibição da transcrição. Estas mudanças na cascata anormal de transcrição mediada por ETV6-RUNX1 alteram tanto a capacidade de auto-renovação como a de diferenciação das células-tronco hematopoéticas (NOTTA *et al.*, 2011; ZELENT; GREAVES; ENVER, 2004).



**Figura 1. 3.** Representação esquemática da fusão entre ETV6 e RUNX1.

As setas indicam os pontos de quebra e de fusão entre as sequências de TEL e AML1 como resultado da t(12; 21). Runt é o domínio que interage com o domínio PD de TEL. O domínio terminal, ETS se liga se liga à sequência de DNA de consenso, 5-GGAA/T-3 dentro de uma sequência de 9 - 10 pb nos genes-alvo. Os aminoácidos VWRPY estão presentes nas regiões carboxi-terminal (c-terminal) e podem ligar-se a co-repressores transcripcionais. Os números de 1 – 796 representam a posição dos aminoácidos que delimitam os domínios funcionais. O número 1 corresponde à primeira metionina. Na parte debaixo da figura, podemos então ver como fica a estrutura da oncoproteína de fusão TEL-AML1 (ETV6-RUNX1). Adaptado de Zelent, 2004.

ETV6-RUNX1 também causa a superexpressão do receptor de eritropoietina e ativação da sinalização a jusante de JAK-STAT. A presença de ETV6-RUNX1 promove a auto-renovação de progenitores de célula B, mas por si só não induz o surgimento da LLA propriamente dita. Este modelo, no qual há a necessidade da ocorrência e do acúmulo de alterações secundárias para o surgimento da leucemia é sustentado por estudos genômicos em LLA que tem identificado alterações submicroscópicas recorrentes em pacientes com *ETV6-RUNX1* incluindo deleções de fatores de transcrição fundamentais para a ontogenia da célula B, tais como, *PAX5del* e *EBF1del*, como também deleções do alelo não-rearranjado de *ETV6*.

Cerca de 30% dos casos *ETV6-RUNX1* apresentam deleção do alelo normal de *ETV6* (RAYNAUD *et al.*, 1996). Esta deleção parece desempenhar um importante papel na etiopatogênese da LLA-CPB pediátrica. Acredita-se, que a deleção do *ETV6* não-rearranjado

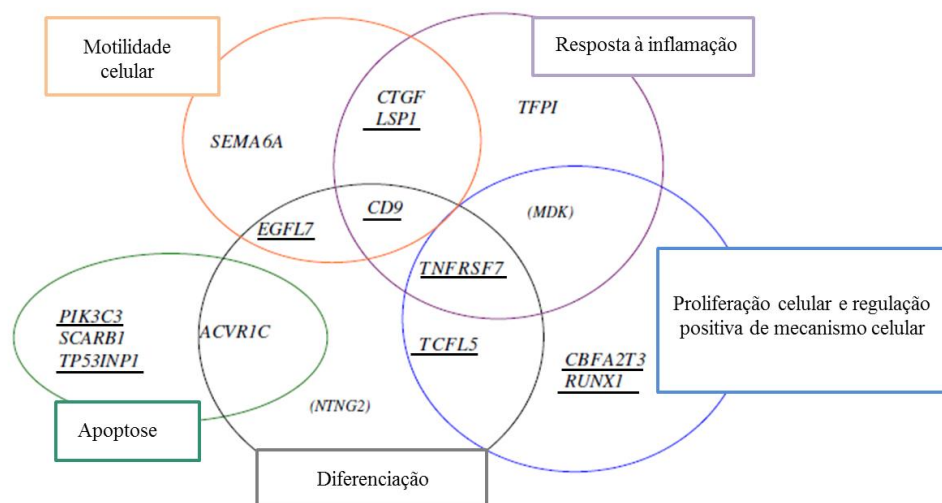
poderia conferir alguma vantagem seletiva nas células contendo a fusão *ETV6-RUNX1*, que pode estar relacionada a uma função supressora de *ETV6* e/ou a capacidade desta proteína de dimerizar com *ETV6-RUNX1* e reduzir sua atividade de transformação (GREAVES, M. F.; WIEMELS, 2003). Nestas leucemias, está cada vez mais evidente que, independentemente das alterações cromossômicas de origem intrauterina, o evento pós-natal ou as exposições que favorecem a ocorrência de alterações genéticas secundárias são cruciais para a maioria dos casos de LLA-CPB pediátrica (WIEMELS *et al.*, 1999).

Diferente de muitas translocações cromossômicas, a t(12:21) é citogeneticamente críptica, sendo assim, não pode ser visualizada por cariotipagem com bandeamento G e, por este motivo, foi somente detectada com, o uso da técnica de FISH em meados da década de 90. Pacientes com *ETV6-RUNX1* possuem excelente prognóstico e apresentam outros aspectos demográficos e laboratoriais como sexo feminino, idade jovem (entre 2-5 anos), baixa contagem leucocitária e imunofenótipo CD10+. Entretanto, alguns estudos relatam um prognóstico desfavorável para subgrupos específicos de pacientes com *ETV6-RUNX1*, havendo relatos de recaídas tardias em ~20% dos pacientes (MULLIGHAN, C. G., 2012). Estas recaídas, quando ocorrem, são observadas em pacientes que já concluíram o tratamento e estão frequentemente associados à presença de alterações adicionais, principalmente as que envolvem o alelo não-rearranjado de *ETV6* e genes reguladores do processo de diferenciação linfóide (*IKZF1*, *PAX5* e *EBF1*) (MULLIGHAN, C. G. *et al.*, 2008).

### **1.3.1. Relação genótipo-fenótipo em casos com *ETV6-RUNX1***

Como descrito anteriormente no Quadro 1.1, alguns marcadores apresentam expressão fraca ou negativa para certos grupos contendo marcadores moleculares específicos. Estudos recentes têm sugerido que essa condição pode ter um valor preditivo significativo, como por exemplo, a correlação entre a expressão fraca/negativa de CD9 com a fusão gênica *ETV6-RUNX1*. Geralmente, os blastos com *ETV6-RUNX1* expressam CD19 e CD34 positivos (BORKHARDT *et al.*, 1997), mas na maioria das células alteradas, observa-se uma alta expressão de CD10, e uma expressão fraca ou negativa de CD9. Além disso, também é muito comum a expressão positiva de CD13 e CD33 (BOROWITZ *et al.*, 1998; MCGREGOR; MCNEER; GURBUXANI, 2012). Gandemer e colaboradores investigaram o perfil de expressão gênica global de uma série de pacientes com *ETV6-RUNX1* para definir uma possível assinatura (de acordo com a ontologia gênica dos genes diferencialmente expressos) que caracterizasse este subtipo leucêmico. Com isso, cinco categorias de ontologia gênica foram reveladas: diferenciação celular, proliferação celular, apoptose, motilidade celular e resposta a inflamação. Dezesseis genes diferencialmente expressos foram associados a esses

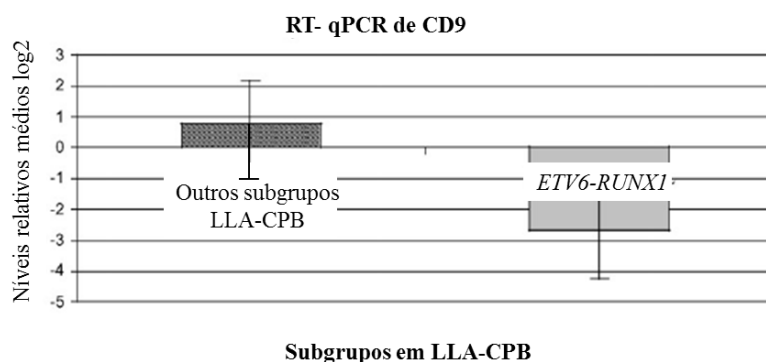
processos biológicos, sendo capazes de caracterizar as leucemias *ETV6-RUNX1*<sup>+</sup> (Figura 1.5). A expressão aumentada de *RUNX1*, *CBFA2T3*, *TCFL5*, *TNFRSF7* e a baixa expressão/negatividade concomitante de CD9 podem caracterizar processos de proliferação celular e diferenciação nas linhagens hematopoéticas (GANDEMER *et al.*, 2007).



**Figura 1. 4.** Representação esquemática de genes associados com a ontologia gênica.

Cada círculo representa grupos de genes, compartilhando propriedades comuns em processos biológicos relevantes. Foram identificadas cinco categorias de ontologia gênica: diferenciação celular, proliferação celular, apoptose, mobilidade celular e resposta a inflamação. Essas categorias estão representadas por 16 genes anotados. Nove (sublinhados) foram previamente estudados e escolhidos como sendo os mais relevantes biologicamente, capazes por si próprios de segregar pacientes *ETV6-RUNX1* positivos de pacientes *ETV6-RUNX1* negativos. Adaptado (GANDEMER *et al.*, 2007).

Em 2009, este mesmo grupo estudou mais detalhadamente a correlação entre a baixa expressão de CD9 e *ETV6-RUNX1*. A molécula CD9 foi escolhida por estar envolvida em processos de motilidade celular, modulação da adesão celular e progressão tumoral, todos associados à progressão da LLA-CPB e invasão extramedular (GANDEMER *et al.*, 2010). Além disso, a proteína CD9 também está localizada na superfície celular dos linfoblastos B e sua expressão é aberrante em comparação com a maturação normal das células - B (BOROWITZ *et al.*, 1998; WEIR *et al.*, 1999). Gandemer e colaboradores confirmaram que a expressão fraca/negativa de CD9 está diretamente correlacionada com a presença de *ETV6-RUNX1* (Figura 1.6).



**Figura 1. 5.** Níveis de transcrição CD9 em pacientes diagnosticados com LLA-CPB.

O CD9 é significativamente ( $P < 0,01$ ) menos expresso em amostras *ETV6-RUNX1* positivas em comparação com amostras de outros subgrupos em LLA-CPB. Adaptado (GANDEMER *et al.*, 2010).

Nossos dados anteriores também mostraram o potencial da expressão celular do CD9 em prever a presença de *ETV6-RUNX1*. Através de análise de curva ROC foi possível estabelecer o melhor ponto de corte para prever a presença da fusão. Para o percentual de células marcadas o valor estabelecido foi 64% com uma acurácia de 0,80. Enquanto o melhor ponto de corte para intensidade média de fluorescência (IMF) de CD9 foi 12,52 com uma acurácia de 0,84. Sendo assim, a análise qualitativa (percentual de células marcadas) de CD9 mostrou uma sensibilidade de 99,0% e uma especificidade de 88,2% para prever *ETV6-RUNX1*. Quando analisado por IMF, o resultado mostrou 72% de sensibilidade e 86,3% de especificidade (BLUNCK, CB *et al.*, 2018).

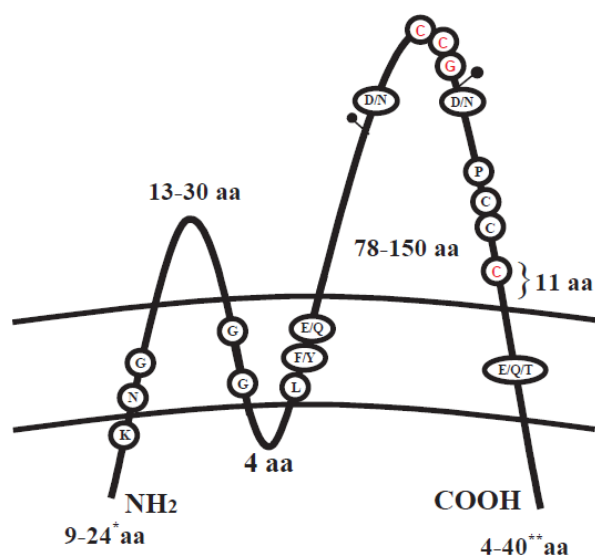
### 1.3.2. CD9 em LLA-CPB com *ETV6-RUNX1*

CD9 é uma proteína pertencente à superfamília de tetraspanina. As tetraspaninas são proteínas pequenas com uma estrutura terciária altamente conservada que consiste em 4 domínios transmembrana (pequenos e grandes, envolvidas na interação proteína-proteína com proteínas localizadas lateralmente) e curtas caudas intracitoplasmáticas nas extremidades amino e carboxi (estão ligadas ao citoesqueleto e às moléculas de sinalização). (Figura 1.7) (BERDITCHEVSKI, 2001).

Os domínios transmembranares permitem a associação de tetraspaninas adicionais para formar a rede de tetraspaninas onde as integrinas estão incluídas. Funcionam como organizadores de superfície pelo agrupamento e interconexão de proteínas específicas de superfície celular. São também moléculas supressoras de metástases. A redução na expressão

de tetraspaninas se correlaciona com um aumento no potencial invasivo e metastático (BERDITCHEVSKI, 2001; MAECKER; TODD; LEVY, 1997).

Como já descrito anteriormente, o antígeno CD9 tem sido implicado em processos fisiológicos, como motilidade e adesão. Esta proteína também desempenha um papel crítico em processos patológicos, incluindo progressão tumoral e metástase em tumor sólido, como câncer de próstata (WANG *et al.*, 2007; ZOLLER, 2009). No entanto, seus modos de ação permanecem desconhecidos e são altamente dependentes do tipo celular (HEMLER, 2005; MAECKER *et al.*, 1997). Em células hematopoéticas, a expressão de CD9 depende do estágio de diferenciação e da célula.



**Figura 1. 6.** Representação esquemática de uma tetraspanina genérica.

A sequência CCG e a posição do último resíduo de cisteína (identificado de vermelho) no grande circuito extracelular são conservadas em todas as tetraspaninas. A maioria das tetraspaninas (com exceção de CD81 e NET-2) tem um sítio consenso para a glicosilação N-ligante no grande *loop* extracelular (LECL) (como marcado). Observa-se que um local de glicosilação para CD9 foi mapeado no pequeno *loop* extracelular. \* A região N-terminal da oculospanina contém 78 resíduos. \*\* As regiões C-terminal de RDS-1, ROM-1 e NET-2 contêm 63, 65 e 63 resíduos, respectivamente (BERDITCHEVSKI, 2001).

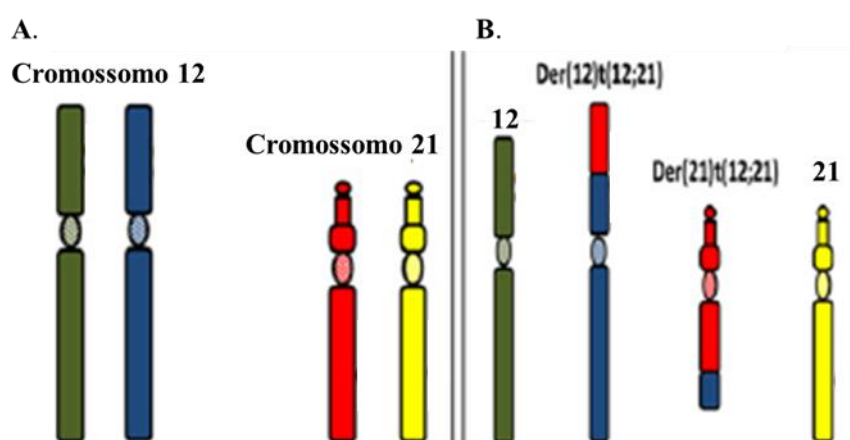
Em modelos murinos de leucemia, CD9 aumenta a capacidade metastática e diminui a sobrevivência de camundongos foram transplantados com células leucêmicas pré-B (LEUNG *et al.*, 2011). Em um estudo recente foi investigado o papel de CD9 na progressão da LLA-CPB através de sua desregulação em células REH (*ETV6-RUNX1* positivas) e NALM6. Em células REH, a expressão de CD9 foi associada a níveis mais elevados de adesão celular à



fibronectina e à transição mediada por CXCR4, através de uma via dependente de RAC1. As células precursoras B expressam uma gama limitada de receptores de quimiocinas, e CXCR4 é uma das mais expressivas. Em experimentos *in vivo* com camundongos NSG, foi mostrado que a expressão reduzida de CD9 aumentou consideravelmente a sobrevivência do animal e diminuiu a capacidade de disseminação do enxerto. Estes resultados apontam que células CD9-positivas são mais tumorigênicas do que células CD9-negativas.

### 1.3.3. Translocação cromossômica t(12;21)(p13;q22) – *RUNX1-ETV6* (Transcrito recíproco)

Na translocação t(12;21), a fusão recíproca é formada no der(12)t(12;21) (AL-SHEHHI *et al.*, 2013). O transcrito recíproco é formado pelo éxon 1 ou os exons 1 e 2 de *RUNX1* (onde nenhum domínio funcional está presente) e os últimos três exons de *ETV6*, que contém o domínio ETS. No *ETV6*, identificou-se um domínio de repressão que abrange o ETS e os 50 aminoácidos imediatamente a montante do domínio ETS (LOPEZ *et al.*, 1999). O transcrito recíproco *RUNX1-ETV6* apresenta aproximadamente 134 pb, sendo constituído pela junção dos exons 1-2 de *RUNX1* com os exons 6 a 8 de *ETV6* (VAN DONGEN *et al.*, 1999).

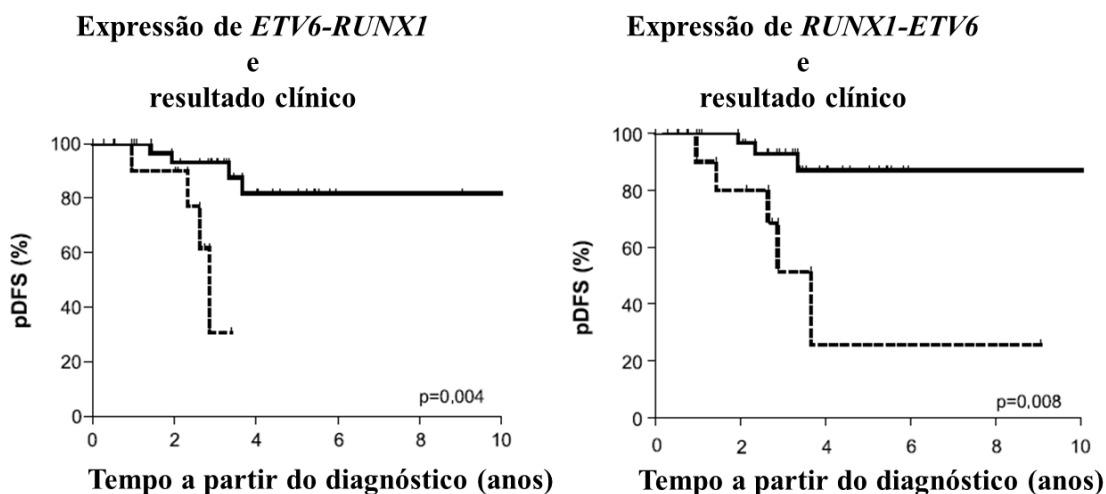


**Figura 1. 7.** Representação esquemática das translocações envolvendo os cromossomos 12 e 21.

A) Cromossomo 12 em verde e azul e cromossomo 21 em vermelho e amarelo. B) Cromossomos 12 e 21 normais (não envolvidos na translocação) em verde e amarelo, respectivamente. E a representação do cromossomo com o der(12)t(12;21) que compreende a fusão recíproca *RUNX1-ETV6* e do cromossomo com o der(21)t(12;21) que compreende a fusão direta *ETV6-RUNX1*. Adaptado (AL-SHEHHI *et al.*, 2013).

Estudos sugerem que as proteínas ETS com atividade de repressão transcricional (como ETV6) estão principalmente envolvidas na garantia do equilíbrio entre proliferação celular e diferenciação em diferentes tipos celulares e estágios de desenvolvimento, em resposta a sinais extracelulares (MAVROTHALASSITIS; GHYSDAEL, 2000). O domínio ETS isolado de *ETV6*, *in vitro*, liga os sítios convencionais de ligação ETS e regula a transcrição dirigida pelo sítio ETS (POIREL *et al.*, 1997). A proteína quimérica reversa (RUNX1-ETV6) pode então atuar de modo similar a um domínio ETS isolado e competir pela ligação com o ETV6 endógeno, ou ainda atuar do mesmo modo que ETV6 na ausência da proteína ETV6 selvagem (ARNAUD *et al.*, 2015).

Um estudo realizado por Stams e colaboradores em 2005 demonstrou que o aumento de expressão de *RUNX1-ETV6* está associado a uma maior probabilidade de recaída em pacientes com t(12;21) (Figura 1.10). Além disso, através de uma análise multivariada, onde foram avaliadas além da expressão gênica de *RUNX1-ETV6*, idade e leucometria, observamos que apenas a alta expressão do transcrito recíproco pode ser considerada um fator independente de mau prognóstico (STAMS *et al.*, 2005).



**Figura 1. 8.** Papel da expressão de *ETV6-RUNX1* e *RUNX1-ETV6* na sobrevida de pacientes com LLA-CPB.

**A)** A alta expressão de *ETV6-RUNX1* está associada a uma menor sobrevida livre de doença em comparação com a sobrevida de pacientes com baixa expressão (25% versus 5%; pDFS em 3 anos; Pcox=0,004; variável contínua Pcox=0,003). **B)** Alta expressão de *RUNX1-ETV6* está associada a uma menor sobrevida livre de doença em comparação com a sobrevida de pacientes com baixa expressão (25% versus 6%; pDFS de 3 anos; Pcox=0,008; Pcox variável contínua=0,001). Linha tracejada: alta expressão; linha sólida: baixa expressão (STAMS *et al.*, 2005).

Em 2015, Al-Shehhi e colaboradores caracterizaram duas novas anormalidades que estão envolvidas com a ocorrência da fusão recíproca; deleção do der(12)t(12;21) e a duplicação do gene de fusão *RUNX1-ETV6* em casos *ETV6-RUNX1* positivo. Ambas as anormalidades podem alterar os níveis de expressão de *RUNX1-ETV6* (AL-SHEHHI *et al.*, 2013).

#### **1.3.4. Alterações adicionais ou anormalidades genéticas secundárias**

A presença de alterações de número de cópias (*Copy number alterations*- CNAs) em genes comprometidos com o desenvolvimento de células - B tem sido associada a um aumento na taxa de recaída e a um prognóstico inferior em subgrupos de pacientes com LLA-CPB (VAN DER VEER *et al.*, 2013). Alguns estudos identificaram várias microdeleções que acometem especificamente genes envolvidos nas vias de sinalização da diferenciação de células - B como, por exemplo, *IKZF1*, *ETV6*, *PAX5* e *EBF1*; genes envolvidos no controle do ciclo celular e supressão tumoral como, por exemplo, *CDKN2A/B*, *BTG1* e *RBI* e receptores de citocina localizados na região pseudo-autossômica 1 (PAR1) como, por exemplo, *CRLF2*, *IL3RA*, *CSF2RA* e *SHOX* (MULLIGHAN, CHARLES G. *et al.*, 2007). A frequência de cada CNA varia de acordo com as anormalidades genéticas primárias dos diferentes subtipos de LLA-CPB (SCHWAB *et al.*, 2013).

A relevância prognóstica das CNAs em LLA-CPB tem sido objeto de estudos em diversas coortes de diferentes países, incluindo o Brasil (BARBOSA *et al.*, 2015; IRVING *et al.*, 2016; MULLIGHAN, C. G. *et al.*, 2008; YAMASHITA *et al.*, 2013). Em estudo prévio, nosso grupo determinou a frequência e a relevância clínica de CNAs nos genes *IKZF1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PAX5*, *EBF1*, *ETV6*, *BTG1*, *RBI* e *PAR1* em uma coorte brasileira de pacientes pediátricos com LLA-CPB. Os genes que mais frequentemente apresentaram CNA foram *CDKN2A/2B*, *PAX5*, *ETV6* e *IKZF1*, enquanto que as deleções nas regiões *PAR1*, *BTG1* e *EBF1* foram menos frequentes. O número de deleções de genes foi associado com idade, leucometria e também com a classificação de risco prognóstico proposto pelo NCI (BARBOSA *et al.*, 2015). Além disso, outros estudos mostraram que 73,9% dos pacientes apresentam deleções concomitantes nestes genes. Por exemplo, a deleção de *PAX5* é frequentemente acompanhada por deleção em *CDKN2A/2B*, *PAX5* (9p13.2), *IKZF1* (7p12.2) e *ETV6* (12p13.2). As deleções concomitantes de *PAX5* e *CDKN2A/2B* sugerem que eles são alvos comuns na patogênese da LLA-CPB (KIM *et al.*, 2011; SCHWAB *et al.*, 2013).

## 2 JUSTIFICATIVA

A LLA-CPB é uma doença consideravelmente heterogênea em termos imunofenotípicos e genético-moleculares, o que resulta em vários subtipos com associações de risco prognóstico distintos. Para seu melhor entendimento etiológico e clínico são necessárias diferentes abordagens analíticas e multidisciplinares. Sabe-se também que a identificação precoce de marcadores moleculares ao diagnóstico pode auxiliar na estratificação de risco dos pacientes e desta maneira direcioná-los para protocolos de tratamento mais adequados.

