



Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva  
Coordenação de Pesquisa  
Divisão de Pesquisa Clínica e Desenvolvimento Tecnológico

Pós-Graduação em Oncologia - INCA

***ANA LUIZA TARDEM MACIEL***

**Expressão de *CRLF2* associada ao status de *NOTCH1/IKZF1* na leucemia linfoblástica aguda de células-T**

**Orientação:** Dra. Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá e Dra. Marcela B. Mansur

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2019



Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva  
Coordenação de Pesquisa  
Divisão de Pesquisa Clínica e Desenvolvimento Tecnológico

Pós-Graduação em Oncologia - INCA

***ANA LUIZA TARDEM MACIEL***

**Expressão de *CRLF2* associada ao status de *NOTCH1/IKZF1* na leucemia linfoblástica aguda de células-T**

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.

**Orientação:** Dra. Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá e Dra. Marcela B. Mansur

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2019



Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva  
Coordenação de Pesquisa  
Divisão de Pesquisa Clínica e Desenvolvimento Tecnológico

Pós-Graduação em Oncologia - INCA

***ANA LUIZA TARDEM MACIEL***

**Expressão de *CRLF2* associada ao status de *NOTCH1/IKZF1* na leucemia linfoblástica aguda de células-T**

**Orientação:** Dra. Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá e Dra. Marcela B. Mansur

Dra. Raquel Ciuvalschi Maia (Titular interna)

Dr. Marcelo Alex Carvalho (Titular interna)

Dr. Paulo Vidal Campregher (Titular externo)

Dra. Mariana Lima Boroni Martins (Suplente interno)

Dra. Miriam Bianchi de Frontin Werneck (Suplente externo)

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2019

M152e Maciel, Ana Luiza Tardem.  
Expressão de *CRLF2* associada ao status de *NOTCH1/IKZF1* na leucemia linfoblástica aguda de células-T / Ana Luiza Tardem Maciel. – Rio de Janeiro, 2019. XVI, 57 f.: il. color.

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

Orientadora: Dra. Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá  
Co-orientadora: Dra. Marcela B. Mansur

1. Leucemia-Linfoma Linfoblástico de Células T Precursoras. 2. Receptores de Citocinas. 3. CRLF2. 4. Receptor Notch1. 5. IKZF1. I. Sá, Mariana Emerenciano Cavalcanti (orient.). II. Mansur, Marcela B. (co-orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99419

Dedico este trabalho a todas as crianças diagnosticadas com leucemia e seus familiares e, que possamos estar cada vez mais próximos de ajuda-las.

## AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras que fazem deste trabalho uma verdadeira parceria, na qual me espelho todo dia para moldar minha carreira científica. À **Dra. Mariana Emerenciano** pelo acolhimento com que me recebeu no grupo desde a iniciação científica, por todo conhecimento compartilhado e pela confiança prestada. À **Dra. Marcela B. Mansur**, por todos os “puxões de orelha” acompanhados de muito aprendizado e de um companheirismo incondicional. Possuem minha admiração e gratidão por poder fazer parte do crescimento deste grupo.

À minha amiga e colaboradora **Caroline Poubel**, que participou ativamente deste trabalho, dispôs de todo tempo e esforço possível para me ajudar no andamento do projeto. Além do suporte emocional nestes dias mais estressantes, deixando-os mais leves, obrigada!

Nossas conquistas nunca são individuais e, este trabalho tem a participação de cada membro do **MECS**, ao qual agradeço muito pelas sugestões, ajudas, esclarecimento de dúvidas e boas risadas. Gostaria de destacar aqui a **Dra. Thayana Barbosa**, minha coorientadora durante a iniciação científica e por quem tenho imensa admiração e, nossa nova doutora **Caroline Barbieri** que está compartilhando esses dias corridos comigo.

À **minha família**, em especial aos meus pais, **Lélio e Ana Lúcia**, que me apoiam nas minhas decisões, torcem e vibram as minhas conquistas mais até que eu mesma. Ao meu noivo **Pedro Henrique** pelo apoio incondicional, pelas conversas, desabafos e por todo carinho, principalmente nos dias mais difíceis. Não poderia deixar de agradecer ao meu companheiro de todo dia, **Lúcifer**, o cachorrinho mais carinhoso e bravo, que ama na mesma medida que morde, meu parceiro mais leal! Aos **meus amigos** que fizeram desses dias muito mais felizes!

À **Dra. Maria do Socorro** e todo os membros do **Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico** pela disponibilidade das amostras e pela estrutura física para a realização dos experimentos durante o primeiro ano deste trabalho.

À **Divisão de Pesquisa Clínica e Desenvolvimento Tecnológico** por fornecer todo suporte necessário para a conclusão deste projeto.

Aos **membros da banca examinadora** pela disponibilidade, foram todos cuidadosamente escolhidos para contribuir com este trabalho.

A todos que de alguma forma contribuem para minha trajetória, sou muito privilegiada por todas as oportunidades que tive e, por isso, tenho muito a agradecer. Espero que um dia todos possam ter as mesmas oportunidades e, que estas não sejam mais um privilégio.

## ÍNDICE

LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT .....	xvi
1. Introdução.....	1
1.1. Epidemiologia e classificação das leucemias linfoblásticas agudas .....	1
1.2. Leucemia linfoblástica aguda de células-T.....	3
1.2.1. Subgrupos genético-moleculares da LLA-T .....	4
1.2.2. Via NOTCH1 .....	6
1.2.3. <i>CRLF2</i> - identificação de um novo marcador na LLA-T .....	10
1.2.3.1. <i>CRLF2</i> – caracterização e função.....	10
1.2.3.2. <i>CRLF2</i> – valor prognóstico .....	13
1.3. <i>IKZF1</i> – regulador mestre da linfopoiese .....	14
1.4. Inter-relação entre os genes <i>CRLF2</i> , <i>IKZF1</i> e <i>NOTCH1</i> .....	16
2. Justificativa do estudo.....	18
3. Objetivos .....	20
3.1. Objetivo principal .....	20
3.2. Objetivos secundários.....	20
4. Materiais e métodos .....	21
4.1. Coorte PHOP - casuística.....	22
4.2. Coorte PHOP - extração e preparação de ácidos nucleicos .....	22
4.2.1. Extração de ácido ribonucleico (RNA) e síntese do DNA complementar ..	22
4.2.2. Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) .....	24
4.3. Coorte PHOP - Caracterização molecular das amostras de LLA-T .....	24
4.4. Coorte PHOP - Detecção de deleções em <i>IKZF1</i> .....	27

4.5.	Coorte PHOP - Quantificação relativa dos níveis de transcritos de <i>CRLF2</i> e <i>IKZF1</i>	29
4.6.	Coorte TARGET - Casuística	30
4.7.	Coorte TARGET - Caracterização molecular das amostras e investigação dos genes de interesse	30
4.8.	Estabelecimento de ponto de corte para análises de expressão gênica	31
4.9.	Análises estatísticas	31
5.	Resultados	33
5.1.	Caracterização dos pacientes	33
5.2.	Identificação de alterações em <i>IKZF1</i>	35
5.3.	Determinação dos níveis de expressão gênica de <i>CRLF2</i>	36
5.4.	Caracterização dos pacientes de acordo com os níveis de expressão gênica de <i>CRLF2</i>	37
5.5.	Correlação entre as expressões de <i>CRLF2</i> e <i>IKZF1</i>	40
5.6.	Expressão de <i>CRLF2</i> e <i>IKZF1</i> associada com o status de <i>NOTCH1/FBXW7</i>	41
6.	Discussão	45
8.	Referências	52
9.	Anexos	58
9.1.	Carta de aprovação do Comitê de ética	58
9.2.	Termo de outorga para concessão de Bolsa Nota 10 – Mestrado -FAPERJ	62
9.3.	Artigo aprovado para publicação	65
9.4.	Trabalhos apresentados em Congressos	82



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Dados clínico-laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo. ....	34
<b>Tabela 2.</b> Características clínico-laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo categorizados de acordo com os níveis de expressão de <i>CRLF2</i> .....	38

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1.** Oligonucleotídeos utilizados para detecção de deleções em *IKZF1* pelo MP-PCR ..28

