



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

AMANDA DE ALBUQUERQUE LOPES MACHADO

Relação entre deleções nos genes *IKZF1* e *BTG1* e a
resistência ao tratamento com glicocorticoides em leucemia
linfoblástica aguda

Orientadora: Dra. Mariana Emerenciano

Coorientador: Dr. Bruno de Almeida Lopes

Rio de Janeiro

2020



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

AMANDA DE ALBUQUERQUE LOPES MACHADO

Relação entre deleções nos genes *IKZF1* e *BTG1* e a
resistência ao tratamento com glicocorticoides em leucemia
linfoblástica aguda

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Oncologia, Instituto
Nacional de Câncer, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do
título de Mestre em Oncologia.

Orientadora: Dra. Mariana Emerenciano

Coorientador: Dr. Bruno de Almeida Lopes

Rio de Janeiro

2020

M149r Machado, Amanda de Albuquerque Lopes.

Relação entre deleções nos genes *IKZF1* e *BTG1* e a resistência ao tratamento com glicocorticoides em leucemia linfoblástica aguda. – Rio de Janeiro, 2020.
xviii, 69 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2020.

Orientador: Dra. Mariana Emerenciano

Coorientador: Dr. Bruno de Almeida Lopes

1. Leucemia Linfoblástica Aguda / genética. 2. B-cell Translocation Gene 1 (*BTG1*).
3. Ikaros Family Zinc Finger 1 (*IKZF1*). I. Emerenciano, Mariana (Orient.).
II. Lopes, Bruno de Almeida (Co-orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99419042



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

AMANDA DE ALBUQUERQUE LOPES MACHADO

Relação entre deleções nos genes *IKZF1* e *BTG1* e a
resistência ao tratamento com glicocorticoides em leucemia
linfoblástica aguda

Orientadora: Dra. Mariana Emerenciano

Coorientador: Dr. Bruno de Almeida Lopes

Aprovada em: 15/07/2020

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Gabriela Nestal de Moraes – INCA (Presidente - Titular)

Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro – UFRJ (Titular)

Prof. Dr. Raimundo Fernandes De Araújo Junior – UFRN (Titular)

Prof. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba – INCA (Suplente)

Prof. Dra. Marco Aurelio Salvino de Araújo – UFBA (Suplente)

Rio de Janeiro

2020

A professora Aída e aos pacientes com leucemia, a quem a esse estudo se destina, os quais são a motivação para a busca de transformação por meio da ciência.

AGRADECIMENTOS

À professora Aída, responsável por crescer em mim a paixão pela ciência e que, carinhosamente, me mostrou um caminho pelo qual nos aproximamos do próximo e de nós mesmos. Sua memória sempre será lembrada.

Aos pacientes, os quais, mesmo sem contato direto no dia a dia, me ensinam a sorrir e levantar a cabeça em frente às adversidades. A luta diária de vocês é a razão e o “combustível” para minha dedicação.

À Dra. Mariana Emerenciano e ao Dr. Bruno Lopes, meus orientadores e fonte de admiração. Agradeço por terem confiado e me permitido embarcar nesse projeto tão cheio de novidades e desafios para mim. Cada tropeço e acerto me fez aprender mais sobre o “fazer ciência”.

A Dra. Marcela Mansur, ou, simplesmente, Cela. A admiração do curso de verão se tornou inspiração para a vida, você é aquela pessoa que “eu quero ser quando crescer” e vou sempre lembrar de todo carinho que recebi ao longo desses anos.

Aos MECS, por toda a disponibilidade e ensinamentos. Cada um de vocês me ensinou algo, seja na pesquisa, seja referente a vida. Foi lindo crescer com vocês e também é uma alegria enorme ter visto o crescimento de cada um. Onde quer que eu esteja, estarei torcendo pelo sucesso de todos vocês.

À Alê, Barbie, Thay, Wolch, Vanessa e Ana Clara, vocês foram mais que colegas de trabalho, foram amigas, família e amor. Tenho um orgulho enorme das mulheres incríveis que vocês são e sei que vocês são NECESSÁRIAS para o mundo.

Aos meus parceiros de experimentos e discussões de copa Júlio, Isabella e Renan. Obrigada por terem me ajudado a dar os primeiros passos e terem quebrado a cabeça tentando buscar soluções quando os problemas apareceram. Não se faz ciência sozinho e vocês sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus pais, por terem me mantido perto dos livros e terem me apoiado em

todas as vezes que eu decidi deixar minha imaginação e curiosidade aflorar.

Aos meus familiares, em especial meus irmãos e minha avó, eu agradeço todos os vocês pelo encorajamento nas diversas vezes que decidi buscar um novo desafio, mesmo quando isso significou estar ausente por tantas vezes.

Aos “Indelévels” (Clara, Yves, Chu, Dani e Luana) que são meu refúgio, meus amigos e irmãos. Quem eu sou hoje está ligado a tudo que aprendi com vocês e todo o companheirismo ao longo desses 15 anos de crescimento juntos.

A Carla, que apareceu e se tornou minha amiga no momento que tinha que ser e hoje é alguém em quem busco força, risos e um pouco de perturbação. Só tenho de agradecer por seu apoio incondicional e sua presença mesmo que à distância.

Aos amigos do CsF, em especial, Regina, Daniel, Milene, Selin, Vanessa e Polly. Vocês me tornaram uma pessoa muito mais respeitosa, empática e justa, mas, principalmente, vocês me fizeram ganhar brilho nos olhos.

À Dra. Livia Finoti, você é meu orgulho e inspiração, é e sempre será o símbolo do que é fazer ciência por amor e com humildade. Eu não tenho palavras para expressar meu carinho e admiração pela pessoa que você é.

Ao Felipe, quem compartilhou por tanto tempo o meu dia a dia no mestrado e foi um grande parceiro, sempre buscando entender sobre leucemias e me apoiar nos meus desafios. Obrigada por ter me motivado em todas as etapas desse ciclo.

Aos amigos do Rio, esse trabalho é de vocês tanto quanto meu. Jéssica, Tamara, Mari, Lari, Tai, Diego, Igor e Ailton e Da Silva (meus seguranças/pais). Vocês foram abrigo; parceiros de copo, funk, risos, reclamações, karaokês; e puro confronto. A taurina aqui, jamais teria aprendido tanto sobre a luta que cada um enfrenta se não fossem vocês quebrando minhas verdades absolutas.

Aos amigos de alojamento, o caminho se tornou muito mais feliz por ter vocês ao meu lado, dividindo as dificuldades e alegrias.

ÍNDICE

| | |
|--|--------------|
| LISTA DE TABELAS | xi |
| LISTA DE FIGURAS | xii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xiv |
| RESUMO..... | xvii |
| ABSTRACT..... | xviii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Linfopoiese e maturação de células linfoides B..... | 1 |
| 1.2. Leucemia linfoblástica aguda | 2 |
| 1.2.1 Aspecto epidemiológicos e etiológicos | 2 |
| 1.2.2 Aspectos clínico-laboratoriais | 4 |
| 1.2.3 Características imunofenotípicas | 6 |
| 1.2.4 Alterações citogenético-moleculares | 7 |
| 1.2.4.1 Subgrupos associados com risco prognóstico favorável..... | 8 |
| 1.2.4.1.1 Alta hiperdiploidia | 8 |
| 1.2.4.1.2 Translocação t(12;21)(p13;q22)/ETV6- RUNX1..... | 9 |
| 1.2.4.2 Subgrupos associados com risco prognóstico intermediário..... | 9 |
| 1.2.4.2.1 Translocação t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1 .. | 9 |
| 1.2.4.3 Subgrupos associados com risco prognóstico desfavorável | 10 |
| 1.2.4.3.1 Translocação t(4;11)(q21;q23)/KMT2A/AFF1 | 10 |
| 1.2.4.3.2 Translocação t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1 .. | 11 |
| 1.2.5 Alterações de número de cópias | 12 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1.2.5.1 | Genes reguladores do desenvolvimento linfoide | 12 |
| 1.2.5.1.1 | <i>Ikaros family zinc finger 1 (IKZF1)</i> | 12 |
| 1.2.5.2 | Genes envolvidos em processos antiproliferativos. | 15 |
| 1.2.5.2.1 | <i>B-cell translocation gene 1 (BTG1)</i> | 15 |
| 1.2.6 | Tratamento das leucemias linfoblásticas agudas..... | 17 |
| 1.2.6.1 | Esquema terapêutico | 17 |
| 1.2.6.2 | Efeitos adversos em pacientes submetidos ao tratamento de leucemia linfoblástica aguda | 19 |
| 1.2.7 | Glicocorticoides sintéticos na prática clínica | 20 |
| 1.2.7.1 | Via de sinalização do receptor de glicocorticoides (<i>NR3C1</i>) | 22 |
| 1.2.8 | Fatores relacionados à falha no tratamento com glicocorticoides | 25 |
| 2. | JUSTIFICATIVA | 28 |
| 3. | OBJETIVOS | 30 |
| 3.1 | Objetivos gerais | 30 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 30 |
| 4. | MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 4.1 | Desenho do estudo | 31 |
| 4.2 | Seleção dos genes alvo do estudo | 31 |
| 4.3 | Escolha da linhagem celular | 32 |
| 4.4 | Cultivo celular | 32 |
| 4.5 | Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para a avaliação de expressão gênica | 33 |
| 4.6 | Desenho de oligonucleotídeos de siRNA para a inibição dos genes <i>BTG1</i> e/ou <i>IKZF1</i> | 34 |
| 4.7 | Padronização da inibição dos genes <i>BTG1</i> e/ou <i>IKZF1</i> por meio da técnica de eletroporação..... | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 4.8 Extração, controle de qualidade e quantificação do RNA das células transfectadas | 35 |
| 4.9 Reação de transcrição reversa (RT)..... | 36 |
| 4.10 Análise de expressão gênica por PCR quantitativa (qPCR) | 36 |
| 4.11 Determinação de IC50 de modelo celular 207 tratada com dexametasona por meio do método de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT) | 37 |
| 4.12 Ensaio de citotoxicidade de linhagem 207 transfectada e tratada com glicocorticoide | 38 |
| 4.13 Análise estatística..... | 39 |
| 5. RESULTADOS..... | 40 |
| 5.1 Estabelecimento de linhagem celular como modelo de resistência a glicocorticoides | 40 |
| 5.1.1 Caracterização molecular da linhagem celular 207 | 40 |
| 5.1.2 Os níveis de expressão de <i>BTG1</i> e <i>IKZF1</i> encontram-se diminuídos após a inibição simples e dupla com siRNA na linhagem linfoblastoide de 207..... | 40 |
| 5.2 Avaliação de resposta após inibição dos genes <i>BTG1</i> e <i>IKZF1</i> e tratamento com glicocorticoides | 43 |
| 5.2.1 Determinação de concentrações mínimas de Prednisolona e Dexametasona a serem utilizadas para avaliação de viabilidade celular em linhagem 207 | 43 |
| 5.2.2 Determinação dos efeitos da inibição de <i>BTG1</i> e <i>IKZF1</i> em linhagem celular 207 após tratamento com dexametasona | 45 |
| 5.3 Avaliação de resposta à inibição dos genes <i>BTG1</i> e <i>IKZF1</i> após tratamento com glicocorticoides | 49 |
| 5.3.1 Expressão gênica de alvos da via de resposta a glicocorticoides mediante inibição simples ou dupla dos genes <i>BTG1</i> e <i>IKZF1</i> e tratamento com dexametasona | 49 |
| 6. DISCUSSÃO | 52 |
| 7. CONCLUSÕES | 61 |

| | |
|-----------------------------|-----------|
| 8. REFERÊNCIAS | 62 |
|-----------------------------|-----------|

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1.1. Correlação entre sinais e sintomas com apresentações clínico-laboratoriais comuns em LLA..... | 5 |
| Tabela 1.2. Comparação da sobrevida livre de eventos (SLE) dos principais protocolos realizados no mundo..... | 19 |
| Tabela 1.3. Mecanismos envolvidos na resistência a glicocorticoides sintéticos usados em esquemas terapêuticos de LLA | 25 |
| Tabela 4.1. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a análise de expressão gênica..... | 33 |
| Tabela 4.2. Sequências de RNA de interferência utilizados para a inibição gênica..... | 34 |
| Tabela 4.3. Condições de ciclagem para a realização de PCR quantitativa (RT-qPCR)..... | 37 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1. Modelo de hierarquia hematopoiética indicando a participação dos principais reguladores da diferenciação e maturação de linfócitos B..... | 2 |
| Figura 1.2. Distribuição dos casos de LLA e LMA conforme a idade..... | 3 |
| Figura 1.3. Exemplo de painéis de anticorpos monoclonais utilizados laboratorialmente para a caracterização imunofenotípica das leucemias linfoblásticas agudas | 7 |
| Figura 1.4. Principais alterações cromossômicas presentes na classificação de pacientes com LLA..... | 8 |
| Figura 1.5. (A) Sobrevida livre de eventos (SLE) e (B) sobrevida global (SG) nos grupos de risco genéticos em crianças e adolescentes com LLA..... | 10 |
| Figura 1.6. Ilustração das oito isoformas da proteína Ikaros, destacando a perda dos seus éxons nas formas dominantes negativas..... | 13 |
| Figura 1.7. Impacto de alterações em IKZF1 na sobrevida livre de recaída e sobrevida global de pacientes com LLA..... | 15 |
| Figura 1.8. Representação esquemática da proteína BTG1..... | 16 |
| Figura 1.9. Localização genômica e representação estrutural da proteína do receptor de glicocorticoide | 23 |
| Figura 1.10. Ilustração simplificada da participação de BTG1 e IKZF1 na via de resposta a glicocorticoides | 27 |
| Figura 4.1. Fluxograma descrevendo as etapas do estudo, incluindo suas metodologias..... | 31 |
| Figura 4.2. Modelo de placa para inibição dupla dos genes BTG1 e IKZF1 na condição de 36h com concentração de oligonucleotídeos de 50 nM e 100 nM | 35 |
| Figura 5.1. RT-PCR das principais alterações citogenético-moleculares encontradas em LLA-B foram realizadas na linhagem celular 207..... | 40 |
| Figura 5.2. Padronização da inibição de BTG1 e IKZF1 e definição do tempo e concentração ótimas para avaliação do ensaio | 42 |
| Figura 5.3. Determinação de concentração mínima de Prednisolona a ser | |

| | |
|--|----|
| utilizada para avaliação de viabilidade celular em linhagem 207 | 43 |
| Figura 5.4. Determinação de concentração mínima de Dexametasona a ser utilizada para avaliação de viabilidade celular em linhagem 207 | 45 |
| Figura 5.5. Avaliação de viabilidade celular em modelo de linhagem 207 após inibição do gene BTG1 e tratamento com dexametasona | 46 |
| Figura 5.6. Avaliação de viabilidade celular em modelo de linhagem 207 após a inibição simples do gene IKZF1 e a dupla inibição com posterior tratamento com dexametasona | 47 |
| Figura 5.7. Comparação da viabilidade celular entre scramble e os grupos que sofreram inibição gênica após tratamento com dexametasona | 48 |
| Figura 5.8. Avaliação antes e depois da expressão gênica de alvos envolvidos no processo de resposta a via de glicocorticoides mediante inibição simples ou dupla dos genes BTG1 e IKZF1 e tratamento com dexametasona..... | 50 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------------------|--|
| <i>ABL1</i> | <i>ABL Proto-Oncogene 1</i> |
| <i>AF-1</i> | <i>Activation function-1 domain</i> |
| <i>AF-2</i> | <i>Activation function-2 domain</i> |
| <i>AF4</i> | <i>AF4/FMR2 Family Member 1 (AFF1)</i> |
| <i>AF9</i> | <i>ALL1-Fused Gene From Chromosome 9 Protein (MLLT3)</i> |
| <i>AKT</i> | <i>Protein kinase B (PKB)</i> |
| <i>ALPs</i> | <i>All lymphoid progenitors</i> |
| <i>AP-1</i> | <i>Activator protein 1</i> |
| <i>APRO</i> | Domínio antiproliferativo |
| <i>BCR</i> | <i>Breakpoint cluster region</i> |
| <i>BLAST</i> | <i>Basic local alignment search tool</i> |
| <i>BLPs</i> | <i>B-cell-biased lymphoid progenitors</i> |
| <i>BTG1</i> | <i>B-cell translocation gene 1</i> |
| <i>CBFβ</i> | Core binding factor β |
| <i>CDKN2A</i> | <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> |
| <i>cDNA</i> | DNA complementar |
| <i>DBD</i> | <i>DNA-binding domain</i> |
| <i>DMSO</i> | Dimetilsulfóxido |
| <i>DN</i> | Células duplo negativas |
| <i>DNA</i> | Ácido desoxirribonucleico |
| <i>DP</i> | Células duplo positivas |
| <i>DUSP1</i> | <i>Dual Specificity Phosphatase 1</i> |
| <i>EBF1</i> | <i>Early B-cell factor 1</i> |
| <i>ENL</i> | <i>Super Elongation Complex Subunit (MLLT1)</i> |
| <i>ETPs</i> | <i>Early T-cell progenitors</i> |

| | |
|----------------|--|
| <i>ETV6</i> | <i>ETS variant 6 (TEL1)</i> |
| <i>FBXW7</i> | <i>F-Box And WD Repeat Domain Containing 7</i> |
| <i>Foxo1</i> | <i>Forkhead Box O1</i> |
| <i>GAPDH</i> | Gliceraldeído – 3 – fosfato desidrogenase |
| GMPs | <i>Granulocyte/macrophage progenitors</i> |
| <i>HLF</i> | <i>Hepatic leukemia factor</i> |
| Hsp | Proteínas <i>heat shock</i> |
| lamp21 | Amplificação intracromossomal do 21 |
| IgG | Imunoglobulina G |
| <i>IKZF1</i> | <i>Ikaros family zinc finger 1</i> |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer |
| <i>KMT2A</i> | <i>Lysine Methyltransferase 2A</i> |
| <i>KMT2A-r</i> | Rearranjo no gene <i>KMT2A</i> |
| LBD | Ligand-binding domain |
| LLA | Leucemia linfoblástica aguda |
| LLC | Leucemia linfocítica crônica |
| LMA | Leucemia mieloide aguda |
| LMC | Leucemia mieloide crônica |
| LMPPS | <i>Lymphoid primed multipotent progenitors</i> |
| LT-HSCs | <i>Long-term hematopoietic stem cells</i> |
| MAC | Macrófagos |
| <i>MLL</i> | <i>Mixed lineage leukemia</i> |
| MLPA | Amplificação Multiplex Dependente de Ligação de Sondas |
| MO | Medula óssea |
| MPP | <i>Multipotent progenitors</i> |
| MTT | Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |

| | |
|--------------|---|
| NEU | Neutrófilos |
| NF-κB | Factor nuclear kappa B |
| <i>NR3C1</i> | <i>Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1</i> |
| NTD | N-terminal domain |
| <i>Pax5</i> | <i>Paired box 5</i> |
| <i>PBX1</i> | <i>Pre-B-cell leukemia homeobox 1</i> |
| Ph | Cromossomo <i>Philadelphia</i> |
| PL | Progenitor das células linfoides |
| PLB | Progenitores linfoides com programa para célula b |
| PMG | Progenitores de macrófagos-granulócito |
| PRMT1 | Protein arginine N-methyltransferase 1 |
| qPCR | PCR quantitativa |
| RG | Receptor de glicocorticoide |
| RPM | Rotações por minuto |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> |
| RT-PCR | Transcrição Reversa acoplada à PCR |
| RT-qPCR | <i>Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction</i> |
| <i>RUNX1</i> | <i>Runt-related transcription factor 1 (AML1)</i> |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SG | Sobrevida global |
| <i>SGK1</i> | <i>Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1</i> |
| siRNA | Pequeno RNA de interferência |
| SLE | Sobrevida livre de eventos |
| SNC | Sistema nervoso central |
| TBE | Tampão tris/borato/EDTA |
| <i>TCF3</i> | <i>Transcription factor 3 (E2A)</i> |



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

Relação entre deleções nos genes *IKZF1* e *BTG1* e a resistência ao tratamento com glicocorticoides em leucemias linfoblásticas agudas

RESUMO

Amanda de Albuquerque Lopes Machado

A leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLA-B) é caracterizada pelo aumento da proliferação e pelo bloqueio da diferenciação de células imaturas da linhagem linfóide. Estudos demonstraram que alterações genéticas secundárias (por exemplo, deleções de *IKZF1*, *CDKN2A* e *BTG1*) afetam a regulação da especialização das células linfóides e da progressão no ciclo celular e estão fortemente relacionadas à resposta ao tratamento. Neste cenário, um estudo revelou que deleções em *IKZF1* e *BTG1* atuam sinergicamente e conferem pior prognóstico ao paciente com LLA-B. Este achado pode estar associado à resistência aos glicocorticoides, já que estudos *in vitro* identificaram aumento na viabilidade de linfócitos B de murinos que continham estas deleções quando tratados com esta classe de fármacos. Considerando o amplo uso de glicocorticóides no tratamento da LLA-B, é necessário elucidar quais mecanismos estão envolvidos no processo de resistência farmacológica. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a resposta *in vitro* ao tratamento com glicocorticoides mediante a inibição dos genes *BTG1* e *IKZF1*. Para isso, estabelecemos as condições de transfecção para a inibição de *BTG1* e/ou *IKZF1* na linhagem celular 207 por meio de RNA de interferência e eletroporação utilizando o sistema Nucleofactor 4D. Em seguida, investigamos o efeito da supressão desses genes na viabilidade celular por meio do ensaio colorimétrico de MTT, bem como na expressão de genes responsivos a glicocorticoides (*DUSP1*, *SGK1*, *FBXW7* e *NR3C1*), a qual foi quantificada por RT-qPCR. Após tratamento com 1 mM dexametasona por 24h, houve aumento na viabilidade das células transfectadas, indicando o estabelecimento de um fenótipo resistente quando mimetizamos as deleções em *IKZF1*, em concomitância ou não, com deleções em *BTG1*. Adicionalmente, observamos que a inibição exclusiva de *BTG1* não é capaz de alterar a expressão dos genes da via de glicocorticoides nos estados pré e pós tratamento com dexametasona. Por outro lado, a inibição de *IKZF1*, resulta na diminuição da expressão de *SGK1* (2,6x), *FBXW7* (2,4x) e *NR3C1* (1,7x), demonstrando seu papel em alterações na sinalização da via de resposta aos glicocorticoides. Com base em nossos resultados, sugerimos que deleções em *IKZF1* resultam em prejuízos na atividade de elementos envolvidos na resposta a glicocorticoide. Como consequência, células que sofreram a inibição desse gene apresentam um fenótipo resistente a esses fármacos, o que pode justificar a maior incidência de recaídas em pacientes com LLA-B com esse genótipo.



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

Relação entre deleções nos genes *IKZF1* e *BTG1* e a resistência ao tratamento com glicocorticoides em leucemias linfoblásticas agudas

RESUMO

Amanda de Albuquerque Lopes Machado

B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is characterized by an increased proliferation and differentiation blockage of immature lymphoid cells. Studies have demonstrated that secondary events (e.g. *IKZF1*, *CDKN2A* and *BTG1* deletions) affect the regulation of specialization and progression through the cell cycle in lymphoid cells, and are strongly related to the response to treatment. In this scenario, a study revealed that *IKZF1* and *BTG1* deletions act synergistically and confer a worse prognosis to B-ALL patients. This finding may be associated with resistance to glucocorticoids, since in vitro studies have identified an increased viability of murine B lymphocytes that contained these deletions when treated with this class of drugs. Considering the wide use of glucocorticoids in the treatment of B-ALL, it is necessary to elucidate which mechanisms are involved in the process of pharmacological resistance. Thus, the objective of this study was to evaluate in vitro the response to treatment with glucocorticoids under *BTG1* and *IKZF1* inhibition. We established the transfection conditions for the inhibition of *BTG1* and/or *IKZF1* in the 207 cell lineage by RNA interference and electroporation using the Nucleofactor 4D system. Then, we investigated the effect of gene suppression on cell viability using the MTT colorimetric assay, as well as on the expression of glucocorticoid-responsive genes (*DUSP1*, *SGK1*, *FBXW7* and *NR3C1*) by RT-qPCR. After treatment with 1 mM of dexamethasone for 24 hours, there was an increase in the viability of after inhibition, indicating the establishment of a resistant phenotype when mimicking *IKZF1* deletions, concomitantly or not, with *BTG1* deletions. Additionally, we observed that the exclusive inhibition of *BTG1* is not able to alter the expression of the genes of the glucocorticoid pathway at time points pre- and post-treatment with dexamethasone. On the other hand, *IKZF1* inhibition results in decreased expression of *SGK1* (2.6x), *FBXW7* (2.4x) and *NR3C1* (1.7x), demonstrating its role in signaling alterations of the glucocorticoid response pathway. Based on our results, we suggest that *IKZF1* deletions result in loss in the activity of glucocorticoid responsive elements. Therefore, cells with these alterations present a resistant phenotype to these drugs, which may justify the higher incidence of relapses in patients with B-ALL with this genotype.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Linfopoiese e maturação de células linfoides B

Por meio de estudos na década de 50, os quais avaliaram camundongos irradiados com raio-x, iniciou-se o entendimento de que células presentes na medula óssea (MO) poderiam repovoar aquele microambiente e restaurar os subtipos celulares presentes no mesmo (JACOBSON et al., 1951; FORD et al., 1956). Anos mais tarde, isolando células-tronco hematopoiéticas (CTH) de murinos, foi possível estabelecer o modelo de hierarquia hematopoiética, o qual postula que todas as células hematopoiéticas derivam de um mesmo progenitor de células tronco multipotentes (SPANGRUDE; HEIMFELD; WEISSMAN, 1988).