Como descrito anteriormente, a translocação  $t(12;21)(p13;q22)$  resulta em dois produtos de fusão: o transcrito direto (*ETV6-RUNX1*) e o transcrito recíproco *RUNX1-ETV6*. Sabe-se que pacientes com *ETV6-RUNX1* são, em geral, estratificados no grupo de prognóstico favorável. Porém, cerca de 20% destes pacientes recaem e as causas para estas diferenças na resposta ao tratamento ainda não foram elucidadas (AMPATZIDOU *et al.*, 2018). É possível, portanto, que as alterações secundárias associadas com a translocação  $t(12;21)$  possam impactar no prognóstico destes pacientes.

Compilando estas informações, nossa hipótese é que pacientes com *RUNX1-ETV6* possam ter um perfil clínico-laboratorial único. Além disso, acreditamos que este perfil esteja associado com o desfecho clínico, em especial, com a ocorrência das recaídas. Entendemos, portanto, que é de fundamental importância definir o perfil molecular destes pacientes, determinando os níveis do transcrito recíproco, a frequência de alterações secundárias neste grupo, bem como, avaliando o valor prognóstico deste biomarcador.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

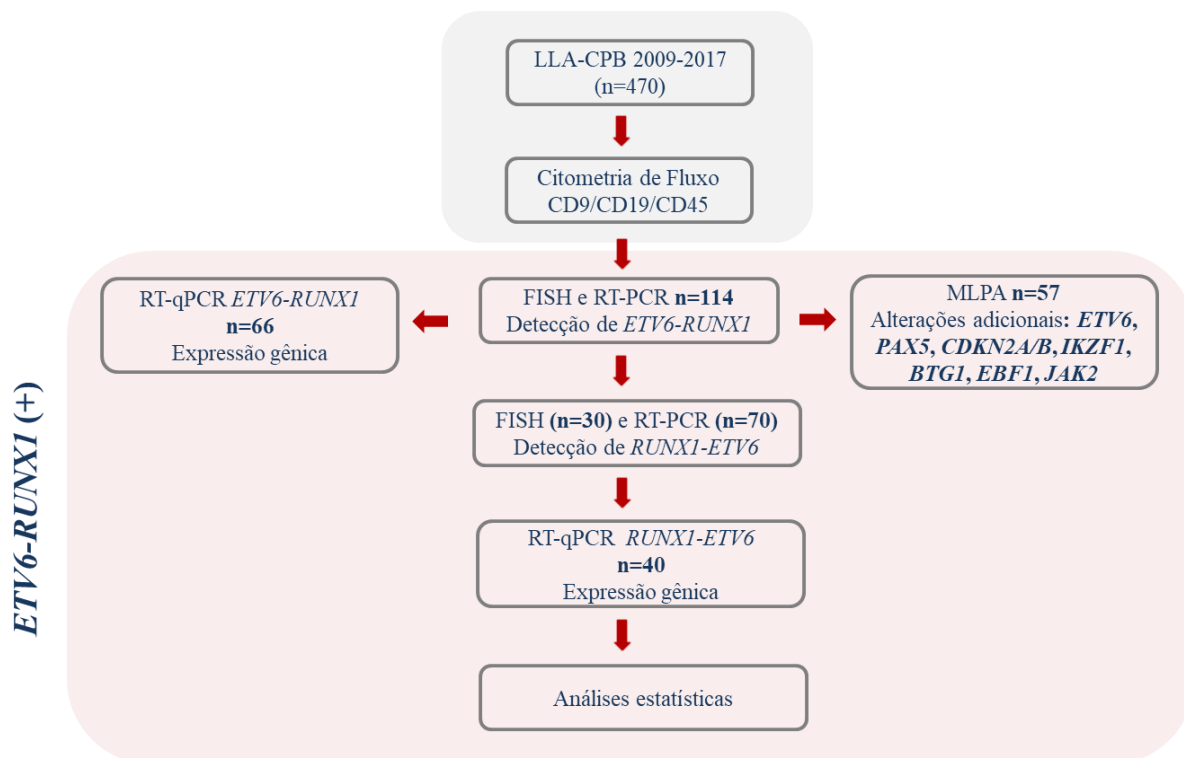
Caracterizar os padrões moleculares de pacientes com *RUNX1-ETV6* em pacientes com LLA-CPB *ETV6-RUNX1*<sup>+</sup>.

#### **3.2 Objetivos secundários**

- Avaliar a correlação entre a presença de *RUNX1-ETV6* e as características clínico-laboratoriais de crianças com LLA-CPB;
- Quantificar a expressão dos transcritos direto (*ETV6-RUNX1*) e recíproco (*RUNX1-ETV6*) nas amostras de LLA-CPB pediátricas;
- Investigar a possível correlação entre marcadores imunofenotípicos e a expressão do transcrito recíproco;
- Investigar a correlação entre as alterações adicionais vistas por MLPA e a expressão do transcrito recíproco;
- Correlacionar as alterações adicionais e a classificação de risco prognóstico;
- Avaliar o impacto da presença ou dos níveis de expressão do transcrito recíproco na sobrevida global (SG) e na sobrevida livre de eventos (SLE) dos pacientes estudados.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Casuística



Desenho do estudo e esquema metodológico neste estudo.  
CEP-INCA; CAAE: 33243214.7.0000.5274; Número do Parecer: 1.102.908.

**Critério de exclusão:**

- Síndromes congênitas
- Outras alterações comuns em LLA-CPB

**Figura 4. 1.** Desenho do estudo e esquema metodológico neste estudo.

CEP-INCA; CAAE: 33243214.7.0000.5274; Número do Parecer: 1.102.908.

Foram incluídas 114 amostras de pacientes diagnosticados com LLA-CPB com *ETV6-RUNX1*, com idade entre 0 e 18 anos, provenientes de 11 estados do Brasil (Alagoas, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Piauí, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo). As amostras de aspirados de MO e/ou SP foram encaminhadas para o Programa Hematologia e Oncologia Pediátrica (PHOP) na Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, para testes diagnósticos e para pesquisas de marcadores imuno-moleculares no período de 2009 a 2017.

As amostras enviadas continham 2 ml ou mais do aspirado de MO e/ou SP em EDTA para imunofenotipagem e 1 - 2 ml em heparina para citogenética-molecular. Foram também coletados os dados demográficos e clínicos de cada paciente.

**Crítérios de exclusão:** Pacientes portadores de síndromes genéticas, como por exemplo, síndrome de Down.

**Classificação de risco:** Os critérios descritos pelo NCI utilizados para classificação de risco foram: (i) Alto risco: leucometria  $> 50 \times 10^9$  céls/L ou idade  $\leq 12$  meses ou  $> 120$  meses; (ii) Risco padrão: leucometria  $\leq 50 \times 10^9$  céls/L ou idade entre 13 – 120 meses (SMITH *et al.*, 1996).

## 4.2 Ética em pesquisa

Este estudo foi desenvolvido como parte integrante do projeto “*Estudo multi-institucional das leucemias infantis: contribuição dos marcadores imuno-moleculares na distinção de seus subtipos e de fatores de riscos etiopatogênicos*” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer – INCA (CEP-INCA; CAAE: 33243214.7.0000.5274; Número do Parecer: 1.102.908).

## 4.3 Imunofenotipagem

### 4.3.1. Painéis de anticorpos monoclonais (AcMo) utilizados na caracterização imunofenotípica dos casos

Para caracterização do subtipo da LLA, utilizou-se combinações de três a seis anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados aos seguintes fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), Proteína piridina de clorofila (PerCP), Ficoeritrina cianina (PE-CY7), alofocianina (APC) e alofocianina H7 (APC-H7). Inicialmente, para a definição de linhagem, foi utilizado um painel de triagem, com marcações de AcMo intracitoplasmáticos (c) (aMPO<sup>FITC</sup>, CD22+CD79a<sup>PE</sup>, CD3<sup>APC</sup>) e de membrana (CD19<sup>PE-CY7</sup>, CD19<sup>PE</sup>, CD45<sup>PERCP</sup>, CD7<sup>FITC</sup>, CD34<sup>APC</sup>). A marcação positiva para CD22, CD79, CD19, e negativa para aMPO e CD3 identifica casos de LLA-CPB. Após a confirmação da linhagem B, foi utilizado um painel complementar (Quadro 4.1) para caracterizar o subtipo de LLA-CPB, incluindo o marcador CD9.

**Quadro 4. 1.** Painel para caracterização do subtipo de LLA-CPB.

	FITC	PE	PERCP	PE-CY7	APC	APC-H7
Tubo 1	CD9	CD22	CD45	CD19	CD10	-
Tubo 2	CD20	CD10	CD45	CD19	CD34	CD38
Tubo 3	-	cIgM	CD45	CD19		
Tubo 4	CD58	CD66C	CD45	CD19	CD123	
Tubo 5		CD13+CD33	CD45	CD19		

c - citoplasmático

### 4.3.2. Técnica para marcação imunofenotípica

Para a marcação de AcMos de membrana e intracitoplasmático no mesmo tubo, (como exemplo o tubo de triagem e o tubo 3 do Quadro 4.1) utilizou-se em cada tubo, 50 µL da amostra de MO. Primeiramente realizou-se a marcação dos AcMos de membrana (ex. CD19<sup>PE-CY7</sup>, CD45<sup>PerCP</sup>). Acrescentou-se aos tubos, as quantidades de AcMos previamente estabelecidas em titulações (volume de 1 - 10 µL). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 20 minutos no escuro à temperatura ambiente (TA). Após o tempo transcorrido, foram adicionados em cada tubo 1000 µL da solução de lise de hemácias *FacsLysing* (BD Biosciences) (diluída 1:10 em água Milli-Q). Em seguida, os tubos foram homogeneizados vigorosamente e incubados por 10 minutos no escuro à TA. As amostras foram então centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as amostras foram lavadas com 2 mL de PBS (1X), centrifugadas novamente, e o sobrenadante descartado. Para dar seguimento a marcação intracitoplasmática, foi necessário permeabilizar as células. Desta forma, acrescentou-se 50 µL de *Tween* 20 na concentração de 0,5% e homogeneizou-se a amostra vigorosamente para então acrescentar os AcMos (ex: CD3, CD22, CD79a e aMPO), nas respectivas quantidades tituladas. Incubou-se por 20 minutos à TA. Posteriormente, as amostras foram lavadas com 2 mL de *Tween* 20 a 0,1%, centrifugadas e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em 200 µL de PBS 1x e, em seguida, as amostras foram analisadas no citometro de fluxo.

Tanto para a marcação intracitoplasmática quanto para a marcação de membrana, foram adicionados tubos controles negativos, contendo as amostras avaliadas, que foram submetidos ao mesmo processo de marcação, porém não-marcadas com AcMos.

### 4.3.3. Padronização, aquisição e análise por citometria de fluxo

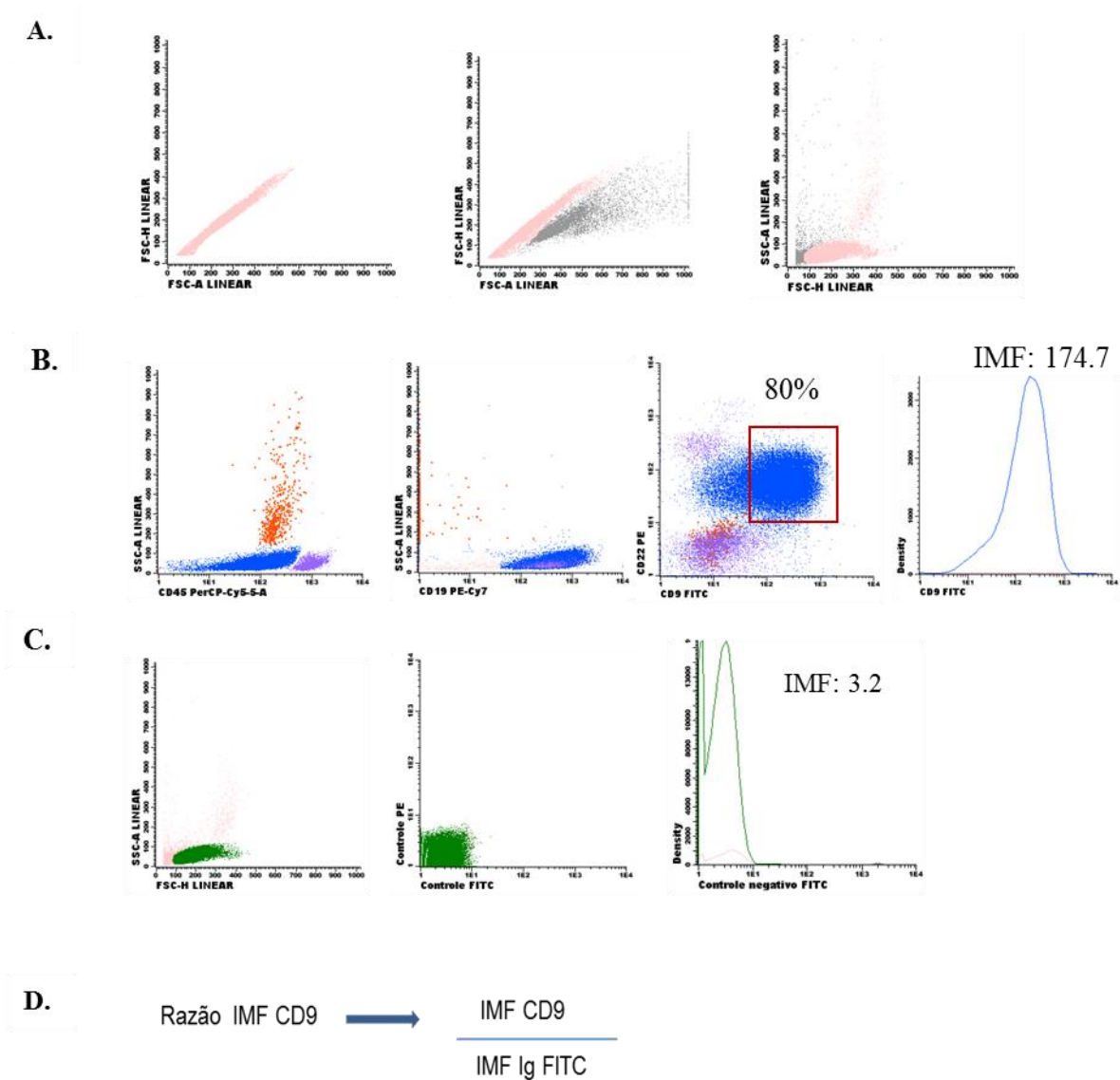
As aquisições das amostras marcadas com AcMo foram realizadas nos CFs FACSCalibur ou FACS CANTO II (*BD Biosciences- Becton Dickinson, San José, CA, EUA*). Para aquisição, no FACS Calibur, foi utilizado o programa de análise *CellQuest* (*BD Biosciences*), e para o FACS CANTO II, o programa de análise DIVA, sendo adquiridos pelo menos 15.000 eventos na área de células viáveis.

Com base no padrão de expressão dos antígenos cCD22, cCD79a, CD45, CD19, CD10 foi realizada a classificação das células - B em estágios maturativos de acordo com os critérios estabelecidos pelo grupo EGIL (BENE *et al.*, 1995). A avaliação imunofenotípica do



CD9 foi realizada em duas etapas, utilizando o programa de análise *Infinicity* versão 18.0 (Cytognos). Em resumo, foi avaliado tanto o percentual de células marcadas por CD9 como a intensidade mediana de fluorescência (IMF), conforme previamente descrito (BLUNCK CB, 2018). O esquema de análise pode ser visto na figura 4.2.

Neste trabalho utilizamos IMF como um fator de medição destas moléculas por se tratar de uma medida de tendência central, em que podem ser avaliadas populações heterogêneas. Para um resultado de análise confiável, foi necessário realizar a normalização de IMF. Esta normalização foi definida a partir da razão entre o valor da expressão do marcador em questão sobre o valor da expressão de um controle negativo interno.



**Figura 4. 2.** Esquema da análise do percentual e IMF do CD9 por citometria de fluxo.

*Forward scatter* (FSC) é primeiramente dependente do volume de partículas ou células, enquanto *Side Scatter* (SSC) provê uma medida da organização interna, granulação citoplasmática, densidade nuclear e estruturas celulares externas. FSC-H, representa altura das

células, e FSC-A, a área. **A)** Delimitação das células (em rosa) consideradas em nossas análises. **B)** No primeiro gráfico pode ser visualizada população granulócitos (em laranja), população de linfócitos maduros (em lilás) e população de blastos (azul). No segundo gráfico está representado população majoritariamente de blastos. No terceiro gráfico os blastos são identificados pela expressão baixa à intermediária do CD45 e positiva para o CD19. No quadrado vermelho percentual de células positivas para o CD9. E no histograma avaliação da IMF do CD9. **C)** Análise do controle negativo. Células mononucleares (marcadas em verde) e no histograma, a avaliação da IMF destas células. **D)** Cálculo para normalização da IMF do CD9, através da divisão do valor da IMF do CD9 pela IMF do controle negativo.

#### **4.4. Extração de DNA**

A fase orgânica obtida pelo processo de separação das células armazenadas em TRIzol™ (Invitrogen) com clorofórmio, foi conduzida para extração do DNA genômico.

Inicialmente, foi realizada a etapa de precipitação em que a amostra é diluída em 300 µL de etanol 100%, incubada por 3 min e centrifugada a 10000 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seguiu para a etapa de lavagem em 1 mL de solução de citrato de sódio 0,1M em etanol 10%. Esta mistura foi incubada à temperatura ambiente por 30 min, sendo periodicamente misturada por inversão e, então conduzida para mais uma etapa de centrifugação a 10000 rpm por 5 min a 4°C, descartando o sobrenadante ao final desse processo. Essa etapa de lavagem com solução de citrato de sódio foi repetida. Após o descarte do sobrenadante obtido ao final da segunda etapa de lavagem, o precipitado foi ressuspenso em 1,5-2 mL de etanol 75% e incubado por 15 min à temperatura ambiente, sendo misturado por inversão periodicamente. Seguiu-se mais uma centrifugação a 10000 rpm por 5 min a 4°C e, os tubos contendo os precipitados foram deixados abertos à temperatura ambiente para retirada do máximo de etanol presente. Após a secagem do tubo, o precipitado foi eluído em 50 µL de tampão de eluição e incubado 6 min no banho seco a 68°C. Centrifugou-se os tubos a 12000 rpm por 10 min para que o material insolúvel fosse removido e em seguida, o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo tubo identificado. Ao final, o DNA foi então armazenado a uma temperatura de -30°C.

A quantificação do DNA foi realizada através da leitura no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). A mensuração da quantidade de DNA obtida das amostras foi realizada utilizando 1 µL de cada. A unidade de concentração foi dada em ng/µL, sob absorvância medida a 260 nm. Entretanto, foi utilizado como referência, da razão dos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm, valores próximos a 1,8 e valores entre 2,0 e 2,2 quando considerados 260 nm e 230 nm, para verificar a pureza das amostras.

#### 4.5. Extração de RNA total

A extração de RNA foi realizada a partir das células mononucleares separadas após gradiente de Ficoll (leucometria  $\geq 16.000$ ) ou de lise de hemácias (leucometria  $< 16.000$ ). A partir de  $5 \times 10^6$  células, o RNA total destas amostras foi extraído seguindo-se as recomendações do fabricante do reagente TRIzol™ (Invitrogen). Em resumo, foram acrescentados 1000  $\mu\text{L}$  de Trizol ao precipitado de células, homogeneizou-se com a pipeta e incubou-se por 5 min à TA. Em seguida, foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, pipetando vigorosamente por alguns segundos e incubando por 3 min à TA. As amostras foram então centrifugadas a 12500 rpm por 15 min à 4°C (centrífuga *eppendorf 5402*, rotor fixo). Após a centrifugação, foi retirada a fase superior (transparente) que é onde se encontra o RNA e transferiu-se esta fase para um tubo novo livre de RNase. A retirada da fase superior foi feita com o máximo de cuidado para que não houvesse contaminação com as fases inferiores que contêm DNA e proteína

A esse tubo novo com a solução contendo RNA foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de etanol isopropílico 100%. Depois, foi incubado por 10 min à TA. O material foi então centrifugado a 12500 rpm por 10 min à 4°C (centrífuga *eppendorf 5402*, rotor fixo). O sobrenadante foi descartado e o precipitado (RNA) lavado com 1000  $\mu\text{L}$  de etanol 75%. O material foi novamente centrifugado a 12500 rpm por 10 min à 4°C (centrífuga *eppendorf 5402*, rotor fixo). Foi retirado o máximo possível de sobrenadante para secagem do precipitado, e acrescentados 20  $\mu\text{L}$  de água DEPC. O material foi homogeneizado com o auxílio da pipeta e incubado por 10 min a 60°C. Após a extração, o RNA foi mantido à -80°C até o seu uso nas reações de síntese de DNA complementar (cDNA).

#### 4.6. Síntese de cDNA

A transcrição reversa foi realizada através do *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Life Technologies), utilizando 500ng do RNA total. A amostra de RNA foi misturada a uma solução contendo RT Buffer 10x, mistura de dNTPs 25x (100mM), RT *Random Primers* 10x e *Multi Scribe™ Reverse Transcriptase* 50U. A solução final de 20 $\mu\text{L}$  foi incubada a 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas e 85°C por 5 minutos.

Para verificar a integridade do cDNA, foi realizada uma RT-PCR para a amplificação do gene endógeno *GAPDH* (Quadro 4.1), de acordo com as seguintes condições: *PCR Buffer* 1x,  $\text{MgCl}_2$  2,5mM, dNTP 0,15 $\mu\text{M}$ , iniciadores 0,2 $\mu\text{M}$ , *Taq DNA Polymerase* 1U e 1,5 $\mu\text{L}$  de cDNA. Esta mistura foi submetida a seguinte ciclagem: 95°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, e uma fase de extensão final a 72°C por 10 minutos. Em seguida foi verificada a presença do produto de

amplificação por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed<sup>TM</sup> e visualizado em transiluminador UV.

**Quadro 4. 2.** Iniciadores utilizados para amplificação do gene GAPDH.

Iniciador	Sequência 5'-3'
<i>GAPDH-F</i>	TGACCCCTTCATTGACCTCA
<i>GAPDH-R</i>	AGTCCTTCCACGATACCAAA

F, *foward*; R, *reverse*

#### 4.7. Detecção das fusões direta (*ETV6-RUNXI*) e recíproca (*RUNXI-ETV6*)

##### 4.7.1. Identificação qualitativa por RT-PCR

A RT-PCR para detectar o transcrito direto foi realizada com os oligonucleotídeos específicos descritos por Van Dongen et al. (1999) (VAN DONGEN *et al.*, 1999): 5'-ACCCTCTGATCCTGAACC-3', 5'-CATCCGTGGACGTCTCT-3'. Para detectar o transcrito recíproco utilizamos os oligonucleotídeos previamente publicados (STAMS *et al.*, 2005): 5'-GAGTCCCAGAGGTATCCAG-3', 5'-AATCCCAAAGCAGTCTACA-3'. A reação foi executada com 2 µL de cDNA, tampão 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50pM de oligos, 10 nM de dNTPs, 0,1 U/reação de Taq DNA polimerase (Invitrogen), nas condições de ciclagem 95°C por 5 minutos. (1 ciclo); 94°C por 30 segundos; 65°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto (35 ciclos). Um ciclo de extensão final a 72°C por 2 minutos em termociclador. O produto de amplificação da RT-PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com Gel Red e visualizado em transiluminador UV.