Por sua vez, o processo de diferenciação e maturação das células de linhagem linfóide, também chamado de linfopoiese, começou a ser elucidado em virtude da descoberta das células B e T (COOPER; PETERSON; GOOD, 1965) e da observação de marcadores celulares, a exemplo da IgG (COOMBS; FEINSTEIN; WILSON, 1969). No caso das células linfóides B, sabe-se que inúmeras moléculas regulam a cadeia de processos necessários para a correta maturação e diferenciação dessas células, como é apresentado na figura 1.1. Tais reguladores são centrais, uma vez que as células-tronco hematopoiéticas podem se diferenciar em progenitores multipotentes tanto da linhagem mieloide quanto da linhagem linfóide. Contudo, a expressão precoce dos genes *IKZF1* e *TCF3* possui um papel crítico para o estabelecimento do ramo linfóide (GEORGOPOULOS, 2017; MURRE, 2018). Adicionalmente, a ativação da proteína *forkhead box O1* (*FOXO1*) e a posterior expressão do *early B-cell factor 1* (*EBF1*), permitem a ativação do programa de comprometimento linfóide. No outro braço dessa via, a expressão do gene da família paired Box (*PAX5*) levará à repressão de genes que não fazem parte do repertório da linhagem linfóide, bem como a ativação de genes importantes para a especialização das células B (MEDVEDOVIC; EBERT; BUSSLINGER, 2011). Deste modo, alterações nesses reguladores podem resultar em estados patológicos que serão caracterizados pela imaturidade celular e descontrole no processo proliferativo, como no caso da leucemia linfoblástica aguda (LLA), a qual será melhor caracterizada nos capítulos posteriores.

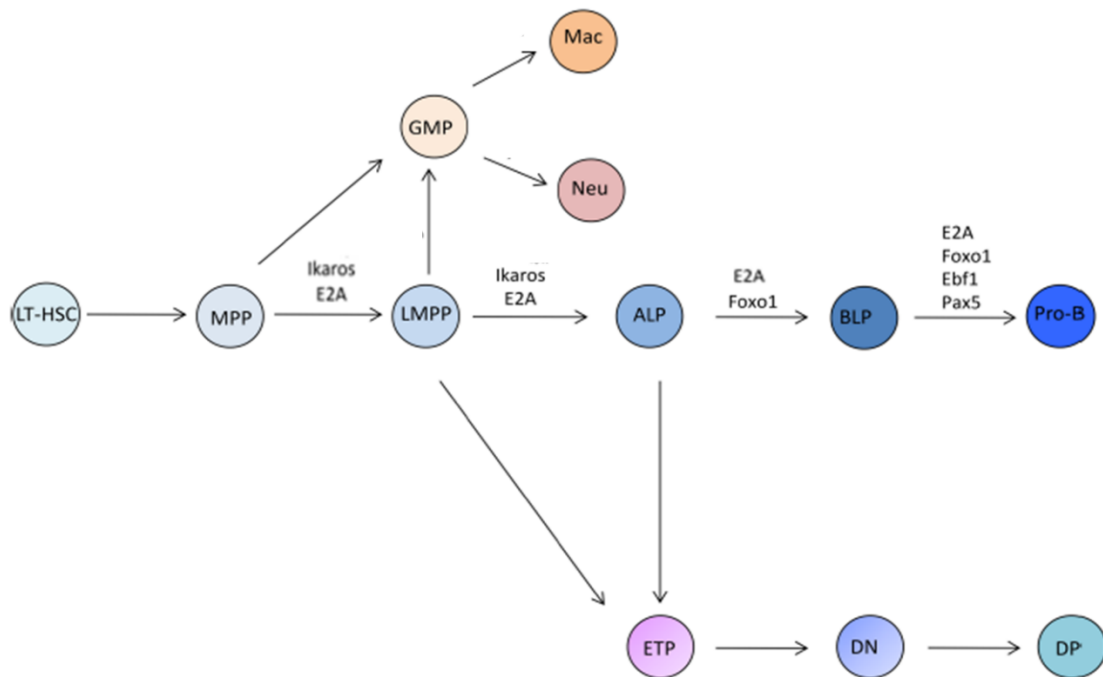


Figura 1.1. Modelo de hierarquia hematopoiética indicando a participação dos principais reguladores da diferenciação e maturação de linfócitos B. A partir desse modelo, foi possível observar a necessidade de variados fatores transcricionais, tais como E2A, IKZF1 e PAX5, para a iniciação de eventos sucessivos que estão relacionados ao programa de diferenciação linfóide B. *Long-term hematopoietic stem cells* (LT-HSCs); *multipotent progenitors* (MPP); *Lymphoid primed multipotent progenitors* (LMPPs), *granulocyte/macrophage progenitors* (GMPs); neutrófilos (NEU); *lymphoid progenitors* (ALPs); *B-cell-biased lymphoid progenitors* (BLPs); célula Pró-B (Pro-B); *early T-cell progenitors* (ETPs); duplo negativas, as quais são CD4-CD8- (DN); duplo positivas possuindo marcação CD4+CD8+ (DP). Modificado de: (MURRE, 2018).

1.2 Leucemia linfoblástica aguda

1.2.1 Aspectos epidemiológicos e etiológicos

De acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se que no biênio 2020-2022 o Brasil apresentará 10.810 novos casos de leucemias por ano, sendo 5.920 em homens e 4.890 em mulheres (INCA, 2020). As leucemias se distinguem a depender do subtipo e do grau de maturidade celular, além do tempo de progressão da leucemia. Deste modo, é possível identificar quatro entidades principais, são elas: LLA, leucemia mieloide aguda (LMA),

leucemia mieloide crônica (LMC) e leucemia linfocítica crônica (LLC). Apesar de acometer adultos e crianças, a LLA consiste na principal neoplasia pediátrica. A doença possui seu pico de incidência entre 1-5 anos de idade, contrariamente ao que se verifica na LMA, cuja incidência se correlaciona com o aumento da idade (Figura 1.2) (HOWLADER et al., 2019).

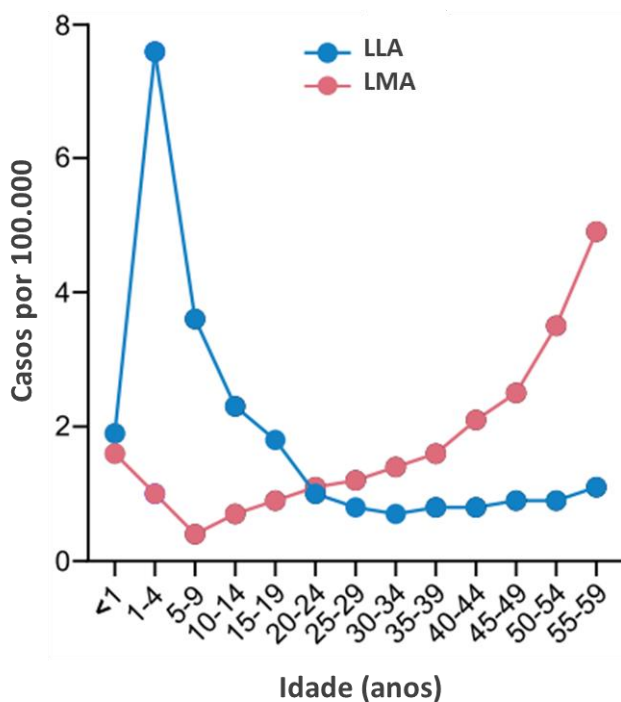


Figura 1.2. Distribuição dos casos de LLA e LMA conforme a idade. A distribuição da idade de pacientes com LLA e LMA por 100.000 casos em uma série histórica entre os anos de 1975 to 2016 nos EUA mostra a presença de um pico de incidência de LLA entre 1-5 anos de idade dos pacientes. Por outro lado, a incidência dos casos de LMA aumenta com o passar da idade.

A identificação de fatores exógenos e endógenos que estão por trás da história natural da doença e de seu estabelecimento permanece sendo um desafio nos dias atuais. Contudo, sabe-se que os distintos subtipos da LLA podem não compartilhar um mesmo mecanismo etiológico (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013). Em geral, o modelo de dois eventos genéticos caracteriza a patogênese das LLAs. Ele é baseado em inúmeros estudos epidemiológicos e genômicos que buscam desvendar os mecanismos envolvidos no estabelecimento da doença. O modelo propõe que lesões pré-natais, a exemplo de hiperdiploidias e fusão *ETV6-RUNX1*, poderiam ocorrer e resultar em clones

pré-leucêmicos, sendo esse o primeiro passo ou *hit* para o desenvolvimento da doença. Posteriormente, cerca de 1% dos indivíduos com um clone pré-leucêmico apresentam desregulações no sistema imune que resultam em erros na resposta contra infecções e induzem mutações secundárias – em geral, alterações de número de cópias. Essas alterações caracterizam o segundo evento (*hit*) do modelo e estariam relacionadas ao estabelecimento da doença (GREAVES, 2018).

A promoção destes eventos genéticos deve estar relacionada à mecanismos etiológicos específicos. Um dos mais bem aceitos foi proposto em 1917 por Gordon Ward e vem se mantendo como uma hipótese plausível devido a estudos realizados pelo Dr. Mel Greaves. A chamada “teoria da infecção tardia” hipotetiza que indivíduos com susceptibilidade genética que tenham um clone pré-leucêmico, uma vez que não fossem expostos a infecções na fase inicial de suas vidas poderiam gerar respostas aberrantes quando fossem expostos tardiamente, levando à formação de alterações secundárias que promovam a instalação do fenótipo leucêmico (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013; PILLER, 2001; PUI; ROBISON; LOOK, 2008). Contudo, tem sido observado que o processo de leucemogênese é provocado por uma combinação de elementos, tais como a exposição a patógenos na primeira infância e o contexto genético dos pacientes.

1.2.2 Aspectos clínico-laboratoriais

Apesar da etiologia da doença ainda não estar completamente esclarecida, é bem descrito que a LLA é caracterizada pelo comprometimento da diferenciação e o aumento da proliferação de células precursoras de linhagem linfoide. Como resultado há a expansão descontrolada de blastos leucêmicos na MO, os quais são células imaturas e incapazes de exercer suas funções corretamente. Na maioria dos casos (cerca de 85%) as células acometidas são da linhagem linfoide B e apenas 15% apresentam comprometimento de células T (PUI et al., 2011). Contudo, sabe-se que uma diversidade de alterações genéticas determina os subtipos da leucemia, as quais possuem mecanismos biológicos particulares e apresentam

características clínicas distintas (MULLIGHAN et al., 2007; TIJCHON et al., 2013). Como demonstrado na tabela 1.1., os sintomas clínicos decorrentes da LLA podem variar de indivíduo para indivíduo, contudo, em decorrência da biologia da doença, são observadas principalmente alterações de teor hematológico. O comprometimento medular, em virtude da alta proliferação de células linfoides, resulta em anemia (normocrômica e normocítica), neutropenia (<500 granulócitos/mm³) e trombocitopenia (contagem plaquetária inferior a 150x10⁹/L). Deste modo, é comum que crianças acometidas pela doença se queixem de fadiga e tenham sangramentos, petéquias e febre. Vários órgãos podem ser acometidos pela infiltração leucêmica, porém, é verificado maior comprometimento de órgãos linfoides e do sistema nervoso central (SNC), sendo comuns os casos de linfadenopatias, hepatoesplenomegalias e comprometimento de SNC. De modo também característico, há a presença de dores ósseas que podem limitar a locomoção dos pacientes e que são resultado da infiltração tecidual por blastos leucêmicos (HAMID, 2013; LARSON; ANASTASI, 2008).

Tabela 1.1. – Correlação entre sinais e sintomas com apresentações clínico-laboratoriais comuns em LLA

| Sinais e sintomas | Achados clínico-laboratoriais |
|--|---|
| Palidez, fadiga, dispnéia ao esforço | Anemia |
| Febre (~ 50%), infecção (<30%) | Neutropenia |
| Petéquias, equimoses, hemorragias retinianas | Trombocitopenia |
| Hepatomegalia, esplenomegalia (~50%), linfadenopatia, dor óssea e dor nas articulações (5–20%) | Leucocitose (10% dos pacientes com leucometria > 100.000 céls/mm ³) |
| Leucemia cutânea | Leucostase |
| Dispnéia, hipóxia, alterações do estado mental, tosse, dor no peito | Massa mediastinal (80% dos pacientes com LLA-T) |
| Dor de cabeça, diplopia, neuropatias cranianas, papiledema, náusea, vômito | Envolvimento do SNC (<10%) |

| | |
|---------------------------|--|
| Sangramento intracraniano | Tempo elevado de protrombina (PT), tempo parcial de tromboplastina (PTT), baixo fibrinogênio |
|---------------------------|--|

Na coluna à esquerda, estão listados sinais e sintomas comumente observados em pacientes com LLA, enquanto que a coluna da direita faz uma correlação com achados clínico-laboratoriais que resultam na sintomatologia da doença. Modificado de (HAMID, 2013).

1.2.3 Características imunofenóticas

As alterações ao longo do processo de diferenciação linfóide resultam em células com características imunofenóticas específicas que permitem o diagnóstico do câncer e auxiliam na estratificação de risco do paciente e nas decisões do esquema terapêutico a ser utilizado, bem como na avaliação de doença residual mínima, que vem sendo de grande importância na avaliação de resposta terapêutica (PUI; ROBISON; LOOK, 2008).

Avanços tecnológicos permitiram a criação de novos anticorpos monoclonais e a elaboração de painéis de citometria mais complexos e específicos, sendo fundamentais na identificação das características imunofenóticas das células leucêmicas. A LLA-B é caracterizada por células que apresentam expressão das moléculas CD20 CD19 e CD34 (PUI; ROBISON; LOOK, 2008). No seu processo de desenvolvimento, essas células passam ou deixam de expressar alguns marcadores que permitem a realização do diagnóstico diferencial com outras neoplasias hematológicas. Além disso, esses marcadores são utilizados para a definição do subtipo imunofenotípico da LLA. Por exemplo, a LLA comum é caracterizada por células precursoras B que expressam CD10, CD19, CD22, TdT, CD79A citoplasmático, contudo, não apresentam expressão da cadeia pesada μ citoplasmática e de imunoglobulinas de superfície, que indicam maior maturidade celular (LARSON; ANASTASI, 2008). Na figura 1.3, é possível observar o exemplo de painéis usados para a caracterização imunofenotípica das leucemias agudas.

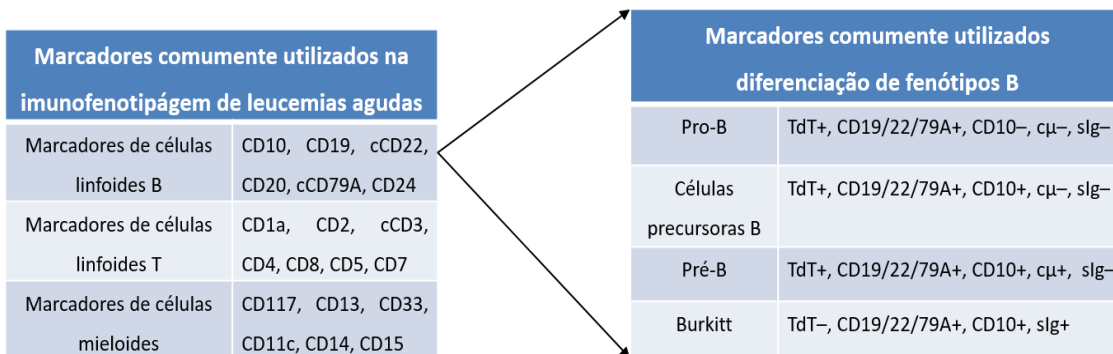


Figura 1.3. Exemplo de painéis de anticorpos monoclonais utilizados laboratorialmente para a caracterização imunofenotípica das leucemias linfoblásticas agudas. À esquerda temos a etapa inicial do processo de caracterização, o qual permite a diferenciação entre os subtipos mieloide e linfóide B e T. Posteriormente, mostrado à direita, temos um modelo com a listagem de marcadores determinantes para a subclassificação das células de fenótipo B entre: pró-B, precursoras B (LLA comum), pré-B e Burkitt. Modificado de (LARSON; ANASTASI, 2008)

1.2.4 Alterações citogenético-moleculares

O estabelecimento e a progressão da LLA-B dependem de uma variedade de alterações genéticas, que podem ser descritas como eventos primários ou secundários. Os primeiros são responsáveis pela iniciação da doença e estão presentes em, virtualmente, todos os clones leucêmicos do paciente, enquanto que as alterações secundárias estão correlacionadas ao estabelecimento e progressão da doença (MOORMAN, 2016). Estudos clínicos e moleculares identificaram que as alterações cromossômicas consistem nos principais eventos primários na doença e permitiram a categorização de subgrupos genéticos a partir de alterações cromossômicas (a exemplo, hiperdiploidia e translocações com consequentes rearranjos gênicos). Atualmente, a classificação desses subgrupos é essencial para a estratificação de risco dos pacientes (Figura 1.4) e o direcionamento da estratégia terapêutica mais adequada (GREAVES; WIEMELS, 2003; MOORMAN, 2016). A seguir, serão detalhadas as características dos principais grupos citogenético-moleculares da LLA-B.

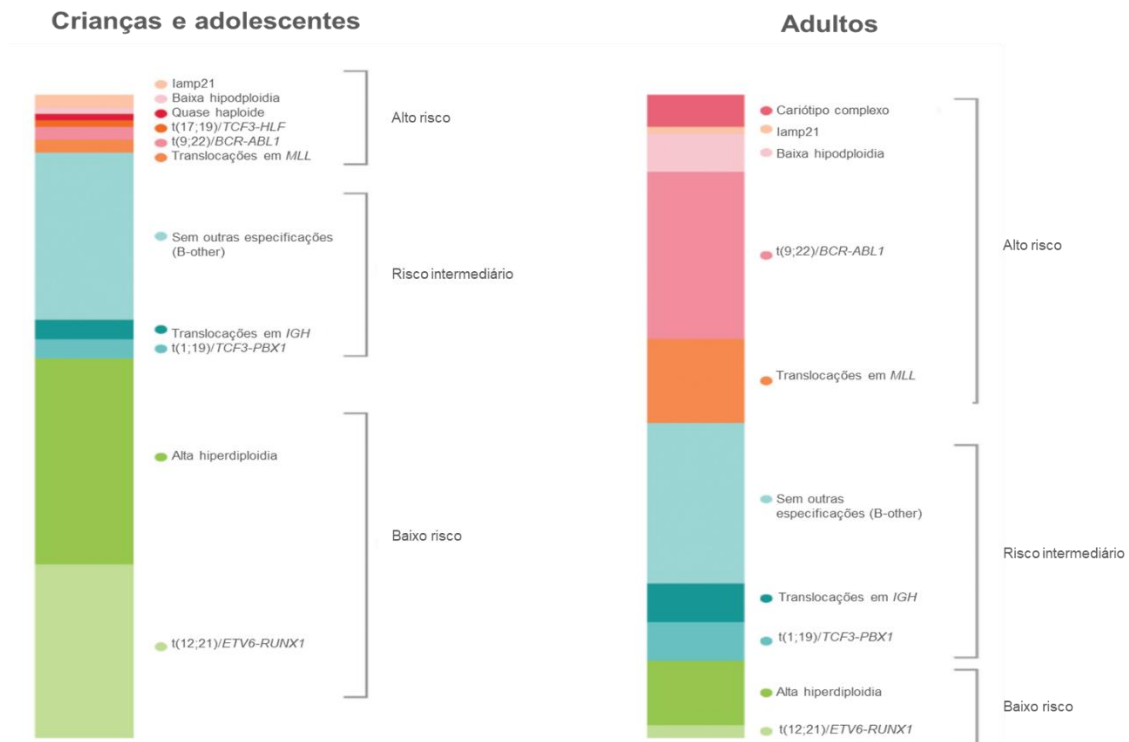


Fig 1.4 Principais alterações cromossômicas presentes na classificação de pacientes com LLA. As alterações estão divididas de acordo com os grupos de risco existentes, que são eles: alto risco (iAMP21, baixa hipodiploidia, haploidia, *TCF3-HLF*, *BCR-ABL1* e rearranjos em *MLL*), risco intermediário (B-other, translocações em *IGH* e *TCF3-PBX1*) e baixo risco (alta hiperdiploidia e fusão *ETV6-RUNX1*). Modificado de (MOORMAN, 2016).

1.2.4.1 Subgrupos associados com risco prognóstico favorável

1.2.4.1.1 Alta hiperdiploidia

O *status* de alta hiperdiploidia é definido pela presença de 51 a 67 cromossomos nos blastos, sendo os cromossomos X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 e 21 os mais comumente acometidos (PAULSSON; JOHANSSON, 2009). Como ilustrado na figura 1.3, a alta hiperdiploidia consiste na alteração cromossômica mais frequente (aproximadamente 30%) presente nas crianças e jovens com LLA-B, sendo acompanhada de uma baixa leucometria e associada a um melhor prognóstico ao paciente (PAULSSON, 2016).

1.2.4.1.2 Translocação *t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1*

A translocação *t(12;21)(p13;q22)* resulta na fusão gênica *ETV6-RUNX1*,

conhecida antigamente como *TEL-AML1*, é resultado da translocação críptica entre o gene *ETV6*, presente no braço curto do cromossomo 12, e o gene *RUNX1*, que está presente no braço longo do cromossomo 21 (ROMANA et al., 1995). O gene *ETV6* é crucial no processo de migração e estabelecimento das células-tronco hematopoiéticas ou progenitoras para a MO, enquanto o *RUNX1* é um fator de transcrição que se complexa ao CBF β e permite a ativação de genes importantes no processo de hematopoiese (WANG et al., 1998; LORSBACH; DOWNING, 2001). Cerca de 25% dos pacientes pediátricos possuem a fusão *ETV6-RUNX1*, a qual está presente em apenas 2% dos casos adultos e, assim como para a alta hiperdiploidia, este evento é considerado de risco favorável ao paciente (PUI; ROBISON; LOOK, 2008; MOORMAN, 2016).

1.2.4.2 Subgrupos associados com risco prognóstico intermediário

1.2.4.2.1 Translocação t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1

Entre 3-5% dos pacientes pediátricos possuem a translocação t(1;19)(q23;p13) que resulta na fusão *TCF3-PBX1* (*E2A-PBX1*). O *TCF3* também pode estar fusionado com outros parceiros na LLA-B, tais como *HLF* e *FB1* (INABA et al., 1992; BRAMBILLASCA et al., 1999). Contudo, em cerca de 90-95% dos casos, o mesmo encontra-se fusionado com *PBX1*, um proto-oncogene que codifica uma proteína da família homeobox e que vem sendo relacionada a programas transcricionais de controle da proliferação de progenitores linfoides (KAMPS et al., 1990; NOURSE et al., 1990; SANYAL et al., 2007).

Apesar de estar presente no grupo citogenético de risco intermediário, estudos clínicos que incluíram pacientes com *TCF3-PBX1* apresentam resultados divergentes. Ao restringir a análise a indivíduos que recaíram pela primeira vez, foi observado um prognóstico desfavorável. Semelhantemente, a ocorrência de recaída com comprometimento do SNC foi associada com a presença da translocação. Tais dados indicam a possível participação de outros biomarcadores no desfecho clínico e a necessidade de mais estudos que auxiliem na classificação desse subgrupo (Figura 1.5) (MOORMAN, 2016).

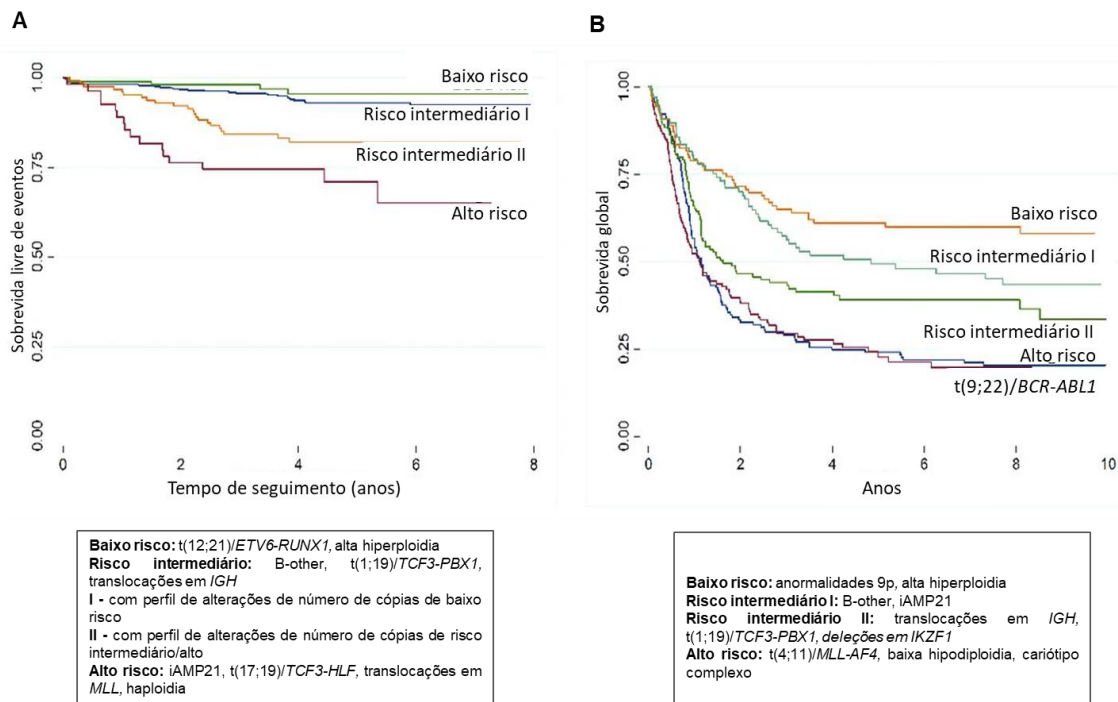


Fig 1.5. (A) Sobrevida livre de eventos (SLE) e (B) sobrevida global (SG) nos grupos de risco genéticos em crianças e adolescentes com LLA. A divisão dos grupos de risco levou em consideração alterações citogenéticas, como por exemplo *(12;21)/ETV6-RUNX1*, alta hiperdiploidia e rearranjos com *IGH*, conjuntamente com o perfil de alterações de número de cópias, tais como deleções em *IKZF1* (MOORMAN, 2016).

1.2.4.3 Subgrupos associados com risco prognóstico desfavorável

1.2.4.3.1 Translocação *t(4;11)(q21;q23)/KMT2A/AFF1*

O gene *KMT2A* (*MLL*) codifica uma histona metiltransferase que atua sobre processos epigenéticos determinantes para a regulação da transcrição gênica e que são relacionados ao desenvolvimento hematopoiético e etapas de *checkpoint* de ciclo celular (GOLE; WIESMÜLLER, 2015). Atualmente, se tem o conhecimento de 135 parceiros diretos diferentes em rearranjos envolvendo *KMT2A* (*KMT2A-r*). Contudo, apesar da promiscuidade desse gene, cerca de 90% dos casos possuem os parceiros de fusão *AFF1/AF4*, *MLLT3/AF9* ou *MLLT1/ENL* (MEYER et al., 2018).

Os *KMT2A-r* têm sido muito estudados nas LLAs, não apenas em virtude de sua função biológica, mas também em virtude deste evento poder acontecer ainda no período intrauterino. Globalmente, rearranjos neste gene estão

presentes em 10% dos casos de LLA e estudos têm demonstrado que essas alterações estão ligadas a uma doença agressiva e que representa um pior prognóstico aos pacientes (BRITTEN et al., 2019; FORGIONE et al., 2020). Apesar da LLA ser rara em pacientes com menos de um ano de idade, já foi vista a recorrência de *KMT2A-r* em neonatos diagnosticados com a doença e que esse evento consiste em um fator independente para um prognóstico extremamente desfavorável nessa faixa etária (PIETERS et al., 2007). Em 2007, um estudo brasileiro verificou que os *KMT2A-r* ocorreram em 58% dos lactentes, bebês com até 12 meses de vida, do estudo (EMERENCIANO et al., 2006).

1.2.4.3.2 Translocação t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1

Apesar de ser encontrada em cerca de 90% dos pacientes com LMC, a fusão entre os genes que codificam para a proteína BCR e para a tirosina quinase ABL1 está presente em 5% das LLAs pediátricas e chega a cerca de 40% das LLAs em adultos (KURZROCK; TALPAZ, 1991; MULLIGHAN et al., 2008). Ela é denominada popularmente de cromossomo *Philadelphia* (Ph), e há a observação do derivativo do cromossomo 22 – der(22) – que se origina a partir da translocação t(9;22)(q34;q11.2). O der(22) apresenta a fusão *BCR-ABL1* e gera uma tirosina quinase que permanece constitutivamente ativada, resultando na desregulação de vias de sinalização envolvidas em processos de diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (REN, 2005). Tendo em vista sua atividade de tirosina quinase, pacientes com a proteína de fusão BCR-ABL1 são passíveis de receber terapia-alvo com inibidores que bloqueiam por competição o domínio catalítico da enzima, a exemplo do Imatinib e Dasatinib (WEI; RAFIYATH; LIU, 2010).

1.2.5 Alterações de número de cópias

1.2.5.1 Genes reguladores do desenvolvimento linfoide

1.2.5.1.1 *Ikaros family zinc finger 1 (IKZF1)*

Como apresentado previamente, estudos demonstram que as alterações iniciadoras podem ocasionar anormalidades celulares a nível de regulação do ciclo celular, diferenciação celular, e expressão de receptores atuantes no processo de sinalização. Entretanto, tais lesões são frequentemente acompanhadas de eventos secundários para que ocorra o desenvolvimento e a progressão da LLA-B (GREAVES, 2018). Uma destas alterações acomete o gene *IKZF1*, que codifica o fator de transcrição Ikaros. Ele pertencente à família de proteínas com domínios de ligação ao DNA do tipo *zinc-finger* e é essencial no desenvolvimento e diferenciação de células linfoides.

O gene *IKZF1* está localizado na região 7p12 e contém oito éxons. Sua proteína possui quatro domínios *zinc-finger* codificados na região que concerne os éxons 4 a 6 e dois domínios adicionais codificados no éxon 8. Em conjunto, os domínios de *IKZF1* são fundamentais não apenas para a ligação ao DNA, como também para a homo ou heterodimerização da proteína. Ikaros possui diversas isoformas, devido a mecanismos de *splicing* ou deleções intragênicas. Cinco isoformas resultam na forma ativa da proteína e seis isoformas dominantes negativas resultam em perda de função e atuam competindo com as proteínas funcionais (Figura 1.6) (MEYER et al., 2013).

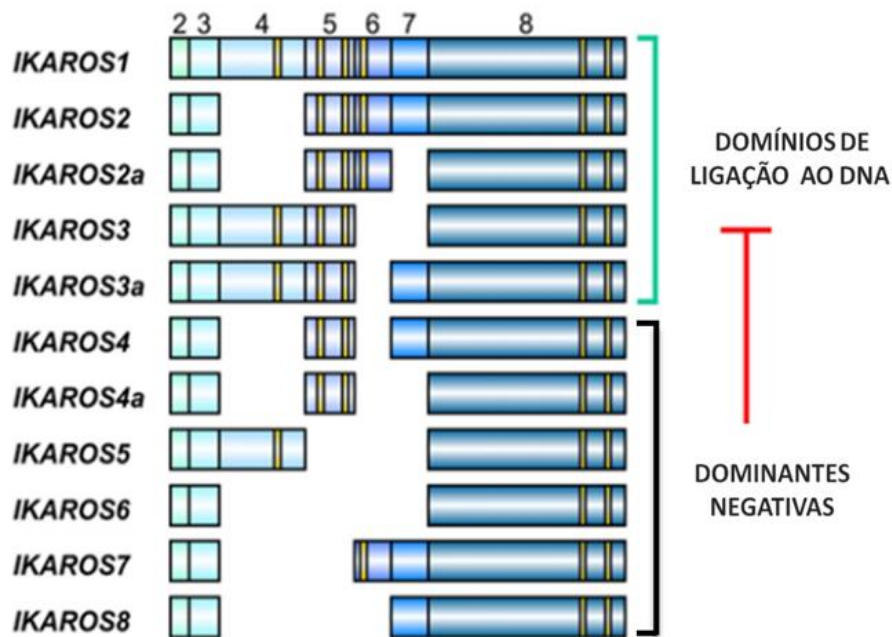


Fig 1.6. Ilustração das oito isoformas da proteína Ikaros, destacando a perda dos seus éxons nas formas dominantes negativas. Deleções no gene *IKZF1* podem resultar em oito isoformas descritas até o momento. A perda de seus domínios *zinc-finger*, marcados em amarelo, impede a sua ligação ao DNA e são características das isoformas dominantes negativas da proteína, as quais atuam competindo com as isoformas funcionais de Ikaros. Modificado de (MEYER et al., 2013a)

Para compreender o processo de proliferação e diferenciação de células linfoides é preciso, inicialmente, levar em consideração a variedade de elementos de regulação que participam desse processo, onde fatores ambientais, epigenéticos e transcricionais atuam de modo a garantir o equilíbrio do organismo e o correto desenvolvimento do sistema imunológico. Nesse contexto, *IKZF1* consiste em um regulador principal participante nas etapas iniciais da linfopoiese. Conjuntamente com outros genes, *IKZF1* atua de modo a eliciar o comprometimento de células pluripotentes em um fenótipo linfoide e regular a proliferação dessas células diferenciadas (GEORGOPOULOS, 2017). Por meio de seus domínios *zinc-finger*, Ikaros interage com fatores de transcrição, como PAX5, e regula o programa de expressão linfoide através do recrutamento de complexos proteicos que atuam alterando padrões epigenéticos da célula (OLSSON; JOHANSSON, 2015).

Em decorrência da sua relevância no contexto da linfopoiese normal, é de se esperar que alterações no gene *IKZF1* possam resultar em uma

desregulação da proliferação e estão correlacionadas com o aparecimento de neoplasias hematológicas. Na LLA-B pediátrica, essas deleções ocorrem em 15% dos pacientes, contudo, estão presentes em aproximadamente 30% dos casos de alto risco da doença (KUIPER et al., 2007; MULLIGHAN et al., 2009). Deleções em *IKZF1* são encontradas com maior frequência em casos com *BCR-ABL1*, ocorrendo em cerca de 75% dos casos (MULLIGHAN et al., 2008; IACOBUCCI et al., 2012;). Estas deleções variam em extensão, podendo acometer apenas um ou alguns éxons do gene, ou mesmo toda a extensão do gene (completas). Esta alteração apresenta grande relevância pois está associada a um risco prognóstico desfavorável aos pacientes (MULLIGHAN et al., 2007).

Em um estudo realizado com uma coorte de 131 pacientes tratados com protocolo baseado em dexametasona, pesquisadores demonstraram a importância clínica do perfil de *IKZF1*. Alterações nesse gene foram observadas em amostras de pacientes em recaída, contudo, o mesmo não foi observado para outras alterações típicas da doença, como deleções em *PAX5*, *EBF1* e *CDKN2A*, os quais apresentaram-se alterados quase que exclusivamente em amostras ao diagnóstico. Adicionalmente, em comparação entre os grupos de pacientes com e sem deleções em *IKZF1*, foi constatado que pacientes com a alteração apresentam um risco doze vezes maior de apresentar uma recaída do que aqueles com status normal do gene (KUIPER et al., 2010). Mullighan e colaboradores haviam mostrado resultados semelhantes anteriormente. Por meio de uma coorte teste (n=221) e uma coorte de validação (n=258), os pesquisadores correlacionaram o desfecho clínico com a presença das principais alterações envolvidas na LLA-B. Ao final das análises, foi possível observar que apenas alterações no gene *IKZF1*, presentes em um total de 28,6% dos casos, correlacionaram-se a maior incidência de recaídas em ambas as coortes (MULLIGHAN et al., 2009). Portanto, a literatura indica que deleções em *IKZF1* consistem em um marcador prognóstico importante na doença (Figura 1.7).

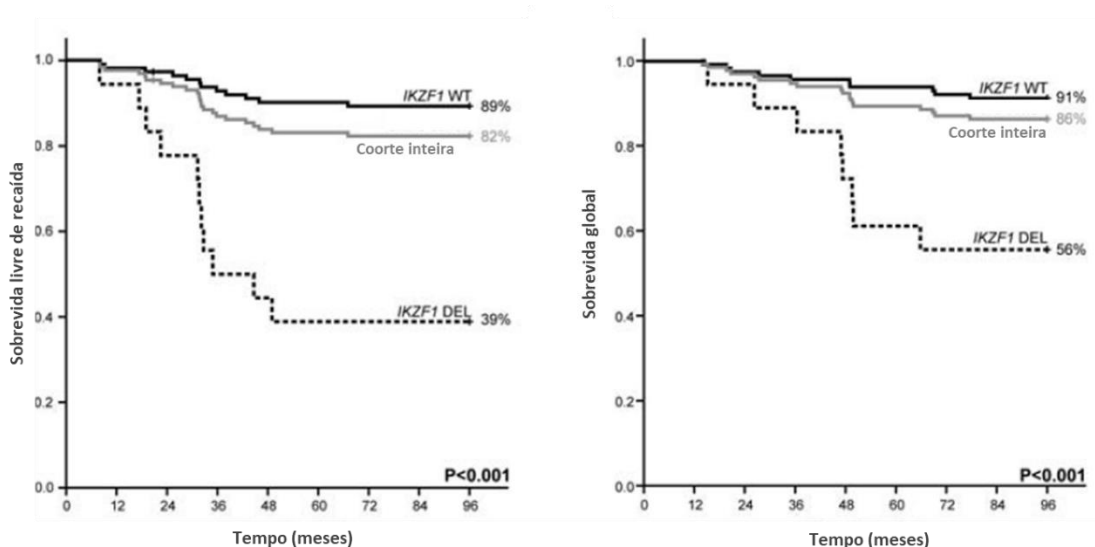


Fig 1.7. Impacto de alterações em *IKZF1* na sobrevida livre de recaída e sobrevida global de pacientes com LLA. Por meio do acompanhamento de uma coorte com 131 pacientes, foi possível avaliar a relevância de deleções no gene *IKZF1* para com as condições clínicas dos pacientes. As linhas pretas indicam os pacientes com *IKZF1* selvagem; em cinza são considerados todos os pacientes presentes na coorte e as linhas pontilhadas representam os pacientes com deleções em *IKZF1*, indicando que essas deleções estão associadas a um maior risco para os pacientes. Modificado de (Kuiper et al., 2010).

1.2.5.2 Genes envolvidos em processos antiproliferativos

1.2.5.2.1 *B-cell translocation gene 1 (BTG1)*

O *BTG1* é um supressor tumoral pertencente à família de genes antiproliferativos *BTG/TOB* está localizado na região cromossômica 12q21.33 e possui apenas dois éxons (RIMOK et al., 1991; ROUAULT et al., 1992). Juntamente com outros membros da família, a proteína *BTG1* possui um núcleo conservado evolutivamente, responsável por sua atividade antiproliferativa, o qual é chamado de domínio antiproliferativo (APRO). Sua estrutura também é composta pelo motivo de ligação LxxLL, o qual está relacionado à interação com receptores nucleares e por outros três domínios que estão relacionados a sua interação com outras proteínas (Figura 1.8). São eles: Box A e B, que estão conservados entre os componentes da família *BTG/TOB* e o Box C, o qual é exclusivo de *BTG1* e *BTG2*, e é responsável por sua ligação à arginina metiltransferase (*PRMT1*), uma enzima metiltransferase que realiza

modificações em histonas (BERTHET et al., 2002; SCHEIJEN et al., 2017).

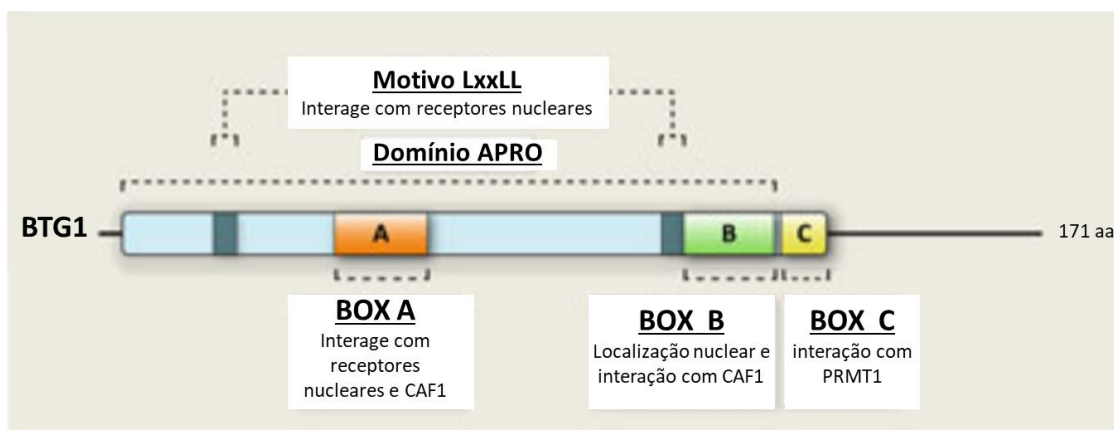


Fig 1.8. Representação esquemática da proteína BTG1. A proteína BTG1 é composta por 5 domínios principais: 1) domínio antiproliferativo (APRO), pelo qual vem a exercer as suas funções de supressor tumoral; 2) motivo de ligação LxxLL, relacionado a interação com receptores nucleares; 3) o Box A que irá interagir com receptores nucleares; 4) por sua vez, o Box B atua como sinal de localização nuclear; e 5) o Box C é responsável pela ligação de BTG1 à PRMT1. Modificado de (SCHEIJEN et al., 2017).

A expressão do gene *BTG1* se dá ubiquamente, entretanto, células hematopoiéticas, pancreáticas e cardíacas apresentam maior expressão do mesmo. Adicionalmente, células quiescentes também expressam o gene em maiores níveis, reforçando seu papel em vias antiproliferativas (ROUAULT et al., 1992). Será por meio de seus domínios de ligação que BTG1 irá atuar como coativador transcricional e se ligará a proteínas responsáveis pela regulação transcricional. Em 2010, Galen e colaboradores, mostraram que a interação entre PRMT1 e BTG1 é essencial para o processo de regulação da auto indução do receptor de glicocorticoides (RG) e a posterior resposta obtida através do tratamento com esses fármacos (GALEN et al., 2010).

No contexto da LLA-B, é crescente a busca pela compreensão do papel de *BTG1*. Foi observado que deleções neste gene são frequentes em cerca 9% dos casos, não tendo sido detectadas em LLA-T. Deleções no éxon 2 de *BTG1* levam à codificação de uma proteína truncada (WAANDERS et al., 2012). Contudo, a presença de deleções em *BTG1* também se correlaciona com subtipos específicos de LLA-B, com presença da fusão *ETV6-RUNX1* (19%) e *BCR-ABL1* (31.3%) (WAANDERS et al., 2012; XIE et al., 2014). Em pesquisa

realizada por pesquisadores do nosso grupo no INCA, foi observado que deleções neste gene foram encontradas exclusivamente em casos contendo deleções intragênicas no gene *IKZF1*, não estando presentes em casos com deleção completa do mesmo. Portanto, a deleção de ambos os genes poderia atuar sinergicamente no processo de leucemogênese, variando de acordo com o tipo de deleção de *IKZF1* (LOPES et al., 2016). Além disso, por meio de uma coorte com 533 pacientes, um estudo do grupo holandês demonstrou que, apesar da deleção monoalélica em *BTG1* não estar associada ao pior risco prognóstico, quando em concomitância com deleções em *IKZF1*, há considerável aumento no risco de recaída ($p=0.0003$). Afim de fortalecer suas observações, o grupo realizou ensaios de *knockdown* de *BTG1* em murinos haploinsuficientes para *IKZF1*. Ao final dos experimentos, foi possível verificar uma atividade cooperativa dessas deleções para o processo neoplásico. As células B murinas deficientes para tais genes apresentaram maior resistência aos glicocorticóides; o mesmo não sendo visto quando comparado com 6-mercaptopurina, doxorubicina, vincristina e asparaginase (SCHEIJEN et al., 2017).

1.2.6 Tratamento das leucemias linfoblásticas agudas

1.2.6.1 Esquema terapêutico

O advento de sequenciamento de nova geração permitiu avanços importantes no conhecimento das bases biológicas envolvidas no estabelecimento e progressão da LLA-B (PUI et al., 2015). Estudos multicêntricos fizeram uso dessa tecnologia, de modo a terem como resultado o refinamento da estratificação de risco da doença, uma vez que reúnem dados clínico-laboratoriais e os associam às principais alterações comumente encontradas na doença. Deste modo, a cooperação internacional resultou no desenvolvimento de rígidos protocolos que buscam otimizar os esquemas terapêuticos vigentes, reduzindo ao máximo a toxicidade inerente ao tratamento e suas posteriores sequelas, bem como consolidou-se como uma estratégia essencial para o desenvolvimento de novos esquemas terapêuticos (COOPER; BROWN, 2015; PUI et al., 2018).

Os protocolos utilizados globalmente possuem distinções em aspectos como: tempo de cada etapa do esquema terapêutico, fármacos utilizados ao longo do tratamento e variáveis utilizadas na estratificação de risco dos pacientes. Contudo, apesar da existência de uma variedade de protocolos, há uma consistência nas etapas principais dos mesmos, de modo que podemos separá-las em três blocos (COOPER; BROWN, 2015). O primeiro bloco terapêutico consiste na indução de remissão. É nessa etapa que se visa a eliminação dos blastos leucêmicos, sendo assim, importante monitorar a resposta terapêutica a fim de indicar uma eventual necessidade de transplante de MO para o paciente (SCHRAPPE et al., 2012). Na fase de indução, é preciso fazer uso de antraciclinas (doxorubicina ou daunorubicina), corticosteroides (prednisona ou dexametasona) e asparaginase durante um período que varia entre quatro a seis semanas. Posteriormente, é realizado o bloco de consolidação, o qual é realizado após 6 a 9 meses do tratamento e visa eliminar clones residuais. Esta etapa do tratamento é fundamental para o paciente, de modo que seu tempo e intensidade variam de acordo com a classificação de risco do mesmo. Fármacos de diversas classes, tais como mercaptopurina, etoposídeo e citarabina, são utilizados nesta etapa a fim de reduzir a indução de resistência farmacológica e inibir diversos mecanismos que propiciam a manutenção dos clones leucêmicos. Por fim, há o bloco de manutenção, o qual consiste em um regime mais longo, contudo menos agressivo e que busca eliminar por completo células leucêmicas remanescentes e a cura do paciente (COOPER; BROWN, 2015).

A tabela 1.2 lista os principais protocolos aplicados no tratamento da LLA. É possível observar que em comparação com protocolos executados em países de primeiro mundo, os quais chegam a relatar 90% de SLE. O Brasil ainda possui uma taxa bem inferior a desses, sendo de cerca de 66% em uma avaliação de 15 anos.

Tabela 1.2. – Comparação da sobrevida livre de eventos (SLE) dos principais protocolos realizados no mundo

| Grupo cooperativo | Estudo | Anos de inclusão | Pacientes | SLE em 5 anos (%) |
|---|---------------|-------------------------|------------------|--------------------------|
| Berlin-Frankfurt-Münster | ALL-BFM-95 | 1995–2000 | 2.169 | 79.6 ^a |
| Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia | GBTLI ALL-93 | 1993-1999 | 853 | 66.1 ^b |
| Children’s Oncology Group | Multiple | 2000–2005 | 7.153 | 90.4 |
| Dana Farber Cancer Institute Consortium | DFCI 95-01 | 1996–2001 | 491 | 82.0 |
| St Jude Children’s Research Hospital | TOTXV | 2000–2007 | 498 | 85.6 |
| United Kingdom Acute Lymphoblastic Leukaemia | UKALL 2003 | 2003–2011 | 3.126 | 87.2 |

Na primeira coluna estão listados os principais grupos cooperativos com protocolos estabelecidos para LLA. Estão especificados nas três colunas seguintes o nome do estudo, os anos de inclusão de pacientes, o total de pacientes avaliados. A última coluna da tabela ilustra o percentual obtido pelos pacientes do estudo em termos de SLE em cinco anos de acompanhamento. Modificado de (COOPER; BROWN, 2015)

^a O grupo de estudo do ALL-BFM-95 levou em conta a SLE em 6 anos

^b O grupo de estudo do GBTLI ALL-93 levou em conta a SLE em 15 anos de acompanhamento

1.2.6.2 Efeitos adversos ao tratamento em pacientes com leucemia linfoblástica aguda

Em virtude da variedade de drogas utilizadas nos protocolos de tratamento de pacientes com LLA, inúmeros efeitos adversos são verificados a curto, médio e longo prazo. Apesar dos benefícios trazidos por essas drogas citotóxicas e do aumento da sobrevida trazida aos pacientes após a elaboração de novos esquemas terapêuticos, a presença desses efeitos adversos ainda é uma preocupação para os clínicos e seu estudo é central para a redução de sequelas aos pacientes oncológicos. Dentre os principais efeitos adversos, estão elencados com maior frequência infecções, miopatias, ganho de peso,

osteonecrose e alterações gastrointestinais e de humor (LANGEBRAKE; REINHARDT; RITTER, 2002).