##### 4.7.2. Identificação das fusões direta e recíproca por citogenética-molecular

- **Cultura e Preparação Citológica**

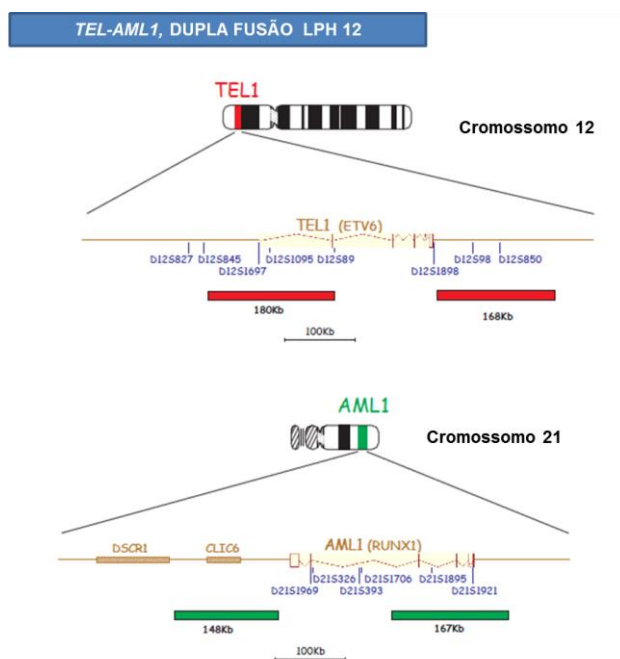
Para realização da técnica de FISH as amostras de MO foram encaminhadas para a preparação de cultura de células ou para a preparação citológica de fixação direta (metanol/ácido acético). Cerca de 10x10<sup>6</sup> células/ml do material foram adicionados em frascos de cultura com 5 ml de meio de cultura (RPMI 1640) suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibiótico e posteriormente foram incubados por 24 horas a 37°C. Após este período, o protocolo de preparação citológica consistia em três etapas principais: interrupção mitótica, quando foi adicionado 0,05 µg/mL de colchicina (Sigma – 16 µg/ml) na cultura, mantida a 37°C por 1 hora; tratamento hipotônico com solução de cloreto de potássio (KCL –

0,75M) a 37°C por 40 minutos e a fixação do material com 3 volumes de metanol para 1 de ácido acético glacial recém preparado. Em seguida, 30µL de suspensão foram posicionadas em lugar marcado em lâmina previamente lavada e a secagem foi realizada em temperatura ambiente.

Para fixação citológica direta (sem realização de cultura) a amostra deve estar lisada (livre de hemácias). Então, após a lise, as células separadas (viáveis) foram ressuspensas (em solução) em PBS + 5% de SBF (aproximadamente 0,5 – 2 mL, dependendo do tamanho do precipitado celular) em tubo Falcon de 15mL. Em seguida, adiciona-se 2 mL de solução hipotônica (KCl - 0,075M) pré-aquecida a 37°C. Centrifugar a 1000rpm por 5 minutos e 2 mL de solução fixadora (metanol/ácido acético) fresca e gelada.

- **Hibridização in situ por fluorescência**

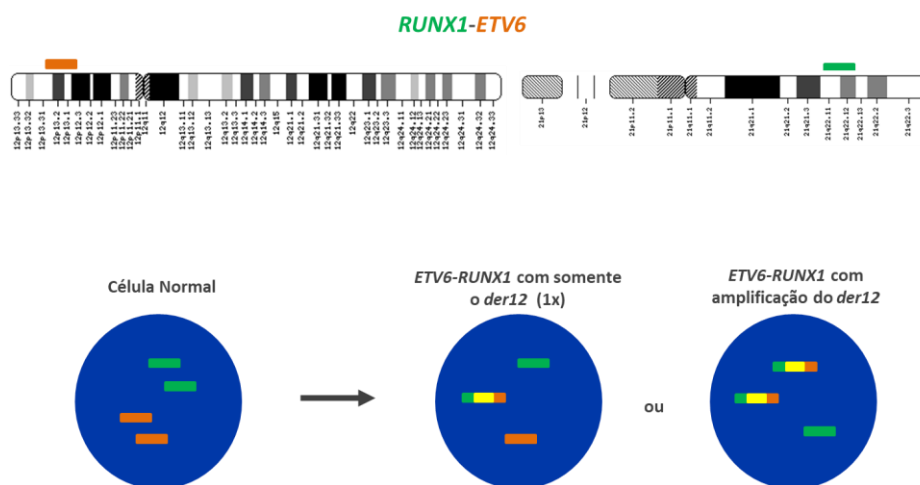
A técnica de FISH em núcleos interfásicos foi realizada em células fixadas em metanol-ácido acético (3:1). Os fixados foram preparados a partir de células viáveis de casos com material disponível como descrito acima. A técnica de FISH foi dividida em duas etapas. Na primeira, foram utilizadas sondas do tipo comercial (*TEL/AML1 ES Dual Color Translocation Probe*) tanto para a confirmação da presença do transcrito direto, quanto para o rastreamento de sinais adicionais em núcleos interfásicos envolvendo estes dois genes. A sonda comercial *TEL/AML1 Translocation, Dual Fusion LPH 012* (Cytocell) é de dupla fusão e flanqueia a região do ponto de quebra nos dois genes envolvidos na translocação (Figura 4.3).



**Figura 4. 3.** Ilustração da localização da sonda comercial TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) Translocation, Dual Fusion (Cytocell).

Esta sonda foi utilizada para detecção da fusão direta (*ETV6-RUNX1*). A sonda de *ETV6* (*TELI*), marcada com fluorocromo (Texas-Red), cobre duas regiões: uma de 180 kb entre os marcadores D12S845 e D12S89 e uma segunda que se estende na direção centromérica a 168 kb do marcador D12S1898. Para o *RUNX1* (*AML1*) as sondas são marcadas com fluorocromo (FITC) uma parte inclui uma região de 148 kb centromérica ao *RUNX1* e uma segunda região de 167 kb, incluindo os marcadores D21S1895 e D21S1921. Os processos de hibridização e lavagens foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante.

Na segunda etapa, com o objetivo de melhor caracterizar a heterogeneidade clonal dos pacientes incluídos no estudo e também confirmar a presença do transcrito recíproco *RUNX1-ETV6* (inicialmente detectados por RT-PCR) foram utilizadas sondas de FISH produzidas *in-house* localizadas nos pontos de quebra dos genes *RUNX1* e *ETV6* (Figura 4.4). Sondas do tipo BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) para as regiões de interesse em *RUNX1* e *ETV6* foram obtidas do *BACPAC Resource Center, Children's Hospital, Oakland Research Institute, Oakland, CA* (<http://bacpac.chori.org>). A preparação das sondas *in-house*, marcadas através da técnica de *nick translation*, o processo de hibridização, lavagens e as análises foram todas realizadas de acordo com protocolos padrões previamente descritos (BATEMAN *et al.*, 2010; KEARNEY; COLMAN, 2009).



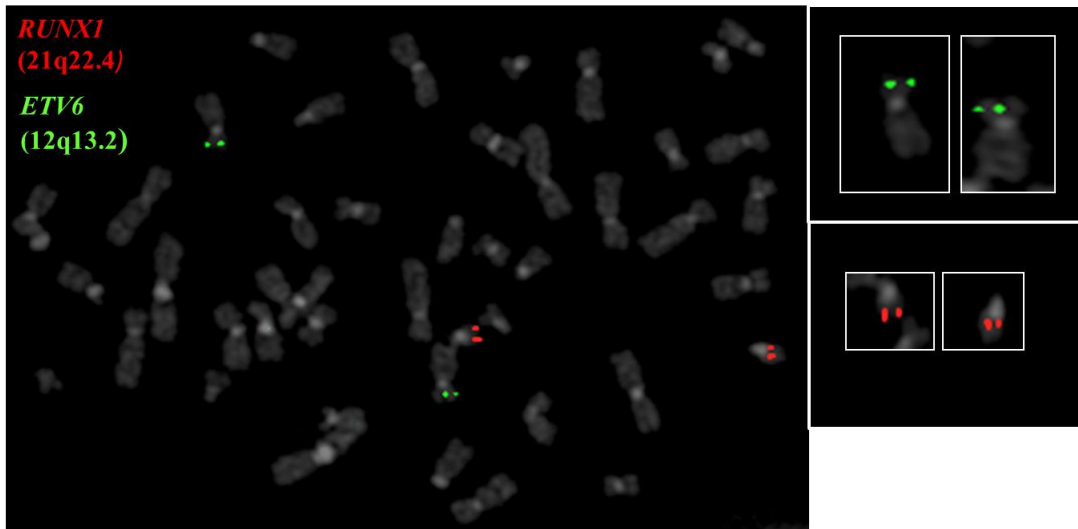
**Figura 4. 4.** Desenho esquemático das sondas BAC para a detecção da fusão gênica *RUNX1-ETV6* por FISH.

As sondas foram desenhadas para serem tipo dupla fusão. O primeiro núcleo interfásico apresenta padrão normal, esperávamos encontrar dois sinais vermelhos (referente às duas cópias de *ETV6*) e dois sinais verdes (referente às duas cópias de *RUNX1*). O núcleo interfásico do meio apresenta padrão para a fusão recíproca, esperávamos encontrar um sinal vermelho (*ETV6* não rearranjado), um sinal verde (*RUNX1* não rearranjado) e um sinal de

amarelo (referente à fusão dos dois genes). C) Em uma célula com amplificação (duplicação) da fusão recíproca esperávamos encontrar dois sinais amarelos (um referente à fusão recíproca e o outro referente à amplificação desta fusão) e um sinal vermelho (referente ao *RUNX1* não rearranjado).

Inicialmente, para a confirmação da localização das sondas nas regiões cromossômicas de interesse (*RUNX1* - 21q22 e *ETV6* - 12p13) foi realizada uma hibridização de cada sonda, separadamente, em lâminas contendo metáfases de doadores saudáveis (Figura 4.5).

Os sinais fluorescentes foram visualizados utilizando o microscópio de fluorescência Olympus BX41 TR/URA/DP2 equipado com filtros para DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), *Spectrum Green* (FITC - *fluorescein isothiocyanate*) e *Spectrum Red*/Cy3. As imagens foram capturadas e analisadas com o programa *GenASIs Capture & Analysis platform* (Applied Spectral Imaging). Para cada caso (lâmina com interfases da amostra de cada paciente) foram contados pelo menos 100 núcleos interfásicos para cada sonda, os pontos de corte (*cut-offs*) foram estabelecidos através da contagem de 300 núcleos de metáfases normais. Para o estabelecimento do ponto de corte, o cálculo foi realizado de acordo com o modelo proposto por So e colaboradores (SO, 2009). Existe uma possibilidade acidental de justaposição dos sinais verde e vermelho em células normais que pode ser interpretado como positivo para a presença de rearranjos em casos que são normais ou selvagens para estas alterações. Para determinar os níveis de falsos-positivos, um ponto de corte foi calculado para todos os lotes de sondas comerciais usadas e, também, para as *BACs*. Sendo assim, cinco amostras de MO de indivíduos normais e cinco amostras de MO de pacientes leucêmicos sabidamente *ETV6-RUNX1* positivos foram analisadas e 200 núcleos interfásicos de cada caso foram avaliados por três analistas independentes. Utilizando as amostras normais, determinamos os pontos de corte das sondas através da média das taxas de falso-positivo calculadas por cada analista. Em se tratando da fusão *ETV6-RUNX1* o ponto de corte encontrado foi de 7% com desvio padrão de +/- 2. Quando avaliamos *RUNX1-ETV6* encontramos um ponto de corte de 5% com desvio padrão de +/-2. Para a interpretação dos resultados, qualquer contagem dos núcleos interfásicos de um indivíduo maior do que o ponto de corte foi considerado como positivo.



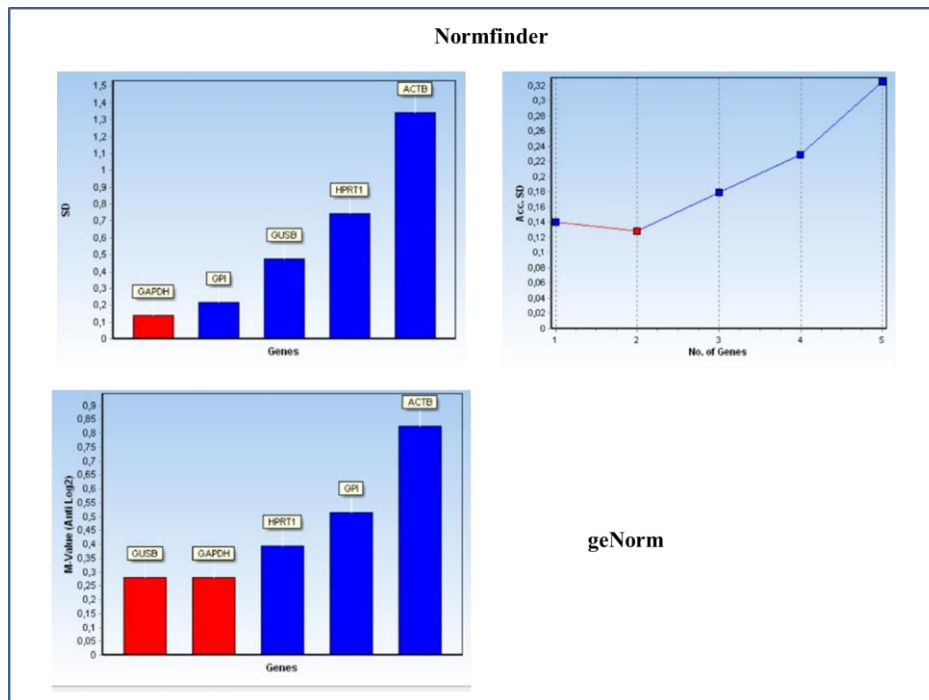
**Figura 4. 5.** Localização das sondas de FISH *in-house* em cromossomos metafásicos.

A confirmação da localização das *BACs* para *RUNXI* e *ETV6* foi realizada em cromossomos metafásicos de amostra de doador saudável. Nesta imagem verificamos que as sondas referentes aos genes de interesse estavam corretamente localizadas nos cromossomos 12 e 21 (*ETV6* e *RUNXI*, respectivamente).

#### 4.8 Quantificação da expressão gênica de *ETV6-RUNXI* (transcritos direto) e *RUNXI-ETV6* (recíproco)

Todas as corridas foram realizadas com os controles de qualidade recomendados para PCR quantitativo em tempo-real (*quantitative real-time PCR*, qPCR) (BUSTIN et al., 2009). Controles da reação não contendo cDNA chamados de NTC (*no template control*), ou seja, controle sem-molde, foram colocados em cada placa (2 NTC por cada gene de interesse avaliado), o qual não deveria amplificar até o *Cycle Threshold* (Ct) < 40 ciclos. Todas as reações de qPCR foram realizadas em duplicata. No desenho das placas, os genes de interesse (GDI) e genes de referência (GDR) foram colocados na mesma corrida, para evitar o uso de calibradores interplaca. Como descrito por Bustin, para a análise de expressão é recomendada à utilização de pelo menos dois genes de referência para realizar a normalização. Para escolher os dois genes foram testados 5 genes de referência e através do programa de análise *Genex enterprise* (MultiD) foi possível a escolha do *GAPDH* e *GUSB*, como mostrado na Figura 4.6. Devido à limitada disponibilidade de amostra para cada paciente, realizamos um teste estatístico em 8 amostras pareadas, utilizando a média do Ct do *GAPDH* versus a média do *GAPDH* mais *GUSB*. O teste de Wilcoxon mostrou valor de  $P=0,123$ . Isso nos permitiu avaliar a expressão dos nossos genes de interesse utilizando apenas um gene de referência. O gene de referência escolhido foi o *GAPDH*. Dados ilustrados na Figura 4.6.





**Figura 4. 6.** Escolha dos genes de referência para as reações de RT-qPCR.

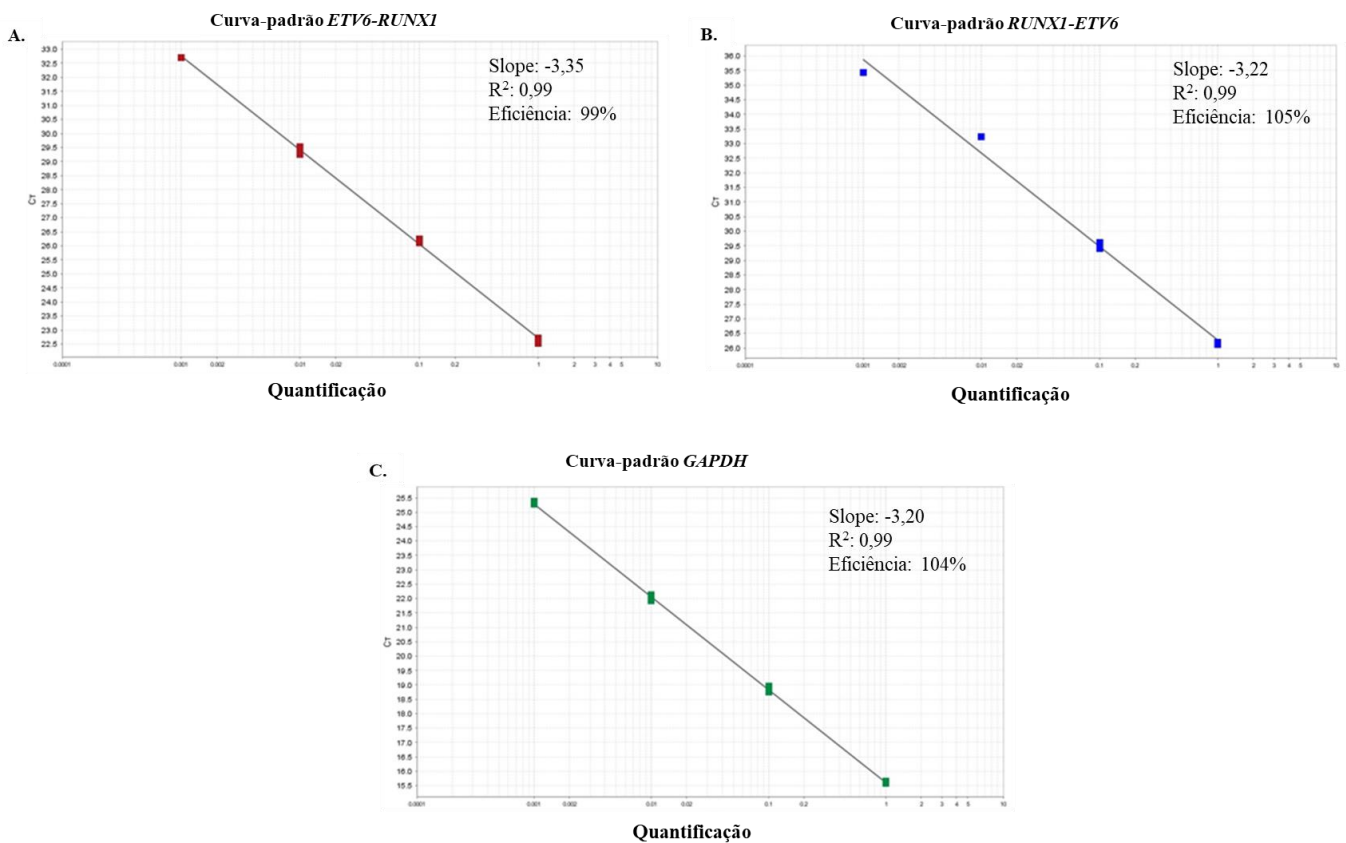
Gráficos gerados pela análise realizada nos programas *Normfinder* e *geNorm* para avaliação do gene de referência mais estável.

- **Eficiência de amplificação**

A eficiência dos oligonucleotídeos foi calculada para cada um dos genes avaliados a partir dos valores de Ct obtidos pela amplificação de um conjunto de diluições seriadas (5 pontos) em base 10 ( $\log_{10}$ ) utilizando um cDNA de paciente de alta qualidade.

Utilizamos uma curva-padrão para avaliar a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos. As reações foram realizadas em duplicatas para cada uma das diluições do cDNA e as condições de ciclagem das reações estão descritas abaixo no tópico específico para as condições de cada reação de RT-qPCR realizada. Para a construção do gráfico utilizamos o log da concentração de cDNA e o respectivo valor de Ct. O grau de ajuste da linearidade da reta ( $R^2$ ) das reações de *ETV6-RUNX1* e *RUNX1-ETV6* foi de 0,99 e o coeficiente de inclinação da reta (slope) foi entre 3.20-3.35. A eficiência de amplificação para cada oligonucleotídeo utilizado ficou entre 99-105%. Como para a análise de eficiência da reação o coeficiente de correlação linear deve ter valores  $>0,99$  e o slope deve ser próximo de 3,33 (BUSTIN, 2010), a análise de eficiência da reação apresentou resultados considerados aceitáveis para os ensaios de RT-qPCR. A curva padrão realizada para os oligonucleotídeos de *ETV6-RUNX1* apresentou  $R^2=0.99$ , com Slope de -3,35 e eficiência de 99% (Figura 4.7A). Em relação aos oligos de *RUNX1-ETV6* foi observada  $R^2=0.99$ , com Slope de -3,20 e

eficiência de 105% (Figura 4.7B). A curva-padrão dos oligonucleotídeos para *GAPDH* apresentou  $R^2=0.99$ , com Slope de -3,22 e eficiência de 104% (Figura 4.7C).



**Figura 4. 7.** Representação gráfica das curvas-padrão referentes aos oligonucleotídeos utilizados.

Gráficos das curvas-padrão para os oligonucleotídeos de **A) *ETV6-RUNX1***, **B) *RUNX1-ETV6*** e **C) *GAPDH***. CT, *threshold cycle*; R<sup>2</sup>, grau de ajuste da linearidade da reta; Slope, coeficiente de inclinação da reta.

- **Condições de ciclagem das RT-qPCR**

As análises de expressão gênica dos transcritos *ETV6-RUNX1* e *RUNX1-ETV6* foram realizadas a partir da amplificação dos transcritos por PCR quantitativa em tempo-real. O volume final da reação foi de 15  $\mu$ L, os quais continham 30 ng (1,5 $\mu$ L) de cDNA, 100 nM (0,75 $\mu$ L) de cada oligonucleotídeo e 7,5 $\mu$ L do ensaio *GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix* (Promega BioSciences, LLC, San Luis Obispo, CA), de acordo com o protocolo do fabricante. A amplificação ocorreu no sistema *ViiA<sup>™</sup> 7 Real-Time PCR System* (Life Technologies) utilizando a seguinte ciclagem: incubação de 2 minutos a 50°C, seguida por uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C. Depois as reações seguiram 40 ciclos a 95°C por 10 segundos, a 60°C por 30 segundos (para o anelamento dos oligonucleotídeos), e para a extensão da fita e aquisição do sinal de fluorescência do intercalante *BRYT<sup>®</sup> 72°C* por 30 segundos. A curva de dissociação ou de *melting* foi gerada após a amplificação gênica e compreendeu uma etapa de

5 segundos a 95°C, seguido por outra de 5 segundos a 55°C e finalmente uma nova etapa a 5 segundos a 95°C.

Dois métodos foram utilizados para calcular o valor de quantificação das reações de RT-qPCR: o método do ciclo *threshold* e o método do Cy0. A quantificação foi determinada a partir de um limiar ou *threshold* (linha paralela ao eixo x, estabelecido na fase exponencial da reação), onde o valor de quantificação é determinado no número de ciclo ao momento que a quantidade de fluorescência da reação cruza o limiar estabelecido. O valor do *threshold* foi estabelecido em 0,40 e mantido em todas as corridas realizadas. Para a análise dos níveis transcricionais foram calculados os valores do Ct de cada amostra, utilizando-se a média das duplicatas. Em seguida, a estratégia escolhida foi a da quantificação relativa que determina as mudanças de expressão de um GDI em relação à expressão de um GDR. As reações foram realizadas em duplicatas, aceitando como valor máximo diferencial de desvio padrão (DP) < +0,15 ciclos. Desta forma, foram calculados os valores de *delta Cycle Thresholds* (dCts) a partir das diferenças médias entre os Cts dos transcritos de interesse (*ETV6-RUNX1* e *RUNX1-ETV6*) e do Ct do gene de referência (*GAPDH*) ( $dCT = CT_{\text{interesse}} - CT_{\text{constitutivo}}$ ).

Em seguida, a quantificação foi realizada utilizando o modelo matemático proposto por LIVAK (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), sem a utilização de um calibrador: Quantificação relativa =  $2^{-\Delta Ct}$ , onde  $\Delta Ct = Ct \text{ GDI} - Ct \text{ GDR}$ . A unidade de  $\Delta Ct$  é a normalização da expressão de um GDI com a expressão de GDR, no qual a expressão não varia entre os tecidos, células ou na resposta aos tratamentos experimentais.

Posteriormente, para medir as alterações nos níveis dos transcritos gênicos foi utilizado o cálculo matemático  $2^{(-dCT)}$ . Além disso, como controle de qualidade, utilizamos a curva de *melting* para a identificação e distinção dos diferentes fragmentos amplificados através das temperaturas específicas de dissociação (temperatura de *melting*).

#### 4.9. Detecção de alterações adicionais por MLPA

A identificação de alterações moleculares adicionais foi realizada através da técnica de MLPA, utilizando o kit SALSA MLPA P335 (MRC Holland), o qual possibilitou a avaliação do número de cópias dos genes *IKZF1*, *PAX5*, *ETV6*, *EBF1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *BTG1*, *RBI*, *CRLF2*, *IL3RA*, *CSF2RA* e *SHOX*, de acordo com critérios previamente descritos (BARBOSA et al., 2015). Foram incluídas nesta análise apenas os pacientes cujas amostras tinham 30% ou mais de blastos, devido à sensibilidade do método estabelecida pelo fabricante. As sondas contidas neste ensaio estão descritas no Anexo 1. Foram utilizados 100-150ng de DNA genômico em um volume de 5uL para cada reação de MLPA. Amostras que extraídas pelo método de Trizol devem ser eluídas em H<sub>2</sub>O (pH~7,0), fazendo-se necessária a

precipitação dessas amostras. O processo de precipitação foi realizado adicionando-se 1/10 do volume da amostra de DNA de acetato de sódio (3M; pH 5,2) e 2,5 vezes o volume (calculado após adição acetato de sódio) da amostra de etanol 100% gelado. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 12h, e em seguida foram centrifugadas por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e os tubos mantidos abertos por 30 minutos, para a completa evaporação do etanol. Finalmente as amostras foram eluídas em TE (10 mM Tris-HCl pH 8,2 + 0,1 mM EDTA) em volume proporcional ao adicionado da amostra estoque. A mistura contendo SALSA MLPA Buffer e *SALSA MLPA Probemix* foi adicionada ao DNA e a solução resultante aquecida a 98°C por 1 minuto, antes da incubação a 60°C por 16 h, para a hibridização das sondas. Em seguida, adicionou-se a mistura da contendo *Ligase Buffer A*, *Ligase Buffer B*, H<sub>2</sub>O livre de DNase e RNase e a enzima *SALSA Ligase-65*, e incubou-se a 54°C por 10 minutos, seguido de 5 minutos a 98°C (para inativar a enzima *Ligase-65*) e pausa à 20°C. Neste ponto, foi adicionada uma mistura contendo *SALSA PCR primer mix* e *SALSA Polymerase*, e os produtos da reação de ligação foram amplificados por PCR de acordo com as seguintes condições de ciclagem: 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos.

Para cada amostra, foram misturados os seguintes componentes: 0,8 µL do produto da reação de PCR + 0,2 µL do marcador padrão *GeneScan LIZ500* + 9,0 µL de Formamida HiDi (Life Technologies). Transferiu-se então esta mistura para uma placa de 96 poços, o produto referente a uma única amostra por poço, e as amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 95°C em seguida esfriadas no gelo por 2 minutos. Os fragmentos de PCR foram separados por eletroforese capilar enquanto os dados fluorescentes foram coletados no sequenciador ABI 3500 (Life Technologies).

Os fragmentos foram analisados usando o programa *GeneMarker V2.2.0* (SoftGenetics, State College, PA). Os parâmetros padrões utilizados na análise para determinação do valor de pico relativo foram: valores entre 0,75 e 1,3 foram considerados normais e valores abaixo de 0,75 e acima de 1,3 indicaram perda ou ganho, respectivamente.

#### **4.10. Análise estatística**

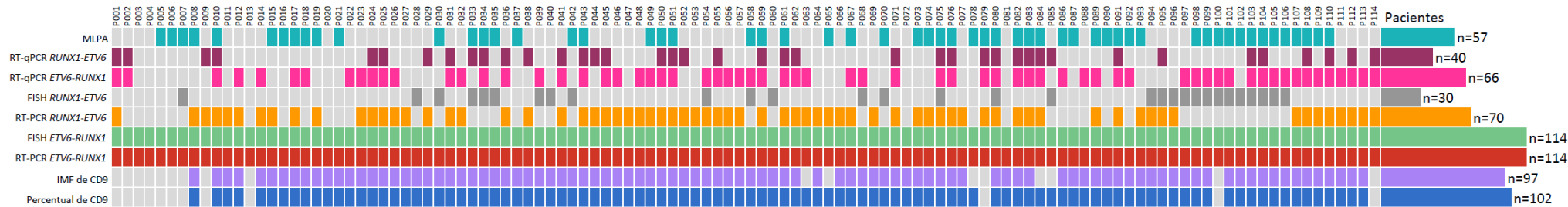
Análises exploratórias e descritivas dos dados foram realizadas para estimar medianas para as variáveis quantitativas e frequências absolutas e relativas para as qualitativas. As variáveis estudadas apresentaram distribuição assimétrica com a utilização de testes paramétricos. Para a avaliação da distribuição das variáveis categóricas foram aplicados os testes Exato de Fisher ou Qui-quadrado. Para a comparação de variáveis contínuas, nós utilizamos o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* (comparação de dois grupos). As

análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 5. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de  $p$  foram menores que 0,05. Utilizamos o teste estatístico de correlação de Pearson para verificar as correlações expressão gênica, expressão celular de CD9, idade, leucometria e classificação de risco. As análises de SG foram realizadas pelo método de *Kaplan-Meier* e diferenças entre os grupos foram comparadas pelo teste de *log-rank* ( $<0,10$ ). Todas as análises de sobrevida foram realizadas através do programa SPSS (*SPSS version 18.0 Inc, Chicago, IL, EUA*).

## 5 RESULTADOS

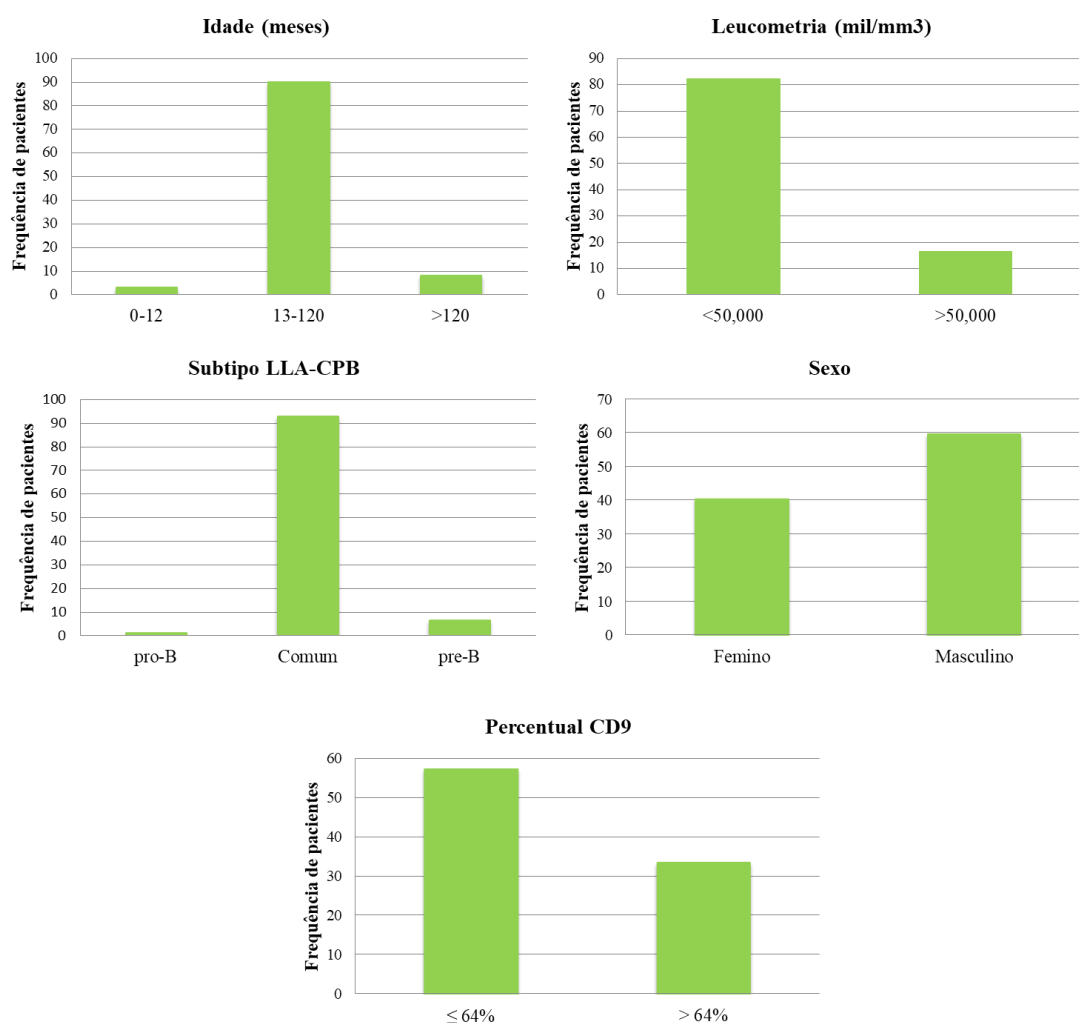
### 5.1 Características demográficas e laboratoriais

No presente estudo, entre os pacientes diagnosticados como LLA-CPB no período de 2009 – 2017 foram identificados 114 pacientes com *ETV6-RUNX1*, o que corresponde a 24,2% dos casos deste período. Destes, 102 (90%) foram analisados por citometria de fluxo para avaliação de CD9, os 114 por RT-PCR para identificação de *ETV6-RUNX1* e 70 (61%) para identificação de *RUNX1-ETV6*. A técnica de RT-qPCR foi realizado em 66 (59%) casos para avaliar os níveis de expressão de *ETV6-RUNX1* e em 40 (35,08%) para avaliar os níveis de expressão de *RUNX1-ETV6*. A técnica de FISH, utilizando sondas comerciais foi realizada nos 114 casos para identificação de *ETV6-RUNX1* e possíveis alterações adicionais. FISH utilizando sondas do tipo BACS foi realizado 30 (26, 3%) casos. Análise de MLPA foi realizada com sucesso em 57(50%) pacientes (Figura 5.0).



**Figura 5.0.** Panorama de testes realizados nesse estudo. As colunas verticais representam os pacientes incluídos e as colunas coloridas representam as técnicas executadas e cada amostra.

As principais características demográficas e laboratoriais dos pacientes podem ser vistas na Figura 5.2. A maioria dos casos apresentou idade entre 13 - 120 meses, baixa contagem leucocitária e subtipo LLA-CPB comum (CD10+). A proporção de pacientes do sexo masculino foi maior em relação ao sexo feminino. Quanto ao percentual de CD9 a maioria dos casos apresentou percentual  $\leq 64\%$  de blastos positivos.



**Figura 5. 1.** Características demográficas e dados laboratoriais das LLAs-CPB *ETV6-RUNX1* dos 114 pacientes incluídos nesse estudo.

O valor de 64% é referente ao ponto de corte estabelecido anteriormente (BLUNCK, CB *et al.* 2018). Nesta figura utilizamos diferentes gráficos para mostrar a distribuição dos pacientes de acordo com as diferentes categorias para as variáveis: idade, leucometria, subtipos de LLA-CPB, sexo e percentual de CD9.

## 5.2 Caracterização clínico-laboratorial em relação ao status do transcrito recíproco

O transcrito recíproco foi identificado em 46/70 casos (65,7%). Não houve diferença das características demográficas e laboratoriais dos pacientes em relação à presença do



transcrito recíproco. Observamos que 36 pacientes (78,2%) com o transcrito recíproco apresentaram percentual de CD9 > 64% ( $P=0,001$ ) (Tabela 5.1).

**Tabela 5. 1.** Características demográficas e laboratoriais dos pacientes em relação à presença do transcrito recíproco.

Variáveis	RUNXI-ETV6		P valor
	Negativo n (%)	Positivo* n (%)	
<b>Idade (meses)</b>			
0-12	2 (8,33)	0	0,236
13-120	20(83,3)	41(89,1)	
>120	2 (8,33)	5(10,8)	
<b>Sexo</b>			
Feminino	9 (37,5)	18(39,1)	0,122
Masculino	15(62,5)	28(60,8)	
<b>Subtipo LLA-CPB</b>			
pro-B	1(4,1)	0	0,631
Comum	21(87,5)	41(89,1)	
pre-B	2(8,33)	05(10,8)	
<b>Leucometria (células/mm<sup>3</sup>)</b>			
<50.000	19(79,1)	39(84,7)	0,603
≥50.000	5(20,8)	7(15,2)	
<b>Valores de CD9</b>			
≤ 64% e ≤ 12,52 <sup>‡</sup>	15(62,5)	10(21,7)	0,001
> 64% e > 12,52 <sup>‡</sup>	9(37,5)	36(78,2)	
<b>TOTAL</b>	24(34,2)	46(65,7)	

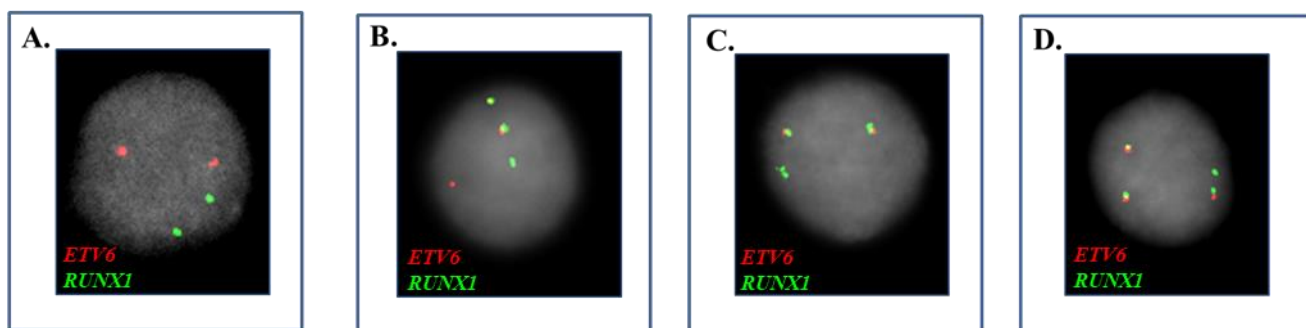
\*RT-PCR para detecção de *RUNXI-ETV6* foi realizada em 70 casos. <sup>‡</sup>Valor ponto de corte da IMF. Os valores de 64% e 12,52 são referentes aos pontos de corte previamente estabelecidos para análises qualitativas (% de CD9 positivo) e quantitativas (valor de IMF de CD9), respectivamente (BLUNCK, CB *et al.* 2018).

### 5.3 Identificação da fusão direta e recíproca por citogenética-molecular

As análises de FISH para a identificação da fusão direta foram realizadas em 470 casos de LLA-CPB. Destes, 114/470 (24,2%) apresentaram núcleos interfásicos com padrão *ETV6-RUNXI*<sup>+</sup>. Em 22/114 casos (25%) foram observadas a deleção do alelo não-rearranjado do gene *ETV6* e *ETV6-RUNXI*<sup>+</sup>, concomitantemente. Em 12/114 casos (10,5%) detectamos a ocorrência de um sinal adicional de *RUNXI* e de *ETV6-RUNXI*<sup>+</sup>. Em 3/114 (2,6%) foi

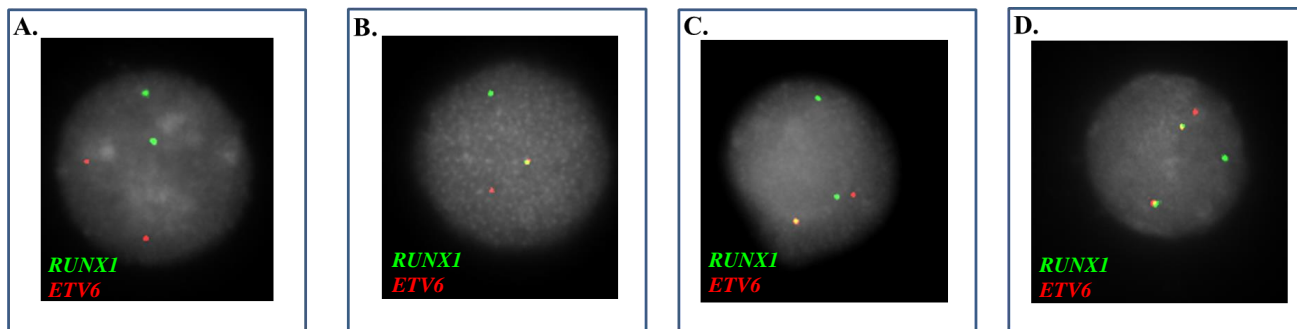
observada a presença de 3 sinais referentes a *ETV6-RUNX1*. Para estas análises, foram observados 200 núcleos interfásicos e a positividade para as alterações como fusão, deleção e ganho foi determinada a partir do estabelecimento do ponto de corte (Figura 5.2).

Para a identificação da fusão recíproca *RUNX1-ETV6*, a análise por FISH utilizando as *BACs* foi realizada em 30 casos. A presença da fusão recíproca (identificada inicialmente por RT-PCR) foi confirmada para 16/30 casos (53,3%). Em 6/16 casos (37,5%), identificamos um padrão de alteração caracterizado pela presença concomitante da fusão recíproca e de um sinal extra do gene *RUNX1*. Em três casos (18%) observamos o padrão de alteração caracterizado pela duplicação da fusão *RUNX1-ETV6*. Para estas análises, foram avaliados 200 núcleos interfásicos e a positividade para as alterações como fusão, deleção e ganho foi determinada a partir do estabelecimento do ponto de corte (Figura 5.3).



**Figura 5. 2.** FISH de núcleos interfásicos usando sonda comercial de dupla fusão.

**A)** Padrão de núcleo interfásico normal apresentando dois sinais vermelhos (*ETV6*) e dois sinais verdes (*RUNX1*) separados. **B)** Núcleo interfásico com *ETV6-RUNX1*<sup>+</sup> representada por dois sinais amarelos (fusão gênica), um sinal vermelho (*ETV6* não-rearranjado) e um sinal verde (*RUNX1* não-rearranjado) separados. **C)** Núcleo interfásico com a fusão gênica *ETV6-RUNX1* representada por dois sinais amarelos, um sinal verde (*RUNX1* não-rearranjado) e a deleção de um sinal vermelho (*ETV6* deletado). **D)** Núcleo interfásico apresentando três sinais de fusão representando amplificação de *ETV6-RUNX1*<sup>+</sup> e um sinal verde referente ao gene *RUNX1* não-rearranjado.



**Figura 5. 3.** FISH de núcleos interfásicos usando as sondas do tipo BACs.

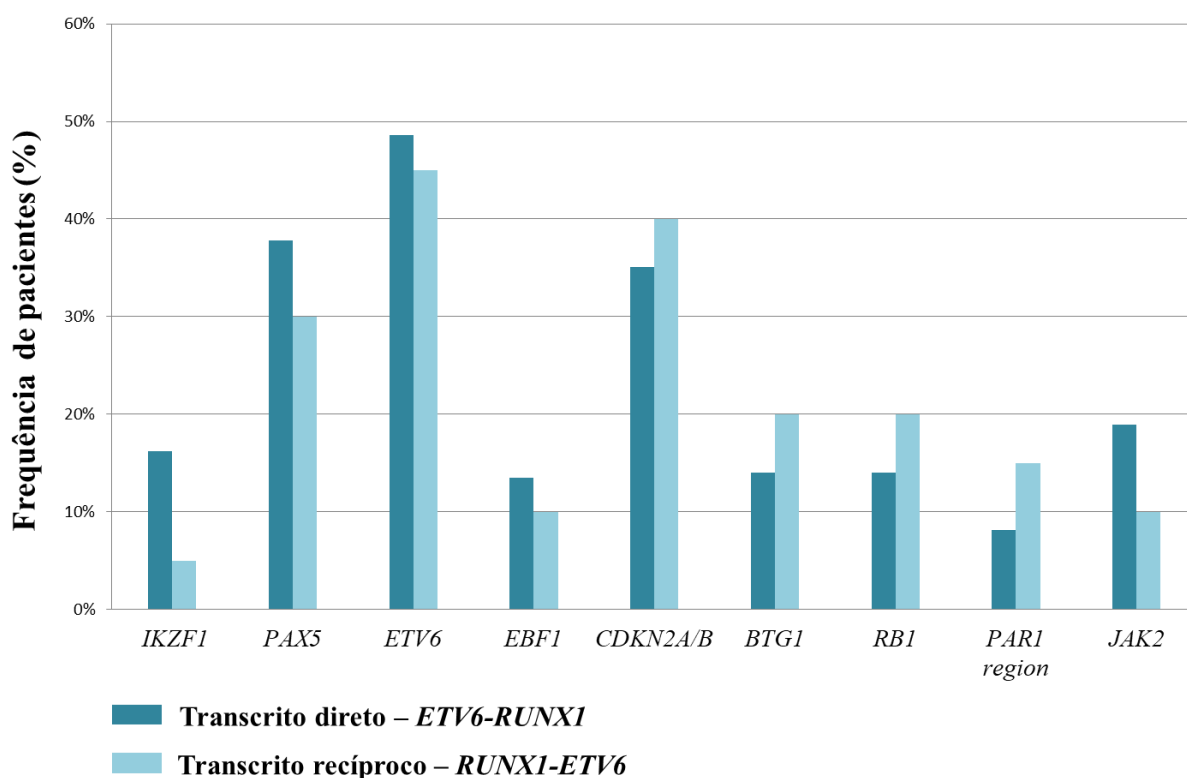
**A)** Núcleo interfásico apresentando padrão de núcleo normal com dois sinais vermelhos (*ETV6*) e dois sinais verdes (*RUNXI*) separados. **B)** Núcleo interfásico com a fusão gênica *RUNXI-ETV6* (representada por um sinal amarelo), *RUNXI* não-rearranjado (um sinal verde separado) e *ETV6* não-rearranjado (um sinal vermelho separado). **C)** Núcleo interfásico com a fusão gênica *RUNXI-ETV6* (representada por um sinal amarelo), o gene *ETV6* não-rearranjado (um sinal vermelho separado) e dois sinais do gene *RUNXI* (sinais verdes separados); sendo um sinal referente ao alelo normal e outro sinal da duplicação do gene *RUNXI*. **D)** Núcleo interfásico apresentando amplificação da fusão *RUNXI-ETV6* (dois sinais amarelos), o gene *ETV6* não-rearranjado (um sinal verde separado) e um sinal do gene *RUNXI* não-rearranjado (sinal vermelho separado).

#### 5.4 Detecção de alterações adicionais por MLPA

Em consequência da disponibilidade de material biológico e considerando o caráter retrospectivo destas análises, as reações de MLPA para a identificação de CNAs foi realizada em 57 dos 114 pacientes incluídos no estudo. Destes, 37 casos apresentavam apenas o transcrito direto e 20 apresentavam o transcrito direto e o transcrito recíproco. Em análise global de frequência de deleções incluindo os dois grupos de pacientes, observou-se que as deleções acometeram com maior frequência os genes *ETV6*, *CDKN2A/B* e *PAX5*. Por outro lado, foram encontradas em menor frequência deleções nos genes *IKZF1*, *EBF1*, *BTG1* e na região *PARI* (Figura 5.4).

A análise de comparação entre as deleções dos genes *IKZF1*, *PAX5*, *ETV6*, *EBF1*, *CDKN2A/B*, *BTG1*, *RBI*, região *PARI* e *JAK2* tanto em paciente com apenas o transcrito direto como em pacientes com os dois transcritos não apresentou diferença ( $P > 0,05$ ; dados não mostrados). Porém, nós observamos que os genes *IKZF1* e *JAK2* são deletados com maior frequência em pacientes que apresentam apenas o transcrito direto (Figura 5.4). Além disso, 27 casos apresentaram deleções em pelo menos 1 éxon do gene *ETV6*. Deleções maiores envolvendo os éxons 1-8 e 1-5 do *ETV6* também foram observadas pela técnica de FISH.

Como esperado, não foram detectadas por FISH, as deleções menores identificadas por MLPA.