A existência desses efeitos adversos se justifica pela falta de especificidade dos mecanismos de ação desses fármacos, o que resulta em impactos nas células normais do organismo. Alguns agentes, tais como antraciclinas (doxorubicina e daunorubicina) e etoposídeo, atuam interrompendo a replicação do DNA por meio da sua interação com a DNA topoisomerase II. Como consequência, tais fármacos vêm sendo relacionados a casos de alterações morfológicas no miocárdio e neoplasias secundárias, como exemplo a LMA (KOLLMANNBERGER et al., 1998; XU et al., 2001). Seguindo a falta de especificidade dos fármacos descritos acima, os glicocorticoides também são descritos como importantes causadores de efeitos adversos, os quais dependem do tempo de exposição e dose aplicada no tratamento. Deve-se ressaltar que a dexametasona possui maior toxicidade quando comparada à prednisona. Dentre os principais efeitos adversos, estão o maior risco de infecções, efeito que decorre da sua poderosa ação imunossupressora; distúrbios endócrinos; miopatias; bem como, em alguns casos, eventos vasculares, a exemplo de oclusão arterial (LANGEBRAKE; REINHARDT; RITTER, 2002). Finalmente, é bem descrito que a combinação desses fármacos tem efeitos tardios que impactam o sistema neurocognitivo das crianças tratadas, sendo assim importante um cuidado multidisciplinar para a redução de danos e garantia de melhor qualidade de vida aos pacientes (LOFSTAD et al., 2019).

1.2.7 Glicocorticoides sintéticos na prática clínica

Apesar da constante elaboração de novos esquemas terapêuticos, os medicamentos presentes no tratamento de LLA-B, em sua maioria, já são usados a ao menos cinquenta anos na prática médica (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013). Dentre eles, temos os glicocorticoides sintéticos, os quais tiveram seu potencial terapêutico avaliado ainda na década de 40 (TIMMERMANS; SOUFFRIAU; LIBERT, 2019).

Análogos aos glicocorticoides endógenos, a exemplo do cortisol, os

glicocorticoides sintéticos atuam suprimindo o sistema imunológico por meio da promoção da apoptose e inibição de citocinas pró-inflamatórias (HERMOSO; CIDLOWSKI, 2003; SMITH; CIDLOWSKI, 2010). O mecanismo de ação destes fármacos se dá por meio da sua ligação ao RG, o qual localiza-se na membrana nuclear da célula. A partir dessa ligação, o RG é translocado para o núcleo onde exerce seu papel de fator de transcrição e, adicionalmente, há o estabelecimento de uma alça de *feedback* positivo que resulta na auto-indução do receptor e na amplificação de sua resposta. Finalmente, a atuação como fator transcricional ativa genes relacionados a resposta aos glicocorticoides, bem como inibe fatores de transcrição envolvidos na resposta pró-inflamatória, como é o caso de AP-1 e NF-κB (SCHMIDT et al., 2004).

Os glicocorticoides são capazes de resultar em respostas nas vias intrínseca e extrínseca da apoptose. Apesar de não se ter a completa compreensão de como essa indução ocorre em diferentes tipos celulares, está claro que vários mecanismos estão envolvidos na resposta a esses fármacos (SCHLOSSMACHER; STEVENS; WHITE, 2011). Tem sido demonstrada a importância de um RG funcional e normalmente expresso para a indução da resposta apoptótica. Estudos da década de 90, mostraram que linhagens que expressam mutações no RG apresentam falhas na indução da apoptose e que a introdução de um receptor exógeno é capaz de restaurar a resposta em linhagens celulares que possuem a menor expressão do receptor e são resistentes a essa classe de fármacos (GELEY et al., 1996; HALA; HAKTMANN; BOCK, 1996). Neste contexto, a literatura indica que os glicocorticoides induzem a apoptose ao estimularem a expressão de elementos pró-apoptóticos, bem como por regularem negativamente a expressão de genes anti-apoptóticos, em um processo que envolve na regulação de proteínas membros da família *BCL-2* (SCHLOSSMACHER; STEVENS; WHITE, 2011; SCHMIDT et al., 2004). Deste modo, por conta de sua atividade imunossupressora e pró-apoptótica, glicocorticoides como prednisona e a dexametasona são vastamente utilizados nos protocolos terapêuticos de neoplasias hematológicas.

O uso destes fármacos se dá na etapa de indução da remissão. A resposta apresentada nessa etapa consiste em um sensor no que diz respeito à evolução do paciente, sua estratificação em um dos grupos de risco da doença e a chance de recaídas no tratamento (SCHRAPPE et al., 2012). Apesar de

parecidos em termos químicos e funcionais, estes dois fármacos possuem algumas diferenças, de modo que, apesar da prednisona ser usada a mais tempo na clínica, tem sido crescente a implementação da dexametasona nos protocolos terapêuticos (COOPER; BROWN, 2015). A fim de estabelecer diferenças claras entre os dois fármacos, foi realizado um ensaio clínico randomizado com 1.621 pacientes recém diagnosticados com LLA na Inglaterra, no qual uma parte dos pacientes recebeu prednisona na fase de indução, enquanto que o outro grupo recebeu dexametasona. Ao final do estudo, foi observado que o uso da dexametasona se correlacionou com um uma maior SLE, assim como uma menor taxa de recaídas, particularmente, recaídas em SNC (MITCHELL et al., 2005). Contudo, apesar de sua indicação para pacientes de alto risco, a toxicidade ainda consiste em um desafio a ser contornado pelos clínicos, necessitando de mais estudos para a elaboração de protocolos cada vez mais eficientes e seguros.

1.2.7.1 Via de sinalização do receptor de glicocorticoides (NR3C1)

O gene *NR3C1*, localizado na região 5q31.32, codifica a proteína do RG, a qual faz parte de uma família de receptores nucleares que respondem a estímulos hormonais e atuam como fatores de transcrição (FRANCKE; FOELLMER, 1989). Como ilustrado na figura 1.9, estruturalmente, o gene *NR3C1* é composto por nove éxons, sendo que a codificação da proteína é determinada pelos éxons de 2-9. A funcionalidade do receptor é garantida a partir de domínios de ligação ao DNA presentes nos éxons 3 e 4, bem como de domínios de ligação ao ligante arranjados entre os éxons 5 e 9, e de sítios de ligação a fatores transcricionais. Adicionalmente, há a presença de domínios funcionais de ativação, AF-1 e AF-2, os quais permitem a ativação de genes alvo de modo independente da ligação ao hormônio esteroide. Devido a mecanismos de *splicing* alternativo, são geradas duas isoformas do RG, RG α e RG β , sendo a forma RG α a mais comumente expressa e que dá origem a uma proteína com 777 aminoácidos (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2011; RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2013).

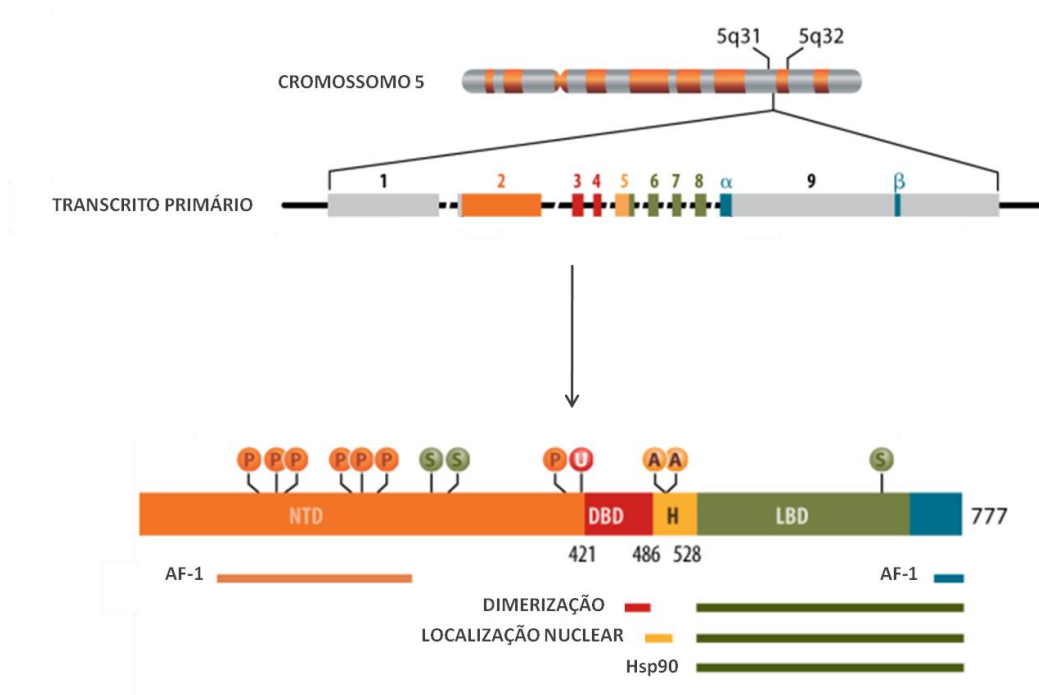


Fig 1.9. Localização genômica e representação estrutural da proteína do receptor de glicocorticoide. Acima, temos a ilustração do gene *NR3C1* localizado na região cromossômica 5q31.32. Abaixo na figura, estão representados os domínios estruturais do receptor. Em laranja encontra-se o domínio de transativação N-terminal (NTD); a cor vermelha destaca o domínio de ligação ao DNA (DBD); em verde encontra-se o domínio de ligação ao ligante (LBD). Adicionalmente, estão ilustrados os domínios de ativação funcional AF-1 e AF-2. Modificado de (RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2013).

Mecanicamente, a resposta a glicocorticoides é dependente de fatores que induzem tanto a ativação quanto a inibição de transcrição em vias relacionadas a apoptose e resposta pró-inflamatória, respectivamente (PHUC LE et al., 2005). Na ausência de ligante, o RG permanece complexoado à proteínas chaperonas da família *heat shock* (HSP70 e HSP90). Uma vez que ocorra a liberação de glicocorticoides endógenos ou sintéticos no citoplasma celular, a interação ligante/receptor irá propiciar a homodimerização do RG e resultar em sua translocação para o núcleo da célula (PHUC LE et al., 2005; RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2013). Por outro lado, essa ligação irá disparar uma resposta de auto-indução do RG na membrana nuclear e amplificar a sua resposta, processo esse que, segundo um estudo de Galen e colaboradores, parece ser regulado por meio da interação da proteína BTG1 com um coativador transcrricional, a arginina metiltransferase PRMT1 (GALEN et al., 2010).

Uma vez no núcleo, a resposta eliciada pelo RG depende de sua ligação ao DNA em regiões de elementos de resposta a glicocorticoides (GRE), uma vez que a partir dessa ligação, o receptor irá mudar a sua conformação estrutural e recrutar fatores de transcrição e outros elementos reguladores para regiões promotoras e de *enhancers*, de modo a atuar inibindo ou ativando a atividade transcricional de seus genes alvo (PHUC LE et al., 2005). Além dos elementos descritos anteriormente, outras moléculas e mecanismos são responsáveis pela formação da resposta a glicocorticoides. A metilação do DNA, por exemplo, configura uma alteração epigenética que está relacionada ao acesso do RG aos sítios de genes responsivos a glicocorticoides, de modo que alterações tecido-específicas na cromatina permitem respostas distintas aos glicocorticoides (RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2013).

NR3C1 atua nas regiões promotoras de diferentes genes que possuem GREs, como por exemplo, a fosfatase *DUSP1* e a quinase *SGK1*. Um estudo com mastócitos e fibroblastos mostrou que mediante o uso de dexametasona a expressão do gene *Dual Specificity Phosphatase 1 (DUSP1)* era induzida, bem como observou-se inibição de sua degradação (KASSEL et al., 2001). Shah e colaboradores, observaram em células respiratórias que *DUSP1* consiste em uma fosfatase que atua de forma transiente na resposta a glicocorticoides. Uma vez expressa, sua proteína apresenta papel inibitório sobre a via de MAPK e resulta no estabelecimento do processo antiinflamatório promovido pelos glicocorticoides (SHAH et al., 2014). Por sua vez, o *Serum/glucocorticoid-regulated kinase (SGK1)* possui elementos responsivos a glicocorticoides e tem sua expressão aumentada em função do estímulo com os mesmos (NÁRAY-FEJES-TÓTH et al., 2000; TISSING et al., 2007). Como consequência, *SGK1* participa de uma série de eventos envolvidos na resposta a estresse, levando à expressão de carreadores e canais de Na⁺ e K⁺, dentre outras funções (ITANI et al., 2002; LANG et al., 2019).

Em conjunto com outros genes de resposta a glicocorticoides, *DUSP1* e *SGK1* serão responsáveis pela promoção das funções efectoras desses fármacos. Por fim, o RG será ubiquitinado e levado a degradação proteossomal. Um estudo sobre LLA-T observou que a proteína FBXW7, pertencente ao complexo E3 ubiquitina ligase, pode intermediar esse processo e que mutações em *FBXW7* estão relacionadas a um melhor prognóstico dos pacientes (ASNAFI

et al., 2009; MALYUKOVA et al., 2013).

1.2.8 Fatores relacionados a falhas no tratamento com glicocorticoides

Devido ao amplo uso dos glicocorticoides sintéticos no tratamento de LLA, a resistência aos mesmos consiste em um fator limitante para o desfecho clínico favorável do paciente, sendo assim, pesquisas são realizadas no intuito de melhor compreender este problema (YOSHIDA et al., 2002; TISSING et al., 2007). Mecanismos *upstream* e *downstream* à via de sinalização dos glicocorticoides têm sido relacionados ao processo de resistência. Dentre os mecanismos *upstream*, estão aqueles que resultam na diminuição dos níveis do ligante, ou seja, do próprio glicocorticoide; mutações ou alterações na expressão do receptor, bem como redução de sua auto-indução; e deficiência em proteínas acessórias à formação de resposta. No caso dos mecanismos *downstream*, podem existir defeitos em componentes essenciais à resposta celular e interferência de vias que atuam de forma antagônica (SCHMIDT et al., 2004; SCHEIJEN, 2019). Os principais mecanismos envolvidos na resistência a glicocorticoides sintéticos estão detalhados na tabela 1.3.

Tabela 1.3. – Mecanismos envolvidos na resistência a glicocorticoides sintéticos usados em esquemas terapêuticos de LLA

| Tipo de mecanismo | Exemplos de alterações envolvidas |
|--|---|
| Expressão e função alterada do receptor | Expressão diferencial de isoformas do receptor por meio de splicing alternativo Auto Regulação transcricional de <i>NR3C1</i> Deleções e mutações no gene <i>NR3C1</i> Regulação de GR por microRNAs Degradação do RG |
| Inibição da apoptose | Translocação em <i>BCL2</i> Expressão diferencial de <i>BIM</i> Expressão alterada de <i>MCL1</i> Mutações de perda de função nas proteínas do complexo PRC2 (EZH2, EED, SUZ12) Sinais de sobrevivência por células estromais |
| Ativação de vias de sinalização | Via de MAPK Fosforilação de RG dependente de CDK Via PI3K / AKT Sinalização LCK Via JAK / STAT Metabolismo/sinalização mTOR Via de NOTCH1 |

Modulação da regulação transcricional do receptor

Expressão reduzida de proteínas do complexo de remodelação da cromatina SWI/SNF
As deleções / mutações nos genes *IKZF1*, *BTG1*, *TBL1XR1* e *CREBBP* afetam a regulação do gene alvo GR
Acessibilidade da cromatina

A tabela agrupa os mecanismos que contribuem para a resistência do receptor de glicocorticoides (RG) em quatro grupos: expressão e função alterada do receptor, inibição da apoptose, ativação de vias de sinalização e modulação da regulação transcricional do receptor. Para cada um desses mecanismos são atribuídos exemplos de vias, genes e proteínas que estão alterados e resultam na falha do receptor. Modificado de (SCHEIJEN, 2019)

A presença de deleções nos genes *IKZF1* e *BTG1* confere um fenótipo de resistência às células neoplásicas, determinando um pior prognóstico aos pacientes com LLA-B. A concomitância de deleções nesses genes aumenta o risco de recaída dos pacientes e demonstra uma possível atuação sinérgica desses no processo de leucemogênese (SCHEIJEN et al., 2017). Em estudo que submeteu células B de murinos com haploinsuficiência de *IKZF1* ao tratamento com glicocorticoides, foi observado que essas células apresentaram maior sobrevivência quando comparadas com um controle selvagem. Ao se analisar a expressão gênica por meio da técnica de microarranjo comparando células com deleção de *IKZF1* e células selvagens, foi visto uma assinatura de expressão gênica específica mediante ao uso de dexametasona e prednisolona (MARKE et al., 2016). Uma possível explicação para tal observação seria que *IKZF1* modularia a sensibilidade aos glicocorticoides por meio da supressão da atividade de AKT1, proteína que, por meio da fosforilação do RG, impede a sua translocação para o núcleo e, conseqüentemente, sua ação como fator transcricional (PIOVAN et al., 2013; CHAN; MÜSCHEN, 2017). Por sua vez, as deleções em *BTG1* também se mostraram relevantes na resistência a glicocorticoides, uma vez que esse gene participa do processo de auto-indução do RG e da ativação de genes relacionados à resposta farmacológica (GALEN et al., 2010). A Fig 1.10 ilustra como *BTG1* e *IKZF1* poderiam interferir na via de resposta a glicocorticoides.

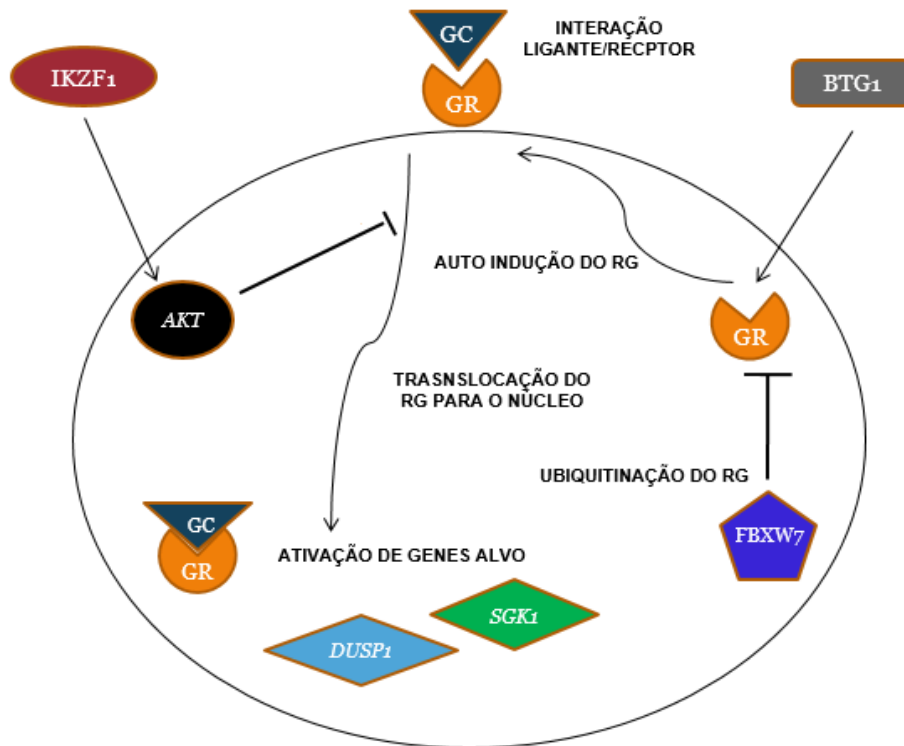


Fig 1.10. Ilustração simplificada da participação de BTG1 e IKZF1 na via de resposta a glicocorticoides. IKZF1 participa da regulação do status de fosforilação da proteína AKT, de modo que impede a sua ação de kinase sobre o RG. BTG1 por sua vez, está diretamente relacionado a promoção de resposta de auto indução do receptor após a indução por glicocorticoides. Uma vez que ocorra a ligação ligante/receptor, haverá a homodimerização deste e sua translocação para o núcleo, onde passará a atuar como fator de transcrição de genes de resposta a glicocorticoides, representados por *DUSP1* e *SGK1*. Por fim, terminada a sua atividade, o receptor poderá então ser enviado para a degradação por meio de sua ubiquitinação pela proteína *FBXW7*. (Machado, 2020)

Adicionalmente, foi visto que células 697 que foram estabelecidas sendo resistentes a dexametasona, possuem menor expressão de *NR3C1*. Isso acompanhava um aumento nos níveis de glutathiona intracelular. Por outro lado, a inibição da síntese de glutathiona estava correlacionada com o retorno de um padrão de sensibilidade dessas células (INOUE et al., 2002). Mas além de alterações na expressão ou função do RG, outros mecanismos estão relacionados a resistência aos glicocorticoides. Por fim, mutações em moléculas reguladoras (como o coativador transcricional – CREBBP) podem interferir na regulação de genes que são essenciais para a indução da apoptose em resposta aos glicocorticoides, resultando na resistência aos glicocorticoides (MULLIGHAN et al., 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Os avanços alcançados na estratificação de risco e elaboração de novos protocolos terapêuticos, resultaram em um índice de cura de mais de 80% na LLA-B nos protocolos mais avançados (HUNGER; MULLIGHAN, 2015). Entretanto, a presença de casos de recaídas permanecem como um desafio para a clínica. Neste contexto, é sabido que diversos mecanismos estão associados com a resistência aos fármacos que são utilizados no tratamento da doença, bem como com a maior agressividade dessa neoplasia hematológica.

Em virtude do amplo uso de glicocorticoides, como dexametasona e prednisolona, no bloco de indução da remissão da doença, a resposta inicial ao tratamento é um importante indicador de direcionamento quanto à estratificação de risco e prognóstico do paciente (SCHRAPPE et al., 2012). Deste modo, já foi demonstrado que inúmeros fatores estão relacionados a prejuízos na resposta a esses fármacos. Assim, estudos genômicos têm sido realizados a fim de identificar biomarcadores que possam estar correlacionados ao processo de resistência e que permitam a elaboração de novas estratégias terapêuticas (SCHEIJEN, 2019).

Nesse cenário, os genes *IKZF1* e *BTG1* aparecem com um papel potencial na resposta aos glicocorticoides. Deleções em *IKZF1* são correlacionadas a um pior prognóstico da doença e, apesar do mesmo não ser observado para *BTG1*, tem sido visto que estes genes podem atuar sinergicamente e resultam em um prognóstico acentuadamente pior em pacientes e na maior chance de ocorrência da leucemia em murinos (LOPES et al., 2016; SCHEIJEN et al., 2017). Estudos com linhagem celular revelaram que a expressão deficiente desses genes pode impactar a resposta aos glicocorticoides uma vez que pode alterar a autoindução do RG, bem como, impedir sua translocação para o núcleo e sua atuação sobre genes de resposta a glicocorticoides (GALEN et al., 2010; MARKE et al., 2016). Entretanto, ainda não se conhece quais alvos *downstream* a essa via são afetados pela deleção concomitante dos genes e, conseqüentemente, levando ao fenótipo de resistência apresentado por essas células.

Visto que deleções em *IKZF1* e *BTG1* devem desempenhar um papel na

via de glicocorticoides, este trabalho visa esclarecer se tais alterações em conjunto promovem maior resistência a glicocorticoides e seus mecanismos, através da análise de expressão de genes essenciais para a promoção da resposta farmacológica.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a modulação da resposta aglicocorticoides nas LLA-B mediante inibição gênica de *BTG1* e/ou *IKZF1*.

Objetivos específicos

- Estabelecer as condições experimentais de transfecção e inibição dos genes *BTG1* e *IKZF1* utilizando uma linhagem celular de LLA-B;
- Avaliar os efeitos da inibição destes genes na resposta ao tratamento com glicocorticoides;
- Caracterizar o perfil de expressão de genes participantes da via de resposta a glicocorticoides após a inibição de *BTG1* e *IKZF1*, de forma exclusiva e concomitantemente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

A figura 4.1 ilustra o fluxograma seguido para a realização do presente estudo.