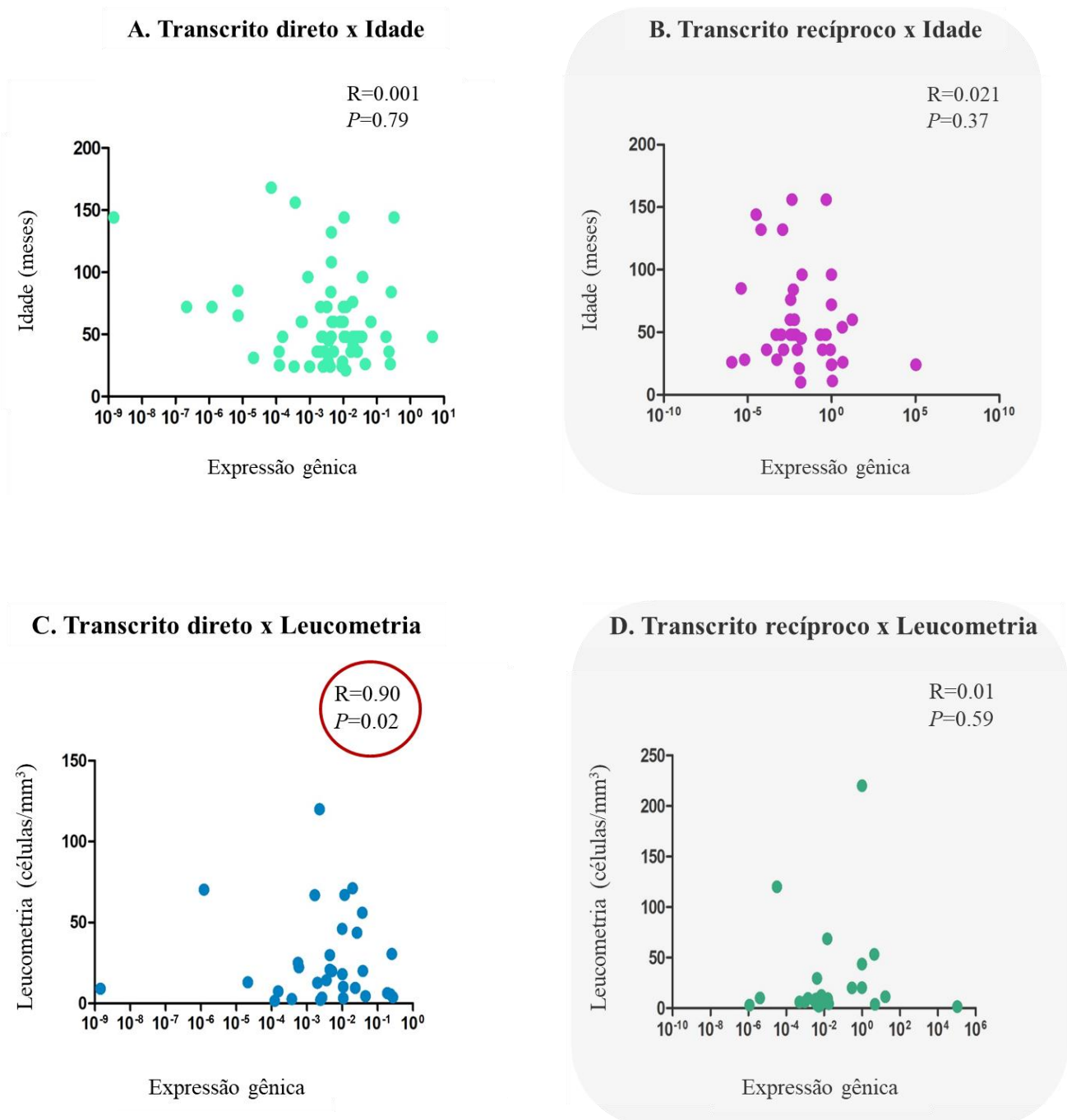
**Figura 5. 4.** Frequência das deleções encontradas por MLPA.

Pacientes com transcrito direto (n=37) e pacientes com transcrito direto e recíproco (n=20). As barras representam a frequência de deleções nos pacientes deste estudo. A cor verde da barra representa os pacientes que apresentaram apenas o transcrito direto e a cor azul da barra representa pacientes que apresentaram o transcrito direto e o transcrito reverso, concomitantemente.

## 5.5 Avaliação dos níveis de expressão dos transcritos direto e recíproco

### 5.5.1 Análise de correlação entre os níveis dos transcritos e os dados clínico-laboratoriais

Foi realizada a análise de expressão do transcrito direto (n=66) e do transcrito recíproco (n=40). Baseando-se nos critérios de estratificação de risco para LLA-CPB, avaliamos a correlação entre os níveis dos transcritos e essas variáveis. Observamos que não houve correlação entre expressão dos transcritos e a idade (Figura 5.5 A e B). Entretanto, observamos uma correlação positiva ( $R=0.90$ ;  $P=0.02$ ) entre os níveis do transcrito direto e a leucometria (Figura 5.5 C).

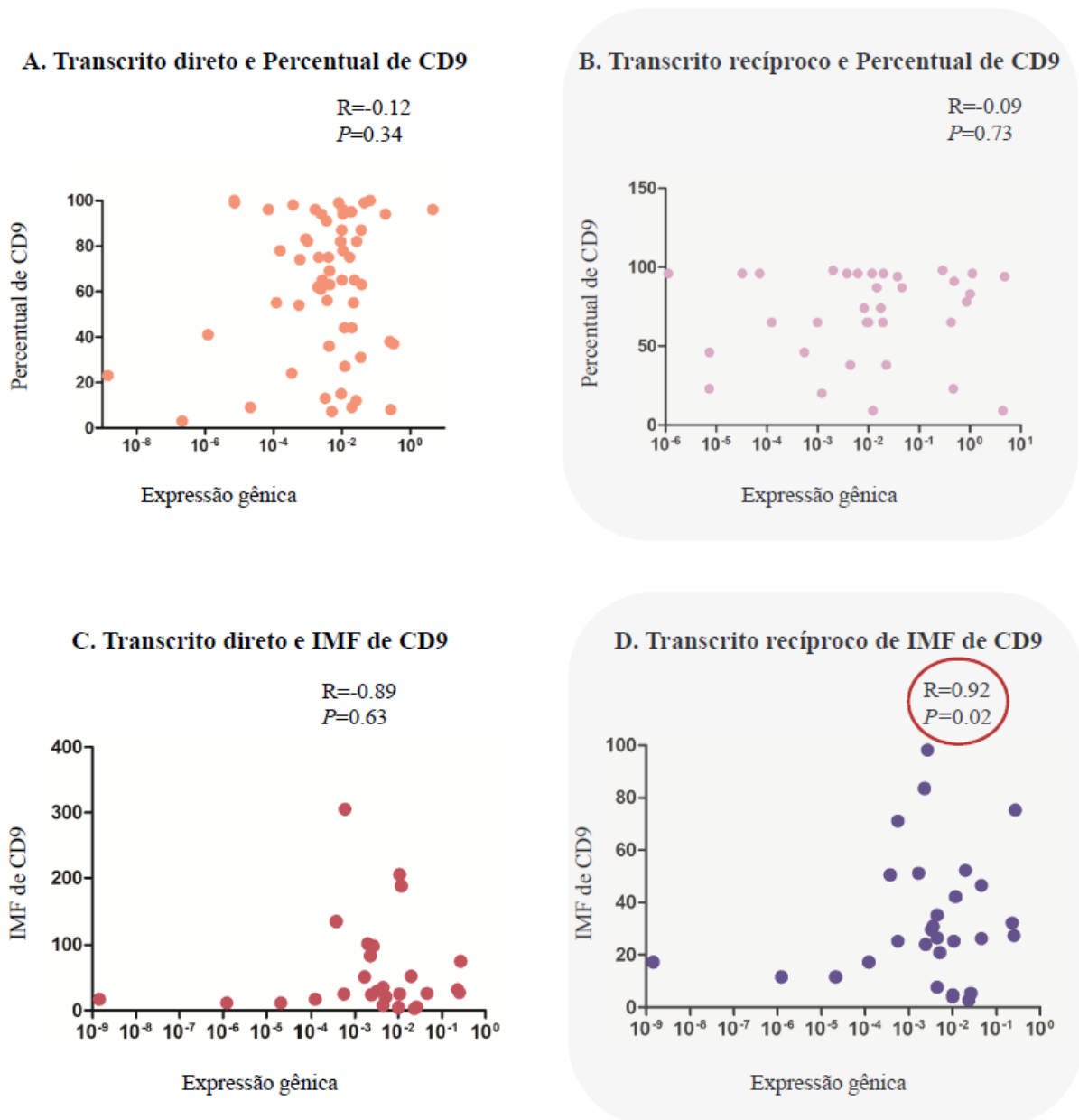


**Figura 5. 5.** Análise de correlação entre os níveis dos transcritos direto/recíproco com a idade e a leucometria.

*P*-valor calculado através do teste de Pearson. **A)** Análise de correlação entre a expressão gênica do transcrito direto e idade (*P*=0.02). **B)** Análise de correlação entre a expressão gênica do transcrito recíproco e idade (*P*=0.37). **C)** Análise de correlação entre a expressão do transcrito direto e leucometria (*P*=0.02). **D)** Análise de correlação entre a expressão gênica do transcrito recíproco e leucometria (*P*=0.59).

### 5.5.2 Análise de correlação entre os níveis dos transcritos e expressão de CD9 (Percentual e IMF)

Observamos que não houve correlação significativa entre a expressão do transcrito direto e a expressão de CD9 tanto percentual como IMF (Figura 5.6 A e B). Porém, quando avaliamos a correlação entre o transcrito recíproco e IMF de CD9, observamos uma correlação positiva ( $R=0.92$ ;  $P=0.02$ ) entre essas variáveis (Figura 5.6 D).



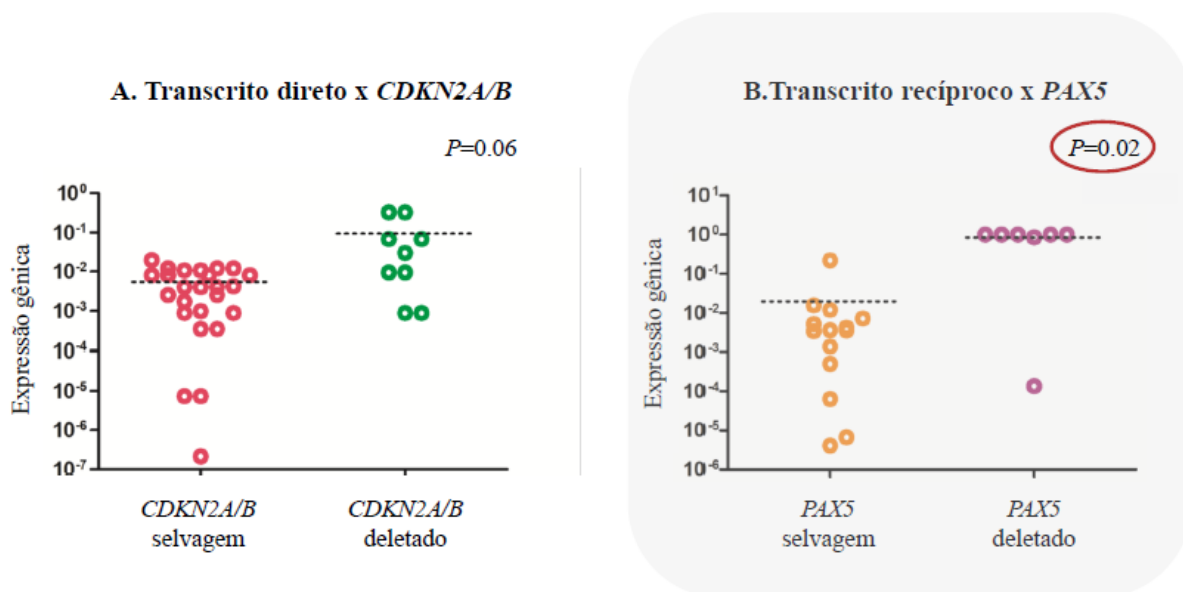
**Figura 5. 6.** Análise de correlação entre os níveis dos transcritos direto/recíproco e expressão celular de CD9 (Percentual e IMF).

*P*-valor calculado através do teste de Pearson. **A)** Análise de correlação entre a expressão gênica do transcrito direto e percentual de CD9 ( $P=0.34$ ). **B)** Análise de correlação entre a expressão do transcrito recíproco e percentual de CD9 ( $P=0.73$ ). **C)** Análise de correlação

entre a expressão gênica do transcrito direto e IMF de CD9 ( $P=0.37$ ). **D)** Análise de correlação entre a expressão gênica do transcrito recíproco e IMF de CD9 ( $P=0.02$ ).

### 5.5.3. Análise de comparação entre os níveis dos transcritos e as alterações vistas por MLPA

Foi observada uma tendência de aumento da expressão do transcrito direto em pacientes com deleção em *CDKN2A/B* ( $P=0.06$ ) (Figura 5.7A). Em relação ao transcrito recíproco, nós observamos um aumento significativo na expressão de *RUNX1-ETV6* em pacientes com deleção em *PAX5* ( $P=0.02$ ) (Figura 5.7A).



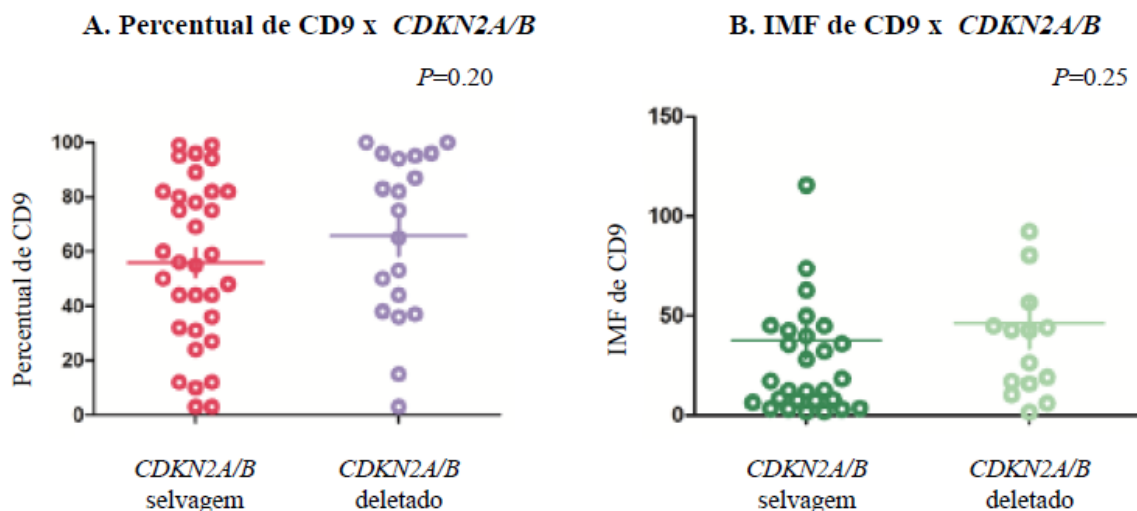
**Figura 5. 7.** Avaliação dos níveis de expressão dos transcritos direto e recíproco em pacientes de acordo com o status de *CDKN2A/B* e *PAX5*.

**A)** Expressão do transcrito direto em pacientes com *CDKN2A/B* selvagem e *CDKN2A/B* deletado. **B)** Expressão do transcrito recíproco em pacientes com *PAX5* selvagem e *PAX5* deletado. Esta mesma análise também foi realizada para o *status* de: *ETV6*, *IKZF1*, *BTG1*, *EBF1*, *JAK2* e não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa.

### 5.5.4. Avaliação da expressão celular de CD9 (percentual e IMF) e relação ao *status* de *CDKN2A/B* e *PAX5*

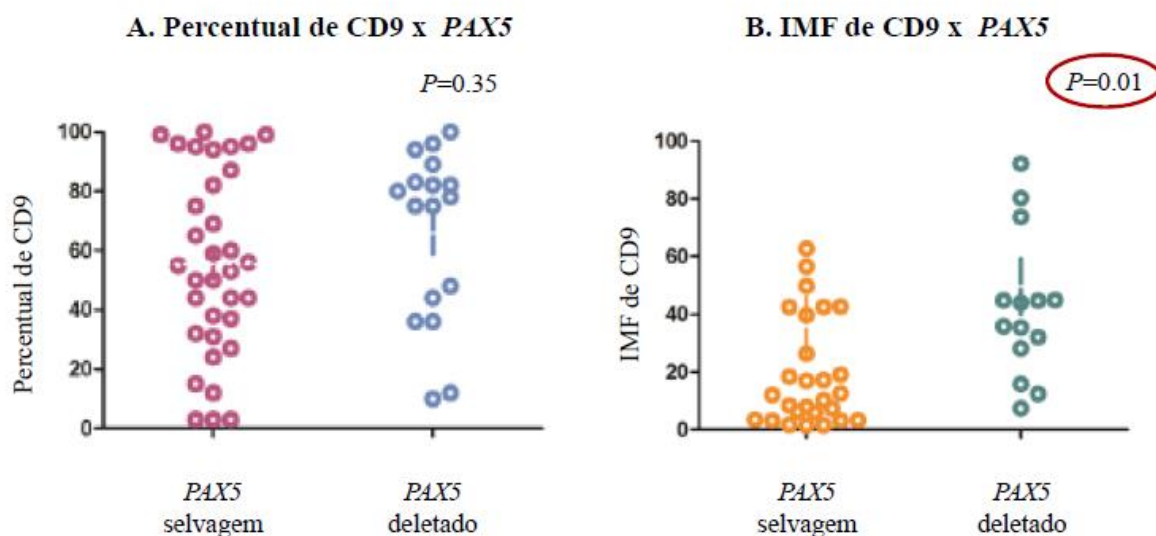
Com base nos resultados encontrados na análise de comparação entre a expressão dos transcritos e as CNAs, avaliamos a expressão celular de CD9 em relação ao *status* de *CDKN2A/B* e *PAX5*. Através da análise de comparação entre a IMF de CD9 e o *status* de *CDKN2A/B* não observamos nenhuma associação significativa (Figura 5.8). Porém, foi

observado um aumento da IMF de CD9 em pacientes com deleção em *PAX5* comparados aos pacientes com *PAX5* selvagem ( $P=0.01$ ) (Figura 5.9.B).



**Figura 5. 8.** Análise da avaliação da expressão celular de CD9 em relação status de *CDKN2A/B*.

A) Análise do percentual de CD9 *versus* *CDKN2A/B* selvagem e deletado. B) Análise da IMF de CD9 *versus* *CDKN2A/B* selvagem e deletado.



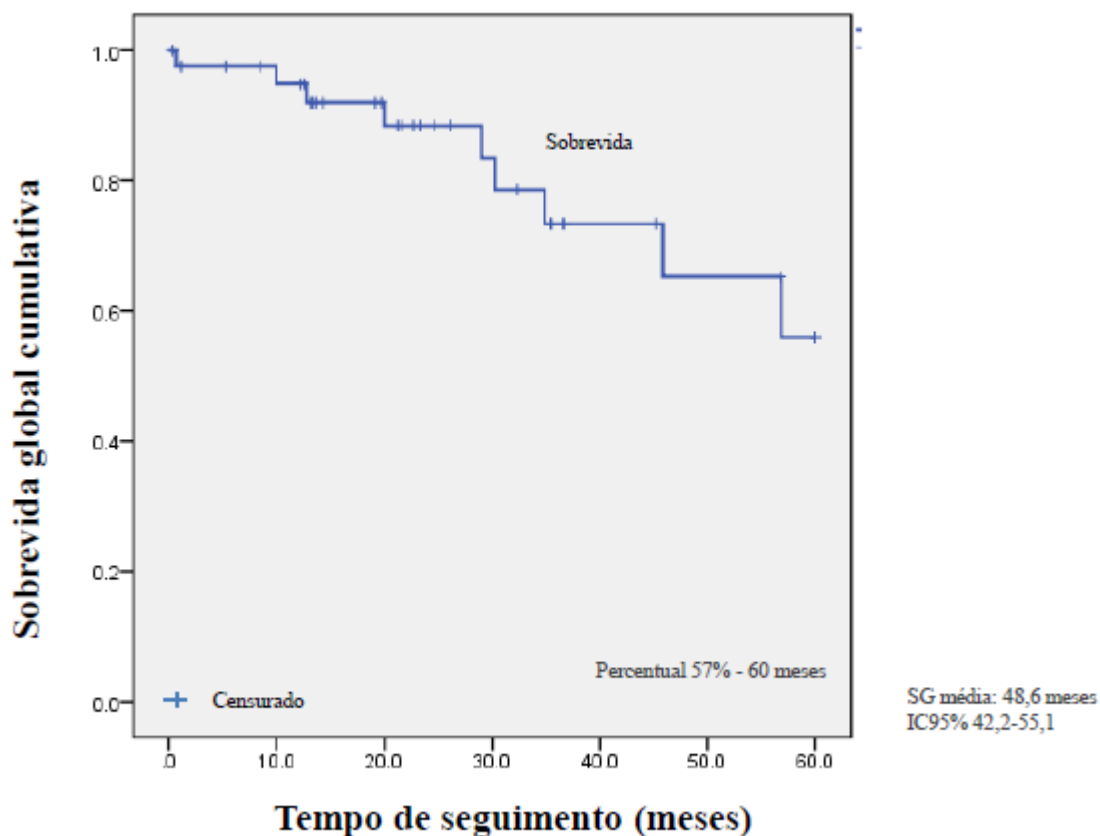
**Figura 5. 9.** Análise da avaliação da expressão celular de CD9 em relação status de *PAX5*.

A) Análise do percentual de CD9 *versus* *PAX5* selvagem e deletado. B) Análise da IMF de CD9 *versus* *PAX5* selvagem e deletado.



## 5.6. Análise de Sobrevida

As análises de SG foram realizadas com dados de seguimento de 42 pacientes acompanhados por um tempo médio de 60 meses. Observamos uma SG média de 48,6 meses para estes pacientes (IC95% 42,2 - 55,1) (Figura 5.10). Não foi possível realizar análise de SLE devido à escassez de informações de seguimento.



**Figura 5. 10.** Curva de Kaplan Meier mostrando a sobrevida global dos pacientes incluídos neste estudo.

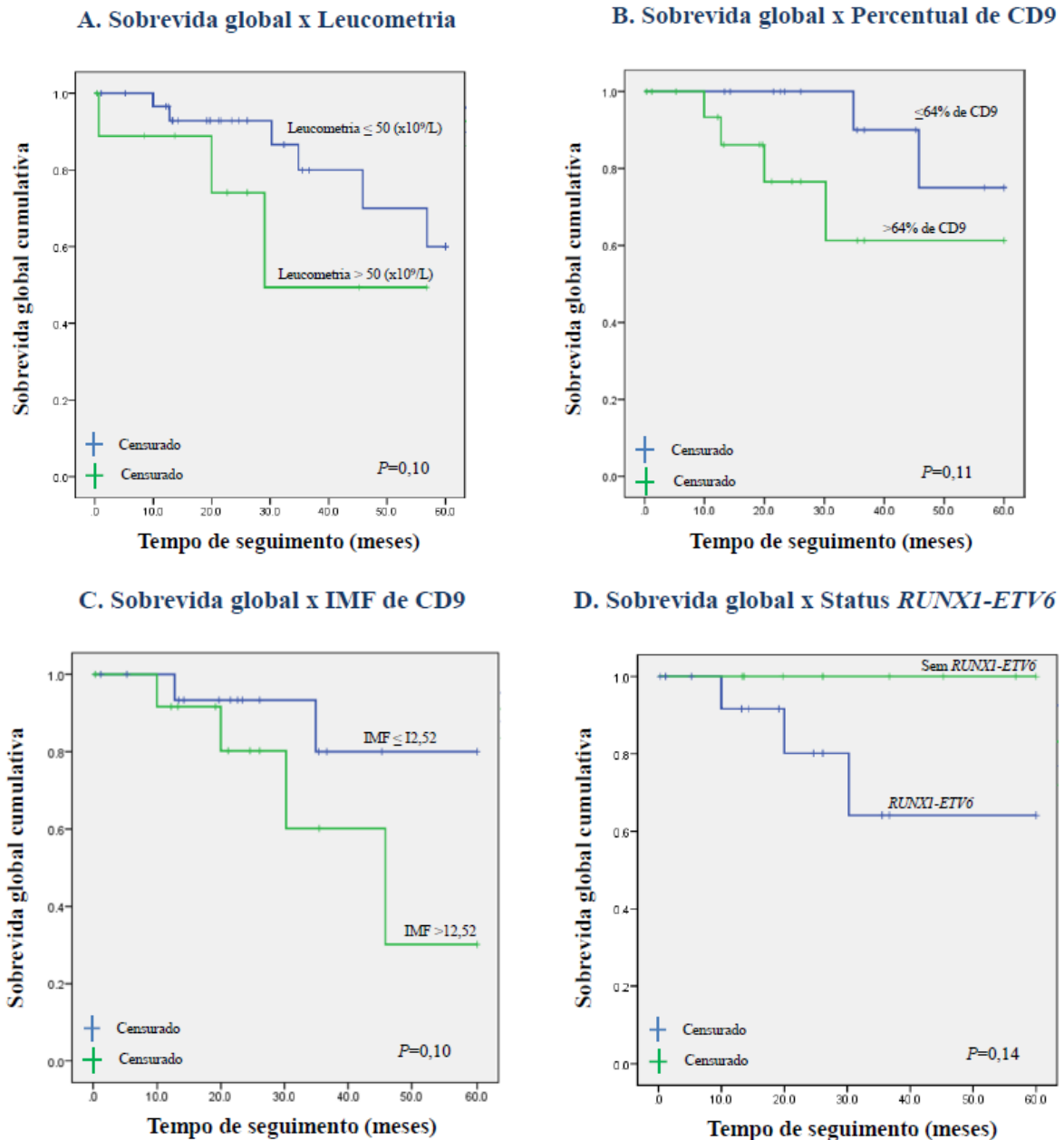
De acordo com o número de casos com informações de seguimento, foram incluídas na análise univariada para SG as variáveis: idade, sexo, leucometria, percentual e IMF de CD9. Não foi possível incluir o status do transcrito recíproco. A análise univariada de SG, de acordo com informações clínico-laboratoriais, encontra-se descrita na Tabela 5.2.