Fig 4.1. Fluxograma descrevendo as etapas do estudo, incluindo suas metodologias. O estudo foi iniciado a partir da escolha de genes da via de resposta a glicocorticoides que apresentaram-se diferencialmente expressos em trabalhos que avaliaram a resposta após indução com glicocorticoides ou pós silenciamento dos genes *BTG1* e *IKZF1*. Após sua seleção, iniciamos a inibição dos genes *BTG1* e *IKZF1* por meio de siRNAs específicos e, posteriormente, tratamos essas células com dexametasona. Após as etapas descritas, avaliamos a expressão dos genes alvo do estudo por meio da técnica de RT-qPCR. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 5.

4.2 Seleção dos genes alvo do estudo

Com base na literatura, buscamos selecionar estudos que avaliaram a presença de genes diferencialmente expressos após a indução das células a tratamento com fármacos glicocorticoides. Adicionalmente, avaliamos estudos

que realizaram o silenciamento dos genes *BTG1* ou *IKZF1* e procuramos identificar genes que possuíam expressão diferencial pós silenciamento e que viessem a fazer parte da via de resposta a glicocorticoides sintéticos (TISSING et al., 2007; GALEN et al., 2010; MARKE et al., 2016; CHAN; MÜSCHEN, 2017). Adicionalmente, foi feita a análise dos processos biológicos em que estes genes candidatos estão envolvidos e verificada sua participação em vias relacionadas a resposta aos glicocorticoides. Ao final dessas etapas, foram selecionados quatro genes que se apresentavam diferencialmente expressos de forma sobreposta em dois ou mais dos artigos avaliados, e que há o indicativo de uma potencial modulação, direta ou indireta, em sua transcrição devido a deleções em *BTG1* e/ou *IKZF1*. Dentre eles, estão alvos *downstream* e *upstream* da via, tais como o receptor de glicocorticoide (*NR3C1*), dois de seus alvos transcricionais (*SGK1* e *DUSP1*), bem como da proteína responsável pelo seu encaminhamento para a degradação proteossomal (*FBXW7*).

4.3 Escolha da linhagem celular

Um modelo celular *in vitro* de linhagem linfoblastoide foi utilizado para avaliar o impacto da inibição de *BTG1* e/ou *IKZF1* mediante indução com glicocorticoides sobre a viabilidade celular e a expressão de genes associados à resposta a glicocorticoides. Como as deleções em *BTG1* e *IKZF1* não são exclusivas ou preponderantes em um subgrupo molecular específico de LLA-B, optou-se pelo uso da linhagem celular 207, a qual não possui as principais alterações citogenéticas observadas na doença. A 207 é uma linhagem de precursor linfóide B que foi obtida a partir da amostra de um paciente no momento da segunda recaída (FINDLEY et al., 1982). A linhagem celular 207 foi gentilmente cedida pelo Dr. Martin Bonamino.

4.4 Cultivo celular

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina (Sigma), 100 U/mL de

penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina (Sigma) em pH 7,2. As mesmas foram mantidas em estufa com 5% de dióxido de carbono e 37°C.

4.5 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para a avaliação de expressão gênica

Por meio da plataforma Ensembl Genome Browser, foram identificados os transcritos que resultaram nas proteínas de cadeia completa de cada gene de interesse. De posse das sequências de cada mRNA, as mesmas foram inseridas no Primer-Blast, uma ferramenta de desenho de oligonucleotídeos desenvolvida pelo NCBI. Visando o melhor desenho dos oligonucleotídeos, foram utilizados parâmetros que buscam reduzir a chance de amplificação de DNA genômico, como o desenho em regiões entre junções éxon-éxon. Além disso, o tamanho máximo do amplicon foi limitado a 250 pb e configuramos o tamanho ótimo dos oligonucleotídeos para 25 pb.

Tabela 4.1 Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a análise de expressão gênica

| Gene | Oligonucleotídeo | Sequência (5'-3') |
|-----------------|------------------|---------------------------|
| <i>β-actina</i> | Senso | GGCGGCACCACCATGTACCCT |
| | Antissenso | AGGGGCCGGACTCGTCATACT |
| <i>IKZF1</i> | Senso | GATGAAGAGAATGGGCGTTGC |
| | Antissenso | CATTCATTTTCTCTCCCGAGGC |
| <i>BTG1</i> | Senso | GCTGCTGGCAGAACATTATAAACAT |
| | Antissenso | CTCTCCAATTCTGTAGGACACTTCA |
| <i>DUSP1</i> | Senso | ATTTTGAGGGTCACTACCAGTACAA |
| | Antissenso | TCCAGCATTCTTGATGGAGTCTATG |
| <i>SGK1</i> | Senso | TCTTTGAGCGCTAACGTCTTTCT |
| | Antissenso | TCTGCTTCATGAAAGCGATGAGAAT |
| <i>FBXW7</i> | Senso | CCACCCAGAGGAAACTTTACAAAAA |
| | Antissenso | CGCGGTACTCCTCTTTTCCTCTT |
| <i>NR3C1</i> | Senso | TTGGATTCTATGCATGAAGTGGTTG |
| | Antissenso | AGCTAACATCTCGGGGAATTCAATA |

Descrição das sequências senso e antissenso dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-qPCR para amplificar os RNAm dos genes *β-actina*, *IKZF1*, *BTG1*, *DUSP1*, *SGK1*, *FBXW7*, *NR3C1*.

4.6 Desenho de oligonucleotídeos de siRNA para a inibição dos genes *BTG1* e/ou *IKZF1*

Por meio do *Ensembl Genome Browser*, foram selecionados os transcritos que produzem as proteínas funcionais dos genes *BTG1* e *IKZF1*. Os transcritos de interesse foram inseridos na plataforma Block-it™ RNAi design (Invitrogen), a qual gerou as sequências de pequeno RNA de interferência (siRNA) a serem utilizadas para a inibição gênica. Posteriormente, de posse das sequências sugeridas pela plataforma, foi realizado o alinhamento usando o algoritmo do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) e avaliados os parâmetros, tais como o *Query cover* e o *E value*, os quais estão correlacionados ao percentual de similaridade biológica entre uma sequência referência e a nossa sequência de interesse. Ao final desta etapa, foram verificados os parâmetros de auto-complementaridade das sequências de siRNA a partir da ferramenta *online* do *Oligonucleotide Properties Calculator* (OligoCalc), onde foi descartada a existência de *hairpins* e complementaridade na região 3' das nossas sequências.

Tabela 4.2 Sequências de RNA de interferência utilizados para a inibição gênica

| Gene | RNA de interferência | Sequência (5'-3') |
|--------------|----------------------|-----------------------|
| Scramble | Senso | AGGUAGUGUAAUCGCCUUGTT |
| | Antissenso | CAAGGCGAYUACACUACCUTT |
| <i>IKZF1</i> | Senso | GGGUCAAGACAUGUCCCAATT |
| | Antissenso | UUGGGACAUGUCUUGACCCTT |
| <i>BTG1</i> | Senso | GGAUCGGGUUACCGUUGUATT |
| | Antissenso | UACAACGGUAACCCGAUCCTT |

Sequências senso e antissenso dos RNAs de interferência utilizados para a realização da inibição de *BTG1* e/ou *IKZF1*. Adicionalmente, estão descritas as sequências utilizadas como controle (Scramble)

4.7 Padronização da inibição dos genes *BTG1* e/ou *IKZF1* por meio da técnica de eletroporação

Inicialmente, por meio da plataforma ProtParam (ExPASy), estimamos

computacionalmente a meia vida das proteínas codificadas pelos genes *BTG1* e *IKZF1*, de modo a ter um direcionamento do tempo mínimo necessário para a ação dos RNAs de interferência a serem utilizados. A fim de determinar a condição ótima para a realização da inibição dos genes *BTG1* e *IKZF1*, células de linhagem 207 foram transfectadas com um siRNA isoladamente e com ambos siRNAs de interesse por meio da técnica de eletroporação usando o tampão 1SM (CHICAYBAM et al., 2013) e o programa T-016 com o sistema eletroporação Nucleofector 4D™ (Lonza). A inibição foi avaliada em triplicatas experimentais nos tempos de 36h e 48h nas concentrações de oligonucleotídeos de 50 nM e 100 nM. Adicionalmente, foram inseridos poços com controles negativos que consistiram de células que não sofreram a etapa de transfecção. Um total de 2×10^6 células foi inserido em cada poço de uma placa de 12 poços, onde foram mantidas em 2 mL de meio RPMI 1640 com 20% de SFB, sem adição de antibióticos e em estufa com 5% de dióxido de carbono e 37°C.

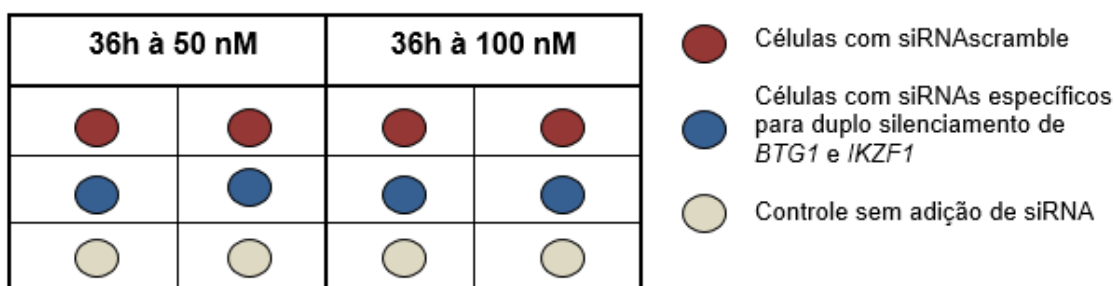


Fig 4.2. Modelo de placa para inibição dupla dos genes *BTG1* e *IKZF1* na condição de 36h com concentração de oligonucleotídeos de 50 nM e 100 nM. Diferentes abordagens foram feitas buscando a otimização da transfecção. Ao final, os tempos de 36h e 48h após a transfecção foram testados utilizando duas concentrações diferentes de siRNA (50 nM e 100 nM).

4.8 Extração, controle de qualidade e quantificação do RNA das células transfectadas

Após os tempos avaliados, as células foram centrifugadas a rotação de 1.500 rpm durante 5 minutos e seu sobrenadante descartado. Em seguida, adicionamos 1 mL do reagente Trizol™ (Invitrogen) e realizamos a extração do RNA de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA foi

observada a partir da eletroforese em gel com concentração de 0,8% de agarose com tampão TBE 1x (Tris/Borato/EDTA). Posteriormente, foi realizada a quantificação dos ácidos nucléicos utilizando 1 µL da amostra e medindo a sua absorbância na faixa de 260 nm por meio do aparelho NanoDrop™ (ThermoScientific).

4.9 Reação de transcrição reversa (RT)

Uma concentração inicial de 1 µg de RNA foi utilizada para realizar a síntese de DNA complementar (cDNA). De modo a garantir a remoção de DNA genômico remanescente, as amostras de RNA foram submetidas ao tratamento com Ambion DNase I (RNase free) durante 30 minutos a 37 °C. Para a reação de transcrição reversa e síntese do cDNA, foram utilizados oligonucleotídeos randômicos, de acordo com o protocolo disponível para a SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Após a síntese, a presença de cDNA foi confirmada a partir da amplificação do transcrito constitutivo de *GAPDH* (senso: 5'-TGA CCC CTT CAT TGA CCT CA-3'; antissenso: 5'-AGT CCT TCC ACG ATA CCA AA-3').

4.10 Análise de expressão gênica por PCR quantitativa (qPCR)

Inicialmente, buscamos obter as eficiências de amplificação com nossos oligonucleotídeos iniciadores para os alvos e gene de referência (B-actina). Para este objetivo foi feita a padronização das condições da RT-qPCR por meio da realização de uma curva de diluição do cDNA da linhagem celular 207 seguindo as proporções de 1:10 e 1:5. Após esta etapa, observamos valores de coeficiente de determinação (R²) entre 0,98 e 0,99, mostrando pouca variação entre os pontos da reta. Posteriormente, realizamos o cálculo da eficiência de nossas reações, onde temos que a eficiência é igual a $10^{-1/\text{coeficiente angular da reta}} - 1$. Ao final desta etapa obtivemos valores entre 90 a 105%, demonstrando boa eficiência da reação com nossos oligonucleotídeos e permitindo o posterior uso do método de quantificação relativa através do

cálculo de $\Delta\Delta Cq$. Para a análise de expressão gênica, o equivalente a 75 ng de cada cDNA (1,5 μ L) foram utilizados para a PCR quantitativa (qPCR). A análise de expressão gênica foi realizada com amostras em duplicatas por meio do ensaio *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega), utilizando o sistema *7500 Real-Time PCR System™* (Applied Biosystems). As condições de amplificação dos genes analisados variaram quanto à concentração de oligonucleotídeo, sendo 0,15 μ M para a amplificação de *BTG1*, *SGK1*, *DUSP1* e *FBXW7*, e 0,20 μ M de cada iniciador para *B-actina*, *IKZF1* e *NR3C1*, em volume final de 15 μ L.

A amplificação de todos os genes (*B-actina*, *BTG1*, *IKZF1*, *SGK1*, *DUSP1*, *FBXW7*, *NR3C1*) foi realizada de acordo com as condições de ciclagem descritas na Tabela 5.2.

Tabela 4.3. – Condições de ciclagem para a realização de PCR quantitativa (RT-qPCR)

| Etapa | Perfil Térmico | Ciclagem |
|--|---------------------|----------|
| Ativação da enzima GoTaq® Hot Start Polymerase | 2 min 50°C | 1x |
| Desnaturação inicial | 10min 95°C | 1x |
| Desnaturação | 15 seg 95°C | 40x |
| Anelamento e extensão | 60 seg 63°C | 1x |
| Curva de melting | 15 seg 60°C-95°C | |

A primeira coluna apresenta as etapas da técnica; a segunda coluna descreve o perfil térmico e tempo de cada uma das etapas; por fim, na terceira coluna está demonstrando a quantidade de ciclos realizados em cada um dos processos.

4.11 Determinação de IC50 de modelo celular 207 tratada com dexametasona por meio do método de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT)

A fim de saber o impacto da inibição dos genes *BTG1* e *IKZF1* sobre a linhagem 207 mediante indução com a dexametasona, foi determinada inicialmente a concentração mínima a ser utilizada para inibir o crescimento

celular em ao menos 50%. Tal avaliação foi realizada por meio de ensaio colorimétrico de (MTT), o qual permite avaliar a viabilidade mitocondrial das células submetidas ao tratamento farmacológico.

As células de linhagem 207 foram plaqueadas em triplicatas em uma placa de 96 poços contendo 3×10^4 células em um volume de 100 μL de meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SFB. Adicionalmente, foram plaqueados poços com controles negativos, contendo células de linhagem 207 nas quais não se teve adição de fármaco, e poços que denominamos de brancos, os quais continham apenas meio RPMI 1640 e serviu com calibrador para a leitura final no espectrofotômetro. A fim de definir o tempo ideal para leitura, foi feito o plaqueamento de três placas nas condições descritas acima, onde cada uma consistia em um dos tempos de leitura (24h, 48h e 72h) após a aplicação do fármaco. As células foram mantidas em estufa com 5% de dióxido de carbono e 37°C durante o período de 24h. Após esse período, as células foram cultivadas em crescentes concentrações de fosfato dissódico de dexametasona (0,25 mM a 5 mM - Farmace). Em cada poço, foi adicionado 100 μL de solução de fosfato dissódico de dexametasona diluída em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SFB. As células foram mantidas em cultura e, 4h antes do tempo de leitura, foi adicionado 10 μL da solução de MTT a 0,5 mg/mL (Sigma-Aldrich) nos poços utilizados. Passado o tempo de 4h com a solução de MTT, as placas foram centrifugadas durante 5 minutos a rotação de 1.500 rpm, em seguida, o sobrenadante foi descartado e os cristais presentes na placa foram diluídos em 100 μL do solvente ThermoScientific™ Dimetilsulfóxido (DMSO). A placa ficou 5 minutos em agitação e 10 minutos em estufa à 37°C. Finalmente, a atividade das desidrogenases mitocondriais foi mensurada por meio da leitura à 538 nm no leitor de microplaca Spectramax 190 (Molecular Device).

4.12 Ensaio de citotoxicidade de linhagem 207 transfectada e tratada com glicocorticoide

Uma vez definida a concentração ideal para ser utilizada na indução de resposta no modelo de linhagem 207, foi realizada a inibição dos genes *BTG1* e *IKZF1*, de modo separado e concomitante, e avaliada a resposta mediante

posterior tratamento com dexametasona. Mediante os resultados da etapa de padronização, as células foram submetidas ao protocolo de transfecção, conforme descrito na seção *Padronização da transfecção dos genes BTG1 e/ou IKZF1 por meio da técnica de eletroporação*, e mantidas em cultura durante o período de 36h. Afim de avaliar a eficiência da inibição após a adição de glicocorticoides, o tempo de 72h também foi avaliado na concentração de oligonucleotídeo de 100 nM. Em seguida, foi feito o tratamento com 1 mM de dexametasona. A avaliação da citotoxicidade nos cenários sem inibição e com inibição simples e concomitante dos genes *BTG1* e *IKZF1* seguiu o protocolo do ensaio de MTT, descrito na sessão *Determinação de IC50 de modelo celular 207 tratada com dexametasona por meio do método de MTT*. Para permitir a melhor visualização gráfica dos resultados, os valores de densidade óptica serão normalizados para 100%, tendo como base os valores obtidos por meio da amostra *scramble* não tratada com dexametasona.

4.13 Análise estatística

As diferenças encontradas entre os grupos de estudo avaliados foram submetidas a análises estatísticas realizadas por meio do Teste T de Student. Os cálculos de significância e os gráficos construídos posteriormente foram realizados usando o pacote computacional GraphPad Prism 5 (GraphPad™ Software, San Diego, CA, EUA), onde valores de $p < 0,05$ foram interpretados como significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Estabelecimento de linhagem celular como modelo de resistência a glicocorticoides

5.1.1 Caracterização molecular da linhagem celular 207

Por meio da RT-PCR foi confirmado que a linhagem celular 207 não possui nenhuma das fusões gênicas recorrentes em LLA-B, como *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* (p190 e p210), *MLL-AF4* e *MLL-ENL* (Figura 5.1). Adicionalmente, não foram detectadas deleções em *IKZF1* ou *BTG1* por meio da técnica de MLPA. Contudo, foi verificada a amplificação do gene *IKZF1*.

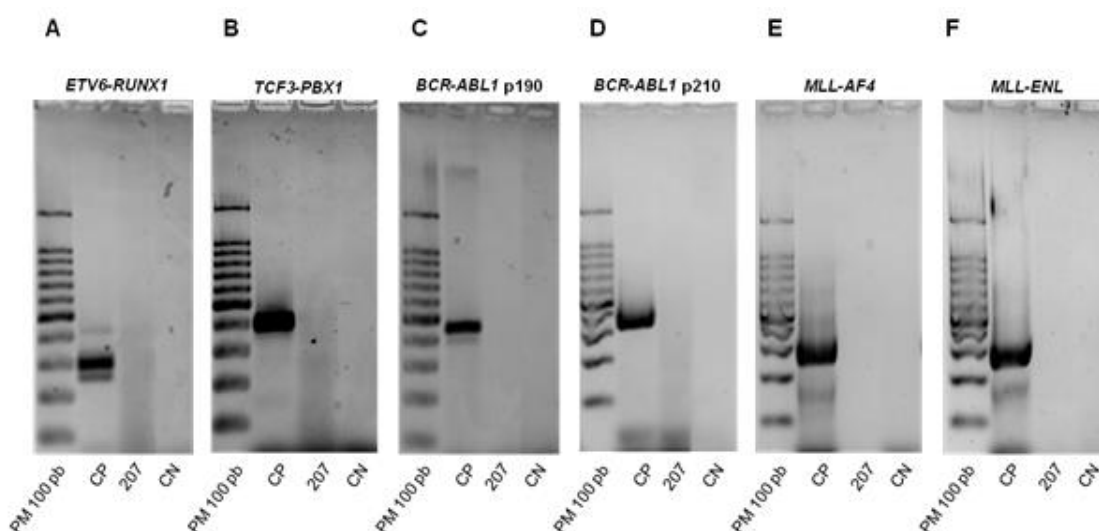


Fig 5.1. RT-PCR das principais alterações citogenético-moleculares encontradas em LLA-B foram realizadas na linhagem celular 207. (A) *ETV6-RUNX1*, (B) *TCF3-PBX1*, (C) *BCR-ABL1* p190, (D) *BCR-ABL1* p210, (E) *MLL-AF4* e (F) *MLL-ENL*. A linhagem celular 207 foi negativa para todas as alterações avaliadas. Em todas as avaliações foram utilizadas amostras sabidamente positivas para as alterações avaliadas, as quais foram nossos controles positivos (CP), bem como adicionamos um controle negativo (CN) contendo o mix de reação sem a adição do cDNA da linhagem 207.

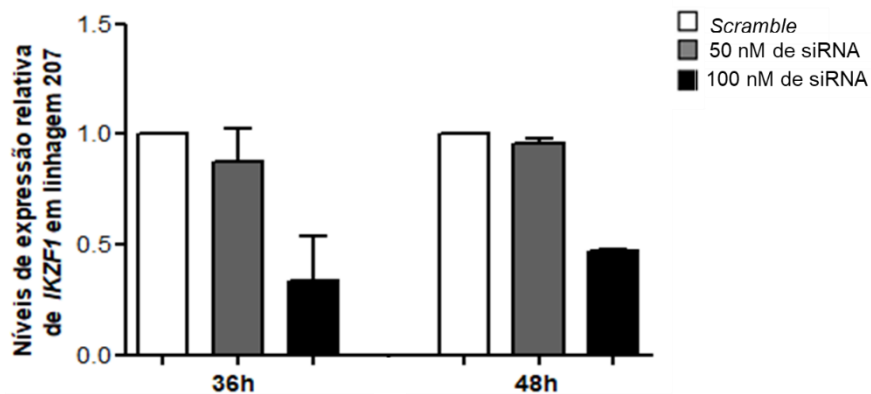
5.1.2 Os níveis de expressão de *BTG1* e *IKZF1* encontram-se diminuídos após a inibição simples e dupla com siRNA na linhagem linfoblastoide de 207

Após o estabelecimento do nosso modelo celular mimetizando deleções

isoladas ou concomitantes de *BTG1* e *IKZF1* por meio de siRNA, foi realizada a análise dos níveis de expressão de ambos os genes. Ao final da padronização, verificamos que o tempo de 36h e 100 nM consistiu na condição ótima para a realização da transfecção e resultou em uma eficiência de 70% para a inibição simples de *IKZF1* (Figura 5.2 A), 92% na inibição de *BTG1* (Figura 5.2 B), bem como 67% e 87% durante a dupla inibição de *IKZF1* e *BTG1* (Figura 5.2 C), respectivamente. Após estabelecer o melhor tempo e concentração para a inibição desses genes, foi realizada a dupla inibição dos mesmos na condição de 72h, a fim de garantir que haveria inibição mesmo durante o tratamento com dexametasona. Neste caso, *IKZF1* foi inibido em 60% e *BTG1* em 65% (Figura 5.2 D).