**Tabela 5. 2.** Análise de sobrevida global dos pacientes incluídos no estudo com informação de seguimento.

Variáveis	SG (meses)	IC 95% <sup>i</sup>	Log-rank
<b>Idade (meses)</b>			0,41
≤12	50,1	43,4 – 56,8	
13-120	41,7	26,9 – 56,4	
<b>Sexo</b>			0,46
Feminino	50,2	40,3 – 60,9	
Masculino	47,3	38,9 – 55,8	
<b>Leucometria (cél/mm<sup>3</sup>)</b>			0,10
<50.000	51,2	44,8 – 57,6	
≥50.000	38,2	22,4 – 53,9	
<b>Percentual de CD9</b>			0,11
≤ 64%*	55,3	49,6 – 61,0	
> 64%*	44,8	32,7 – 57,0	
<b>IMF de CD9</b>			0,10
≤12,52 <sup>£</sup>	53,4	45,2 – 61,7	
>12,52 <sup>£</sup>	41,0	28,5 – 53,4	

<sup>i</sup>Intervalo de confiança de 95%. \* Valor ponto de corte percentual de CD9. <sup>£</sup>Valor ponto de corte da IMF (BLUNCK, CB *et al.* 2018). SG, sobrevida global.

Apesar de não ter apresentado significância estatística, o grupo de pacientes com idade 13-120 meses apresentou uma SG inferior (41,7 meses) quando comparados com o grupo de pacientes com idade ≤12 (50,1 meses) ( $P=0,41$ ). Em relação ao sexo também não observamos significância estatística na SG dos pacientes. Pacientes com alta leucometria ( $\geq 50.000$  células/mm<sup>3</sup>) apresentavam uma SG inferior (38,2 meses) enquanto os pacientes com baixa leucometria ( $< 50.000$  células/mm<sup>3</sup>) apresentaram uma SG de (51,2 meses) ( $P=0,10$ ). Pacientes que com percentual de CD9  $> 64\%$  apresentaram uma SG inferior (44,8 meses) quando comparados aos pacientes que apresentaram o CD9  $\leq 64\%$  (55,3 meses) ( $P=0,11$ ). Em relação à IMF, foi observado que pacientes com a IMF  $> 12,52$  também apresentaram uma SG inferior (41,0 meses) quando comparados aos pacientes com a IMF  $\leq 12,52$  (53,4 meses). As curvas de Kaplan Meier das variáveis que apresentaram significância estatística estão ilustradas na Figura 5.11. Incluímos na análise univariada para SG avaliando o *status* de *RUNXI-ETV6* (presença ou ausência). A SG média dos pacientes que não apresentavam o transcrito recíproco foi de 40,5 meses (IC95% 29,5-52,4). A SG média dos pacientes que apresentavam o transcrito recíproco foi de 39,1 meses (IC95% 29,3-51,5) ( $P=0,14$ , Figura 5.11).



**Figura 5. 11.** Curvas de Kaplan Meier mostrando diferenças da sobrevida global (SG) em relação às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes incluídos neste estudo com informação de seguimento.

**A)** Análise de SG *versus* leucometria. **B)** Análise de SG *versus* percentual de CD9. **C)** Análise de SG *versus* IMF de CD9. **D)** Análise de SG *versus* status I (presença e ausência) do transcrito recíproco. *p*-valor calculado pelo teste de *log-rank*.

Na Tabela 5.3 colocamos os resultados referentes à SG dos pacientes de acordo com o perfil de CNAs dos casos. Apesar de não ter sido observada significância estatística, de um modo geral, pacientes com deleções nos genes avaliados apresentaram uma sobrevida inferior aos pacientes sem deleções.

**Tabela 5. 3.** Análise de sobrevida global dos pacientes em relação às alterações adicionais.

<b>Variáveis</b>	<b>SG (meses)</b>	<b>IC 95%<sup>i</sup></b>	<b>Log-rank</b>
<b><i>IKZF1</i></b>			0,85
deletado	45,1	19,9 - 70,35	
selvagem	51,6	44,0 - 59,3	
<b><i>CDKN2A/B</i></b>			0,67
deletado	47,3	32,4 - 62,2	
selvagem	52,8	44,7 - 61,0	
<b><i>PAX5</i></b>			0,71
deletado	48,7	35,0 - 62,3	
selvagem	52,8	44,7 - 61,0	
<b><i>RBI</i></b>			0,39
deletado	45,8	45,8 - 45,8	
selvagem	51,5	42,9 - 60,1	

<sup>i</sup>Intervalo de confiança de 95%. SG, sobrevida global. Os dados de SG correspondem ao valor médio uma vez que, de um modo geral, os pacientes não atingiram a SG mediana. Para os genes *PAR1*, *EBF1*, *ETV6* e *BTG1* não foi possível realizar a análise de sobrevida.

## 6 DISCUSSÃO

A translocação t(12;21)(p13;q22) é a segunda anormalidade cromossômica mais frequente na LLA-CPB da infância, ocorrendo em 22-25% dos pacientes (SCHAFER *et al.*). Em nosso estudo, a frequência de *ETV6-RUNX1* foi de 24,2% e nossa série de casos apresentou as características demográficas e clínico-laboratoriais esperadas para este grupo de pacientes (ALPAR *et al.*, 2015; AMPATZIDOU *et al.*, 2018; MOORMAN *et al.*, 2010). Esta translocação resulta em dois produtos de fusão gênica: o transcrito direto - *ETV6-RUNX1* - e o transcrito recíproco - *RUNX1-ETV6*. Pacientes *ETV6-RUNX1* são, em geral, estratificados no grupo com prognóstico favorável. Porém, cerca de 20% destes pacientes recaem e as causas para diferenças na resposta ao tratamento ainda precisam ser elucidadas. Em 2005, Stams e colaboradores mostraram que o aumento de expressão de *RUNX1-ETV6* está associado a um aumento da incidência de recaída em pacientes com t(12;21) e que a alta expressão do transcrito recíproco foi um fator independente para prognóstico desfavorável naquela série de casos (STAMS *et al.*, 2005).

Enquanto a fusão direta é detectada em 100% dos casos com t(12;21), o único estudo que avaliou a presença da fusão recíproca concomitantemente com a fusão direta encontrou uma frequência de ~76% das LLAs-CPB (AL-SHEHHI *et al.*, 2013; STAMS *et al.*, 2005). Em nosso estudo, observamos uma frequência de 65,7% dos casos com a fusão recíproca e descrevemos, pela primeira vez, as características demográficas e clínico-laboratoriais deste subgrupo de pacientes com t(12;21). Em comparação ao estudo de Stams e colaboradores, observamos uma frequência menor de pacientes com o transcrito. Porém, não pudemos realizar esta análise para todos os pacientes incluídos. As perdas observadas nas nossas análises moleculares resultaram da disponibilidade e/ou qualidade do RNA e/ou cDNA, o que impossibilitou a realização da técnica em todos os casos. Além do mais, considerando a natureza retrospectiva das nossas análises, já prevíamos a ocorrência inerente de perdas. Um outro importante aspecto que também explica estas perdas, é o fato de que estas mesmas amostras também foram incluídas e investigadas em outros projetos de pesquisa de cunho molecular do grupo em anos anteriores ao presente estudo.

Atualmente, para prever um melhor resultado para o paciente e atribuir uma terapia risco-adaptada, está claro que a caracterização do perfil molecular destes casos deve ser realizada tão logo o diagnóstico leucêmico seja confirmado. Contudo, várias questões precisam ser consideradas em relação à realização destas abordagens genético-moleculares, tais como qualidade da amostra, reprodutibilidade, padronização e factibilidade de utilização como ferramenta de rotina diagnóstica. Cabe salientar o aspecto complementar dos métodos utilizados ao diagnóstico, pois na maioria das vezes buscam-se alterações genômicas

envolvendo regiões de DNA não acessíveis aos métodos cito-morfológicos, mas passíveis de serem estudadas pelos métodos de genética molecular.

Em um estudo recente do nosso grupo, criamos um algoritmo de testes que pudesse otimizar a identificação da fusão direta, justamente, por causa das limitações que a técnica de RT-PCR pode apresentar. Este estudo teve como objetivo avaliar a utilização da expressão celular de CD9 por citometria de fluxo como uma possível ferramenta para prever a presença da fusão direta. Nós avaliamos tanto o percentual como a IMF de CD9, e uma forte associação foi observada entre o nível de expressão de CD9 e a presença de *ETV6-RUNX1*. Em resumo, nossos dados indicaram que a expressão de CD9 é uma ferramenta rápida para prever testes moleculares citogenéticos para estratificação de risco na prática clínica (Blunck, CB *et al.*, 2019 – Aceito para publicação). No presente estudo, observamos que 78,3% dos casos com *RUNX1-ETV6*, apresentaram percentual de CD9 maior do que 64% e IMF maior do que 12,52. Este achado poderia ser um dos fatores que explica a falta de correlação absoluta entre CD9 e *ETV6-RUNX1*. Neste contexto cabe ressaltar, estudos relatam que CD9 tem sido implicado em vários processos fisiológicos, como motilidade e adesão. CD9 também desempenha um papel crítico em vários processos patológicos, incluindo progressão tumoral e metástase em tumores sólidos (WANG *et al.*, 2007; ZOLLER, 2009).

Estes achados estão de acordo com o fato de CD9 estar com uma expressão (percentual e IMF) menor em casos que apresentam apenas a fusão direta (estratificada como bom prognóstico) e maior em pacientes que apresentam a fusão recíproca. Portanto, é possível que, se CD9 desempenha função em processos de progressão tumoral e metástase, a expressão aumentada desta molécula possa contribuir para a maior agressividade da doença e até mesmo para a ocorrência de recaídas. Esta hipótese precisa ser confirmada em estudos futuros.

Como é de amplo conhecimento, *ETV6-RUNX1* tem origem intra-uterina, caracterizando um evento de iniciação ou primário que, em geral, é seguido pela ocorrência e acúmulo de alterações moleculares secundárias que são de fato necessárias para o surgimento e progressão da leucemia (GREAVES, M. F.; WIEMELS, 2003). Além disso, muitas alterações secundárias foram descritas em associação com a fusão direta. As mais frequentemente relatadas são aquelas que afetam o braço cromossômico não-translocado 12p, incluindo a perda do alelo *ETV6* selvagem (ALVAREZ *et al.*, 2005; GOLUB *et al.*, 1996). Em nosso estudo, 25% dos casos apresentaram, concomitantemente, a deleção do alelo não-rearranjado de *ETV6* e a fusão direta. Este percentual corrobora com o que está descrito na literatura (RAYNAUD *et al.*, 1996) e embora a del(12p) seja uma aberração recorrente em algumas neoplasias hematológicas, o papel leucemogênico do gene *ETV6* ainda é desconhecido (ALVAREZ *et al.*, 2005). Além disso, nós também observamos em 2,6% dos

pacientes a presença de três sinais referentes à fusão *ETV6-RUNX1* em, pelo menos, 60 núcleos interfásicos analisados em cada um dos três casos. Tem sido descrito que sinais adicionais de fusão podem contribuir para a transformação maligna mediada por *ETV6-RUNX1* (AL-SHEHHI *et al.*, 2013).

Em relação ao *RUNX1*, além do envolvimento em translocações cromossômicas, este gene pode se apresentar amplificado em alguns subtipos leucêmicos. Esta amplificação/ganho tem recebido bastante atenção dentro do contexto da LLA-CPB devido a sua associação com prognóstico desfavorável (LI *et al.*, 2014; REICHARD; KANG; ROBINETT, 2011). Em nosso estudo, encontramos 10,5% dos casos apresentando um sinal adicional de *RUNX1* selvagem, concomitantemente com a presença de *ETV6-RUNX1*, porém, não foi possível realizar a análise de sobrevivência destes casos, uma vez que tivemos limitações na obtenção de dados de seguimento.

Em uma translocação t(12;21) balanceada, a fusão gênica recíproca é formada na der(12)t(12;21) (AL-SHEHHI *et al.*, 2013) e, como já descrito anteriormente em estudo de Stams e colaboradores, a expressão de *RUNX1-ETV6* é encontrada em 76% dos casos *ETV6-RUNX1*. Tem sido sugerido que o *RUNX1-ETV6* provavelmente possui alguma influência na fusão direta *ETV6-RUNX1* através da ação de um domínio ETS isolado e pode comportar-se de maneira semelhante ao *ETV6* selvagem, quando este alelo não-rearranjado foi deletado (STAMS *et al.*, 2005). No entanto, os fatores que controlam a expressão de *RUNX1-ETV6* e seu efeito na leucemogênese ainda precisam ser melhor elucidados. Em nosso estudo, encontramos uma menor frequência do transcrito recíproco, provavelmente, porque causa das inúmeras perdas nas investigações moleculares, principalmente pela qualidade do RNA/cDNA. Em relação aos fixados, utilizados para a FISH, as perdas que eventualmente ocorreram foram devidas à insuficiência de material, neste caso, atribuídas ao uso destas amostras em projetos anteriores. Isto impossibilitou a realização da FISH para a identificação de alterações adicionais relacionadas a *RUNX1-ETV6*.

Outra alteração encontrada em nosso estudo, foi um padrão caracterizado pela presença da fusão recíproca e um sinal extra do gene *RUNX1* selvagem em 37,5% dos casos, sugerindo uma possível duplicação do alelo não-rearranjado de *RUNX1*. Em relação às características clínico-laboratoriais, nós observamos nos pacientes que apresentaram sinal extra de *RUNX1* eram hiperleucocitários. Segundo os critérios propostos pelo NCI a alta leucometria pode alocar o paciente no grupo de alto-risco (SMITH *et al.*, 1996). Com relação ao comportamento biológico e desfecho, a literatura relata que os pacientes com amplificação de *RUNX1* geralmente têm um risco aumentado de recaída e um pior prognóstico (ROBINSON *et al.*; SOULIER *et al.*).

Um padrão de alteração caracterizado pela duplicação da fusão *RUNX1-ETV6* recíproca foi observado em 18% dos casos. Estudos demonstram que alguns casos *ETV6-RUNX1* exibem alta expressão de *RUNX1-ETV6* (AL-SHEHHI *et al.*, 2013; STAMS *et al.*, 2005). Desta forma, é possível que a duplicação de *RUNX1-ETV6* resulte na sua superexpressão. Porém, esta confirmação não foi possível em nosso estudo devido a limitações na disponibilidade de cDNA e no pequeno número de casos identificados com esta duplicação. Por outro lado, está descrito que a duplicação de *RUNX1-ETV6* resulta em eventos que podem contribuir para a leucemogênese, isso porque existem vários genes contidos nesta região, incluindo *LRP6*, *BCL2L14*, *DUSP16*, *CREBL2* e *CDKN1B* que podem inativar genes supressores de tumor ou pela ativar de oncogenes (AL-SHEHHI *et al.*, 2013). De fato, estudos funcionais precisam ser realizados para abordar mais a fundo estas questões.

Em relação a ocorrência de CNAs, a frequência de deleções encontradas em nosso estudo nos genes *ETV6*, *CDKN2A/B* e *PAX5* foi similar à observada em outros estudos que avaliaram pacientes com LLA-CPB (SCHWAB *et al.*, 2013). Além disso, nós observamos que os genes *IKZF1* e *JAK2* são deletados com maior frequência em pacientes que apresentam apenas o transcrito direto. As deleções de *IKZF1* foram associadas a um prognóstico inferior e a maior chance de recaída em crianças com LLA-CPB (HARVEY *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2011). Por outro lado, deleções em *JAK2* têm sido associadas com a resistência a quimioterapia (HORN *et al.*, 2018). Desta forma, sugerimos que estes dois eventos associados com pior prognóstico não estariam acontecendo ao mesmo tempo, uma vez que, os pacientes ou apresentam deleção de *IKZF1*, ou *RUNX1-ETV6*.

Nós também investigamos a correlação das CNAs com a expressão do transcrito direto e observamos uma tendência de aumento da expressão do transcrito direto em pacientes com deleção em *CDKN2A/B* em relação aos pacientes com *CDKN2A/B* selvagem. Para confirmar esta tendência, será preciso avaliar um número maior de casos no futuro. Os genes *CDKN2A/B* desempenham importantes funções na regulação do ciclo celular e apoptose, isto pode estar associado ao fato de a inativação de *CDKN2A*, por exemplo, ser a segunda alteração genética mais comum em neoplasias depois das alterações envolvendo *TP53* (LIGGETT; SIDRANSKY, 1998). Muitos estudos têm investigado sobre a importância de deleções de *CDKN2A/B* na progressão da doença e poucos sugerem seu papel no desfecho da doença (BRAUN *et al.*, 2017; GUPTA *et al.*, 2017). A relevância prognóstica de *CDKN2A/B* parece estar associada com os critérios propostos pelo NCI, ou seja, não possuem valor prognóstico independente (SCHWAB *et al.*, 2013). Deste modo, mais estudos precisam ser realizados para investigar a importância de alterações em *CDKN2A/B* no contexto da LLA-CPB.



Nós avaliamos a correlação entre os níveis de mRNA dos transcritos direto e recíproco e as variáveis consideradas como critérios para a estratificação de risco *NCI*, idade e leucometria. Em nossas análises, observamos uma correlação positiva ( $R=0,90$ ;  $P=0,02$ ) entre os níveis do transcrito direto e a contagem leucocitária. Até o momento, não foram esclarecidos os fatores biológicos que explicam a associação entre alta leucometria e o pior prognóstico na LLA-CPB. Edwards e colaboradores sugerem que alguns genes, tais como, *BCAR3*, *IL1R1*, *KCNH2*, *PIR* e *ZDHHC23* podem estar envolvidos em mecanismos celulares que levam a diferenças na contagem leucocitária e no prognóstico dos pacientes (EDWARDS *et al.*, 2016).

Estudos demonstram que várias LLAs podem ser distinguidas com base no perfil imunofenotípico, incluindo a expressão de CD9 (ARNAUD *et al.*, 2015). CD9 é uma proteína pertencente à superfamília das tetraspaninas. Tais proteínas desempenham papéis importantes na sinalização de várias vias biológicas. CD9 tem sido associado tanto com processos fisiológicos, quanto patológicos (GANDEMER *et al.*, 2007; HEMLER, 2005). A correlação positiva que observamos entre a IMF de CD9 e os níveis de mRNA do transcrito recíproco, corrobora com os achados anteriores de que CD9 pode estar envolvido na progressão tumoral e que o aumento da expressão do transcrito recíproco tem sido mostrado como um marcador para prognóstico desfavorável tanto em células humanas como em modelos murinos (NISHIDA *et al.*, 2009; STAMS *et al.*, 2005; YAMAZAKI *et al.*, 2011).

As nossas análises de SG foram realizadas com dados de seguimento de 42 pacientes acompanhados por um tempo médio de 60 meses. Foi obtida a SG média de 48,6 meses (IC95% 42,2 - 55,1). Pacientes com leucometria alta ( $\geq 50.000$  céls/mm<sup>3</sup>) apresentaram SG inferior aos pacientes com baixa leucometria ( $< 50.000$  céls/mm<sup>3</sup>) ( $P=1,0$ ).

Em relação à expressão de CD9, observamos que pacientes que com alto percentual e alta IMF deste marcador apresentaram uma SG inferior. Caso esta associação seja confirmada em estudos subsequentes, estes marcadores podem auxiliar, logo ao diagnóstico, quanto a estratificação de risco de pacientes *RUNX1-ETV6*. Em nossa análise univariada para o *status* de *RUNX1-ETV6* (presença e ausência), a SG média dos pacientes que apresentavam o transcrito recíproco foi inferior. Estes resultados sinalizam que tanto a presença quanto a expressão do transcrito recíproco podem estar associados a um prognóstico desfavorável.

Nós avaliamos a sobrevida global em 5 anos dos pacientes incluídos no estudo de acordo com a presença ou ausência de deleções nos genes *IKZF1*, *CDKN2A/2B*, *PAX5*, *ETV6*, *EBF1*, *BTG1* e *RBI*. Apesar de não ter sido observada significância estatística, de um modo geral, pacientes com estas deleções nestes genes apresentaram uma sobrevida inferior aos pacientes sem deleções.

Em relação as nossas análises de sobrevida, reconhecemos que existe uma limitação significativa dos nossos resultados devido à ausência de informações mais completas de seguimento, principalmente referentes aos dados de recaída, respostas ao tratamento (resposta a indução, remissão completa e contínua, etc), progressão da doença e outras informações sobre a evolução clínica destes pacientes. Com isso, não fomos capazes de realizar as análises de SLE. Entendemos que os resultados destas análises seriam de fundamental importância para melhor embasar as nossas hipóteses iniciais, mas a impossibilidade de coletar estas informações foi inerente ao nosso esforço científico.

A translocação  $t(12;21)(p13;q22)$  é caracterizada como uma lesão primária e que, portanto, demanda a ocorrência de alterações adicionais para que a progressão do clone pré-leucêmico ocorra de fato (ALPAR *et al.*, 2015; VAN DELFT *et al.*, 2011). Há evidências substanciais da presença de múltiplos subclones ao diagnóstico, o que resulta em diferentes perfis de resposta ao tratamento em ~25% dos pacientes *ETV6-RUNX1* (KUSTER *et al.*, 2011; ROTHMAN *et al.*, 2005). Portanto, prognóstico favorável deste grupo de pacientes pode ser modificado com a presença de alterações secundárias (AMPATZIDOU *et al.*, 2018; KNEZ *et al.*, 2015; RUBNITZ *et al.*, 2008).

Como demonstrado em nosso estudo o grupo *RUNX1-ETV6* é um grupo molecularmente heterogêneo que apresenta deleções submicroscópicas englobando genes relevantes para o contexto leucêmico, como *PAX5*, o qual associado ao aumento dos níveis de expressão deste transcrito, o que poderia aumentar a probabilidade de recaídas neste pacientes.

## 7 CONCLUSÕES

- Nós observamos que pacientes com *RUNX1-ETV6* são em sua maioria do sexo feminino, com idade entre 13-120 meses, com leucometria  $\leq 50,000$  células/mm<sup>3</sup>;
- Nós observamos que pacientes com *RUNX1-ETV6* em sua maioria apresentam percentual de CD9>64% e IMF de CD9>12,52;
- Nós observamos uma correlação positiva entre leucometria e a expressão do transcrito direto;
- Nós observamos uma correlação positiva entre a IMF de CD9 e a expressão do transcrito recíproco;
- Pacientes com deleção em *PAX5* apresentaram um aumento na expressão do transcrito recíproco.

## 8 REFERÊNCIAS

- AL-SHEHHI, H. *et al.* Abnormalities of the der(12)t(12;21) in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 52, n. 2, p. 202-13, 2013.
- ALPAR, D. *et al.* Clonal origins of ETV6-RUNX1(+) acute lymphoblastic leukemia: studies in monozygotic twins. **Leukemia**, v. 29, n. 4, p. 839-46, 2015.
- ALVAREZ, Y. *et al.* Genetic abnormalities associated with the t(12;21) and their impact in the outcome of 56 patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 162, n. 1, p. 21-9, 2005.
- AMOR, D. J. *et al.* High frequency of t(12;21) in childhood acute lymphoblastic leukemia detected by RT-PCR. **Pathology**, v. 30, n. 4, p. 381-5, 1998.
- AMPATZIDOU, M. *et al.* ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL): The spectrum of clonal heterogeneity and its impact on prognosis. **Cancer Genet**, v. 225, p. 1-11, 2018.
- ANDERSON, K. *et al.* Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 356-61, 2011.
- ARBER, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-405, 2016.
- ARNAUD, M. P. *et al.* CD9, a key actor in the dissemination of lymphoblastic leukemia, modulating CXCR4-mediated migration via RAC1 signaling. **Blood**, v. 126, n. 15, p. 1802-12, 2015.
- BARBOSA, T. C. *et al.* Frequency of copy number abnormalities in common genes associated with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cytogenetic subtypes in Brazilian children. **Cancer Genet**, v. 208, n. 10, p. 492-501, 2015.
- BATEMAN, C. M. *et al.* Acquisition of genome-wide copy number alterations in monozygotic twins with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 115, n. 17, p. 3553-8, 2010.
- BENE, M. C. Immunophenotyping of acute leukaemias. **Immunol Lett**, v. 98, n. 1, p. 9-21, 2005.
- BENE, M. C. *et al.* Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias. **Haematologica**, v. 84, n. 11, p. 1024-34, Nov 1999.
- BENE, M. C. *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). **Leukemia**, v. 9, n. 10, p. 1783-6, Oct 1995.
- BERDITCHEVSKI, F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. **J Cell Sci**, v. 114, n. Pt 23, p. 4143-51, 2001.
- BORKHARDT, A. *et al.* Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. **Blood**, v. 90, n. 2, p. 571-7, Jul 15 1997.
- BOROWITZ, M. J. *et al.* Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. **Am J Clin Pathol**, v. 100, n. 5, p. 534-40, 1993.