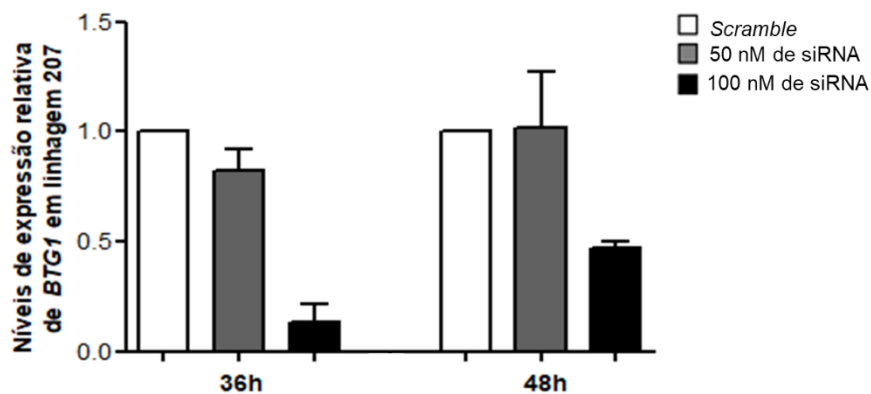
A

Silenciamento duplo



B

Silenciamento duplo



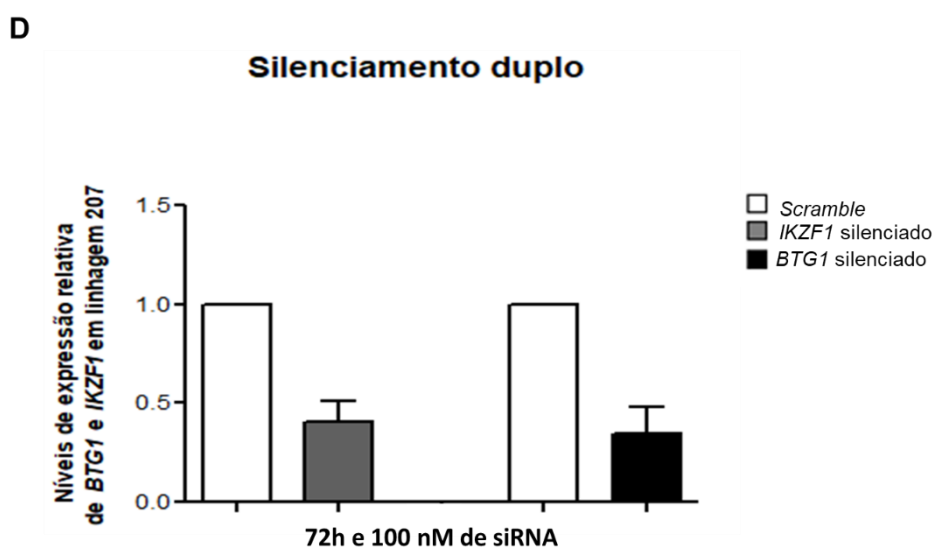
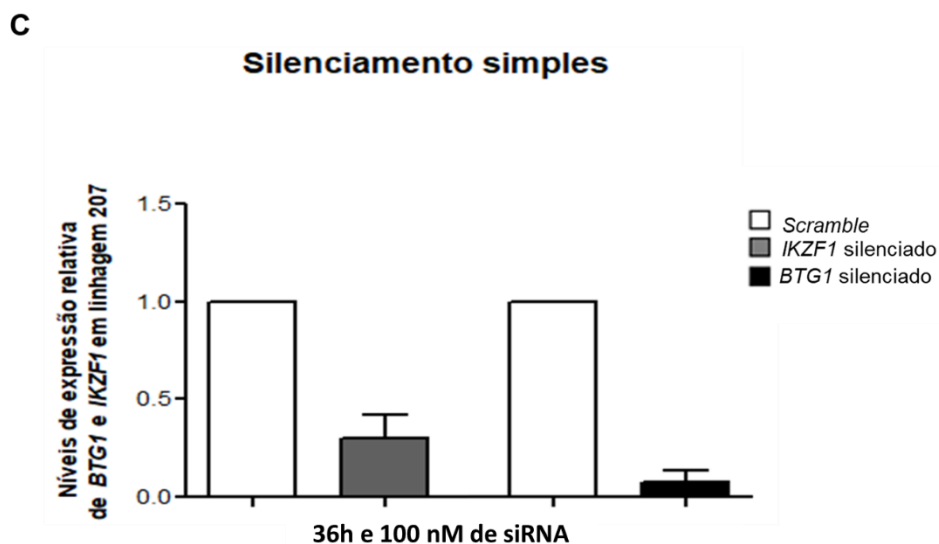
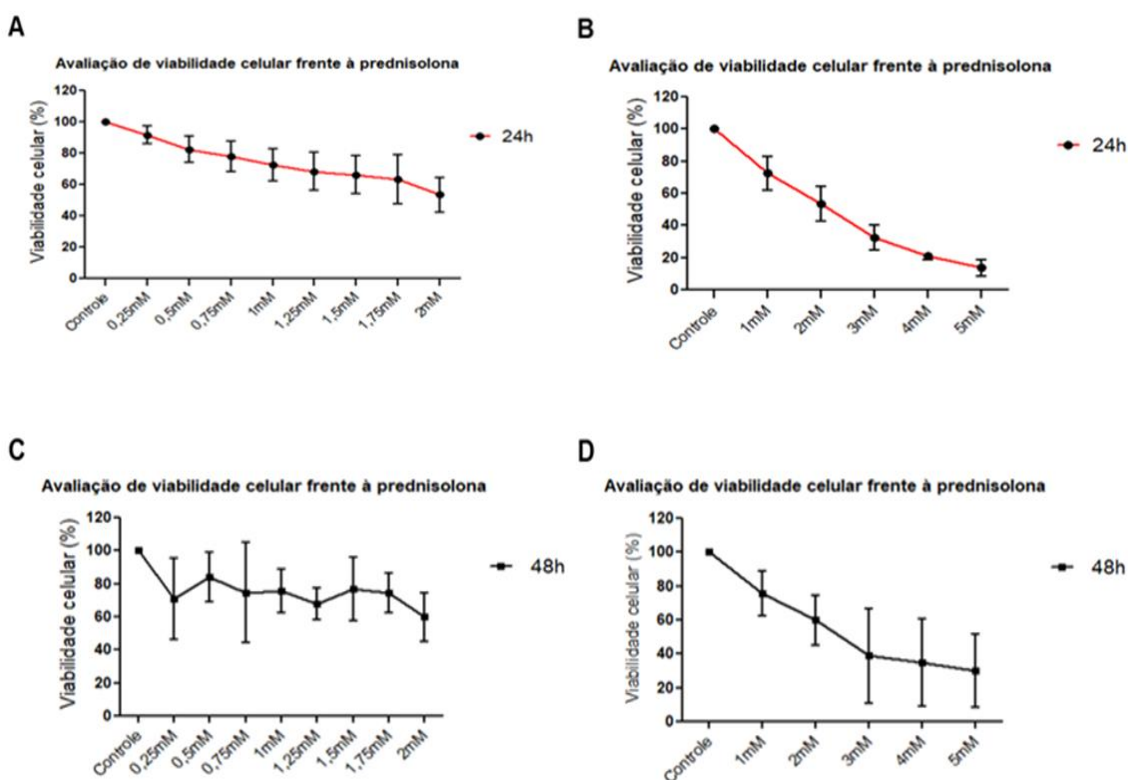


Fig 5.2. Padronização da inibição de *BTG1* e *IKZF1* e definição do tempo e concentração ótimas para avaliação do ensaio. As concentrações de 50 nM e 100 nM foram utilizadas para observar a eficiência da dupla inibição dos genes *IKZF1* (A) e *BTG1* (B) nos tempos de 36h e 48h . Posteriormente, visto a maior eficiência do ensaio no tempo de 36h e concentração de 100 nM para ambos os genes, foi feita a inibição isolada de cada um(C). Por fim, foi feita a dupla transfecção no tempo de 72h (D), de modo a garantir que haveria inibição durante o tratamento farmacológico. A expressão transcricional de ambos os genes foi avaliada por meio de RT-qPCR, onde a β -actina foi utilizada como gene de referência da reação. Utilizamos o método de quantificação de $\Delta\Delta CT$ para o cálculo da expressão relativa. As análises estatísticas foram feitas por meio do teste T de Student.

5.2 Avaliação de resposta após inibição dos genes *BTG1* e *IKZF1* e tratamento com glicocorticoides

5.2.1 Determinação de concentrações mínimas de prednisolona e dexametasona a serem utilizadas para avaliação de viabilidade celular em linhagem 207

Foi evidenciada a redução de ao menos 50% da viabilidade após a concentração de 3 mM de prednisolona para os três tempos avaliados. Entretanto, a viabilidade celular variou significativamente entre os três experimentos independentes, de modo que foram verificadas flutuações na viabilidade quando comparadas concentrações menores que 3 mM. A necessidade de utilização de alta concentração do fármaco, bem como a presença de desvios padrão elevados indicou uma possível instabilidade do fármaco utilizado no experimento. Diante desse cenário, e baseado no fato de não ser um fármaco de escolha no tratamento de recaídas, optamos pela exclusão do mesmo para avaliações posteriores no estudo (Figura. 5.3.).



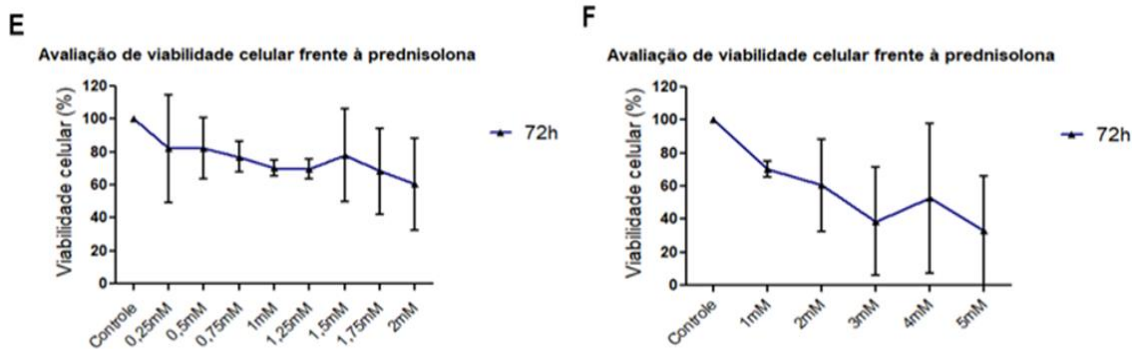
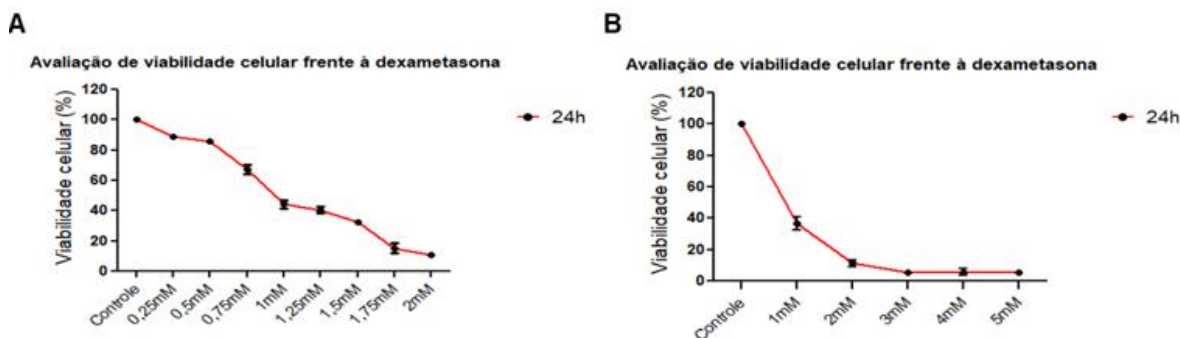


Fig 5.3. Determinação de concentração mínima de Prednisolona a ser utilizada para avaliação de viabilidade celular em linhagem 207. Concentrações crescentes de Prednisolona foram utilizadas para avaliar a viabilidade celular e determinar aquela que promove a inibição do crescimento celular em ao menos 50%. Essa avaliação foi realizada para concentrações variando 1 mM em uma faixa abrangendo de 0,25-2 mM bem como de 1-5mM nos tempos de 24h (A) e (B), 48h (C) e (D) e 72h (E) e (F), respectivamente. A fim de mensurar o efeito do fármaco, também foi utilizado um controle de reação, o qual não foi submetido ao tratamento. A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico de MTT, onde as placas foram lidas na faixa de 538 nm em espectrofotômetro. Todos os ensaios foram feitos utilizando triplicatas experimentais.

No caso da dexametasona, a concentração de 1 mM resultou na redução em ao menos 50% da viabilidade das células da linhagem 207. Contudo, assim como visto para o primeiro fármaco, o tempo de 24h foi o mais indicado para ser utilizado nas etapas posteriores do estudo. Essa escolha foi feita uma vez que em 24h se alcançou uma viabilidade ligeiramente menor que os tempos de 48h e 72h e houve reprodutibilidade entre as replicatas experimentais (Figura 5.4.).



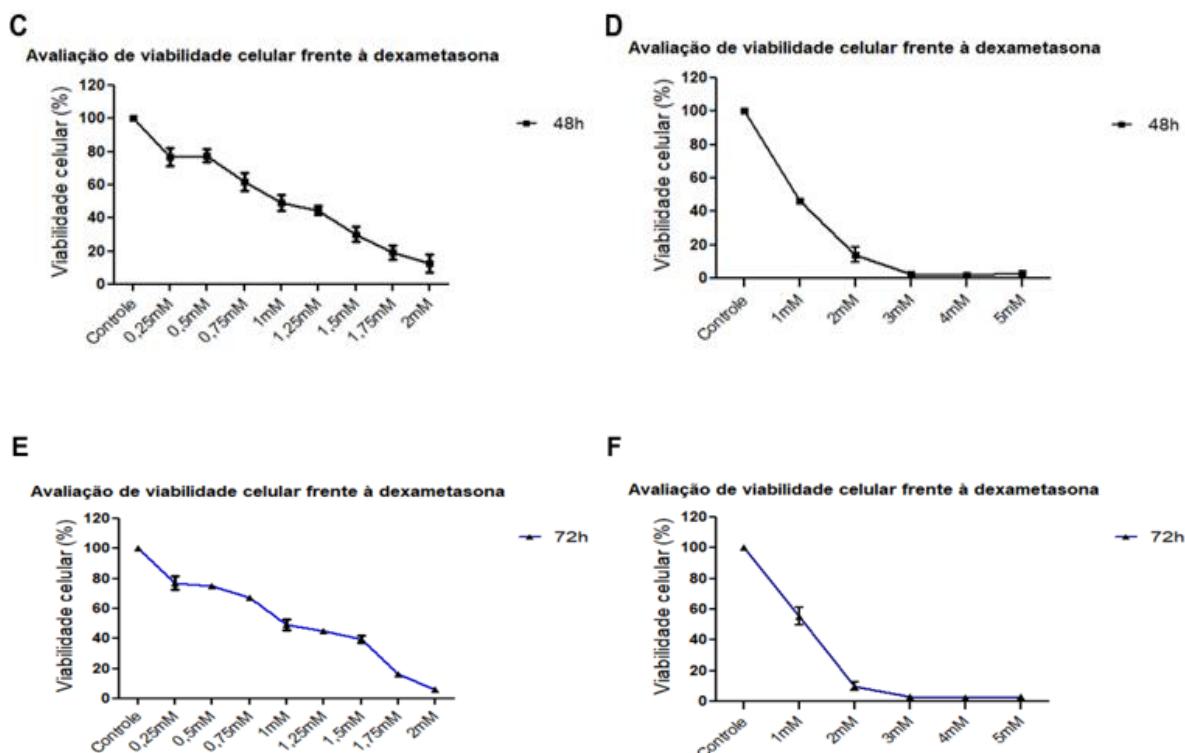


Fig 5.4. Determinação de concentração mínima de Dexametasona a ser utilizada para avaliação de viabilidade celular em linhagem 207. Concentrações variando de 0,25-2 mM e 1-5mM de Dexametasona foram utilizadas durante 24h (A) e (B), 48h (C) e (D) e 72h (E) e (F) de modo a identificar a concentração que reduz a viabilidade celular em ao menos 50%. Células 207 não tratadas foram utilizadas como controle negativo da reação. A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico de MTT, onde as placas foram lidas na faixa de 538 nm em espectrofotômetro. Todos os ensaios utilizaram triplicatas experimentais.

5.2.2 Determinação dos efeitos da inibição de *BTG1* e *IKZF1* em linhagem celular 207 após tratamento com dexametasona

Por meio do ensaio de MTT foi avaliados o efeito da inibição desses genes sobre a viabilidade celular. Como observado na figura 5.5, o tratamento farmacológico com dexametasona leva à redução da viabilidade celular independente do status de *BTG1*. No entanto, o controle com siRNA *scramble* apresentou uma diminuição da viabilidade celular (35%) mais pronunciada quando comparada a inibição isolada de *BTG1* (19%).

Viabilidade celular pós silenciamento de *BTG1* e tratamento com dexametasona

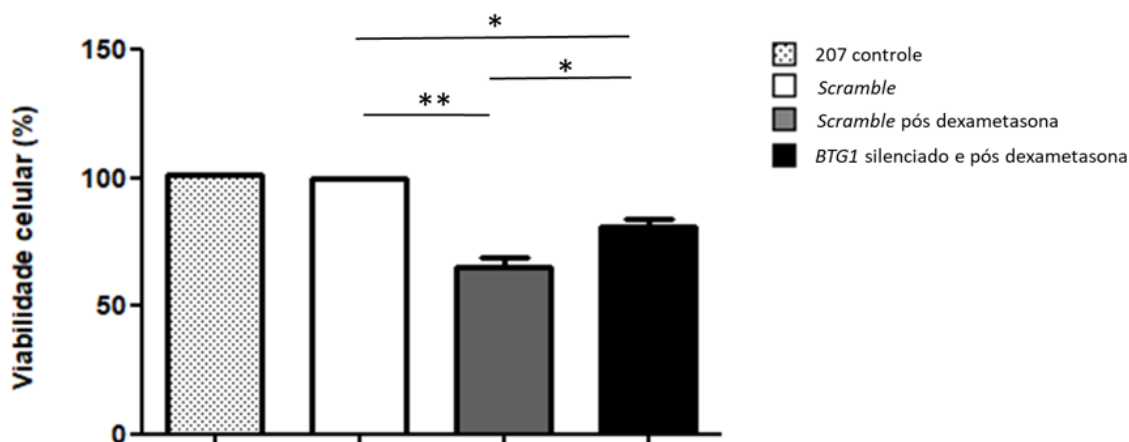
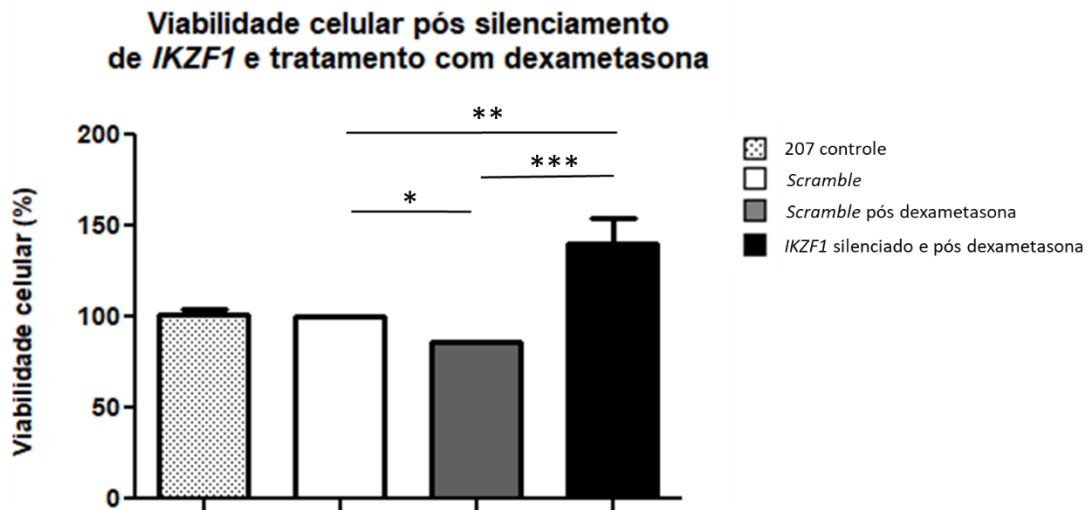


Fig 5.5. Avaliação de viabilidade celular em modelo de linhagem 207 após inibição do gene *BTG1* e tratamento com dexametasona. Células da linhagem 207 foram submetidas a inibição gênica de *BTG1* e após o tempo de 36h foram tratadas com 1 mM de dexametasona durante o período de 24h. Células não transfectadas (barra pontilhada) foram utilizadas como controle da reação da eletroporação para a viabilidade celular. Adicionalmente, foram utilizados outros dois controles: células transfectadas com scramble e não submetidas ao tratamento farmacológico (barra branca) e células transfectadas com o oligonucleotídeo scramble e que foram submetidas ao tratamento farmacológico (barra cinza). Por fim, as células 207 inibidas para o gene *BTG1* foram tratadas com o fármaco (barra preta). A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico de MTT, onde as placas foram lidas na faixa de 538 nm em espectrofotômetro. Todos os ensaios utilizaram triplicatas experimentais.

Em seguida, realizamos os experimentos incluindo a inibição simples de *IKZF1* (Figura 5.6A) e a inibição concomitante de *BTG1* e *IKZF1* (Figura 5.6B). Novamente, o tratamento com dexametasona promoveu a redução da viabilidade celular do grupo com o scramble (15% e 27%, respectivamente). Por outro lado, tanto a inibição isolada de *IKZF1*, quanto a dupla inibição gênica levou ao aumento das células em relação ao *scramble*, seja esse com (63% e 84%, respectivamente). ou sem tratamento significativo (40% e 35%, respectivamente).

A



B

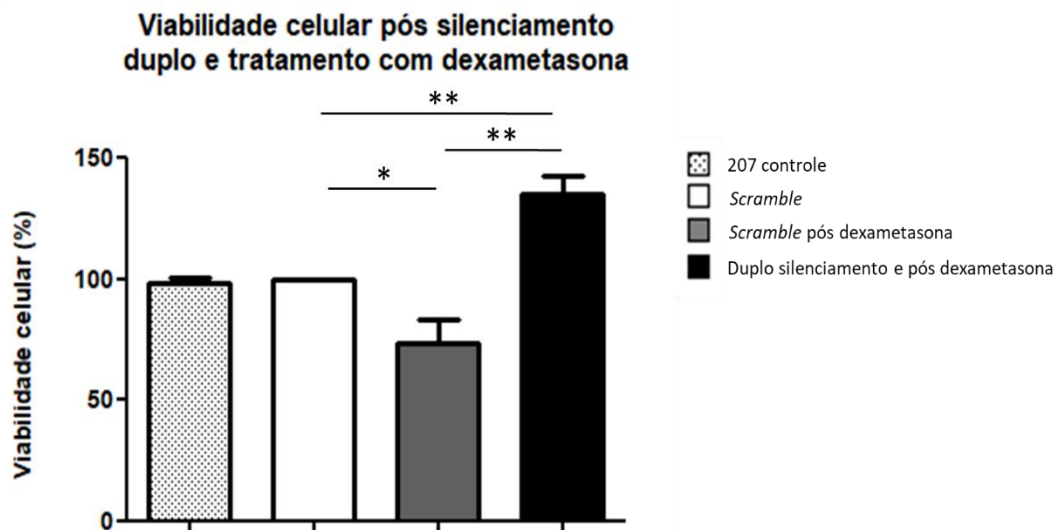


Fig 5.6. Avaliação de viabilidade celular em modelo de linhagem 207 após a inibição simples do gene *IKZF1* e a dupla inibição com posterior tratamento com dexametasona. Células da linhagem 207 foram submetidas a inibição gênica de *IKZF1* (A) e dupla inibição (B) e após o tempo de 36h foram tratadas com 1mM de dexametasona durante o período de 24h. Células não transfectadas (barra pontilhada) foram utilizadas como controle da reação da eletroporação para a viabilidade celular. Adicionalmente, foram utilizados outros dois controles: células transfectadas com scramble e não submetidas ao tratamento farmacológico (barras brancas) e células transfectadas com o oligonucleotídeo scramble e que foram submetidas ao tratamento farmacológico (barras cinzas). Por fim, as células 207 transfectadas foram tratadas com o fármaco (barras pretas).

Por fim, realizamos a comparação da viabilidade celular após o tratamento com dexametasona entre todos os grupos inibidos e o *scramble*. Verificamos diferenças estatísticas ao comparar os diferentes tipos de inibição. Como resultado, observamos que a inibição de *BTG1* representa um aumento de 25% de viabilidade em comparação ao *scramble*. A inibição de *IKZF1* resulta em 24% de aumento de viabilidade celular em comparação a inibição de *BTG1*, enquanto que a dupla inibição resulta em aumento de 50% da viabilidade em relação a este último (Figura 5.7). Portanto, a inibição conjunta de *BTG1* e *IKZF1* levou a um aumento de 86% da viabilidade celular em relação ao controle.

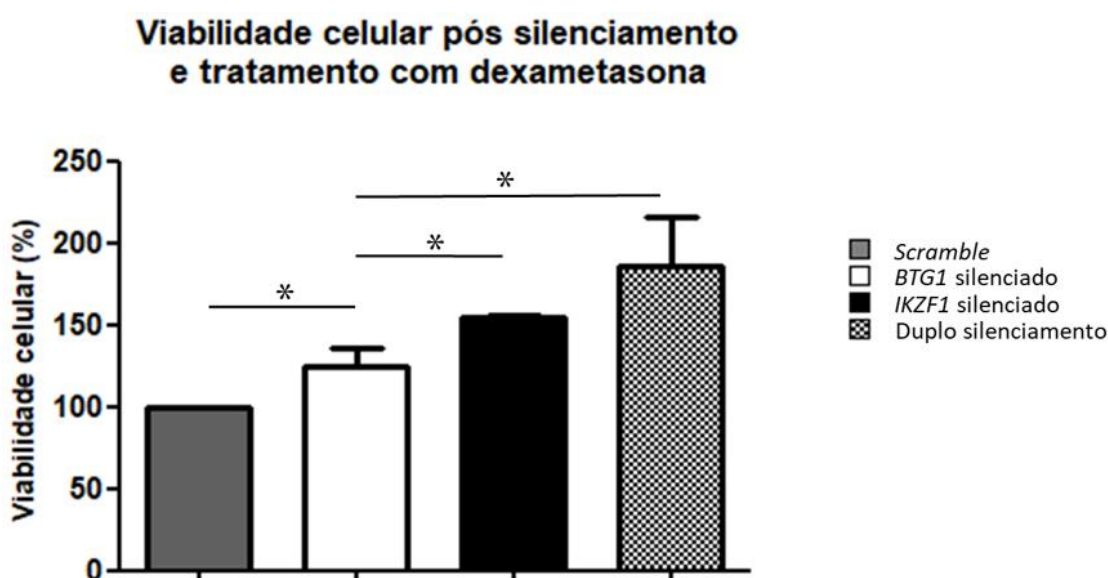


Fig 5.7. Comparação da viabilidade celular entre *scramble* e os grupos que sofreram inibição gênica após tratamento com dexametasona. As células da linhagem 207 foram submetidas à inibição gênica seguida de tratamento com 1mM de dexametasona. Para a comparação entre os grupos, utilizamos o *scramble* (barra cinza) como normalizador e foram feitas as comparações entre células após a inibição de *BTG1* (barra branca), *IKZF1* inibido (barra preta) e dupla inibição (barra pontilhada). Valores menores que $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

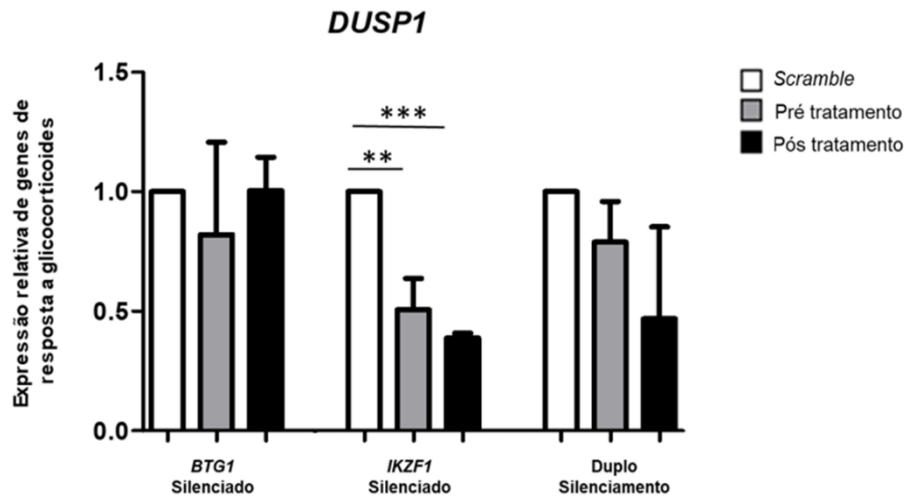
5.3 Avaliação de resposta à inibição dos genes *BTG1* e *IKZF1* após tratamento com glicocorticoides

5.3.1 Expressão gênica de alvos da via de resposta a glicocorticoides mediante inibição simples ou dupla dos genes *BTG1* e *IKZF1* e tratamento com dexametasona

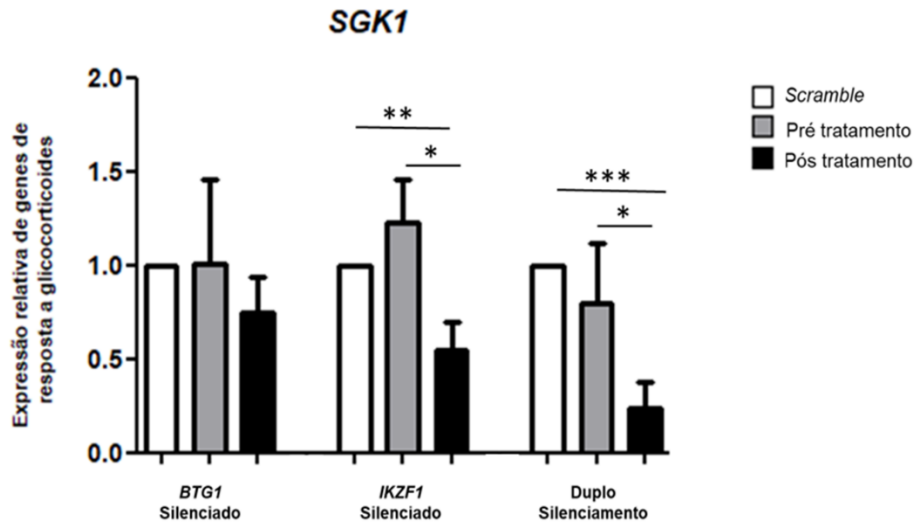
Realizamos a inibição dos genes *BTG1* e *IKZF1* a fim de observar o seu impacto sobre a expressão de genes envolvidos a via de resposta aos glicocorticoides. Quando comparamos as expressões gênicas pré e pós tratamento, observamos que o gene *DUSP1* não apresentou variação em sua expressão em nenhuma condição de inibição. Contudo, houve redução em sua expressão quando se realizou comparações entre o *scramble* e as condições pré e pós tratamento farmacológico (2 e 2,6 vezes, respectivamente) de células submetidas à inibição simples do gene *IKZF1* (Figura 5.8A). Diferentemente, foram observadas variações na expressão de *SGK1*, *FBXW7*, bem como para o receptor *NR3C1* entre os momentos anterior e posterior ao tratamento com dexametasona. Células com inibição simples para *IKZF1* ou duplamente inibidas apresentaram níveis de expressão reduzido para *SGK1* (2,3 e 3,3 vezes, respectivamente), bem como para o gene *NR3C1* (1,6 e 2,6 vezes, respectivamente). Tais resultados também foram encontrados em avaliações entre o *scramble* e células após tratamento com dexametasona (Figura 5.8B e D).

Por outro lado, enquanto *FBXW7* encontra-se diferencialmente expresso nos grupos pré e pós tratamento com dexametasona em células inibidas unicamente para *IKZF1*, apresentando redução de cerca de 2,4 vezes, a redução de sua expressão não foi significativa em células que sofreram inibição concomitante de *BTG1* (Figura 5.8C). Nesse último caso, foram observadas diferenças estatísticas apenas na comparação entre o *scramble* e os grupos de células coletadas anterior ou posteriormente (1,5 e 2,4 vezes, respectivamente) à adição de dexametasona. Finalmente, células que sofreram inibição de *BTG1* não tiveram níveis de expressão diferencial estatisticamente significativos para nenhum dos genes alvo avaliados.

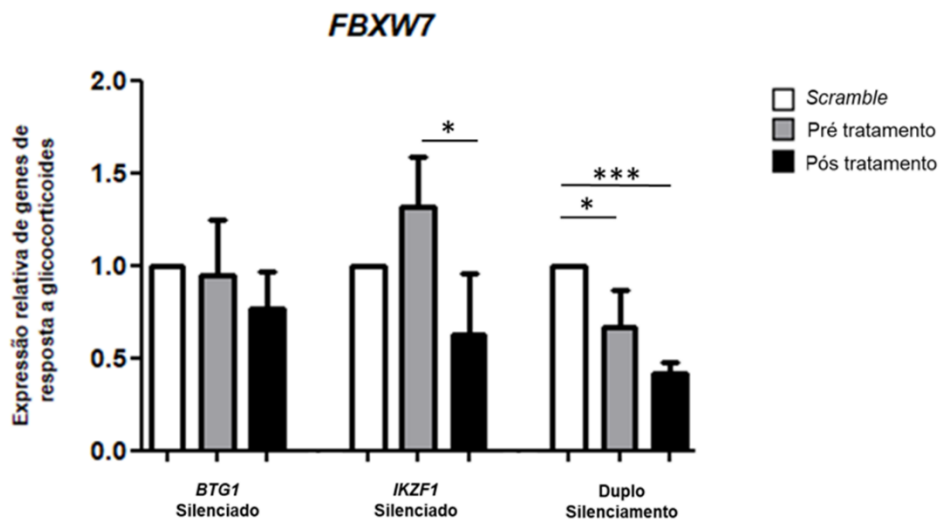
A



B



C



D

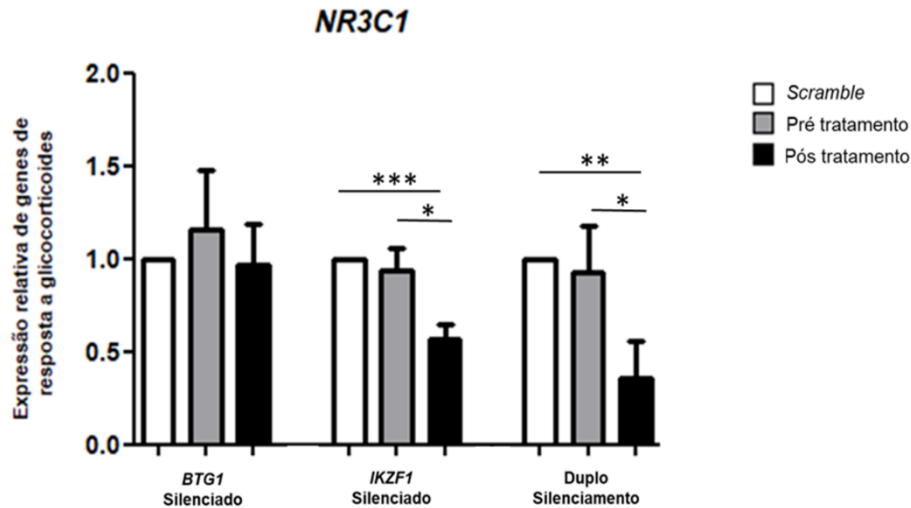


Fig 5.8. Avaliação antes e depois da expressão gênica de alvos envolvidos no processo de resposta a via de glicocorticoides mediante inibição simples ou dupla dos genes *BTG1* e *IKZF1* e tratamento com dexametasona. Células da linhagem 207 foram submetidas a inibição simples e dupla dos genes *BTG1* e *IKZF1*. Nas barras brancas, temos células transfectadas com o oligonucleotídeo scramble, em cinza estão evidenciadas as células que sofreram inibição gênica, porém não passaram por tratamento farmacológico; e nas barras pretas estão as células que foram submetidas a tratamento com 1mM de dexametasona. A avaliação dos genes *DUSP1* (A), *SGK1* (B), *FBXW7* (C) e *NR3C1* (D) foi feita para todos os grupos submetidos ao siRNA. A expressão transcricional dos genes alvo, bem como dos inibidos, foi avaliada a partir da técnica de RT-qPCR e a β -actina foi o gene de referência das reações. O cálculo de expressão relativa quantitativa foi feito através do método de quantificação de $\Delta\Delta CT$. As análises estatísticas foram feitas por meio do teste *T Student's* realizados no software GraphPad Prism 5 e foram considerados significantes valores de $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Considerando uma sequência histórica da evolução nos protocolos de tratamento de LLA-B desde os anos 40 até a última década, foi possível observar o aumento gradativo na sobrevida dos pacientes (HUNGER; MULLIGHAN, 2015). Tais resultados foram decorrentes da criação de inúmeros estudos multicêntricos que realizaram a implementação de novos esquemas terapêuticos, os quais buscaram adaptações em termos da escolha dos fármacos em cada bloco do tratamento, além da dose e tempo de uso dos mesmos. Apesar da constante elaboração de novos esquemas terapêuticos, os medicamentos presentes no tratamento de LLA, em sua maioria, já são usados há mais de cinquenta anos na prática médica (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013). Dentre esses fármacos, podemos citar a classe dos glicocorticoides sintéticos, os quais são agentes indutores de apoptose e vêm sendo amplamente utilizados na etapa de indução de remissão da doença. Justamente em virtude de sua importância nos protocolos vigentes, a resistência a esses fármacos tem sido considerada como um fator crucial na determinação de resposta terapêutica (CHOUGULE et al., 2019).

Adicionalmente, estes estudos se utilizaram dos avanços decorrentes da medicina de precisão e resultaram em novas formas de estratificar o risco de cada paciente diagnosticado com a doença (PUI et al., 2018). Contudo, apesar do progresso na taxa de cura obtida entre os pacientes com LLA-B, ainda é necessário compreender os fatores atrelados a falhas no tratamento. A fim de obter resposta para essa problemática, vários estudos são desenvolvidos globalmente visando encontrar possíveis biomarcadores que estejam correlacionados com o risco de recorrência da doença (MOORMAN, 2016). Dentre estes biomarcadores, pode-se elencar os genes *BTG1* e *IKZF1*, os quais podem apresentar-se deletados em pacientes com LLA-B (KUIPER et al., 2010).

Nesse contexto, Galen e colaboradores mostraram que o silenciamento gênico de *BTG1* resultou no aumento da resistência em células tratadas tanto com prednisolona, quanto com dexametasona, e essa resistência seria resultante da diminuição na expressão e autoindução do receptor NR3C1 de

linhagens celulares de LLA-B (GALEN et al., 2010). Adicionalmente, um estudo que utilizou informações de 498 casos de linfoma difuso de grandes células B do banco de dados do *Gene Expression Omnibus* (GEO), bem como um segundo trabalho realizado em pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático, mostraram que menores níveis de expressão de *BTG1* estariam relacionados a uma pior SLE e SG desses pacientes, indicando que este poderia ser um fator prognóstico independente (HUANG et al., 2018; YAN et al., 2019). Entretanto, contrariando as evidências anteriores, estudos realizados com coortes de pacientes com LLA-B demonstraram que, isoladamente, as deleções no gene *BTG1* não impactam o prognóstico da doença. O primeiro estudo foi realizado com 116 pacientes com LLA e síndrome de Down e um estudo posterior foi realizado com 533 pacientes (BUITENKAMP et al., 2013; SCHEIJEN et al., 2017).

Por outro lado, já é bem descrito que a presença de deleções em *IKZF1* consiste em um fator independente na predição de um pior prognóstico em pacientes com LLA (MULLIGHAN et al., 2009), sendo observado que a associação do status de *IKZF1* com dados de doença residual mínima (DRM) predizem até 79% dos casos de recaída da doença (WAANDERS et al., 2011; DÖRGE et al., 2013; BOER et al., 2016). Adicionalmente, o estudo de Scheijen e colaboradores avaliou uma coorte de 533 pacientes e observou que deleções no *BTG1* são mais frequentes em pacientes que também apresentam deleções no gene *IKZF1*. Finalmente, o estudo mostrou que indivíduos com deleções concomitantes no *IKZF1* e *BTG1* possuem uma resposta ainda pior, demonstrando que essas deleções poderiam atuar sinergicamente e resultar em um pior prognóstico para os pacientes.

Tendo em vista esses achados, buscamos compreender nesse projeto se deleções nesses genes teriam impacto no processo de resposta a glicocorticoides na LLA. A fim de responder essa questão, a primeira etapa deste trabalho consistiu na criação de um modelo *in vitro* que pudesse mimetizar tais deleções de forma concomitante, bem como de forma isolada para cada um dos genes, uma vez que não haviam linhagens disponíveis com esse perfil molecular. Para isso, utilizamos siRNA para realizar a inibição de *BTG1* e/ou *IKZF1* na linhagem celular 207, a qual não possui as principais alterações

primárias presentes em LLA-B. Tal característica foi fundamental para a redução de potenciais vieses na resposta farmacológica, bem como para o estabelecimento de uma condição que mimetize a realidade. Apesar de termos observado amplificação do gene *IKZF1* na linhagem 207 por meio da técnica de MLPA, ampliações em *IKZF1* não são descritas como um fator que impacta o prognóstico dos pacientes e, portanto, não são avaliadas separadamente em estudos de SLE e SG de pacientes com LLA-B (BOER et al., 2016; SCHEIJEN et al., 2017; STEEGHS et al., 2019).

Após a caracterização da célula de linhagem 207, utilizamos siRNAs para o estabelecimento do modelo experimental de dupla inibição de *BTG1* e *IKZF1*, bem como os que apresentavam essa inibição separadamente. Foi observado que, no tempo de 36h com a concentração de 100 nM, os siRNAs tinham funcionamento ótimo, levando à redução nos níveis de transcrito de *BTG1* em 87% e 92% e de *IKZF1* em 67% e 70%, quando avaliadas a inibição dupla e simples destes genes, respectivamente. Em virtude da atividade transiente dos siRNAs (RAO et al., 2009), buscamos garantir que tivéssemos taxas de inibição em um tempo superior à 36h para a realização da próxima etapa do trabalho, quando foi feito o tratamento do nosso modelo celular com glicocorticoides. Deste modo, avaliamos a inibição dupla no tempo de 72h e obtivemos níveis de 65% de eficiência para *BTG1* e 60% para *IKZF1*. Em conjunto, esses dados permitiram o prosseguimento do trabalho, uma vez que foi possível estimar computacionalmente que a meia vida das proteínas codificadas por esses genes é de cerca de 30h.

De posse de nosso modelo experimental, a continuidade do presente trabalho se deu a partir da definição da concentração ideal de glicocorticoides para a avaliação da viabilidade em meio aos diferentes *status* dos genes *BTG1* e *IKZF1*. Os ensaios mostraram que é necessário uma menor concentração de dexametasona para obtermos uma queda de ao menos 50% da viabilidade celular, quando comparado com a prednisolona. Este dado está de acordo com a diferença de potência entre estes fármacos, onde estudos *in vitro* demonstraram que a dexametasona consiste em um glicocorticoide com atividade antileucêmica cerca de 16x mais potente que a prednisolona (KASPERS et al., 1996). Em adição a este dado, foi observado que a

prednisolona apresentava maior variação entre as replicatas experimentais quando comparada com a dexametasona e dificultando o estabelecimento de uma concentração ideal para os ensaios.

A farmacocinética da dexametasona propicia uma maior taxa de infiltração e estabilidade em SNC, sendo seu uso associado à menor incidência de casos de leucemia meningeal (BALIS et al., 1987; JONES et al., 1991). De modo similar, um ensaio clínico randomizado com 1.621 pacientes recém diagnosticados com LLA, verificou que o uso desse glicocorticoide resultou em maior SLE e menor taxa de recaídas, particularmente, as que acometem o SNC (MITCHELL et al., 2005). Em virtude de sua indicação clínica para casos de alto risco, grupo de enfoque deste trabalho, acreditamos que conhecer a resposta mediante o uso de dexametasona consiste em uma informação importante no contexto da LLA-B.

A criação do nosso modelo experimental e o estabelecimento de uma concentração ideal de dexametasona para o tratamento de células 207 permitiu a avaliação do papel de *BTG1* e/ou *IKZF1* na resposta ao tratamento com o fármaco. Foi verificado seu impacto na viabilidade celular, assim como na expressão de genes de resposta a glicocorticoides. É importante ressaltar que em todos os cenários de inibição, não foram verificadas diferenças entre as células 207 que foram transfectadas ou não transfectadas com o *scramble*. Esse resultado indica que alterações na viabilidade são resultado do inibição gênica, mas não de processos estressores derivados da eletroporação das células avaliadas. Nesse cenário, foi observado que células que sofreram inibição de *BTG1* e foram tratadas com 1 mM de dexametasona apresentaram viabilidade celular 23% maior do que quando comparadas com células transfectadas com o siRNA *scramble*. Entretanto, essa viabilidade foi inferior à dos controles sem tratamento farmacológico. Quando avaliados os estados pré e pós tratamento, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de expressão de nenhum dos genes alvo avaliados no estudo (*DUSP1*, *SGK1*, *FBXW7* e *NR3C1*) que estão envolvidos na via de resposta de glicocorticoides.

Em um estudo holandês, no qual foi realizado o tratamento de células da linhagem RS4;11 com prednisolona e dexametasona após silenciamento de

BTG1 com shRNA, observou-se um aumento da viabilidade celular e uma redução nos níveis de expressão de *SGK1*, *FBXW7* e *NR3C1* (GALEN et al., 2010). Apesar de nossos achados estarem de acordo com os resultados relativos ao aumento da viabilidade celular perante inibição de *BTG1*, eles não acompanharam reduções na atividade de genes de resposta a glicocorticoides.

Esse achado pode ser explicado em virtude de possíveis mecanismos compensatórios existentes a partir da atividade de *BTG2*, proteína codificada por um gene da mesma família de agentes antiproliferativos e que exerce diversas funções biológicas similares, bem como, por meio da diferença entre as linhagens escolhidas em ambos os trabalhos. A proteína *BTG2* possui estrutura similar a *BTG1*, tendo, por exemplo, o domínio de ligação para *PRMT1*, o qual é exclusivo desses dois membros da família *BTG/TOB* (HATA; NISHIJIMA; MIZUGUCHI, 2007; YUNIATI et al., 2019). Foi visto que, na linhagem celular de LLA pré-B SUP-B15, que apresenta perda de número de cópias em *BTG1*, há maiores níveis proteicos de *BTG2* e que estes níveis são ainda mais elevados após tratamento com prednisolona (GALEN et al., 2010). Desta forma, podemos hipotetizar que um eventual aumento na expressão de *BTG2* poderia levar a um efeito de compensação na célula, onde, ao se ligar com *PRMT1*, resultaria na manutenção da resposta aos glicocorticoides devido ao estímulo da autoindução de *NR3C1* na membrana citoplasmática. Em conjunto, sabe-se que, apesar de sua atuação ser semelhante a *BTG1*, há diferenças em mecanismos desencadeados por *BTG2*. Um deles se refere ao fato de que, apesar dos dois serem genes induzidos pela resposta a danos no DNA, a resposta de *BTG2* é dependente de *p53* (CORTES et al., 2000). Entretanto, a linhagem celular 207 possui uma mutação no *TP53* (FINDLEY et al., 1997), o que poderia então resultar na incapacidade de *BTG2* atuar como agente antiproliferativo, de modo a não ser possível ver seu impacto sobre a viabilidade celular.

Já é de conhecimento em estudos clínicos e *in vitro* que *IKZF1* constitui um importante biomarcador na LLA-B, sendo suas deleções associadas a uma pior evolução clínica e preditoras de um maior risco de recaídas nos pacientes (MULLIGHAN et al., 2009; KUIPER et al., 2010). Contudo, nos últimos anos, uma série de estudos vem constatando que o impacto dessas deleções no

prognóstico também é fortemente influenciado pelo contexto celular, onde a presença de alterações secundárias poderiam atuar negativamente de maneira sinérgica a *IKZF1*, resultando em uma evolução clínica acentuadamente pior. Exemplos desse fenômeno podem ser verificados no grupo descrito como *IKZF1^{plus}*, caracterizado pela presença de deleções em *IKZF1* e coocorrência com deleções em *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PAX5* ou na região pseudoautosômica 1 (PAR1), mas na ausência de deleções em *ERG*; assim como na presença concomitante de deleções em *IKZF1* e *BTG1*, que é foco do presente estudo (SCHEIJEN et al., 2017; STANULLA et al., 2018; HAMADEH et al., 2019).

Dentro do contexto de deleções em *IKZF1* separadamente e em concomitância a deleções em *BTG1*, verificamos que perante tratamento com dexametasona os dois modelos apresentaram aumento de, respectivamente, 63% e 84% na viabilidade das células que foram submetidas à inibição. Ao realizarmos a comparação entre os grupos inibidos, foi possível verificar que a viabilidade dos grupos com inibição de *IKZF1* e de ambos os genes é estatisticamente maior que a viabilidade após a inibição de *BTG1* isoladamente, sugerindo que a concomitância dessas deleções poderia estar relacionada a um fenótipo mais resistente à dexametasona. Este resultado corrobora com dados descritos na literatura, onde um estudo realizado em camundongos com haplodeficiência em *IKZF1* mostrou que células isoladas desses animais apresentavam resistência ao tratamento com dexametasona e prednisolona (MARKE et al., 2016). Um estudo do mesmo grupo, avaliou a resposta a glicocorticoides em células isoladas de camundongos que sofreram silenciamento de *BTG1* e foram cruzados com camundongos haplodeficientes para *IKZF1*. Foi demonstrado que células contendo deleções em *BTG1*, exclusivamente, possuem uma sobrevida similar a células selvagens. Entretanto, a haplodeficiência de *IKZF1* resulta em aumento de viabilidade celular, fato que é potencializado em células que sofreram o comprometimento de ambos os genes (SCHEIJEN et al., 2017). Apesar desses resultados concordantes e de termos encontrado uma tendência, nosso grupo ainda busca compreender quais fatores explicariam o fato de não ter sido observado significância estatística no que diz respeito a potencialização da sobrevida em células que sofreram dupla inibição quando comparadas a células com inibição

simples de *IKZF1*.

Além da viabilidade, nossos modelos com inibição isolada de *IKZF1*, ou em conjunto com *BTG1*, também foram centrais para a avaliação dos níveis de expressão dos genes alvo que participam da resposta a glicocorticoides. Assim como o que foi observado para *BTG1*, não houve significância estatística para as diferenças encontradas na expressão de *DUSP1* entre os grupos pré e pós tratamento de dexametasona. Apesar de ser descrito como uma fosfatase expressa em resposta a glicocorticoides e que reprime moléculas pró inflamatórias, a expressão deste gene também pode ser induzida por meio de outras vias, como a interleucina-1 β (IL-1 β). Assim, podemos supor que uma explicação para a ausência de expressão diferencial em *DUSP1* poderia estar correlacionada com a sua expressão mediante a resposta a outras moléculas que não a dexametasona (SHAH et al., 2014).

Contudo, a comparação entre antes e após aplicação da droga teve como resultado a redução dos níveis de transcritos de *FBXW7* em cerca de 2,4 vezes nas células com inibição simples de *IKZF1*. Tal redução não foi estatisticamente significativa nas células que sofreram a dupla inibição. *FBXW7* é conhecidamente um supressor tumoral, responsável pela degradação de oncoproteínas, como c-Myc, bem como pelo endereçamento de NR3C1 para o proteossoma (KOURTIS; STRIKOUDIS; AIFANTIS, 2015; YUMIMOTO; NAKAYAMA, 2020). Foi descrito que este gene apresenta expressão atenuada mediante silenciamento de *BTG1* e *IKZF1* em células RS4;11 tratadas com glicocorticoide (GALEN et al., 2010; MARKE et al., 2016). Um estudo em LLA-T demonstrou que *FBXW7* tem um papel importante na regulação da resposta a esses fármacos, por ser responsável por ubiquitinar e direcionar o receptor NR3C1 para a degradação no proteossoma. Deste modo, foi visto que mutações que resultam na perda de função de *FBXW7* estariam associadas a uma melhor resposta aos glicocorticoides (MALYUKOVA et al., 2013). Visto a participação de *FBXW7* na degradação de inúmeras proteínas relacionadas a proliferação celular, é necessário se estabelecer outros modelos experimentais a fim de verificar se deleções em *BTG1* e *IKZF1* resultam em mecanismos que levam a uma menor transcrição desse gene na LLA-B, bem como investigar quais outros mecanismos poderiam estar correlacionados com a regulação de

sua expressão.

O gene *SGK1* encontra-se 2,6 e 3 vezes menos expresso após o tratamento com dexametasona entre os grupos com inibição simples de *IKZF1* e dupla inibição. Adicionalmente, foi observada uma redução de 1,7 e 2,5 vezes na expressão de *NR3C1* quando os mesmos grupos foram avaliados. De modo importante, ambos os genes participam da resposta a glicocorticoides. O *NR3C1* atua tanto como receptor presente no citosol quanto como fator de transcrição, se ligando a elementos responsivos aos glicocorticoides, tais como os presentes em *SGK1*, o qual está relacionado a processos vinculados ao estresse celular (PHUC LE et al., 2005; LANG et al., 2019). Nossos resultados estão de acordo com alguns estudos relacionados não apenas a avaliação de resposta de células leucêmicas aos glicocorticoides, mas também corroboram com dados de dois estudos envolvendo o metabolismo e a participação de reguladores masters da linfopoiese, tais como *PAX5* e *IKZF1* (CHAN et al., 2017; CHAN; MÜSCHEN, 2017). Em 2007, um estudo utilizou o método de microarranjo para identificar genes diferencialmente expressos em células leucêmicas de 13 pacientes que foram ou não tratados com prednisolona. Ao final, o estudo mostrou que *SGK1* estava superexpresso no grupo tratado com prednisolona, sendo um gene responsivo aos glicocorticoides (TISSING et al., 2007). Trabalhos que envolvem a inibição gênica de *BTG1* ou *IKZF1* mostraram, isoladamente, que a perda de expressão nesses genes resulta em menor expressão de *SGK1*. Por outro lado, a restauração nos níveis de expressão desses genes resulta no restabelecimento da resposta à dexametasona e prednisolona (GALEN et al., 2010; MARKE et al., 2016).

A redução na expressão de *SGK1* poderia ser explicada a partir dos mecanismos envolvidos no metabolismo celular e que contariam com a participação dos fatores de transcrição *PAX5* e *IKZF1*. Isso se deve ao fato desses fatores de transcrição estarem relacionados ao destino das células hematopoiéticas para uma diferenciação linfóide B, dependente de um status de privação de energia para a célula, e nesse contexto, *NR3C1* atuaria como efetor da restrição a glicose e suprimento de energia. De forma bastante elegante, Chan e colaboradores demonstraram que a perda desses fatores de transcrição poderia modular a atividade de AKT, uma quinase que promove a

fosforilação de NR3C1 e impede, deste modo, a sua translocação para o núcleo celular após sua ligação a glicocorticoides. De modo oposto, o restabelecimento desses fatores de transcrição na célula resulta na inibição da fosforilação de AKT e permite que, em meio a presença de glicocorticoides, o receptor se transloque para o núcleo e atue sobre genes de resposta ao fármaco, tal como o *SGK1* (CHAN et al., 2017; CHAN; MÜSCHEN, 2017). Neste contexto, supomos que a inibição de *IKZF1* leve ao aumento da fosforilação de AKT e, conseqüentemente, à menor expressão de *NR3C1* e seus alvos.

A redução de expressão de *NR3C1* mediante alterações em *IKZF1* também foi recentemente observada em um estudo que utilizou engenharia de CRISPR/Cas9 a fim de avaliar o impacto da supressão de *IKZF1* na expressão gênica, ciclo celular e sensibilidade a uma variedade de fármacos (dexametasona, vincristina, asparaginase e daunorubicina) usados no tratamento de LLA-B. Como consequência, a perda de atividade de *IKZF1* resultou em aumento proeminente da resistência a dexametasona, a qual foi parcialmente reduzida quando se induziu, por meio de agentes lentivirais, a expressão da isoforma IK1 do gene. Adicionalmente, a depleção de *IKZF1* acompanhou a menor expressão do gene *NR3C1* e, conseqüentemente, de alguns de seus genes alvo que são responsáveis pela promoção da resposta antiinflamatória dos glicocorticoides (ROGERS et al., 2020).

Em conjunto, os achados desse projeto fornecem informações que permitem melhor compreender o papel da inibição em *BTG1* e *IKZF1* na resistência à dexametasona. Por meio de nossos resultados foi possível avaliar a modulação da expressão de genes da via frente a supressão de *BTG1* e *IKZF1* com e sem o tratamento com o medicamento, de modo a auxiliar o entendimento do fenômeno de resistência em células contendo deleção nesses genes. Informações adicionais a respeito do processo de resistência, assim como o conhecimento de outros genes de resposta desses fármacos e seu impacto após a inibição de *BTG1* e *IKZF1* podem consistir em um aspecto fundamental para a elaboração de novas estratégias terapêuticas que visem transpor o fenômeno de resistência.

7 CONCLUSÕES

- Foi possível estabelecer um modelo celular que mimetizou deleções isoladas ou concomitantes de *BTG1* e *IKZF1*;
- O estudo mostrou um aumento gradual da viabilidade de células inibidas para *BTG1*, *IKZF1* e as com inibição dupla em comparação com o scramble após serem submetidas a tratamento farmacológico com dexametasona
- A inibição de *BTG1* não está associado à redução na expressão dos genes de resposta a glicocorticoide que foram avaliados nesse estudo;
- A inibição de *IKZF1* ou a dupla inibição (*BTG1* e *IKZF1*) foi associada à menor expressão dos genes *SGK1*, *FBXW7* e *NR3C1* em células tratadas com dexametasona;
- Nossos achados sugerem que deleções no gene *IKZF1* estão relacionadas ao estabelecimento de um fenótipo de resistência aos glicocorticoides, uma vez que modula a expressão de genes relacionados a promoção da resposta a esses fármacos.

8 REFERÊNCIAS

ASNAFI, V. et al. NOTCH1/FBXW7 mutation identifies a large subgroup with favorable outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): a Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) study. **Blood**, v. 113, n. 17, p. 3918–3924, 2009.

BALIS, F. M. et al. Differences in cerebrospinal fluid penetration of corticosteroids: possible relationship to the prevention of meningeal leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 2, p. 202–207, 1987.

BERTHET, C. et al. Interaction of PRMT1 with BTG/TOB proteins in cell signalling: molecular analysis and functional aspects. **Genes to Cells**, v. 7, n. 1, p. 29–39, 2002.

BOER, J. M. et al. Prognostic value of rare IKZF1 deletion in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: an international collaborative study. **Leukemia**, v. 30, n. 1, p. 32–38, 2016.

BRAMBILLASCA, F. et al. Identification of a novel molecular partner of the E2A gene in childhood leukemia. **Leukemia**, v. 13, n. 3, p. 369–375, 1999.

BRITTEN et al. MLL-Rearranged Acute Leukemia with t(4;11)(q21;q23)—Current Treatment Options. Is There a Role for CAR-T Cell Therapy? **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1341, 2019.

BUITENKAMP, T. D. et al. BTG1 deletions do not predict outcome in Down syndrome acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 27, n. 1, p. 251–252, 2013.

CHAN, L. N. et al. Metabolic gatekeeper function of B-lymphoid transcription factors. **Nature**, v. 542, n. 7642, p. 479–483, 2017.

CHAN, L. N.; MÜSCHEN, M. B-cell identity as a metabolic barrier against malignant transformation. **Experimental Hematology**, v. 53, p. 1–6, 2017.

CHICAYBAM, L. et al. An Efficient Low Cost Method for Gene Transfer to T Lymphocytes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e60298, 26 2013.

CHOUGULE, R. A. et al. Glucocorticoid-resistant B cell acute lymphoblastic leukemia displays receptor tyrosine kinase activation. **npj Genomic Medicine**, v. 4, n. 1, 2019.

COOMBS, R. R. A.; FEINSTEIN, A.; WILSON, A. Immunoglobulin determinants on the surface of human lymphocytes. **The Lancet**, v. 294, n. 7631, p. 1157–1161, 1969.

COOPER, M. D.; PETERSON, R. D. A.; GOOD, R. A. Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken. **Nature**, v. 205, n. 4967, p. 143–146, 1965.

COOPER, S. L.; BROWN, P. A. Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatric clinics of North America**, v. 62, n. 1, p. 61–73, 2015.

CORTES, U. et al. BTG gene expression in the p53-dependent and -independent cellular response to DNA damage. **Molecular carcinogenesis**, v. 27 p. 57-64, 2000.

DÖRGE, P. et al. IKZF1 deletion is an independent predictor of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. **Haematologica**, v. 98, n. 3, p. 428–432, 2013.

EMERENCIANO, M. et al. Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 47, n. 5, p. 549–554, 2006.

FINDLEY, H. W. et al. Expression and Regulation of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax Correlate With p53 Status and Sensitivity to Apoptosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**, v. 89, n. 8, p. 2986–2993, 1997.

FORD, C. E. et al. Cytological Identification of Radiation-Chimæras. **Nature**, v. 177, n. 4506, p. 452–454, 1956.

FORGIONE, M. O. et al. KMT2A rearranged acute lymphoblastic leukaemia: Unravelling the genomic complexity and heterogeneity of this high-risk disease. **Cancer Letters**, v. 469, p. 410–418, 2020.

FRANCKE, U.; FOELLMER, B. E. The glucocorticoid receptor gene is in 5q–q32. **Genomics**, v. 4, n. 4, p. 610–612, 1989.

GALEN, J. C. VAN et al. BTG1 regulates glucocorticoid receptor autoinduction in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 115, n. 23, p. 4810–4819, 2010.

GELEY, S. et al. Lymphoblastic Leukemia CEM-Ci Cells Is Due to Insufficient Glucocorticoid Receptor Expression. **Cancer Research**, v. 56, p. 7, 1996.

GEORGOPOULOS, K. The making of a lymphocyte: the choice among disparate cell fates and the IKAROS enigma. **Genes & development**, v. 31, n. 5, p. 439–450, 2017.

GOLE, B.; WIESMÜLLER, L. Leukemogenic rearrangements at the mixed lineage leukemia gene (MLL)—multiple rather than a single mechanism. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 3, p. 1-13, 2015.

GREAVES, M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, p. 471-484, 2018.

GREAVES, M. F.; WIEMELS, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 9, p. 639–649, 2003.

HALA, M.; HAKTMANN, B. L.; BOCK, G. Glucocorticoid-receptor-gene defects and resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human leukemic cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 68, p. 6, 1996.

HAMADEH, L. et al. Validation of the United Kingdom copy-number alteration classifier in 3239 children with B-cell precursor ALL. **Blood Advances**, v. 3, n. 2, p. 148–157, 2019.

HAMID, G. A. Acute Leukemia Clinical Presentation. **Leukemia**, p. 75-97, 2013.

HATA, K.; NISHIJIMA, K.; MIZUGUCHI, J. Role for Btg1 and Btg2 in growth arrest of WEHI-231 cells through arginine methylation following membrane immunoglobulin engagement. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 11, p. 2356–2366, 2007.

HERMOSO, M. A.; CIDLOWSKI, J. A. Putting the Brake on Inflammatory Responses: the Role of Glucocorticoids. **IUBMB Life**, v. 55, n. 9, p. 497–504, 2003.

HOWLADER, N. et al. **SEER cancer statistics review**, 1975–2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD, 2019.

HUANG, Y. et al. BTG1 low expression in pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with a poorer prognosis. **The International Journal of Biological Markers**, v. 33, n. 2, p. 189–194, 2018.

HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 16, p. 1541–1552, 2015.

IACOBUCCI, I. et al. IKAROS Deletions Dictate a Unique Gene Expression Signature in Patients with Adult B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943–1955, 2013.

INABA, T. et al. Fusion of the leucine zipper gene HLF to the E2A gene in human acute B-lineage leukemia. **Science**, v. 257, n. 5069, p. 531–534, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa/2020 Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) - Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2020.

INOUE, H. et al. Dexamethasone-resistant Human Pre-B Leukemia 697 Cell Line Evolving Elevation of Intracellular Glutathione Level: An Additional Resistance Mechanism. **Japanese journal of cancer research**, v. 93, n. 5, p. 582–590, 2002.

ITANI, O. A. et al. Glucocorticoids stimulate human *sgk1* gene expression by activation of a GRE in its 5'-flanking region. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 283, n. 5, p. 971–979, 2002.

JACOBSON, L. O. et al. Recovery from Radiation Injury. **Science**, v. 113, n. 2940, p. 510–511, 1951.

JONES, B. et al. Lower incidence of meningeal leukemia when prednisone is replaced by dexamethasone in the treatment of acute lymphocytic leukemia. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 19, n. 4, p. 269–275, 1991.

KAMPS, M. P. et al. A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B all. **Cell**, v. 60, n. 4, p. 547–555, 1990.

KASSEL, O. et al. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 24, p. 7108–7116, 2001.

KOLLMANNBERGER, C. et al. Secondary leukemia following high cumulative doses of etoposide in patients treated for advanced germ cell tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 10, p. 3386–3391, 1998.

KOURTIS, N.; STRIKOUDIS, A.; AIFANTIS, I. Emerging roles for the FBXW7 ubiquitin ligase in leukemia and beyond. **Current opinion in cell biology**, v. 37, p. 28–34, 2015.

KUIPER, R. P. et al. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. **Leukemia**, v. 21, n. 6, p. 1258–1266, 2007.

KUIPER, R. P. et al. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. **Leukemia**, v. 24, n. 7, p. 1258–1264, 2010.

KURZROCK, R.; TALPAZ, M. The molecular pathology of chronic myelogenous leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 79, n. s1, p. 34–37, 1991.

LANG, F. et al. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 and the response to cell stress. **Cell Stress**, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2019.

LANGEBRAKE, C.; REINHARDT, D.; RITTER, J. Minimising the Long-Term Adverse Effects of Childhood Leukaemia Therapy: **Drug Safety**, v. 25, n. 15, p. 1057–1077, 2002.

LARSON, R. A.; ANASTASI, J. Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Presentation, Diagnosis, and Classification. In: ESTEY, E. H.; FADERL, S. H.; KANTARJIAN, H. M. (Eds.). . **Acute Leukemias**. Hematologic Malignancies. Berlin, Heidelberg: Springer, p. 109–118, 2008.

LOFSTAD, G. E. et al. Neurocognitive Outcome and Compensating Possibilities in Children and Adolescents Treated for Acute Lymphoblastic Leukemia With Chemotherapy Only. **Frontiers in Psychology**, v. 10, p. 1-12, 2019.

LOPES, B. A. et al. COBL is a novel hotspot for IKZF1 deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Oncotarget**, v. 7, n. 33, p. 53064–53073, 2016.

LORSBACH, R. B.; DOWNING, J. R. The Role of the AML1 Transcription Factor in Leukemogenesis. **International Journal of Hematology**, v. 74, n. 3, p. 258–265, 2001.

MALYUKOVA, A. et al. FBXW7 regulates glucocorticoid response in T-cell acute lymphoblastic leukaemia by targeting the glucocorticoid receptor for degradation. **Leukemia**, v. 27, n. 5, p. 1053–1062, 2013.

MARKE, R. et al. Tumor suppressor IKZF1 mediates glucocorticoid resistance in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 30, n. 7, p. 1599–1603, 2016.

MEDVEDOVIC, J.; EBERT, A.; BUSSLINGER, M. Pax5: A Master Regulator of B Cell Development and Leukemogenesis. In: **Advances in Immunology**. v. 111p. 179–206, 2011.

MEYER, C. et al. Refinement of IKZF1 recombination hotspots in pediatric BCP-ALL patients. **Am J Blood Res**, v. 3, n. 2, p. 165–173, 2013.

MEYER, C. et al. The MLL recombinoome of acute leukemias in 2017. **Leukemia**, v. 32, n. 2, p. 273–284, 2018.

MITCHELL, C. D. et al. Benefit of dexamethasone compared with prednisolone for childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of the UK Medical Research Council ALL97 randomized trial. **British Journal of Haematology**, v. 129, n. 6, p. 734–745, 2005.

MOORMAN, A. V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 101, n. 4, p. 407–416, 2016.

MULLIGHAN, C. G. et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 446, n. 7137, p. 758–764, 2007.

MULLIGHAN, C. G. et al. BCR–ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. **Nature**, v. 453, n. 7191, p. 110–114, 2008.

MULLIGHAN, C. G. et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 5, p. 470–480, 2009.

MULLIGHAN, C. G. et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 471, n. 7337, p. 235–239, 2011.

MURRE, C. ‘Big bang’ of B-cell development revealed. **Genes & development**, v. 32, n. 2, p. 93–95, 2018.

NÁRAY-FEJES-TÓTH, A. et al. SGK is a primary glucocorticoid-induced gene in the human. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 75, n. 1, p. 51–56, dez. 2000

NOURSE, J. et al. Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. **Cell**, v. 60, n. 4, p. 535–545, 1990.

OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms for Generating Tissue-specific

Actions of Glucocorticoids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 5, p. 3177–3184, 2011.

PAULSSON, K. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia: Chromosomal gains as the main driver event. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 3, n. 1, p. e1064555, 2016.

PAULSSON, K.; JOHANSSON, B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 48, n. 8, p. 637–660, 2009.

PHUC LE, P. et al. Glucocorticoid Receptor-Dependent Gene Regulatory Networks. **PLoS Genetics**, v. 1, n. 2, p. 159-170, 2005.

PIETERS, R. et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. **The Lancet**, v. 370, n. 9583, p. 240–250, 2007.

PILLER, G. J. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. **British Journal of Haematology**, v. 112, n. 2, p. 282–292, 2001.

PIOVAN, E. et al. Direct Reversal of Glucocorticoid Resistance by AKT Inhibition in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer Cell**, v. 24, n. 6, p. 766–776, 2013.

PUI, C.-H. et al. Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 5, p. 551–565, 2011.

PUI, C.-H. et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 27, p. 2938–2948, 2015.

PUI, C.-H. et al. Global efforts toward the cure of childhood acute lymphoblastic leukemia. **The Lancet. Child & adolescent health**, v. 2, n. 6, p. 440–454, 2018.

PUI, C.-H.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 371, n. 9617, p. 1030–1043, 2008.

RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J. A. Exploring the Molecular Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Action from Sensitivity to Resistance. **Endocrine development**, v. 24, p. 41–56, 2013.

REN, R. Mechanisms of BCR–ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 3, p. 172–183, 2005.

RIMOK, R. et al. A Chromosome 12 Coding Region Is Juxtaposed to the MYC Protooncogene Locus in a t(8; 12)(q24;q22) Translocation in a Case of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. **GENES, CHROMOSOMES & CANCER**, v. 3, p. :2436, 1991.

ROMANA, S. et al. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. **Blood**, v. 85, n. 12, p. 3662–3670, 1995.

ROUAULT, J. P. et al. BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes. **The EMBO journal**, v. 11, n. 4, p. 1663–1670, 1992.

SANYAL, M. et al. B-cell development fails in the absence of the Pbx1 proto-oncogene. **Blood**, v. 109, n. 10, p. 4191–4199, 2007.

SCHEIJEN, B. et al. Tumor suppressors BTG1 and IKZF1 cooperate during mouse leukemia development and increase relapse risk in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia patients. **Haematologica**, v. 102, n. 3, p. 541–551, 2017.

SCHEIJEN, B. Molecular mechanisms contributing to glucocorticoid resistance in lymphoid malignancies. **Cancer Drug Resistance**, v. 2, p. 647-664, 2019.

SCHMIDT, S. et al. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. **Cell Death & Differentiation**, v. 11, n. 1, p. 45–55, 2004.

SCHRAPPE, M. et al. Outcomes after Induction Failure in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1371–1381, 2012.

SCHLOSSMACHER, G.; STEVENS, A.; WHITE, A. Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. **Journal of Endocrinology**, v. 211, n. 1, p. 17–25, out. 2011.

SHAH, S. et al. Roles for the Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Phosphatase, DUSP1, in Feedback Control of Inflammatory Gene Expression and Repression by Dexamethasone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 19, p. 13667–13679, 2014.

SMITH, L. K.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoid-Induced Apoptosis of Healthy and Malignant Lymphocytes. In: **Progress in Brain Research**, v. 182, p. 1–30, 2010.

SPANGRUDE, G. J.; HEIMFELD, S.; WEISSMAN, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. **Science**, v. 241, n. 4861, p. 58–62, 1988.

STANULLA, M. et al. IKZF1plus Defines a New Minimal Residual Disease–Dependent Very-Poor Prognostic Profile in Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 12, p. 1240–1249, 2018.

STEEGHS, E. M. P. et al. Copy number alterations in B-cell development genes, drug resistance, and clinical outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

TIJCHON, E. et al. B-lineage transcription factors and cooperating gene lesions required for leukemia development. **Leukemia**, v. 27, n. 3, p. 541–552, 2013.

TIMMERMANS, S.; SOUFFRIAU, J.; LIBERT, C. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1-17, 2019.

TISSING, W. J. et al. Genomewide identification of prednisolone-responsive genes in acute lymphoblastic leukemia cells. **Blood**, v. 109, n. 9, p. 3929–3935, 2007.

WAANDERS, E. et al. Integrated use of minimal residual disease classification and IKZF1 alteration status accurately predicts 79% of relapses in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 25, n. 2, p. 254–258, 2011.

WAANDERS, E. et al. The Origin and Nature of Tightly Clustered BTG1 Deletions in Precursor B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Support a Model of Multiclonal Evolution. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 2, p. 1-13, 2012.

WANG, L. C. et al. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. **Genes & Development**, v. 12, n. 15, p. 2392–2402, 1998.

WEI, G.; RAFIYATH, S.; LIU, D. First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2010.

XIE, J. et al. High frequency of BTG1 deletions in patients with BCR-ABL1–positive acute leukemia. **Cancer Genetics**, v. 207, n. 5, p. 226–230, 2014.

XU, M. F. et al. Effects by doxorubicin on the myocardium are mediated by oxygen free radicals. **Life Sciences**, v. 68, n. 8, p. 889–901, 2001.

YAN, W. et al. Identification of B-cell translocation gene 1-controlled gene networks in diffuse large B-cell lymphoma: A study based on bioinformatics analysis. **Oncology Letters**, v. 17, n. 3, p. 2825–2835, 2019.

YOSHIDA, N. L. et al. Analysis of gene expression patterns during glucocorticoid-induced apoptosis using oligonucleotide arrays. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 293, n. 4, p. 1254–1261, 2002.

YUMIMOTO, K.; NAKAYAMA, K. I. Recent insight into the role of FBXW7 as a tumor suppressor. **Seminars in Cancer Biology**, p. S1044579X2030050X, fev. 2020.

YUNIATI, L. et al. Tumor suppressors BTG1 and BTG2: Beyond growth control. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 5, p. 5379–5389, 2019.