- BOROWITZ, M. J. *et al.* Surface antigen phenotype can predict TEL-AML1 rearrangement in childhood B-precursor ALL: a Pediatric Oncology Group study. **Leukemia**, v. 12, n. 11, p. 1764-70, Nov 1998.
- BRAUN, M. *et al.* Biallelic loss of CDKN2A is associated with poor response to treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 58, n. 5, p. 1162-1171, 2017.
- DE CAMARGO, B. *et al.* Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14 population-based cancer registries. **Int J Cancer**, v. 126, n. 3, p. 715-20, 2010.
- DE ZEN, L. *et al.* Quantitative multiparametric immunophenotyping in acute lymphoblastic leukemia: correlation with specific genotype. I. ETV6/AML1 ALLs identification. **Leukemia**, v. 14, n. 7, p. 1225-31, 2000.
- DWORZAK, M. N. *et al.* AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 10, n. 10, p. 21518, 2017.
- EDWARDS, H. *et al.* Gene Signature of High White Blood Cell Count in B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. **PLoS One**, v. 11, n. 8, 2016.
- EMERENCIANO, M. *et al.* Challenges in the use of NG2 antigen as a marker to predict MLL rearrangements in multi-center studies. **Leuk Res**, v. 35, n. 8, p. 1001-7, 2011.
- FARHI, D. C.; ROSENTHAL, N. S. Acute lymphoblastic leukemia. **Clin Lab Med**, v. 20, n. 1, p. 17-28, vii, Mar 2000.
- GANDEMER, V. *et al.* CD9 expression can be used to predict childhood TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia: proposal for an accelerated diagnostic flowchart. **Leuk Res**, v. 34, n. 4, p. 430-7, 2010.
- GANDEMER, V. *et al.* Five distinct biological processes and 14 differentially expressed genes characterize TEL/AML1-positive leukemia. **BMC Genomics**, v. 8, p. 385, 2007.
- GOLUB, T. R. *et al.* Involvement of the TEL gene in hematologic malignancy by diverse molecular genetic mechanisms. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 211, p. 279-88, 1996.
- GREAVES, M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 3, p. 193-203, 2006.
- \_\_\_\_\_. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 18, n. 8, p. 471-484, 2018.
- GREAVES, M. F.; WIEMELS, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 9, p. 639-49, 2003.
- GUPTA, S. K. *et al.* Gene copy number alteration profile and its clinical correlation in B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 58, n. 2, p. 333-342, 2017.
- HARVEY, R. C. *et al.* Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 115, n. 26, p. 5312-21, 2010.
- HEMLER, M. E. Tetraspanin functions and associated microdomains. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 10, p. 801-11, 2005.
- HONG, D. *et al.* Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. **Science**, v. 319, n. 5861, p. 336-9, Jan 18 2008.

- HORN, S. *et al.* Tumor CDKN2A-Associated JAK2 Loss and Susceptibility to Immunotherapy Resistance. **J Natl Cancer Inst**, v. 110, n. 6, p. 677-681, 2018.
- HRUSAK, O.; PORWIT-MACDONALD, A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. **Leukemia**, v. 16, n. 7, p. 1233-58, Jul 2002.
- IRVING, J. A. *et al.* Integration of genetic and clinical risk factors improves prognostication in relapsed childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 128, n. 7, p. 911-22, 2016.
- KEARNEY, L.; COLMAN, S. Specialized fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques for leukaemia research. **Methods Mol Biol**, v. 538, p. 57-70, 2009.
- KEBRIAIEI, P.; ANASTASI, J.; LARSON, R. A. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 15, n. 4, p. 597-621, 2002.
- KIM, M. *et al.* PAX5 deletion is common and concurrently occurs with CDKN2A deletion in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Blood Cells Mol Dis**, v. 47, n. 1, p. 62-6, 2011.
- KNEZ, V. M. *et al.* Heterogeneity of Abnormal RUNX1 Leading to Clinicopathologic Variations in Childhood B-Lymphoblastic Leukemia. **Am J Clin Pathol**, v. 144, n. 2, p. 305-14, 2015.
- KUSTER, L. *et al.* ETV6/RUNX1-positive relapses evolve from an ancestral clone and frequently acquire deletions of genes implicated in glucocorticoid signaling. **Blood**, v. 117, n. 9, p. 2658-67, 2011.
- LEUNG, K. T. *et al.* The tetraspanin CD9 regulates migration, adhesion, and homing of human cord blood CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood**, v. 117, n. 6, p. 1840-50, 2011.
- LI, Y. *et al.* Constitutional and somatic rearrangement of chromosome 21 in acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 508, n. 7494, p. 98-102, 2014.
- LIGGETT, W. H., JR.; SIDRANSKY, D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. **J Clin Oncol**, v. 16, n. 3, p. 1197-206, 1998.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.
- LOPEZ, R. G. *et al.* TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. **J Biol Chem**, v. 274, n. 42, p. 30132-8, 1999.
- LORSBACH, R. B.; DOWNING, J. R. The role of the AML1 transcription factor in leukemogenesis. **Int J Hematol**, v. 74, n. 3, p. 258-65, Oct 2001.
- LUDWIG, W. D. *et al.* Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics, and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukemia: results of the German multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89. **Blood**, v. 92, n. 6, p. 1898-909, 1998.
- MACINTYRE, E. A.; DELABESSE, E. Molecular approaches to the diagnosis and evaluation of lymphoid malignancies. **Semin Hematol**, v. 36, n. 4, p. 373-89, Oct 1999.
- MAECKER, H. T.; TODD, S. C.; LEVY, S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. **FASEB J**, v. 11, n. 6, p. 428-42, 1997.
- MAUVIEUX, L. *et al.* NG2 expression in MLL rearranged acute myeloid leukaemia is restricted to monoblastic cases. **Br J Haematol**, v. 107, n. 3, p. 674-6, 1999.

- MAVROTHALASSITIS, G.; GHYSDAEL, J. Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. **Oncogene**, v. 19, n. 55, p. 6524-32, 2000.
- MCGREGOR, S.; MCNEER, J.; GURBUXANI, S. Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia. **Semin Diagn Pathol**, v. 29, n. 1, p. 2-11, 2012.
- MELNICK, A. *et al.* AML-1/ETO fusion protein is a dominant negative inhibitor of transcriptional repression by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. **Blood**, v. 96, n. 12, p. 3939-47, 2000.
- MITCHELL, C. *et al.* The impact of risk stratification by early bone-marrow response in childhood lymphoblastic leukaemia: results from the United Kingdom Medical Research Council trial ALL97 and ALL97/99. **Br J Haematol**, v. 146, n. 4, p. 424-36, Aug 2009.
- MOORMAN, A. V. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **Blood Rev**, v. 26, n. 3, p. 123-35, May 2012.
- \_\_\_\_\_. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 101, n. 4, p. 407-16, 2016.
- MOORMAN, A. V. *et al.* Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. **Lancet Oncol**, v. 11, n. 5, p. 429-38, 2010.
- MULLIGHAN, C. G. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Invest**, v. 122, n. 10, p. 3407-15, Oct 1 2012.
- MULLIGHAN, C. G. *et al.* Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 446, p. 758, 2007.
- MULLIGHAN, C. G. *et al.* Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. **Science**, v. 322, n. 5906, p. 1377-80, Nov 28 2008.
- NISHIDA, H. *et al.* CD9 correlates with cancer stem cell potentials in human B-acute lymphoblastic leukemia cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 382, n. 1, p. 57-62, 2009.
- NOORDZIJ, J. G. *et al.* Composition of precursor B-cell compartment in bone marrow from patients with X-linked agammaglobulinemia compared with healthy children. **Pediatr Res**, v. 51, n. 2, p. 159-68, 2002.
- NORTH, T. E. *et al.* Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. **Immunity**, v. 16, n. 5, p. 661-72, 2002.
- NOTTA, F. *et al.* Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 362-7, Jan 20 2011.
- PIETERS, R.; CARROLL, W. L. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 24, n. 1, p. 1-18, Feb 2010.
- POIREL, H. *et al.* The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties. **Oncogene**, v. 14, n. 3, p. 349-57, 1997.
- PUI, C. H.; EVANS, W. E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 354, n. 2, p. 166-78, Jan 12 2006.
- RAYNAUD, S. *et al.* The 12;21 translocation involving TEL and deletion of the other TEL allele: two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 87, n. 7, p. 2891-9, 1996.

REICHARD, K. K.; KANG, H.; ROBINETT, S. Pediatric B-lymphoblastic leukemia with RUNX1 amplification: clinicopathologic study of eight cases. **Mod Pathol**, v. 24, n. 12, p. 1606-11, 2011.

ROBINSON, H. M. *et al.* **Amplification of AML1 in acute lymphoblastic leukemia is associated with a poor outcome.** *Leukemia*. 2003 Nov;17(11):2249-50. doi: 10.1038/sj.leu.2403140., ISBN 0887-6924 (Print)  
0887-6924 (Linking).

ROTHMAN, R. *et al.* Co-existence of multiple subclones in TEL-AML1 at diagnosis of acute lymphoblastic leukaemia in association with submicroscopic deletion of AML1. **Br J Haematol**, v. 129, n. 4, p. 491-8, 2005.

RUBNITZ, J. E. *et al.* Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 13, p. 2186-91, 2008.

SCHAFER, D. *et al.* **Five percent of healthy newborns have an ETV6-RUNX1 fusion as revealed by DNA-based GIPFEL screening.** *Blood*. 2018 Feb 15;131(7):821-826. doi: 10.1182/blood-2017-09-808402. Epub 2018 Jan 8., ISBN 1528-0020 (Electronic)  
0006-4971 (Linking).

SCHWAB, C. J. *et al.* Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: association with cytogenetics and clinical features. **Haematologica**, v. 98, n. 7, p. 1081-8, 2013.

SECKER-WALKER, L. M. *et al.* Cytogenetics adds independent prognostic information in adults with acute lymphoblastic leukaemia on MRC trial UKALL XA. MRC Adult Leukaemia Working Party. **Br J Haematol**, v. 96, n. 3, p. 601-10, 1997.

SMITH, M. *et al.* Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 1, p. 18-24, Jan 1996.

SO, C. W. E. **Leukemia: Methods and Protocols.** Humana Press, 2009. ISBN 9781588299895.

SOULIER, J. *et al.* **Amplification of band q22 of chromosome 21, including AML1, in older children with acute lymphoblastic leukemia: an emerging molecular cytogenetic subgroup.** *Leukemia*. 2003 Aug;17(8):1679-82. doi: 10.1038/sj.leu.2403000., ISBN 0887-6924 (Print)  
0887-6924 (Linking).

STAMS, W. A. *et al.* Expression levels of TEL, AML1, and the fusion products TEL-AML1 and AML1-TEL versus drug sensitivity and clinical outcome in t(12;21)-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 8, p. 2974-80, 2005.

TABERNERO, M. D. *et al.* Adult precursor B-ALL with BCR/ABL gene rearrangements displays a unique immunophenotype based on the pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression. **Leukemia**, v. 15, n. 3, p. 406-14, Mar 2001.

VAN DELFT, F. W. *et al.* Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 117, n. 23, p. 6247-54, 2011.

VAN DER VEER, A. *et al.* Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. **Blood**, v. 122, n. 15, p. 2622-9, 2013.

VAN DONGEN, J. J. *et al.* Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the



- BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. **Leukemia**, v. 13, n. 12, p. 1901-28, 1999.
- WANG, J. C. *et al.* Down-regulation of CD9 expression during prostate carcinoma progression is associated with CD9 mRNA modifications. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 8, p. 2354-61, 2007.
- WEIR, E. G. *et al.* A limited antibody panel can distinguish B-precursor acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with four color flow cytometry: implications for residual disease detection. **Leukemia**, v. 13, n. 4, p. 558-67, 1999.
- WIEMELS, J. L. *et al.* Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. **Blood**, v. 94, n. 3, p. 1057-62, Aug 1 1999.
- YAMASHITA, Y. *et al.* IKZF1 and CRLF2 gene alterations correlate with poor prognosis in Japanese BCR-ABL1-negative high-risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Blood Cancer**, v. 60, n. 10, p. 1587-92, 2013.
- YAMAZAKI, H. *et al.* Regulation of cancer stem cell properties by CD9 in human B-acute lymphoblastic leukemia. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 409, n. 1, p. 14-21, 2011.
- YANG, Y. L. *et al.* IKZF1 deletions predict a poor prognosis in children with B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia: a multicenter analysis in Taiwan. **Cancer Sci**, v. 102, n. 10, p. 1874-81, 2011.
- ZELEN, A.; GREAVES, M.; ENVER, T. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Oncogene**, v. 23, n. 24, p. 4275-83, May 24 2004.
- ZOLLER, M. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 1, p. 40-55, 2009.

## 9. ANEXO 1

- DESCRIÇÃO DAS SONDAS CONTIDAS NO KIT SALSA MLPA P335-A4

Tamanho relativo	Gene	Posição cromossômica	Senso	Anti-senso
125 <sup>†</sup>	ATG4B	02q37.3	GTGCAGGACCAGCGTTCCCTGT	GCAGGGCCACTGCGTTTCTGCAGATCCGACCCGGCACT
130 <sup>†</sup>	IL4	05q31.1	CTACATTGTCACCTGCAAAATCGACACCTAT	TAATGGGTCTCACCTCCCAACTGCTTCCCCT
136	CRLF2	Xp22.33PAR	TCTGACCTGTCTACGGGGATCTCCTCTA	TGAGGTTCACTACCGGAGCCCTTCGACACCGAGTGCC
142	IKZF1	07p12.2	TGCAATCAGTGCAGGGCCCTCA	TTCACCCAGAAGGGCAACCTGCTCCGGCACATCA
148	SHOX-AREA	Xp22.33PAR	TACTGCCAATGTGAATGGTGTGAAAT	GAGGAAGCCCTGAGCTAGACTCTTCTCGAGGGTCTTC
154	PAX5	09p13.2	CGTGTCTGGGGACATCTTGATG	TTGGCGAGAACAGGACATGATCTCACATGGCGAGAAG
160	BTG1 AREA	12q21.33	TCATCCTTCTGTGACAAATGCAATTGCTCTCT	GCTTATCTGAGCTCTCAAATGCAATTGGTAGACCTGCAGAGGG
166	CSF2RA	Xp22.33PAR	TAGGAATGGCATGGACATCTCCGCCT	CCGCGACACGGGGAACTGTTTTCTTGATGAT
177	IKZF1	07p12.2	TGTAAGCGATACTCCAGATGAGGGCGA	TGAGCCCATGCCGATCCCGAGGACCTCTCC
184	SHOX-AREA	Xp22.33PAR	TCGAGTCTCCAGACTGCATAATTGATGAGA	TGCAGAAGCCAGTGTGAGAAATCAAATGTCGTAATAATAAA
190 <sup>†</sup>	SCN5A	03p22.2	GTGGAGCACAGCTGGTTCGAGACA	TTCATCATCTTCATGATCCTACTCAGCAGTGGAGCGC
196	ETV6	12p13.2	TGGCAGGGACACTTCTCTTGACAGCA	AGAGGGACCTGGAGCACCTTAGACAAACTACCCAGC
202	PAX5	09p13.2	GCAGAGACTTCTCCGGAAGCAG	ATGCGGGGAGACTTGTTCACACAGCAGCAGCTGGA
208	IKZF1	07p12.2	GCTGATGAGGGTCAAGACATGTCCCA	AGTTTCAGGTGAGACCTTATGAGATAGCTGTGTTGGGAAGTTCATGAG
214 <sup>†</sup>	SLC6A5	11p15.1	GAATCTCTTCCCTTTTGCCTCTCAGG	TGTGGAAAGATGCTGCCACTCAGATTTTCTCTTTATCTGCTGC
220	RB1	13q14.2	GGCATTCTTTGGACTAAATCCCAATTT	TTATTGAGTAATGTAAGTCTCCCTCATTCTCTGCTTGGCT

226	EBF1	05q33.3	GCAGAGGTTTACATTTTTAAAAATTTGCTTTCCA	GCCCGCCTTGATCTTCTAAGTGCAGATTCATCGTCTGA
232	BTG1	12q22	CCACGAGCGAGCGACAGCTGCAGACCTTCAGCCAG	AGCCTGCAGGAGCTGCTGGCAGGTGAGCAGG
238	CDKN2B	09p21.3	GCAGCGGAAAGCCTGTAAGCCTGCAAGCCTGTCTGAGA	CTCACAGGAAGGAGGAGCCGACCCGGGAATAACCTTCCATACAT
244	ETV6	12p13.2	CGGCTTGACAGCAATTTACTGGAGCA	GGGATGACGTAGCCAGTGGCTCAAGTGGGCTGA
251	CDKN2A	09p21.3	CACTCGCTCACGGCTCCCTTGCTGGAAAGAT	ACCGCGGTCCCTCCAGAGGATTTGAGGGACAGGGTCCG
256	CDKN2A	09p21.3	CTCCGGAAGCTGTGCAATTCATGACA	AGCATTTTGTGAAGTGGGAAGCTCAGGGGGTTACTGGCTTCTCT
263	IKZF1	07p12.2	CTGTGCGGAGGATTTACGAATGCTTG	ATGCCTCGGGAGAGAAAATGAATGGCTCCACAG
269	IKZF1	07p12.2	CCGAGGATCAGTCTTGCCCAA	AGCGGACGCACAAATCCAGTGTGTTTTCAA
275	PAX5	09p13.2	CTTTGTTGCTTTGATTCTCAGGCCGTGACT	TGGCGAGCACGACCCCTCCCGGGTACCC
282	PAX5	09p13.2	CTCCGTGACGCAGGTGTCTCGGTGAGCAGGAT	TCGGCCGGCTCGTCTACTCCATCAGCGGCA
288	IKZF1	07p12.2	CAGGGCTGCATTGGGAGCATCCAGAAT	GCTACCTTCTAGATGTTCCCGAGCCGCTGGCT
294 <sup>†</sup>	STX1A	07q11.23	CGGTGAGATCATCAAGCTGGAGAACAGCATCCGT	GAGCTACACGACATGTTTCATGGACATGGCCATGCTCGTGGA GA
301	ETV6	12p13.2	GCTGGAAGAACTTCTAAATGACCCGCTC	TGGCTGGCCGTGGAGCCTTCTGGGTGGGG
310	RB1	13q14.2	CGTGAGTTTTAGACAAGCTAGCTTTTGTGTTG	TCTTGGCGCCATATTTGTAAGAAGGGTGAAGATATG
319 <sup>†</sup>	FBN1	15q21.1	CAACACTGATGGCTCCTACAGATGTG	AATGCTTCCCTGGACTGGCTGTGGGTCTGGAT
328	BTG1	12q22	CCAAGTAAATGATCACTTTATTTGCTAGGGAGG	GAAGTCTAGGGTGGTTTCAGTTTCTCCAGACATACCTA
337	IKZF1	07p12.2	GCAGAAGACCTGTGCAAGATAGGATC	AGAGAGATCTCTCGTGTGGACAGACTAGCAAGTAACGTCCG
346	IL3RA	Xp22.33PAR	CTGCTTTCAGCGCACACGGGAAGATATCAG	AAACATCTAGGATCAGGACACCCAGATCTTCTCAACTG

355	<i>RB1</i>	13q14.2	CCAGGTTCAACTACGCGTGTAATTTACTGCAA	ATGCAGAGACACAAGCAACCTCAGCCTTCCAGACCCA
364	<i>EBF1</i>	05q33.3	CACATCCCTGGTGTGGGAAGTC	ACACTGTCTACAAATCTAAGCAGTTCTGCAAAGGAACACCA G
373	<i>PAX5</i>	09p13.2	CAAACACTGATGGCACCTATTGAGGGT	GACAGCCACCCAGCCCTCCTGAAGATAGCCAGAG
382	<i>ETV6</i>	12p13.2	CATGTCTGAGACTCCTGCTCAGTGTAG	CATTAAGGTAAAAATCTTCTCCCTCCTTCTACGTGGTGG
391	<i>ETV6</i>	12p13.2	CTGACGCCACTTCATGTTCCAG	TGCCTCGAGCGCTCAGGATGGAGGAAGACTCGATC
400 <sup>†</sup>	<i>PYGB</i>	20p11.2	CGACTTGGAGGAACTCGAGGAGATAGAAGAA	GATGCTGGCCTTGGGAATGGAGGCCTGGGGAGGCTGG
409	<i>BTG1 AREA</i>	12q21.33	CTGATGAGTAACGCAGGATGGAGTCTTTG	CAATAAACAGCTGGACCACAAGTCGTGGTGACGTGATG
418	<i>RB1</i>	13q14.2	CGTAGGGGTAACCTTGAAACTTGCCCTT	TGCCCTCCCTAAATATGGGCAATGGCAGAATATGTTCTTG
427 <sup>†</sup>	<i>DNAH5</i>	05p15.2	CCAAATATTCTTCTGGACAAGCAGGT	TACCCTGAACTGGAAGCAGCAATTAGTAGACAGGTAATATGC T
436	<i>EBF1</i>	05q33.3	CACCACTCCCAGCAGACCAACTATAACT	CCGTCACCACGAGCATGAACGGATACGGCTCT
445	<i>RB1</i>	13q14.2	CAGTAAACATCTCCCAGGAGATCCAAATT	TCAGCAGAACTGGCAGAAATGAGTAAGTACTTTTTTACCT TGTG
454	<i>EBF1</i>	05q33.3	CTTCTGAAGCCGATGGCCTCTCGA	GAGCTTGGTGGCACACATACTGTGTGAGAATCTCCTTTGAGA C
465	<i>IKZF1</i>	07p12.2	CTGGGGTCTTGAACCTCAATTGTGTTTTCTGCAGTT	GGTAAACCTCACAAATGTGGATATTGTGGCCGAAGCTA
474	<i>ETV6</i>	12p13.2	CCATCCGTGGATAATGTGCACCAT	AACCCTCCACCATTGAACTGTTGCACCGCTCCAGGT
483	<i>PAX5</i>	09p13.2	CTCCGCCAGAGGATAGTGGAACTTGCTCATCAA	GGTGTGAGGCCCTGCGACATCTCCAGGCAGCTTCG
490 <sup>†</sup>	<i>GPR98</i>	05q14.3	CCTCAACTGGAATAAAAAATCCCTGCCATCGGTAAA	CAGTAACAGATGATTTTCTTAACATTATACCATATATTAATTT TCCAAAGTAAAGAAACACCAGCC
500 <sup>†</sup>	<i>DUSP8</i>	11p15.5	CCTGCCTCACCTCTACCTGGGCTCGCAGAAGGACGTCCT A	AACAAGGTGTGTGTGAGTGGAGTTCGGGGGGTGGTCAATG GGAAA

<sup>†</sup> Sondas utilizadas como controle interno da reação de MLPA

## 10. ANEXO 2

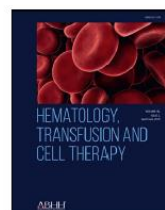
### • PRODUÇÕES DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

HEMATOL TRANSFUS CELL THER. 2019;xx(x):xxx-xxx



HEMATOLOGY, TRANSFUSION AND CELL THERAPY

www.htct.com.br



#### Original article

## CD9 predicts ETV6-RUNX1 in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia

Caroline B. Blunck<sup>a</sup>, Eugênia Terra-Granado<sup>a</sup>, Elda P. Noronha<sup>a</sup>, Gabriel Wajnberg<sup>a,b,c</sup>, Fábio Passetti<sup>a,b</sup>, Maria S. Pombo-de-Oliveira<sup>a</sup>, Mariana Emerenciano<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>b</sup> Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>c</sup> Atlantic Cancer Research Institute, 35 Providence St., E1C 8X3, Moncton, NB, Canada

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 18 September 2018

Accepted 21 November 2018

Available online xxx

##### Keywords:

Acute lymphoblastic leukemia

Biomarker

CD9

ETV6-RUNX1

Flow cytometry

#### ABSTRACT

**Introduction:** The ETV6-RUNX1 is a fusion gene associated with a good outcome in B-cell precursor lymphoblastic leukemia.

**Objective:** This study aimed to re-evaluate the CD9 cellular expression by flow cytometry (FC) as a possible tool to predict the presence of ETV6-RUNX1.

**Method:** Childhood B-cell precursor lymphoblastic leukemia cases were included ( $n = 186$ ). The percentage of CD9-labeled cells and the median fluorescence intensity ratio were used for correlation with the molecular tests. Receiver Operating Characteristic curves were performed to determine the likelihood of the CD9 expression predicting ETV6-RUNX1.

**Results:** The ETV6-RUNX1 was found in 44/186 (23.6%) cases. Data analysis revealed that the best cutoff for CD9 percentage was 64%, with an accuracy of 0.84, whereas the best cutoff for CD9 median fluorescence intensity ratio was 12.52, with an accuracy of 0.80. A strong association was observed between the level of CD9 expression and the presence of ETV6-RUNX1.

**Conclusion:** These data confirm that the CD9 expression could be used for risk stratification in clinical practice.

© 2019 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

#### Introduction

B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) is a heterogeneous disease with a variety of prognostic risk factors.<sup>1</sup> For better understanding of this disease, different etiologic, clinical, analytical and multidisciplinary approaches

are necessary. Immunophenotyping, in combination with cytogenetic-molecular characterization, is of great importance in the identification and classification of different subtypes. The chromosomal translocation t(12;21) (p13;q22), resulting in the ETV6-RUNX1 gene fusion (previously named TEL-AML1), is present in 22–25% of BCP-ALL. This alteration is specific to BCP-ALL, which is primarily CD10 positive,

\* Corresponding author at: Research Center, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rua André Cavalcanti, 37, Rio de Janeiro CEP: 20231-050, RJ, Brazil.

E-mail address: [memerenciano@inca.gov.br](mailto:memerenciano@inca.gov.br) (M. Emerenciano).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.11.007>

2531-1379/© 2019 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article in press as: Blunck CB, et al. CD9 predicts ETV6-RUNX1 in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Hematol Transfus Cell Ther. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.11.007>

CASE REPORT

Open Access

# A novel *PAX5* rearrangement in *TCF3-PBX1* acute lymphoblastic leukemia: a case report



Thayana Conceição Barbosa<sup>1,2</sup>, Bruno Almeida Lopes<sup>1</sup>, Caroline Barbieri Blunck<sup>1</sup>, Marcela Braga Mansur<sup>1</sup>, Adriana Vanessa Santini Deyl<sup>3</sup>, Mariana Emerenciano<sup>1†</sup> and Maria S. Pombo-de-Oliveira<sup>2†\*</sup>

## Abstract

**Background:** Chromosome translocations are a hallmark of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). Additional genomic aberrations are also crucial in both BCP-ALL leukemogenesis and treatment management. Herein, we report the phenotypic and molecular cytogenetic characterization of an extremely rare case of BCP-ALL harboring two concomitant leukemia-associated chromosome translocations: t(1;19)(q23;q13.3) and t(9;17)(p13;q11.2). Of note, we described a new rearrangement between exon 6 of *PAX5* and a 17q11.2 region, where intron 3 of *SPECC1* is located. This rearrangement seems to disrupt *PAX5* similarly to a *PAX5* deletion. Furthermore, a distinct karyotype between diagnosis and relapse samples was observed, disclosing a complex clonal evolution during leukemia progression.

**Case presentation:** A 16-year-old boy was admitted febrile with abdominal and joint pain. At clinical investigation, he presented with anemia, splenomegaly, low white blood cell count and 92% lymphoblast. He was diagnosed with pre-B ALL and treated according to high risk GBTLI-ALL2009. Twelve months after complete remission, he developed a relapse in consequence of a high central nervous system and bone marrow infiltration, and unfortunately died.

**Conclusions:** To our knowledge, this is the first report of a rearrangement between *PAX5* and *SPECC1*. The presence of *TCF3-PBX1* and *PAX5*-rearrangement at diagnosis and relapse indicates that both might have participated in the malignant transformation disease maintenance and dismal outcome.

**Keywords:** der(9)t(9;17)(p13;q11.2) translocation, *PAX5-SPECC1*, Near-triploidy karyotype, *TCF3-PBX1*

## Background

B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) is characterized by recurrent chromosomal alterations including translocations, which result in aberrant fusion genes. *TCF3-PBX1* is one of these fusions and is found in 3–6% of BCP-ALL patients; moreover, the acquisition of secondary genomic aberrations, such as loss of *CDKN2A/B*, *PAX5* or *RBI*, is common and crucial to leukemogenesis in those cases [1, 2].

*PAX5*, a master regulator of B-cell differentiation, is frequently disrupted by deletions, point mutations and amplifications in BCP-ALL. These disruptions might

result in potentially oncogenic proteins [3, 4]. For example, *PAX5* amplifications (*PAX5*<sup>AMP</sup>) were identified in diagnostic-relapse matched samples of patients who lacked common cytogenetic abnormalities at relapse, indicating that *PAX5*<sup>AMP</sup> may be an important driver of leukemogenesis [5]. Notably, *PAX5* can be labeled a “promiscuous” gene since over 16 partner genes have been identified in leukemia-associated rearrangements. These rearrangements result in fusion genes encoding chimeric proteins that modify *PAX5* function and occur in 2–3% of pediatric BCP-ALL patients.

Here, we report an extremely rare case of BCP-ALL harboring two concomitant leukemia-associated alterations: *TCF3-PBX1* and *PAX5* rearrangement (*PAX5-r*). Additionally, to the best of our knowledge, this is the first report of *PAX5* disruption caused by a rearrangement with a 17q11.2 region, where *SPECC1* gene is located.

\* Correspondence: mpombo@inca.gov.br

<sup>†</sup>Mariana Emerenciano and Maria S. Pombo-de-Oliveira contributed equally to this work.

<sup>2</sup>Pediatric Hematology-Oncology Program, Research Center, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brazil  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## ORIGINAL ARTICLE

The *MLL* recombinome of acute leukemias in 2017

C Meyer<sup>1</sup>, T Burmeister<sup>2</sup>, D Gröger<sup>2</sup>, G Tsaour<sup>3</sup>, L Fechina<sup>3</sup>, A Renneville<sup>4</sup>, R Sutton<sup>5</sup>, NC Venn<sup>5</sup>, M Emerenciano<sup>6</sup>, MS Pombo-de-Oliveira<sup>6</sup>, C Barbieri Blunck<sup>6</sup>, B Almeida Lopes<sup>6</sup>, J Zuna<sup>7</sup>, J Trka<sup>7</sup>, P Ballerini<sup>8</sup>, H Lapillonne<sup>8</sup>, M De Braekeleer<sup>9,8</sup>, G Cazzaniga<sup>10</sup>, L Corral Abascal<sup>10</sup>, VHJ van der Velden<sup>11</sup>, E Delabesse<sup>12</sup>, TS Park<sup>13</sup>, SH Oh<sup>14</sup>, MLM Silva<sup>15</sup>, T Lund-Aho<sup>16</sup>, V Juvonen<sup>17</sup>, AS Moore<sup>18</sup>, O Heidenreich<sup>19</sup>, J Vormoor<sup>20</sup>, E Zerkalenskova<sup>21</sup>, Y Olshanskaya<sup>21</sup>, C Bueno<sup>22,23,24</sup>, P Menendez<sup>22,23,24</sup>, A Teigler-Schlegel<sup>25</sup>, U zur Stadt<sup>26</sup>, J Lentjes<sup>27</sup>, G Göhring<sup>27</sup>, A Kustanovich<sup>28</sup>, O Aleinikova<sup>28</sup>, BW Schäfer<sup>29</sup>, S Kubetzko<sup>29</sup>, HO Madsen<sup>30</sup>, B Gruhn<sup>31</sup>, X Duarte<sup>32</sup>, P Gameiro<sup>33</sup>, E Lippert<sup>34</sup>, A Bidet<sup>34</sup>, JM Cayuela<sup>35</sup>, E Clappier<sup>35</sup>, CN Alonso<sup>36</sup>, CM Zwaan<sup>37</sup>, MM van den Heuvel-Eibrink<sup>37</sup>, S Izraeli<sup>38,39</sup>, L Trakhtenbrot<sup>38,39</sup>, P Archer<sup>40</sup>, J Hancock<sup>40</sup>, A Möricke<sup>41</sup>, J Alten<sup>41</sup>, M Schrappe<sup>41</sup>, M Stanulla<sup>42</sup>, S Strehl<sup>43</sup>, A Attarbaschi<sup>43</sup>, M Dworzak<sup>43</sup>, OA Haas<sup>43</sup>, R Panzer-Grümayer<sup>43</sup>, L Sedék<sup>44</sup>, T Szczepański<sup>45</sup>, A Caye<sup>46</sup>, L Suarez<sup>46</sup>, H Cavé<sup>46</sup> and R Marschalek<sup>1</sup>

Chromosomal rearrangements of the human *MLL/KMT2A* gene are associated with infant, pediatric, adult and therapy-induced acute leukemias. Here we present the data obtained from 2345 acute leukemia patients. Genomic breakpoints within the *MLL* gene and the involved translocation partner genes (TPGs) were determined and 11 novel TPGs were identified. Thus, a total of 135 different *MLL* rearrangements have been identified so far, of which 94 TPGs are now characterized at the molecular level. In all, 35 out of these 94 TPGs occur recurrently, but only 9 specific gene fusions account for more than 90% of all illegitimate recombinations of the *MLL* gene. We observed an age-dependent breakpoint shift with breakpoints localizing within *MLL* intron 11 associated with acute lymphoblastic leukemia and younger patients, while breakpoints in *MLL* intron 9 predominate in AML or older patients. The molecular characterization of *MLL* breakpoints suggests different etiologies in the different age groups and allows the correlation of functional domains of the *MLL* gene with clinical outcome. This study provides a comprehensive analysis of the *MLL* recombinome in acute leukemia and demonstrates that the establishment of patient-specific chromosomal fusion sites allows the design of specific PCR primers for minimal residual disease analyses for all patients.

*Leukemia* (2018) 32, 273–284; doi:10.1038/leu.2017.213

<sup>1</sup>Institute of Pharmaceutical Biology/Diagnostic Center of Acute Leukemia (DCAL), Goethe-University, Frankfurt/Main, Germany; <sup>2</sup>Charité—Department of Hematology, Oncology and Tumorimmunology, Berlin, Germany; <sup>3</sup>Regional Children Hospital 1, Research Institute of Medical Cell Technologies, Pediatric Oncology and Hematology Center, Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia; <sup>4</sup>Laboratory of Hematology, Biology and Pathology Center, CHRU of Lille; INSERM, UMR-S 1172, Cancer Research Institute of Lille, Lille, France; <sup>5</sup>Children's Cancer Institute Australia, University of NSW Sydney, Sydney, New South Wales, Australia; <sup>6</sup>Pediatric Hematology-Oncology Program—Research Center, Instituto Nacional de Cancer Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>7</sup>CLIP, Department of Paediatric Haematology/Oncology, Charles University Prague, 2nd Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic; <sup>8</sup>Biological Hematology, AP-HP A. Trousseau, Pierre et Marie Curie University, Paris, France; <sup>9</sup>Université de Bretagne Occidentale, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique & INSERM-U1078, Brest, France; <sup>10</sup>Centro Ricerca Tettamanti, Clinica Pediatrica Univ. Milano Bicocca, Monza, Italy; <sup>11</sup>Erasmus MC, Department of Immunology, Rotterdam, The Netherlands; <sup>12</sup>CHU Purpan, Laboratoire d'Hématologie, Toulouse, France; <sup>13</sup>Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea; <sup>14</sup>Department of Laboratory Medicine, Inje University College of Medicine, Busan, Korea; <sup>15</sup>Cytogenetics Department, Bone Marrow Transplantation Unit, National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil; <sup>16</sup>Laboratory of Clinical Genetics, Fimlab Laboratories, Tampere, Finland; <sup>17</sup>Department of Clinical Chemistry and TYKSLAB, University of Turku and Turku University Central Hospital, Turku, Finland; <sup>18</sup>The University of Queensland Diamantina Institute, The University of Queensland, Brisbane, Queensland, Australia; <sup>19</sup>Northern Institute for Cancer Research, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK; <sup>20</sup>The Great North Children's Hospital, Newcastle upon Tyne Hospitals NHS Foundation Trust, Newcastle upon Tyne, UK; <sup>21</sup>Dmitry Rogachev National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow; <sup>22</sup>Josep Carreras Leukemia Research Institute, Department of Biomedicine, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>23</sup>CIBER de Cancer (CIBERONC), ISCIII, Madrid, Spain; <sup>24</sup>Instituto Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain; <sup>25</sup>Department of Experimental Pathology and Cytology, Institute of Pathology, Giessen, Germany; <sup>26</sup>Center for Diagnostic, University Medical Center Hamburg Eppendorf, Hamburg, Germany; <sup>27</sup>Department of Human Genetics, Hannover Medical School, Hanover, Germany; <sup>28</sup>Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Republic of Belarus; <sup>29</sup>Department of Oncology, University Children's Hospital Zurich, Zurich, Switzerland; <sup>30</sup>Department of Clinical Immunology, University Hospital Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark; <sup>31</sup>Department of Pediatrics, Jena University Hospital, Jena, Germany; <sup>32</sup>Department of Pediatrics, Portuguese Institute of Oncology of Lisbon, Lisbon, Portugal; <sup>33</sup>Hemato-Oncology Laboratory, UIPM, Portuguese Institute of Oncology of Lisbon, Lisbon, Portugal; <sup>34</sup>Hématologie Biologique, CHU de Brest and INSERM U1078, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France; <sup>35</sup>Laboratoire d'hématologie, AP-HP Saint-Louis, Paris Diderot University, Paris, France; <sup>36</sup>Hospital Nacional de Pediatría Prof Dr J. P. Garrahan, Servicio de Hemato-Oncología, Buenos Aires, Argentina; <sup>37</sup>Department of Pediatric Oncology/Hematology, Erasmus MC, Sophia Children's Hospital, Rotterdam, The Netherlands; <sup>38</sup>The Chaim Sheba Medical Center, Department of Pediatric Hemato-Oncology and the Cancer Research Center, Tel Aviv, Israel; <sup>39</sup>Sackler Medical School Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel; <sup>40</sup>Bristol Genetics Laboratory, Pathology Sciences, Southmead Hospital, North Bristol NHS Trust, Bristol, UK; <sup>41</sup>Department of Pediatrics, University Medical Center Schleswig-Holstein, Kiel, Germany; <sup>42</sup>Department of Pediatrics, MHH, Hanover, Germany; <sup>43</sup>Children's Cancer Research Institute and St Anna Children's Hospital, Department of Pediatrics, Medical University of Vienna, Vienna, Austria; <sup>44</sup>Department of Microbiology and Immunology, Medical University of Silesia, Zabrze, Poland; <sup>45</sup>Department of Pediatric Hematology and Oncology, Medical University of Silesia, Zabrze, Poland and <sup>46</sup>Department of Genetics, AP-HP Robert Debré, Paris Diderot University, Paris, France. Correspondence: Dr R Marschalek, Institute of Pharmaceutical Biology/Diagnostic Center of Acute Leukemia (DCAL), Goethe-University, Max-von-Laue-Str. 9, D-60439 Frankfurt/Main, Germany.

E-mail: Rolf.Marschalek@em.uni-frankfurt.de

<sup>\*</sup>Dedicated to Professor Marc Debraekeleer who died in July 2016; he has substantially supported the Frankfurt DCAL over the years.

Received 27 February 2017; revised 25 April 2017; accepted 21 June 2017; accepted article preview online 13 July 2017; advance online publication, 8 August 2017



## Mini-review

## Osteopontin and their roles in hematological malignancies: Splice variants on the new avenues



Ana Clara Santos Fonseca Bastos <sup>a</sup>, Caroline Barbieri Blunck <sup>b</sup>, Mariana Emerenciano <sup>b</sup>,  
Etel Rodrigues Pereira Gimba <sup>a, c, \*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Pesquisa, Programa de Oncobiologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Pesquisa, Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrica, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup> Universidade Federal Fluminense, Instituto de Humanidades e Saúde (IHS), Departamento de Ciências da Natureza (RCN), Rio de Janeiro, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 10 July 2017

Received in revised form

13 August 2017

Accepted 16 August 2017

## Keywords:

Osteopontin

Hematological malignancies

Splicing isoforms

Leukemia

Myeloma

Lymphoma

## ABSTRACT

Osteopontin (OPN) is a protein expressed in several tissues, including bone marrow, in which it performs distinct roles, such as modulating hematopoietic stem cell niche and bone remodeling. Most data in hematological malignancies (HMs) refers to total OPN (tOPN), comprehending the sum of distinct OPN splicing isoforms (OPN-SI), while reports describing the expression and roles of each OPN-SI are scarce. This review aims to summarize tOPN roles in HMs and provide evidence that OPN-SIs can also modulate specific functions in HMs biology. We summarize that upregulated tOPN can modulate HMs (leukemia, lymphoma and myeloma) progression, inducing cell adhesion, invasion, angiogenesis, cell differentiation and extramedullary and/or central nervous system infiltration. Based on this expression pattern, tOPN has been pointed out as a biomarker in those HMs, thus providing potential targets for therapeutic approaches. Our group found that OPN-SIs are expressed in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) cell lines (unpublished data), providing early evidence that OPN-SIs are also expressed in BCP-ALL. Further studies should investigate whether these OPN-SIs can differently modulate HMs biology and their putative application as auxiliary biomarkers for HMs.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Introduction

Among several proteins overexpressed in cancer, osteopontin (OPN) has been largely investigated in several cancer types, including hematologic malignancies (HMs) [1–3]. OPN is a non-collagenous matrix protein produced by various cells, including osteoblasts, osteoclasts and several types of malignant and non-malignant cells [4]. In solid tumors, the roles of OPN on modulating several steps in tumor progression is well established [1]. In these tumors, OPN expression has been clearly correlated to cell proliferation, migration, invasion and metastatic potential [1,5,6]. Also, OPN expression has been broadly suggested as a tumor biomarker [7]. However, OPN functions in HMs, particularly in early disease development and cell differentiation, are still under investigation. In HMs, although generally overexpressed, OPN exhibits distinct expression patterns, depending on the

hematopoietic cell lineage involved, either lymphoid or myeloid. In this regard, OPN roles as additional diagnostic and prognostic marker are yet to be determined and controversial findings have been reported so far [3,6]. Despite the knowledge of OPN wide overexpression in HMs, its roles on modulating tumor cell differentiation and on controlling the bone marrow (BM) niche remain to be further investigated. Besides total OPN (tOPN), which is the main focus of most studies of OPN in cancer, the roles of each OPN splicing isoform (OPN-SI) in solid tumors have been investigated in several tumor types [8,9]. Conversely, OPN-SI expression and contributions in distinct biological and prognostic aspects of HM is starting to be investigated [10]. In this context, the current review aims to discuss known OPN roles on HMs, particularly leukemias, lymphomas and myelomas. Herein, we also highlight tOPN levels as putative HM biomarkers and their roles on modulating hematopoiesis and stem cell properties into the BM niche. Moreover, we also discuss putative tOPN contributions on infiltrating extramedullary sites, including central nervous system (CNS) invasion. Further, our group provides herein early evidence that similarly to solid tumors, OPN-SIs are also expressed in HMs, as demonstrated in acute leukemia cells.

\* Corresponding author. Universidade Federal Fluminense (UFF), Instituto de Humanidades e Saúde (IHS), Departamento de Ciências da Natureza (RCN), Rio de Janeiro, CEP: 28890-000, Brazil.

E-mail addresses: [etelgimba@id.uff.br](mailto:etelgimba@id.uff.br), [egimba@inca.gov.br](mailto:egimba@inca.gov.br) (E.R.P. Gimba).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2017.08.022>

0304-3835/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

METHODOLOGY

Open Access



# Evaluation of multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) for identification of acute lymphoblastic leukemia with an intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) in a Brazilian population

Gerhard Fuka, Tállita M. Farias-Vieira, Leticia Hummel, Caroline B. Blunck, Júlio C. Santoro, Eugênia Terra-Granado, Thayana Conceição Barbosa, Mariana Emerenciano and Maria S. Pombo-de-Oliveira\*

## Abstract

**Background:** An intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) defines a unique subgroup of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). The finding of three or more extra copies of the *RUNX1* gene by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is internationally used to define an iAMP21. Genomic profiling of chromosome 21 has been suggested for assisting diagnostic case identification. Due to limitations of comparative genomic hybridization, in terms of a routine application as first line-screening tests we evaluated the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) SALSA P327\_A1 and P327\_B1 probe sets for detecting chromosome 21 copy number alterations in Brazilian childhood BCP-ALL.

**Results:** In 74 out of 368 patients gain of genetic material was detected. For data confirmation *RUNX1* directed FISH was performed. Cells with  $\geq 5$  *RUNX1* signals ( $n = 9$ ) were considered as "true iAMP21" while  $< 5$  *RUNX1* signals ( $n = 41$ ) were counted as evidence for additional copies of intact chromosomes 21. All patients with an iAMP21 had high MLPA peak ratios ( $\geq 1.8$ ), while the majority of patients with  $< 5$  *RUNX1* presented low MLPA peak ratios ( $< 1.8$ ). Observed differences gained statistical strength by comparing probes located within the common region of amplification. Next, a principal component analysis was performed in order to illustrate distribution of cases according to their MLPA peak profile in two dimensions. Cases with an iAMP21 mostly clustered together, however additional cases with  $< 5$  *RUNX1* signals or no available FISH data located in proximity.

**Conclusions:** MLPA qualified as a high throughput technique that could be employed in future studies for a critical comparison with data obtained by FISH, especially in cases where metaphase nuclei are not available. Taking submicroscopic aberrations into account examined by MLPA, cases exhibiting an "iAMP21 like" peak ratio profile but  $< 5$  *RUNX1* signals should be considered as candidates for this chromosomal abnormality.

**Keywords:** B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL), Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21), Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA), Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

\* Correspondence: mpombo@inca.gov.br  
Pediatric Hematology-Oncology Program, Research Center, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rua André Cavalcanti, 37, Rio de Janeiro, RJ 20231-050, Brazil



© 2015 Fuka et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.





Universidade Federal Fluminense  
Instituto Biomédico  
Curso de Graduação em Biomedicina

---

---


A Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina, do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense, tem o prazer de **convidar** o(a) **MSc. Caroline Barbieri Blunck** para participar como membro **suplente** da Comissão Examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso de Caroline de Aguiar Pires Poubel, sob o tema: **"Identificação de deleções em IKZF1 na Leucemia Linfoblástica Aguda de células precursoras B por PCR Multiplex"**.

**Data: 23 de março de 2016**

**Horário: 14:00 horas**

**Local: Auditório do Instituto Biomédico.**

Niterói, 08 de março de 2016.

  
Prof. Ronald Marques dos Santos  
Coordenador do Curso de Biomedicina

- 
- *Sugerimos que a análise da apresentação escrita seja realizada antes da defesa do TCC.*
  - Normas para apresentação oral
    - O aluno terá 30 (trinta) minutos para a apresentação e cada examinador até 15 (quinze) minutos para arguição/argumentação.
    - A ata de avaliação deverá ser entregue após a defesa à Secretaria da Coordenação do Curso de Biomedicina.



HEMO 2017

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **“THE MOLECULAR HETEROGENEITY OF PATIENTS WITH ETV6-RUNX1 AND ITS IMPACT ON THE DIAGNOSIS AND RISK CLASSIFICATION OF ACUTE LYMPHOCHASTIC LEUKEMIA OF PRECURSOR CELLS B”** de autoria de “Blunck CB, Lopes BA, Mansur MB, Barbosa TC, Santoro JC, Noronha EP, Granado ET, Pombo-De MS, Sá MEC” foi apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2017, realizado no período de 8 a 11 de novembro de 2017, no Expttrade Convention Center de Curitiba/PR, na categoria painel com visita guiada (Painel 475).

Curitiba, 11 de novembro de 2017.



DIMAS TADEU COVAS  
PRESIDENTE DO HEMO 2017  
PRESIDENTE DA ABHIIH



RICARDO PASQUINI  
PRESIDENTE DE HONRA DO HEMO 2017



## XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ONCOLOGIA PEDIÁTRICA FOZ DO IGUAÇU - PR - 03 a 05 /OUT/2018

Certificamos que o trabalho intitulado

### Perfil genômico de RUNX1-ETV6+ em pacientes com leucemia linfoblástica aguda de células precursoras-B

de autoria de Caroline Barbieri Blunck; Bruno de Almeida Lopes; Thayana da Conceição Barbosa; Julio Cesar Santoro; Elda Pereira Noronha; Eugênia Terra-Granado; Gabriela Vera-Lozada; Rocio Hassan; Marcela Braga Mansur; Maria S. Pombo-de-Oliveira; Mariana Emerenciano;  
foi apresentado durante o XVI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, na forma de Oral, realizado entre dias 03 e 05 de outubro de 2018, no Recanto Cataratas - Thermas Resort & Convention, em Foz do Iguaçu/PR.

Foz do Iguaçu/PR, 05 de outubro de 2018.

  
Dra. Teresa Cristina Cardoso Fonseca  
Presidente da Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica

  
Dra. Carmem Maria Costa Mendonça Fiori  
Presidente do XVI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica



## XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ONCOLOGIA PEDIÁTRICA FOZ DO IGUAÇU - PR - 03 a 05 /OUT/2018

Certificamos que

### CAROLINE BARBIERI BLUNCK

participou do XVI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, realizado entre dias 03 e 05 de outubro de 2018, no Recanto Cataratas - Thermas Resort & Convention, em Foz do Iguaçu/PR, com carga horária de 20h.

Foz do Iguaçu/PR, 05 de outubro de 2018.

  
Dra. Teresa Cristina Cardoso Fonseca  
Presidente da Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica

  
Dra. Carmem Maria Costa Mendonça Fiori  
Presidente do XVI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica