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Epidemiologia e classificação nas leucemias linfoblásticas agudas. _____	3
<b>Figura 1.2.</b> Perfil de expressão gênica dos timócitos em diferentes estágios de seu desenvolvimento. _____	6
<b>Figura 1.3.</b> Estrutura do receptor NOTCH1. _____	7
<b>Figura 1.4.</b> Sinalização fisiológica e oncogênica da via NOTCH1. _____	8
<b>Figura 1.5.</b> Esquema ilustrativo da localização cromossômica de <i>CRLF2</i> e sua estrutura. ____	11
<b>Figura 1.6.</b> Estrutura do receptor de TSLP em humanos e camundongos. _____	12
<b>Figura 1.7.</b> Associação entre a superexpressão de <i>CRLF2</i> e desfecho do tratamento. _____	13
<b>Figura 1.8.</b> Estrutura de <i>IKZF1</i> e isoformas de IKAROS. _____	15
<b>Figura 1.9.</b> Modelo representativo da competição entre IKAROS e CSL. _____	16
<b>Figura 1.10.</b> Modelo sugerido por Ge Z para regulação de <i>CRLF2</i> por <i>IKZF1</i> . _____	17
<b>Figura 3.1.</b> Modelo sugerido para explicar a superexpressão de <i>CRLF2</i> nas LLAs-T. _____	19
<b>Figura 4.1.</b> Desenho esquemático de estudo. _____	21
<b>Figura 4.2.</b> Desenho esquemático das regiões de <i>IKZF1</i> cobertas pelo MP-PCR. _____	28
<b>Figura 5.1.</b> Frequência dos subgrupos oncogênicos característicos da LLA-T na coorte TARGET. _____	34
<b>Figura 5.2.</b> Deleção em <i>IKZF1</i> detectada por MP-PCR. _____	35
<b>Figura 5.3.</b> Distribuição dos valores de expressão de <i>CRLF2</i> para a determinação dos pontos de corte pelo <i>Cutoff Finder</i> . _____	36
<b>Figura 5.4.</b> Expressão de <i>CRLF2</i> de acordo com o estágio maturativo dos blastos leucêmicos.	39
<b>Figura 5.5.</b> Expressão de <i>CRLF2</i> nos subgrupos oncogênicos da LLA-T. _____	39
<b>Figura 5.6.</b> Análise de correlação entre a expressão de <i>CRLF2</i> e <i>IKZF1</i> . _____	40
<b>Figura 5.7.</b> Expressão gênica de <i>CRLF2</i> em amostras de diagnóstico de LLA-T. _____	41
<b>Figura 5.8.</b> Expressão gênica de <i>IKZF1</i> de acordo com o status de <i>NOTCH1/FBXW7</i> . _____	42
<b>Figura 5.9.</b> Expressão de <i>CRLF2</i> de acordo com os tipos de mutação na via NOTCH1. _____	43
<b>Figura 6.1.</b> Expressão de <i>IKZF1</i> na LLA-T. _____	47
<b>Figura 6.2.</b> Ik1 reprime a atividade de ICN1 in vitro e a coexpressão de Ik6 impede esta repressão. _____	47
<b>Figura 6.3.</b> Novo modelo sugerido para elucidar a superexpressão de <i>CRLF2</i> nas LLAs-T. _	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>.txt</i>	<i>Text extension</i>
<i>.xlsx</i>	<i>Excel extension</i>
BFM	<i>Berlin-Frankfurt-Münster</i>
CDKN2A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDKN2B	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2B</i>
cDNA	DNA complementar
céls	Células
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
Cols	Colaboradores
CRLF2	<i>Cytokine receptor like factor 2</i>
CSL	<i>CBF-1/RBP-J kappa, suppressor of hairless, and lag-1</i>
CSF2RA	<i>Colony stimulating factor 2 receptor alpha</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphates</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGIL	<i>European group for the immunological characterization of leukemias</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Hi-Di	<i>Highly deionized H</i>
HD	Domínio de heterodimerização
IGH	<i>Immunoglobulin heavy locus gene</i>
IKZF1	<i>IKAROS family zinc finger 1</i>
IKZF2	<i>IKAROS family zinc finger 2</i>
IKZF3	<i>IKAROS family zinc finger 3</i>
IL3RA	Subunidade alpha do receptor de interleucina 3
IL7	<i>Interleukin 7</i>
IL7R	<i>Interleukin receptor 7</i>

*IL3R $\alpha$*  Subunidade  $\alpha$  do receptor de interleucina 7  
INCA Instituto Nacional de Câncer  
Kb Quilo base  
LA Leucemia aguda  
LBBC Laboratório de bioinformática e ciência computacional  
LD-PCR *Long-distance polymerase chain reaction*  
LLA Leucemia linfoblástica aguda  
LLA-B Leucemia linfoblástica aguda de células-B precursoras  
LLA-T Leucemia linfoblástica aguda de células-T  
LMA Leucemia mieloide aguda  
*LMO1 LIM domain only 1*  
*LMO2 LIM domain only 2*  
LNR Repetições LIN-12/NOTCH  
MIQE *Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*  
MLPA *Multiplex ligation-dependent probe amplification*  
MO Medula óssea  
MP-F Mistura de oligonucleotídeos de sentido direto  
MP-PCR *Multiplex polymerase chain reaction*  
MP-R1 Mistura de oligonucleotídeos de sentido indireto (ímpar)  
MP-R2 Mistura de oligonucleotídeos de sentido indireto (par)  
NCI *National cancer institute*  
NEC Subunidade extracelular  
NTM Subunidade transmembrana  
*P2RY8 Purinergic receptor P2Y8*  
PAR1 Região pseudoautossômica 1  
pb Pares de bases  
PCR Reação em cadeia da polimerase  
PBS *Phosphate buffered saline*  
PEST Domínio polipeptídico enriquecido em prolina, glutamina, serina e treonina  
PHOP Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico  
qPCR *Quantitative Polymerase Chain Reaction*  
RAM Proteína ligadora recombinante  
RNA Ácido ribonucleico  
RNA-seq Sequenciamento de RNA  
RT Transcriptase reversa

RT-PCR Transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase  
RT-qPCR Transcriptase reversa – reação em cadeia quantitativa da polimerase  
SG Sobrevida global  
SLE Sobrevida livre de eventos  
SNC Sistema nervoso central  
SP Sangue periférico  
TAD Domínio de transativação  
TAL1 *T-cell acute leukemia gene 1*  
Taq *Thermus aquaticus*  
TARGET *Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments*  
TCR Receptor de células-T  
TCLE Termo de consentimento livre e esclarecido  
TLX1 *T-cell leukemia homeobox 1*  
TLX3 *T-cell leukemia homeobox 3*  
TSLP *Thymic stromal-derived lymphopoietin*  
U Unidade  
WHO *World health organization*  
WGS Sequenciamento completo do genoma  
WES Sequenciamento completo do exoma

## RESUMO

**Introdução.** Apesar das inúmeras alterações moleculares já terem sido identificadas na leucemia linfoblástica aguda de células-T (LLA-T), nos protocolos atuais, nenhuma delas é utilizada para a estratificação de risco destes pacientes. A superexpressão de *CRLF2* foi recentemente detectada em 15% das LLAs-T, porém, até o momento, nenhum mecanismo molecular responsável por esta desregulação foi identificado. *IKZF1* atua como repressor transcricional de *CRLF2* e alguns estudos mostraram que, na LLA-T, a ativação da via NOTCH1 antagoniza o papel de supressor tumoral de *IKZF1*. A partir destas evidências, o objetivo principal deste estudo foi investigar a relação entre a perda de função de *IKZF1*, causada pela sua baixa expressão gênica ou pela ativação de NOTCH1 (mutações em *NOTCH1/FBXW7*), e a superexpressão de *CRLF2* na LLA-T. **Metodologia.** Foram analisadas duas coortes independentes de pacientes pediátricos com LLA-T. As amostras do Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico formaram a coorte PHOP, e as do banco de dados *Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments*, a coorte TARGET. A caracterização molecular incluiu o rastreamento de: *STIL-TAL1*, *TLX3* (RT-PCR) e mutações em *NOTCH1/FBXW7* (PCR seguido de sequenciamento) na coorte PHOP, e por sequenciamento completo do exoma (WES) e sequenciamento do RNA (RNA-seq) na TARGET. Na coorte PHOP, as deleções em *IKZF1* foram avaliadas por PCR-multiplex e os níveis transcricionais de ambos, *IKZF1* e *CRLF2*, foram avaliados por RT-qPCR. Para a coorte TARGET, estas análises foram realizadas por WES e RNA-seq. Os testes estatísticos foram conduzidos no ambiente R Studio. **Resultados.** Nós identificamos *CRLF2* superexpresso em 14% (8/57) e 16,3% (40/264) dos pacientes das coortes PHOP e TARGET, respectivamente. Na coorte TARGET observamos que a expressão de *CRLF2* era maior nos subtipos imaturos de LLA-T do que em subtipos mais maduros ( $p < 0,05$ ). Em ambas coortes, identificamos baixa frequência de alterações moleculares em *IKZF1* (1,75% - PHOP e 4,17% - TARGET) e não foi observada correlação direta entre a expressão deste gene e de *CRLF2*. Contudo, categorizando os pacientes de acordo com o efeito da mutação na via NOTCH1, vimos que as que resultavam em estabilização da subunidade intracelular de NOTCH1 (ICN1) estavam associadas a maior expressão de *CRLF2*, com significância estatística na coorte TARGET ( $p = 0,04$ ). **Conclusão.** *IKZF1* (IK1) não está associado diretamente à expressão de *CRLF2* na LLA-T. Entretanto, sabendo-se que a função de *IKZF1* é antagonizada pela ativação da via NOTCH1 (aumento de ICN1), nós demonstramos pela primeira vez que a estabilização de ICN1 está associada à superexpressão de *CRLF2* em pacientes pediátricos com LLA-T.

**Palavras-chave:** LLA-T; *CRLF2*; NOTCH1; *IKZF1*.

## ABSTRACT

**Introduction.** Despite the efforts that have so far identified several molecular alterations in T-cell acute lymphoblastic leukaemia (T-ALL), none of those alterations is used to stratify patients according to genetic risk in the current treatment protocols. *CRLF2* overexpression was recently described in 15% of T-ALL cases, however no molecular mechanism responsible for this gene deregulation has been identified so far. *IKZF1* has been recently shown to be a direct transcriptional regulator of *CRLF2* expression. Moreover, it is known that *IKZF1* antagonises *NOTCH1* in T-ALL. Considering these pieces of evidence, we reasoned that *IKZF1* binding perturbation and *CRLF2* upregulation could be associated in T-ALL. **Material & Methods.** We evaluated two independent series of paediatric T-ALL cases. Samples from the Paediatric Haematology-Oncology Program formed the PHOP cohort, and the Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments database, the TARGET cohort. The molecular characterization included the screening of *STIL-TAL1*, *TLX3* (RT-PCR) and mutations in *NOTCH1/FBXW7* (PCR followed by sequencing) in the PHOP cohort, and by complete exome sequencing (WES) and RNA sequencing (RNA-seq) in TARGET. In the PHOP cohort, deletions in *IKZF1* were assessed by multiplex PCR and the transcriptional levels of *IKZF1* and *CRLF2* by RT-qPCR. For the TARGET cohort, these analyses were performed by WES and RNA-seq. The statistical tests were conducted in the R Studio. **Results.** We identified 14% (8/57) and 16.3% (40/264) of *CRLF2* overexpression in PHOP and TARGET patients, respectively. In TARGET cohort we observed that *CRLF2* expression was higher in immature T-ALL subtypes ( $p < 0.05$ ). In both cohorts, we identified low frequency of molecular changes in *IKZF1* (1.75% - PHOP and 4.17% - TARGET) and no direct correlation was observed between expression of this gene and *CRLF2*. However, categorizing patients according to the effect of the mutation in the *NOTCH1* pathway, we found that *NOTCH1* intracellular subunit (ICN1) stabilisation were associated with *CRLF2* overexpression, with statistical significance in TARGET cohort ( $p = 0,04$ ). **Conclusion.** We demonstrated that *IKZF1* (IK1) and *CRLF2* expressions are not directly associated in T-ALL. However, since *IKZF1* function is antagonized by *NOTCH1* pathway activation (increase of ICN1), we demonstrated for the first time that ICN1 stabilization and *CRLF2* overexpression are associated in paediatric T-ALL.

**Keywords:** T-ALL; *CRLF2*; *NOTCH1*; *IKZF1*.



## 1. Introdução

Durante o desenvolvimento hematopoiético normal, as células tronco pluripotentes da medula óssea (MO) se diferenciam em progenitores que podem pertencer à linhagem celular mieloide ou linfóide. Os progenitores hematopoiéticos que seguem o desenvolvimento mieloide irão se diferenciar em granulócitos, megacariócitos e monócitos e, os comprometidos com a linhagem linfóide poderão se diferenciar em linfócitos T e B. Enquanto o processo maturativo das células mielóide é confinado na MO, os progenitores linfóides podem migrar para outros órgãos, como linfonodos, baço e timo para completar o seu desenvolvimento (KOCH; RADTKE, 2011a).

A aquisição de alterações moleculares pode promover a desregulação de mecanismos fisiológicos de proliferação, maturação e apoptose nos progenitores hematopoiéticos. Este evento pode resultar no acúmulo de células imaturas na MO, chamadas blastos, incapazes de desempenhar suas funções normais, desencadeando então, o processo leucemogênico. As leucemias são desordens hematopoiéticas caracterizadas por sua heterogeneidade em termos de desenvolvimento, fenótipo, progressão da doença, prognóstico e resposta à terapia (IZRAELI, 2004; PUI; ROBISON; LOOK, 2008).

Dependendo da linhagem celular do progenitor hematopoiético alterado, as leucemias agudas podem ser classificadas em: leucemia mieloide aguda (LMA) ou leucemia linfoblástica aguda (LLA). As LLAs podem ainda ser subdivididas em LLA de células-B precursoras (LLA-B) ou LLA de células-T (LLA-T) (ARBER *et al.*, 2016).

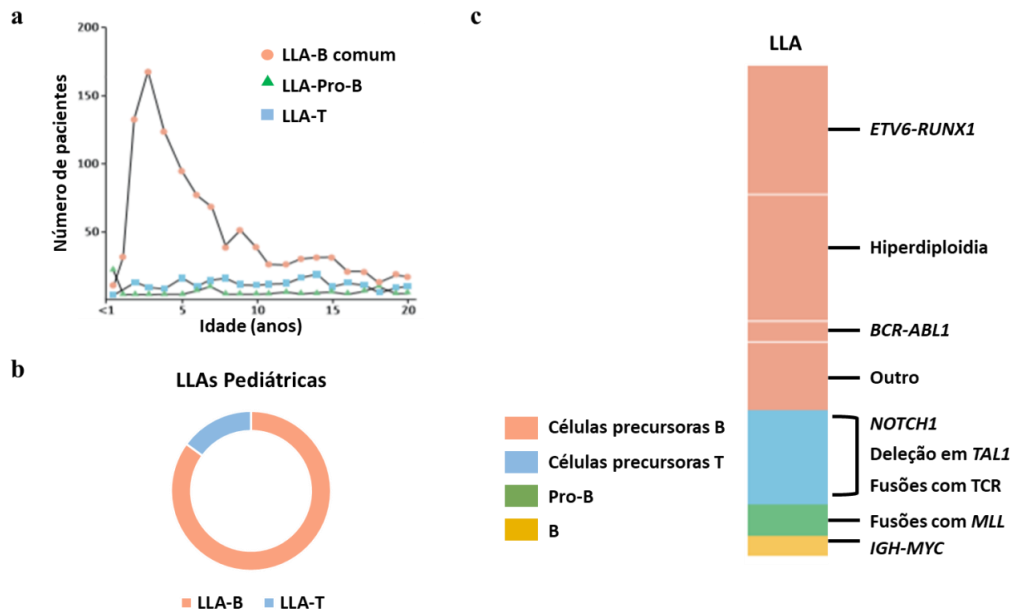
### 1.1. Epidemiologia e classificação das leucemias linfoblásticas agudas

De uma forma geral, as LLAs correspondem ao tipo de câncer mais comum na infância, representando cerca de 25% dos casos diagnosticados de neoplasias pediátricas (DE CAMARGO *et al.*, 2010). Os subtipos de LLA são definidos pela origem das células linfóides, B ou T, havendo, ainda, outras subdivisões de acordo com a parada maturativa destas células. O *European Group for Immunological Characterization of Leukemias* (EGIL) propôs uma classificação em estágios maturativos para as LLAs de acordo com a presença de antígenos celulares nas linhagens T e B e, que foi posteriormente agregada aos critérios da Organização Mundial de Saúde para as definições de LLA (BENE *et al.*, 1995; BENE, 2005; ARBER *et al.*, 2016). As LLAs de células B são classificadas em LLA pró-B, que normalmente ocorre em lactentes, LLA comum, que é o subtipo mais frequente, pré-B e B madura. A classificação EGIL categoriza as LLAs-T nos quatro estágios maturativos seguintes: pró-/pré-T, T cortical, que é subtipo mais frequente, e T madura. Por último, foi

postulado que alguns casos de LLA-T são originados de alterações envolvendo os primeiros timócitos que chegam ao timo durante o processo de diferenciação linfóide-T, chamados de *early T-cell precursors* (ETPs). Estes timócitos retêm o seu potencial de diferenciação em múltiplas linhagens, sugerindo a sua derivação direta das células tronco hematopoiéticas. Este último subgrupo é denominado LLA-ETP (BELL; BHANDoola, 2008; COUSTAN-SMITH *et al.*, 2009; INUKAI *et al.*, 2012).

Os subtipos de LLA também se divergem entre si pela distribuição de idade, prognóstico e etiologia. Enquanto o pico de incidência da LLA-B ocorre entre as idades de 2 e 5 anos, a LLA-T é mais frequente em adolescentes e adultos jovens (Figura 1.1a). Além disso, observa-se uma maior frequência de casos de LLA entre os indivíduos do sexo masculino do que feminino (1,4:1), ainda que não exista alguma justificativa para esta observação (MOORMAN, 2016). Apesar da LLA-T ser um subtipo mais raro de LLA, representando cerca de 15% dos casos pediátricos diagnosticados (Figura 1.1b), ela possui um pior prognóstico quando comparada a LLA-B e é frequentemente associada a fatores clínicos considerados de alto risco, como: alta leucometria, adenomegalia e infiltração dos blastos leucêmicos no sistema nervoso central (SNC) (PUI; ROBISON; LOOK, 2008; PUI; EVANS, 2013; HUNGER; MULLIGHAN, 2015; GREAVES, 2018).

Alguns eventos moleculares já foram descritos como iniciais no processo de leucemogênese como as fusões *ETV6-RUNX1* e *BCR-ABL1*, assim como a hiperdiploidia na LLA-B comum; rearranjos envolvendo o gene *MLL* na LLA pró-B e rearranjos em *IGH*, como a fusão *IGH-MYC* que está relacionada a LLA de células B maduras. Os eventos associados com a leucemogênese-T envolvem mutações causadoras da ativação da via NOTCH1, deleções que causam a superexpressão do gene *TALI* e rearranjos envolvendo genes formadores do receptor de células-T (TCR) (Figura 1.1c) (ROBERTS; MULLIGHAN, 2015; BELVER; FERRANDO, 2016; IACOBUCCI; MULLIGHAN, 2017).



**Figura 1.1.** Epidemiologia e classificação nas leucemias linfoblásticas agudas. **a.** Distribuição da incidência de acordo com a idade dos pacientes diagnosticados com LLA-B comum, pró-B ou LLA-T. O pico de incidência da LLA-B comum ocorre nas idades de 2 a 5 anos, enquanto a LLA-Pro-B é mais incidente nos lactentes. Já a LLA-T, possui a frequência aumentada em adolescentes e adultos jovens (modificado de GREAVES, 2018). **b.** Frequência dos subtipos de LLA encontrada nos pacientes pediátricos, onde a LLA-B corresponde a 85% e a LLA-T a 15% dos casos. **c)** Principais eventos moleculares descritos como promotores na LLA-B pediátrica, LLA-T, LLA-pró-B e LLA-B madura (modificado de GREAVES, 2018).

De uma forma geral, essas lesões primárias não são suficientes para iniciar o processo leucemogênico, sendo, portanto necessária a aquisição e o acúmulo de alterações secundárias para que a doença de fato se estabeleça. Na LLA-B muitas alterações adicionais já foram descritas e associadas tanto ao prognóstico quanto a estratificação de risco dos pacientes (PUI; EVANS, 2013), entre elas destacam-se a perda de *IKZF1* e a superexpressão de *CRLF2*. Ambas as alterações ocorrem com uma frequência de ~15% dos pacientes diagnosticados com LLA-B e estão associadas ao aumento das taxas de recaída (RADTKE *et al.*, 2009; KUIPER *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2015; BOER *et al.*, 2016;). Neste trabalho, especificamente, serão discutidos e melhor elucidados os aspectos da doença derivada de células-T e seu comportamento em pacientes pediátricos.

## 1.2. Leucemia linfoblástica aguda de células-T

A LLA-T é uma desordem maligna que acomete os timócitos em estágios precoces de seu desenvolvimento, resultando na perturbação do processo maturativo destas células. Apesar de

originalmente associada com altos índices de recaída, o prognóstico destes pacientes tem melhorado gradualmente a partir da introdução de quimioterapia intensiva, com as taxas de cura nos protocolos mais modernos atingindo cerca de 75% dos pacientes pediátricos (PUI; EVANS, 2013; TASIAN; HUNGER, 2017).

A identificação de alterações moleculares envolvidas na LLA-T tem sido fundamental para melhor compreender a patogênese desta neoplasia. Análises de larga escala tais como sequenciamento do exoma completo (WES), sequenciamento do genoma completo (WGS) e transcriptoma (RNA-seq), já identificaram mais de 100 genes que podem estar mutados na LLA-T. Apenas dois destes genes, *NOTCH1* e *CDKN2A/B*, são afetados em mais de 50% desses casos e, apesar de outras alterações terem sido identificadas em uma frequência menor de pacientes, muitas foram definidas como promotoras fundamentais da leucemogênese-T e utilizadas para categorização desses pacientes em subgrupos genético-moleculares dentro da própria doença. Porém, ainda que inúmeras alterações genéticas já tenham sido identificadas neste subtipo leucêmico, nenhuma é utilizada para estratificação de risco nos protocolos terapêuticos vigentes ou possui valor prognóstico consensual (VAN VLIERBERGHE *et al.*, 2008).

### **1.2.1. Subgrupos genético-moleculares da LLA-T**

As análises de escala genômica em amostras de pacientes com LLA-T, realizadas para definição das vias oncogênicas responsáveis pela transformação leucêmica, estratificaram esta leucemia em subgrupos genético-moleculares que apresentam um perfil de expressão gênica único caracterizado pela expressão ectópica fatores de transcrição oncogênico, incluindo *LYL1*, *HOXA*, *NKX2.1*, *TLX1*, *TLX3*, *TAL1*, *LMO1* e *LMO2* (FERRANDO; LOOK, 2003; HOMMINGA *et al.*, 2012; SOULIER *et al.*, 2005).

Atualmente são conhecidos quatro mecanismos causadores de expressão aberrante desses fatores de transcrição na LLA-T. O primeiro destes mecanismos são as translocações cromossômicas envolvendo um dos genes de TCR (principalmente *TCRA/B/D locus*). Como resultado desta translocação, os genes parceiros do rearranjo (por exemplo, *LMO1/2* e *TLX1/3*) acabam tendo sua transcrição aumentada já que sua regulação transcricional passa a ser controlada por promotores do *TCR*. Outros mecanismos causadores da superexpressão desses proto-oncogenes envolvidos na LLA-T são os rearranjos gênicos com outras sequências regulatórias, a duplicação/amplificação do próprio fator de transcrição e, por último, mutações ou pequenas inserções gerando novas sequências regulatórias que atuam como *enhancers* neomórficos ou *super enhancers*. Este último foi recentemente identificado por estudos que revelaram alterações na estrutura da cromatina próxima a região gênica de

*TALI*, análises identificaram que mutações criaram um novo sítio de ligação a MYB resultando no recrutamento de reguladores transcricionais adicionais e ativação da expressão de *TALI* em *cis* (GIRARDI *et al.*, 2017; NAVARRO *et al.*, 2015; REFERENCES *et al.*, 2012). Este novo dado demonstrou como mutações em regiões não codificantes podem promover um importante evento para a leucemogênese e, é possível que novas mutações possam ser identificadas através da avaliação da região não codificante do genoma e que possa oferecer novas informações sobre essa doença. Esses eventos ocorrem durante o desenvolvimento do timócito e resultam de recombinação ilegítima do TCR. Apesar de alguns desses fatores de transcrição estarem fisiologicamente presentes nos timócitos e serem reguladores essenciais da ontogenia da célula T, outros não são expressos no timo normal (GIRARDI *et al.*, 2017).

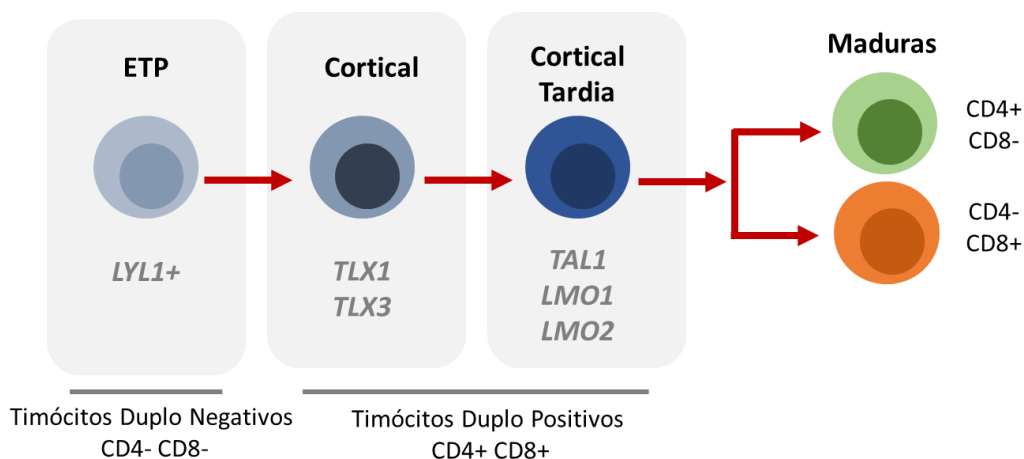
Análises de citogenética convencional já demonstram um cariótipo anormal em 50-60% dos casos de LLA-T (Graux, 2006). Alguns rearranjos gênicos descritos podem levar a formação de transcritos quiméricos como, por exemplo, *STIL-TALI*, *MLL-ENL*, e fusões envolvendo *ABL1* (sendo a mais frequente, *NUP214-ABL1*).

O subgrupo definido pela expressão aberrante de *TALI* é o mais frequente. *TALI* está envolvido na hematopoiese embrionária e adulta e não é normalmente expressa nas células T em desenvolvimento, porém já foi demonstrada a sua co-expressão com *LMO1/2* nos timócitos mais imaturos. A superexpressão desse gene causa a parada da maturação celular no estágio cortical tardio da célula T e pode contribuir para a leucemogênese interferindo na diferenciação e proliferação celular através da inibição da atividade transcricional de *E47/HEB*. Já foram identificados casos de LLA-T com translocações sinérgicas afetando *TALI/2* e *LMO1/2* (FERRANDO; LOOK, 2003).

*TLX1* está fisiologicamente envolvido no desenvolvimento do fígado e não é expresso durante o desenvolvimento normal da célula T. Os pacientes LLA-T *TLX1* positivos compartilham um perfil de expressão semelhante que é caracterizado pela parada da linfopoiese no estágio cortical precoce da célula T, assim como nos casos *TLX3* positivos (Figura 1.2) (FERRANDO; LOOK, 2003).

Já o subgrupo que contempla o acometimento da célula T em seu estágio mais imaturo, LLA-ETP, é caracterizado pela expressão aberrante de *LYL1* e mutações em fatores de transcrição hematopoiéticos, como *RUNX1* e *ETV6*. Assim como ocorre nos pacientes *LMO1/2* e *TALI/2*, translocações em *LYL1* ocorrem de forma sinérgica com rearranjos em *LMO2*, resultando em uma cooperação oncogênica entre esses dois genes. Apesar dos altos níveis de expressão de *LYL1*, os pacientes com rearranjo nesse gene não são necessariamente

associados com o desenvolvimento da célula T imatura, mas induzem uma assinatura de expressão semelhante a de TAL1/LMO2 (Figura 1.2) (HOMMINGA *et al.*, 2011).



**Figura 1.2.** Perfil de expressão gênica dos timócitos em diferentes estágios de seu desenvolvimento. Os casos *LYL1* positivos (*LYL1+*) possuem uma assinatura de expressão gênica correspondente às células precursoras-T mais imaturas, chamadas de duplo negativas por não apresentarem moléculas CD4 e CD8. Os casos *TLX1+* ou *TLX3+* possuem perfil de expressão gênica correspondente aos timócitos no estágio cortical recém diferenciados em duplos positivos (CD4+ CD8+). Estas células seguem o processo maturativo e até o estágio cortical tardio, que possui uma assinatura de expressão encontrada nos casos *TAL1+*, *LMO1+* ou *LMO2+*. No desenvolvimento linfóide normal, estes timócitos passarão pela última etapa de desenvolvimento onde, após o processo de seleção negativa e positiva, se tornam células-T maduras simples positivas, CD4+CD8- ou CD4-CD8+ (modificado de FERRANDO; LOOK, 2003).

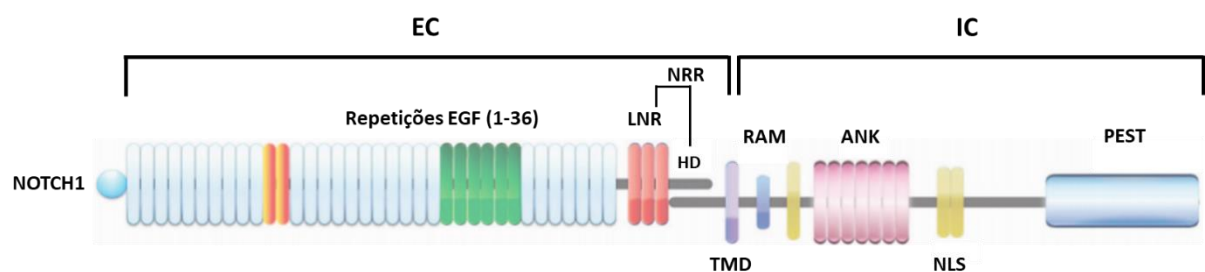
### 1.2.2. Via NOTCH1

O gene *NOTCH1* está localizado na região cromossômica 9p34.3 e pertence à família de genes *NOTCH* formado por mais três outros membros, *NOTCH2-4*, sendo todos codificadores de proteínas que atuam como receptoras transmembrana. Para o desenvolvimento linfóide, destaca-se a via de sinalização de NOTCH1, que é essencial para o comprometimento dos progenitores hematopoiéticos com a linhagem T e para o processo de maturativo dos timócitos (KOCH; RADTKE, 2011b).

Estruturalmente, o receptor maduro NOTCH1 é formado por duas subunidades associadas de forma não-covalente, uma subunidade extracelular (NEC) e uma transmembrana (NTM). A unidade NEC é composta por um domínio EGF (fator de crescimento epidermal) com 36 repetições, um domínio de heterodimerização (HD) e um

domínio com três LNR (repetições *LIN-12/NOTCH*), este último sendo responsável pela estabilização das subunidades NEC e NTM. Já a subunidade NTM, possui o domínio transmembrana, o domínio NICD - que é formado pela porção N-terminal do domínio RAM (proteína ligadora recombinante), um domínio com sete repetições de ankirina (ANK), e os motivos TAD (domínio de transativação) e PEST (domínio polipeptídico enriquecido em prolina, glutamato, serina e treonina) (Figura 1.3) (TIEN; RAJAN; BELLEN, 2009).

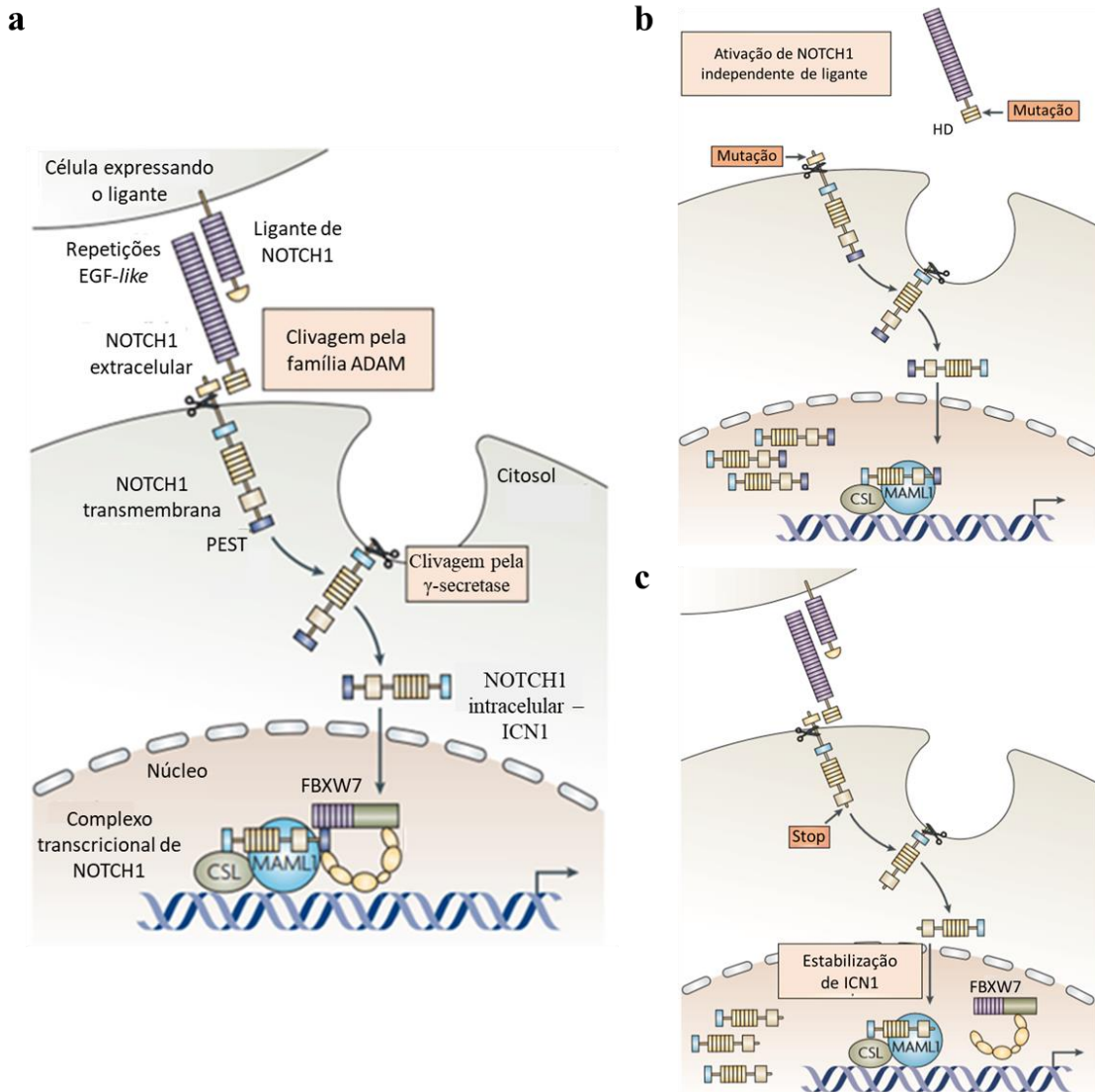
Dessa forma, o é possível dividir este receptor em duas porções principais: extracelular (EC) e intracelular (IC). A primeira abrange a subunidade NEC até parte do domínio HD e, a segunda é compreendida por parte deste domínio até a região PEST (Figura 1.3). Cada domínio desta proteína possui sua função específica, o domínio HD, por exemplo, é responsável pela estabilização da estrutura do receptor e, o domínio PEST participa da degradação fisiológica via proteassoma de NOTCH1. Após a ativação do receptor, a porção intracelular de NOTCH1 é liberada para o núcleo da célula (ICN1) (Figura 1.3) (KOPAN; ILAGAN, 2009; YAVROPOULOU; YOVOS, 2014).



**Figura 1.3.** Estrutura do receptor NOTCH1. O receptor NOTCH1 é uma proteína transmembrana heterodimérica composta de uma porção extracelular (EC) e intracelular (IC). A porção EC deste receptor é composta das repetições EGF e da região regulatória (NRR). A porção IC é composta de quatro domínios (RAM, ANK, TAD e PEST) e duas regiões NLS. EGF, fator de crescimento epidermal; LNR, repetições Lin12-NOTCH; HD, domínio de heterodimerização; RAM, proteína ligadora recombinante; ANK, ankirina; TMD, domínio transmembrana; NLS, sequência de localização nuclear; PEST, polipeptídeo enriquecido em prolina, glutamato, serina e treonina (modificado de (KOPAN; ILAGAN, 2009; YAVROPOULOU; YOVOS, 2014).

Foram identificadas 5 diferentes proteínas com capacidade de ligação ao receptor NOTCH1, sendo elas: *Delta-like-1*, *Delta-like-3*, *Delta-like-4*, *Jagged-1* e *Jagged-2*. Estas proteínas conseguem se ligar ao receptor na sua porção extracelular através do domínio EGF. Uma vez o ligante acoplado ao receptor, são iniciadas uma série de clivagens proteolíticas, sendo a primeira catalisada por uma proteína da família das metalo-proteínas ADAM, como ADAM10. O segundo evento de clivagem ocorre na porção intracelular de NOTCH1 e é

orquestrado pelo complexo da  $\gamma$ -secretase. Estes dois eventos resultam na liberação de ICN1 da membrana celular e, devido aos dois domínios NLS (*nuclear localization sequences*) presentes nesta porção, ICN1 é translocado ao núcleo. No núcleo celular, ICN1 se associa ao repressor transcricional CSL (RBPJ) e, essa interação promove o recrutamento de proteínas co-ativadoras, como *mastermind-like 1* (MAML1) e a histona acetilase P300, formando o complexo transcricional de NOTCH1 (Figura 1.4a).



**Figura 1.4.** Sinalização fisiológica e oncogênica da via NOTCH1. **a.** A via NOTCH1 é ativada a partir do acoplamento do ligante ao domínio EGF (epidermal growth factor) na região extracelular do receptor. Este evento promove uma alteração conformacional no domínio de heterodimerização (HD) de NOTCH1 que permite a clivagem pelas proteínas da família ADAM e posteriormente pelo complexo da  $\gamma$ -secretase. Esses dois eventos de clivagem promovem a liberação da porção intracelular de NOTCH1 (ICN1), que é translocado para o núcleo celular onde se associa a outras proteínas, como CSL e MAML1,



formando ao complexo transcrricional de NOTCH1. **b.** Mutações no domínio HD de NOTCH1 podem tornar o receptor mais suscetível a clivagem mediada por metalo-proteinases no domínio HD, de uma forma independente do estímulo um ligante. **c.** Alternativamente, mutações no domínio PEST podem estabilizar a proteína ICN1 inibindo a sua degradação mediada por FBXW7 (modificado de AIFANTIS *et al.*, 2008).

A primeira evidência de que a via NOTCH1 é um importante elemento na leucemogênese-T surgiu no início dos anos 90, quando Ellisen e cols identificaram a rara translocação cromossômica t(7;9) (q34;q34.3) envolvendo o gene *NOTCH1* que levava a superativação desta via na LLA-T humana (ELLISEN *et al.*, 1991). Porém, o conhecimento sobre a relevância do papel de NOTCH1 na patogênese desta doença foi evidenciada a partir da identificação das mutações nesta via em cerca de 60% dos pacientes diagnosticados com LLAs-T em 2004 (WENG *et al.*, 2004). Estas mutações, que são capazes de promover a ativação constitutiva da via NOTCH1, acometem, principalmente, os domínios HD e PEST do gene, podendo também ocorrer em ambos. É importante ressaltar que o domínio classicamente conhecido como PEST é composto, na verdade, pelos domínios PEST e TAD, portanto, mutações que afetam a região do domínio TAD são também descritas como mutações no PEST.

A localização da mutação envolvendo o gene *NOTCH1* pode influenciar na maneira como a via será ativada. Sabe-se que o domínio HD é importante para a associação estável entre as porções intra e extracelular do receptor NOTCH1, e, além disso, previne a ativação de NOTCH1 independente de interação com ligante. Portanto, mutações neste domínio geram instabilidade no receptor, aumentando a liberação de ICN1 e, conseqüentemente, sua translocação para o núcleo celular (Figura 1.4b). Já no caso do domínio PEST, que tem como função controlar a meia-vida do ICN1 no núcleo, mutações neste domínio promovem estabilização desta proteína a partir do aumento da sua meia-vida (Figura 1.4c) (GUPTA-ROSSI *et al.*, 2001; WENG *et al.*, 2004). Funcionalmente, mutações pontuais no gene *FBXW7* são identificadas em 8-30% dos pacientes diagnosticados com LLA-T e são relacionadas a mutações no domínio PEST de *NOTCH1*, já que resultam na ativação da via NOTCH1 através do aumento da estabilização da proteína ICN1.

Cerca de 25% dos casos de LLA-T possuem mutações no domínio HD associadas a mutações em PEST ou *FBXW7*, o que resulta na ativação constitutiva da via NOTCH1 que combina a ativação do receptor independente de ligante e estabilização de ICN1 (WENG *et al.*, 2004). Um estudo realizado em linhagens celulares humanas (U2OS) transfectadas com um plasmídeo contendo um gene para luciferase responsivo ao *NOTCH1* demonstrou que o nível de ativação da via é relacionado ao domínio mutado. Mutações somente em HD,

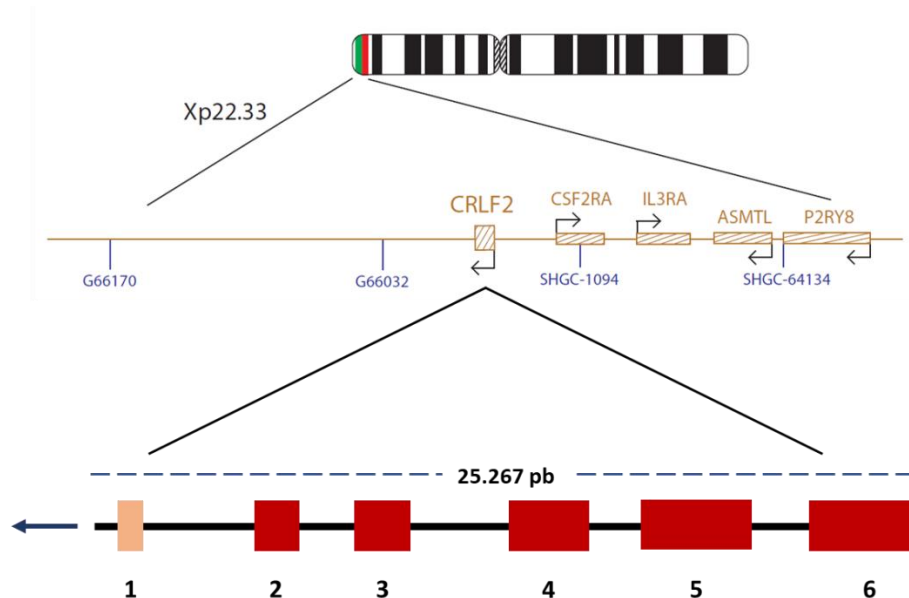
promovem um aumento de até 9 vezes desta atividade, mutações só no domínio PEST um aumento de 2 vezes e, no caso de mutações em ambos os domínios o aumento era bastante expressivo, de 40 vezes (WENG *et al.*, 2004). Desta forma, sabe-se que há um efeito sinérgico das mutações quando elas se combinam em ambos os domínios.

### **1.2.3. *CRLF2* - identificação de um novo marcador na LLA-T**

Sabendo da importância da identificação de biomarcadores moleculares que possam auxiliar na prática clínica da doença e, ainda, que a LLA-T é um subtipo leucêmico já considerado de alto risco, novos estudos têm sido propostos para investigação marcadores que possam auxiliar nos protocolos terapêuticos para estes pacientes. Portanto, recentemente, a partir de ensaios de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), dois estudos identificaram que 15% dos pacientes diagnosticados com LLA-T possuíam a superexpressão de *CRLF2*, um marcador reconhecidamente de pior prognóstico na LLA-B (PALMI *et al.*, 2016; SCHMÄH *et al.*, 2017).

#### **1.2.3.1. *CRLF2* – caracterização e função**

O gene *CRLF2*, *citokine receptor like factor 2*, também denominado *TSLPR* está localizado na região Pseudoautosômica 1 (PAR1) de ambos cromossomos sexuais (Xp22.3/Yp11.3) (Figura 1.5). Estruturalmente, possui 6 éxons e, apesar de *CRLF2* ser um receptor de citocina tipo 1, ele possui algumas particularidades incomuns para este tipo de receptor. Por exemplo, *CRLF2* não possui o segundo de 4 domínios extracelulares conservados de resíduos de cisteína sugerindo que esta proteína possa ter um padrão único de dobramento. Além disso, *CRLF2* mantém a sequência chamada *box1*, encontrada em outros receptores de citocina, porém perde a sequência conservada *box2*. Estes motivos são responsáveis por regular a ligação das proteínas *Janus tyrosine kinase* (JAK) a este receptor (FUJIO *et al.*, 2011). Por fim, diferente dos outros receptores de citocina, *CRLF2* contém um único resíduo de tirosina a 4 aminoácidos de distância de sua região C terminal (PARK *et al.*, 2000).

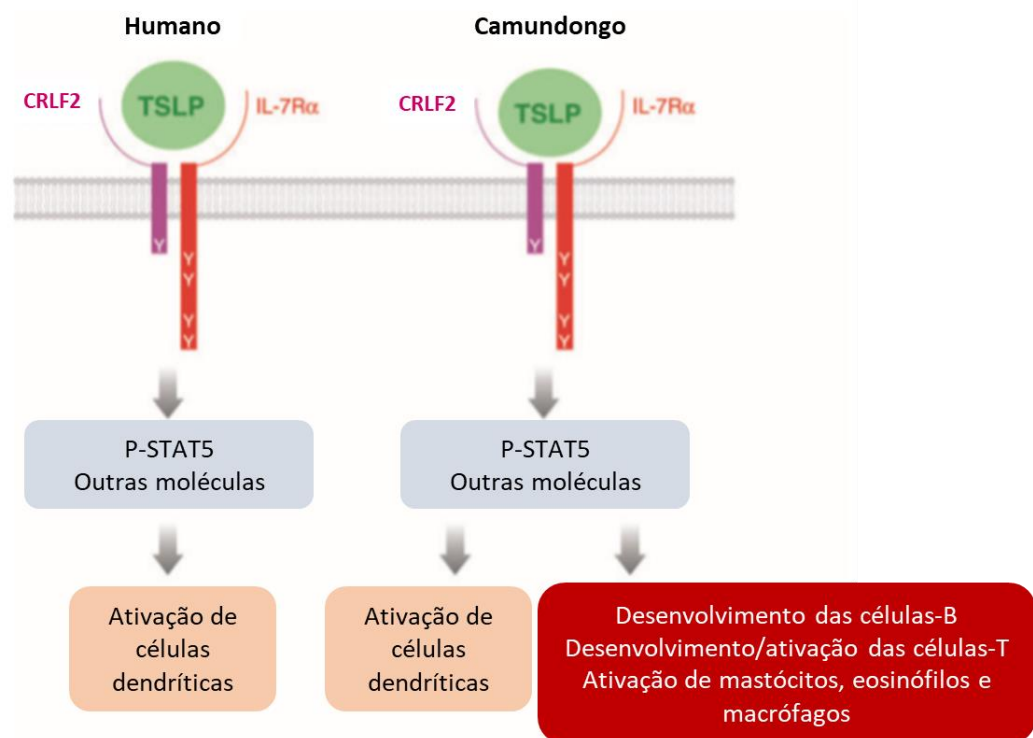


**Figura 1.5.** Esquema ilustrativo da localização cromossômica de *CRLF2* e sua estrutura. *CRLF2* está localizado na região Pseudoautosômica 1 (PAR1) no braço curto dos cromossomos sexuais, na figura representado pelo X, adjacente aos genes *CSF2RA*, *IL3RA*, *ASMTL* e *P2RY8*. Estruturalmente, possui 6 éxons, sendo que sua região promotora está localizada próxima ao primeiro éxon do gene.

O receptor *CRLF2* se liga a citocina TSLP (*Thymic stromal-derived lymphopoietin*) com baixa afinidade, mas a sua combinação com a cadeia alpha do receptor de interleucina 7 (*IL7R $\alpha$* ) resulta não só no aumento da afinidade dessa ligação como também na ativação de *STAT5* e proliferação celular mediada por TSLP. Portanto o receptor funcional para a citocina TSLP é um complexo heterodimérico que consiste no *CRLF2* e *IL7R $\alpha$* . Esta formação sugere que estes dois receptores desencadeiam a ativação de uma via de sinalização em comum. Estudos iniciais em camundongos mostraram que o tanto *Crlf2* quanto *Il7r* promovem a ativação do fator de transcrição *Stat5* e posterior indução da expressão de outros genes, como *Jak1* e *Jak2* (Figura 1.6) (PARK *et al.*, 2000; RECHE *et al.*, 2001).

Alguns estudos *in vitro* indicaram que TSLP tem papel no crescimento de progenitores B no fígado fetal e na medula óssea do adulto e, no comprometimento destas células com o subtipo B. Além disso, estudos iniciais evidenciaram que TSLP pode influenciar no desenvolvimento das células-T. Apesar de exercer um efeito sinérgico com *IL-1 $\beta$*  no crescimento dos tímócitos mais imaturos (*CD4-CD8-*), esta citocina afeta, de forma modesta, o crescimento dos tímócitos. Fisiologicamente, TSLP parece exercer um papel crucial na homeostase das células T *CD4+* nas mucosas periféricas associadas ao tecido linfoide e para a seleção positiva das células T regulatórias no timo (SIMS *et al.*, 2000; WATANABE *et al.*,

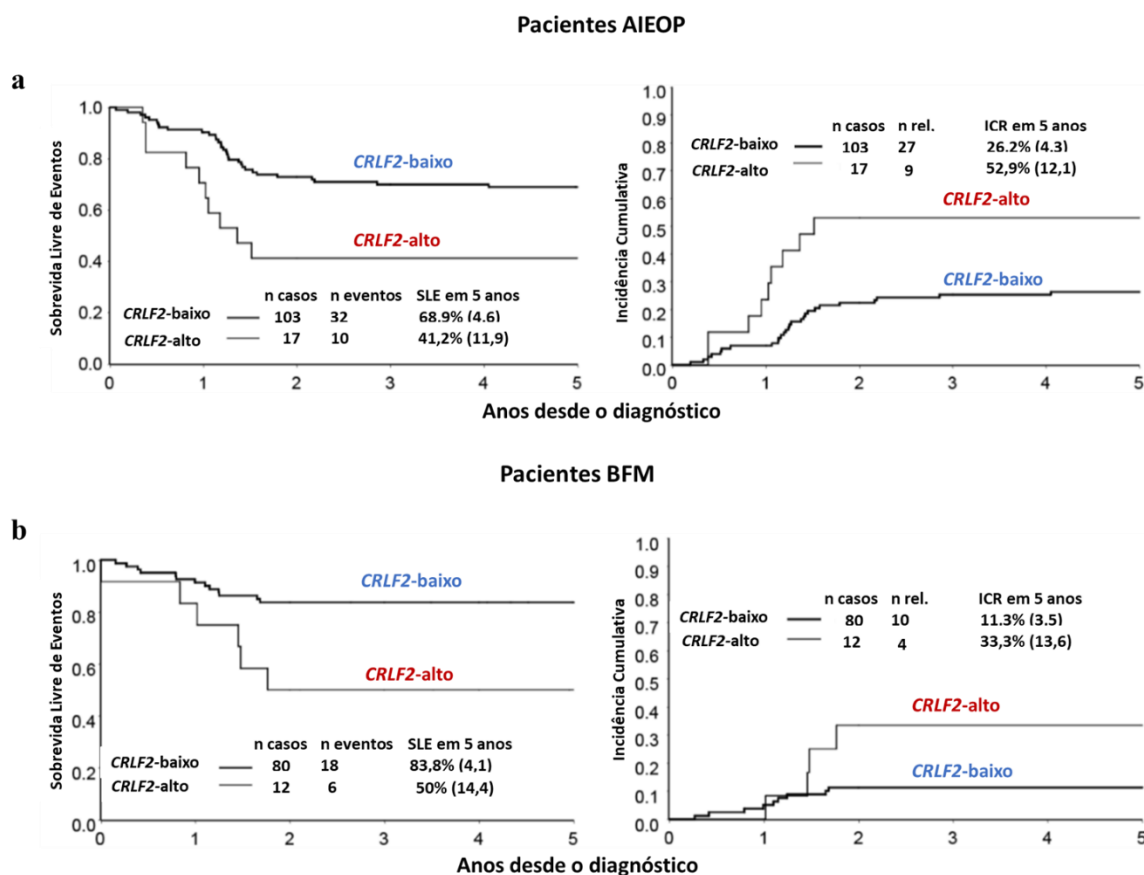
2004, 2005). Os sinais que controlam a produção de TSLP ainda não são bem conhecidos, porém já se sabe que, em algumas doenças inflamatórias, como nas dermatites atópicas, há um aumento considerável da expressão de TSLP em resposta a inflamação. Nos locais onde ocorre este aumento, TSLP é capaz de acentuar o processo maturativo e a ativação das células dendríticas assim como a estimular os macrófagos residentes. As células dendríticas estimuladas por TSLP migram para os linfonodos e conduzem a produção de citocinas inflamatórias das células T *helper* 2 pelas células T CD4+. Dessa forma, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos são atraídos para estes sítios contribuindo para a patogênese. Como a ausência de linfócitos não é capaz de anular a inflamação mediada por TSLP, o recrutamento e ativação das células mieloides parece ser o suficiente para iniciar a o processo patogênico. Alguns têm demonstrado que o bloqueio de TSLP pode ser eficaz no tratamento de doenças alérgicas inflamatórias (LI *et al.*, 2005; SOUMELIS *et al.*, 2002).



**Figura 1.6.** Estrutura do receptor de TSLP em humanos e camundongos. CRLF2 e IL7Rα se heterodimerizam para formar o receptor para TSLP. A estimulação por esta citocina induz a ativação e fosforilação de STAT5 (P-STAT5-P), assim como a ativação de outras vias ainda não bem elucidadas. Em humanos, TSLP ativa diretamente as células dendríticas através da regulação de moléculas co-estimuladoras, promove a sobrevivência celular e secreção de quimiocinas. Em camundongos, já foi reportado que TSLP promove o desenvolvimento das células T e B e ativação dos eosinófilos e macrófagos (modificado de LIU *et al.*, 2007).

### 1.2.3.2. *CRLF2*– valor prognóstico

O primeiro estudo clínico-molecular foi realizado em 212 pacientes pediátricos diagnosticados com LLA-T e tratados seguindo os protocolos dos grupos *Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica* (AIEOP) e *Berlin-Frankfurt-Münster* (BFM) (protocolo AIEOP-BFM ALL 2000). Nestas séries de casos observou-se que cerca de 14% dos pacientes apresentavam superexpressão de *CRLF2*. Em nenhum destes pacientes foram encontradas alterações moleculares conhecidas que pudessem explicar esta desregulação gênica. Interessantemente, as análises de prognóstico mostraram uma sobrevida livre de recaída (41,2% ± 11,9 vs. 68,9% ± 4,6,  $p = 0,006$ ) e sobrevida global (47,1% ± 12,1 vs. 73,8% ± 4,3,  $p = 0,009$ ) significativamente inferiores em pacientes do grupo AIEOP e BFM, respectivamente, com *CRLF2* superexpresso quando comparados aqueles com baixa expressão deste gene (figura 1.7a e b). Além disso, esses pacientes apresentaram um aumento na incidência cumulativa de recaída e foram associados a resposta ruim ao tratamento com prednisona (PALMI *et al.*, 2016).



**Figura 1.7.** Associação entre a superexpressão de *CRLF2* e desfecho do tratamento. **a.** Sobrevida livre de eventos (SLE) e **b.** Incidência cumulativa de recaída dos pacientes dos grupos *Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica* (AIEOP) e *Berlin-Frankfurt-Münster* (BFM) (protocolo AIEOP-BFM ALL 2000). De acordo com a expressão

de *CRLF2*. Por estas análises é possível observar que os pacientes *CRLF2*-alto possuem uma pior sobrevida livre de eventos e uma maior incidência cumulativa de recaída quando comparados aos pacientes *CRLF2*-baixo (modificado de PALMI *et al.*, 2016).

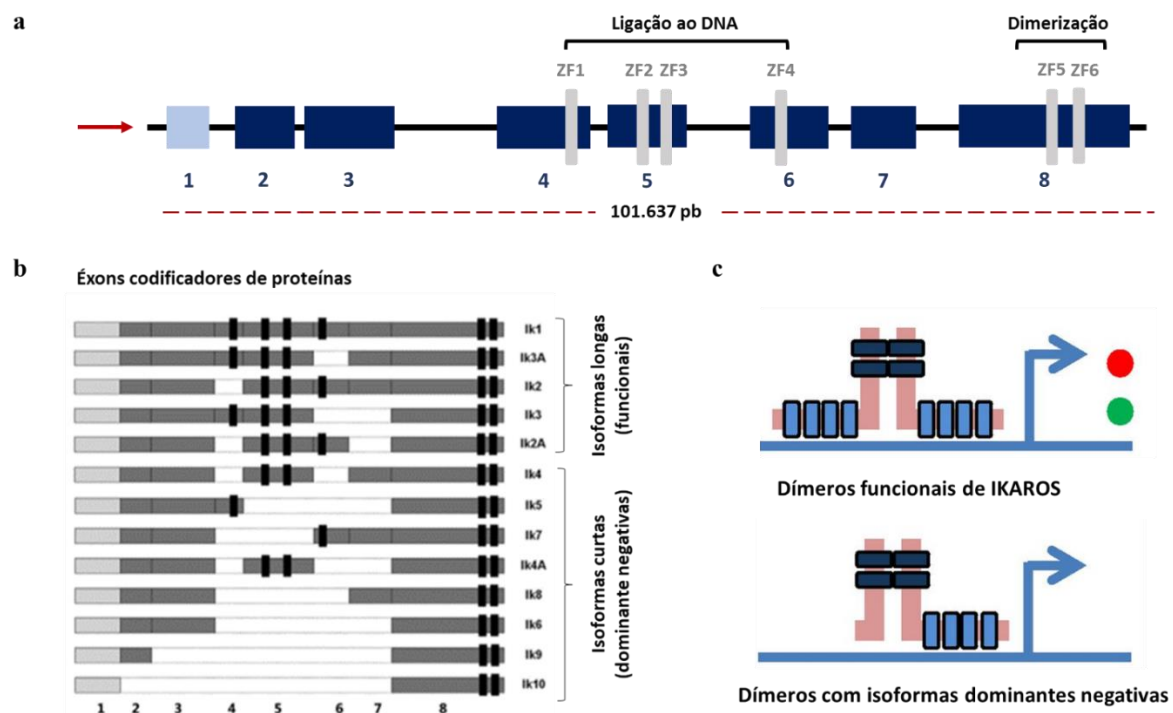
Neste mesmo estudo, experimentos *in vitro* mostraram que blastos leucêmicos com *CRLF2* superexpresso tratados com Ruxolitinib (inibidor de JAK) apresentavam uma diminuição na fosforilação de STAT5 induzida por TSLP. Sugerindo então que pacientes com superexpressão de *CRLF2* poderiam se beneficiar com tratamentos alternativos utilizando inibidores da via JAK (PALMI *et al.*, 2016).

Posteriormente, outro estudo demonstrou a superexpressão de *CRLF2* em 14,6% dos pacientes diagnosticados com LLA-T. Este último também observou que pacientes com superexpressão de *CRLF2* respondiam mal ao tratamento com prednisona quando comparados aqueles com baixa expressão deste gene (16/26 [62%] vs. 53/152 [35%];  $p = 0,02$ ) (SCHMÄH *et al.*, 2017).

### 1.3. *IKZF1* – regulador mestre da linfopoiese

O gene *IKZF1*, localizado no braço curto do cromossomo 7, é responsável por codificar a proteína IKAROS - um importante regulador transcricional expresso exclusivamente no sistema linfoide e necessário para o desenvolvimento de todas as linhagens linfoides (GEORGOPOULOS *et al.*, 1994). IKAROS é membro da família de fatores de transcrição do tipo “dedos de zinco” (*zinc-finger*), assim como HELIOS, AIOLOS, EOS e PEGASUS (KAUFMANN *et al.*, 2003; KELLEY *et al.*, 1998). *IKZF1* possui 8 éxons, sendo apenas o primeiro não-codificante, porém, acredita-se que este éxon, ainda que não codifique a proteína, seja necessário para regulação da sua transcrição (IACOBUCCI *et al.*, 2012; OLSSON; JOHANSSON, 2015; YOSHIDA *et al.*, 2013). Estruturalmente, na sua região N-terminal, IKAROS possui um domínio de ligação ao DNA, codificado pelos éxons 4, 5 e 6 e formado por quatro dedos de zinco. Este domínio é responsável pela ligação da proteína IKAROS a regiões promotoras do DNA de seus genes alvo. Na região C-terminal da proteína encontra-se o domínio de dimerização, que é codificado pelo éxon 8 e formado por dois dedos de zinco. Este domínio possibilita a formação de homo ou heterodímeros com diferentes isoformas de *IKZF1* ou com outros membros de sua família (Figura 1.8a) (IACOBUCCI *et al.*, 2012; YOSHIDA *et al.*, 2013). Fisiologicamente, a regulação de *IKZF1* é mediada pelo mecanismo de *splicing* alternativo que pode gerar, em humanos, pelo menos 13 isoformas diferentes desta proteína (Figura 1.8b). Estas isoformas podem ser classificadas em duas categorias, ligadoras de DNA (isoformas longas ou funcionais) e dominantes negativas. A

principal diferença entre estas duas categorias é a presença do domínio funcional de ligação ao DNA. Todas as isoformas de IKAROS contém dois domínios *zinc-finger* C-terminal de dimerização a proteínas, porém, nem todas as isoformas contém os domínios *zinc-finger* N-terminal necessários para ligação ao DNA. As isoformas funcionais de IKAROS formam dímeros e medeiam a repressão transcricional dos seus genes alvo, já as dominantes negativas formam dímeros com estas isoformas impedindo a sua ligação ao DNA dos genes alvo, inibindo a sua função (Figura 1.8c) (REBOLLO; SCHMITT, 2003; VSHYUKOVA; VALOCHNIK; MELESHKO, 2018).

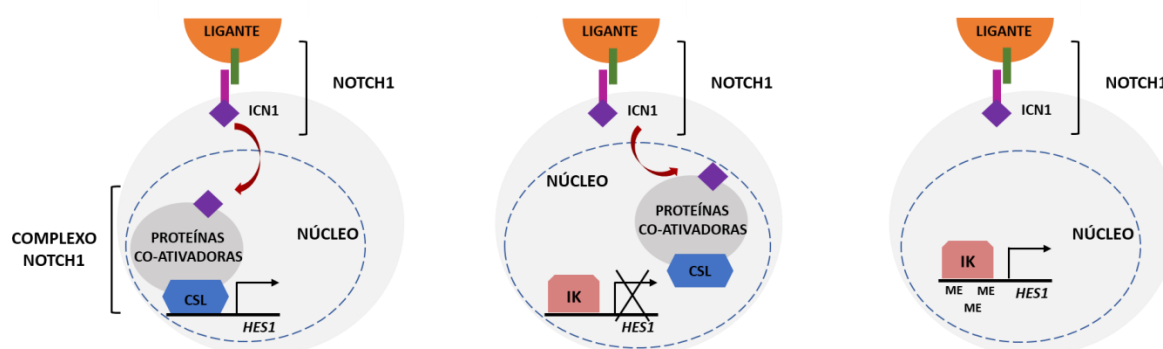


**Figura 1.8.** Estrutura de *IKZF1* e isoformas de IKAROS. **a.** Representação esquemática do gene *IKZF1*, composto por 8 éxons (retângulos) e 6 dedos de zinco (ZF) representados pelas barras cinzas. O fator de transcrição IKAROS é codificado pelos éxons de 2 a 8 (azul escuro). **b.** IKAROS pode ser representado em 13 isoformas, funcionais ou dominante-negativas, e é formado por um domínio de ligação ao DNA e um domínio de dimerização. **c.** Com a formação de homodímeros pela ligação ao domínio de dimerização (retângulos cor azul-escuro), o complexo se liga ao DNA pelo domínio de ligação ao DNA (retângulos cor azul-claro) sendo capaz de exercer sua função regulatória sobre outros genes. Seja ativando (círculo verde) ou reprimindo (círculo vermelho) seu alvo. Diante de uma proteína dominante-negativa, a resposta é uma formação de heterodímeros, que perde essa capacidade funcional (Modificado de RAETZ; CARROLL, 2015; VSHYUKOVA; VALOCHNIK; MELESHKO, 2018).

Estudos *in vivo* já demonstraram a importância da função de supressor tumoral de IKAROS no desenvolvimento e proliferação linfóide, através de experimentos com camundongos “*knockout*”. Nestes estudos, foi observado que a ausência de IKZF1 resultava no surgimento de linfoma ou LLA-T nestes animais (GEORGOPOULOS *et al.*, 1994; WINANDY; WU; GEORGOPOULOS, 1995). Entretanto, em humanos, as alterações em *IKZF1* (deleções e mutações – do tipo *frameshift* ou *missense*) são pouco frequentes acometendo ~5% dos casos de LLA-T (KASTNER; CHAN, 2011).

#### 1.4. Inter-relação entre os genes *CRLF2*, *IKZF1* e *NOTCH1*

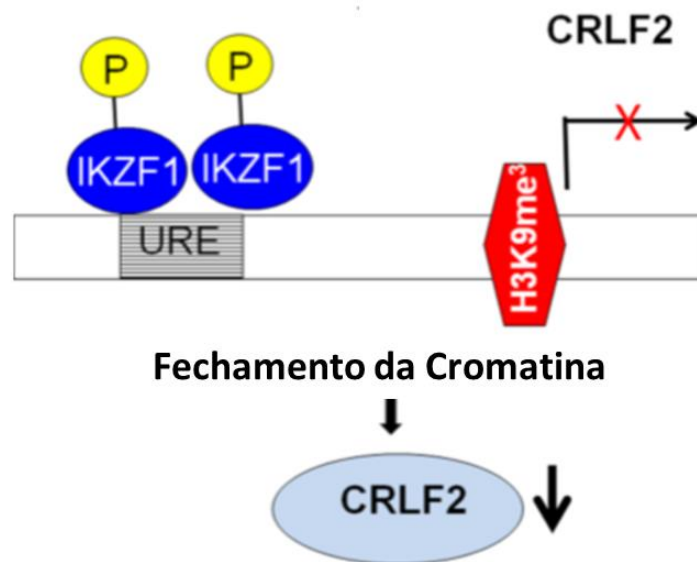
Inicialmente, foi sugerido por Beverly e Capobianco que IKAROS pode antagonizar a ativação dos genes alvo da via de NOTCH1. Estudo em linhagens celulares de murinos mostraram que a presença da isoforma completa de Ikaros (Ik1) causa a parada do ciclo celular associada a repressão transcricional de genes da via Notch, como *Hes1*. Sendo capaz de reconhecer a mesma sequência de DNA que CSL (TGGGAA), Ikaros compete com esta proteína pela região promotora de seus genes alvo. Desta forma, quando há maior disponibilidade de Ikaros no núcleo celular, esta se liga a região promotora de *Hes1*, impedindo a ligação do complexo transcricional de NOTCH1 através da proteína CSL, causando repressão transcricional deste gene (Figura 1.9) (BEVERLY; CAPOBIANCO, 2003; KLEINMANN *et al.*, 2008).



**Figura 1.9.** Modelo representativo da competição entre IKZF1 e CSL. Quando o receptor NOTCH1 é ativado através do acoplamento do ligante, a subunidade intracelular de NOTCH1 (ICN1) transloca para o núcleo da célula. No núcleo celular, ICN1 forma, junto a outras proteínas, o chamado complexo transcricional de NOCTH1. A proteína ligadora de DNA deste complexo, CSL, se liga a região promotora dos genes alvo da via NOTCH1, como *HES1*, ativando a sua transcrição. Quando há maior disponibilidade da proteína IKAROS no núcleo celular, esta se liga ao mesmo sítio na região promotora de *HES1*, impedindo a ligação por CSL e induzindo à modificação H3K9me<sup>3</sup> que leva a sua repressão transcricional.



Recentemente, um estudo demonstrou que *IKZF1* é um importante regulador direto da expressão de *CRLF2*. Ao se ligar a região promotora de *CRLF2*, IKAROS induz a trimetilação da lisina 9 na histona 3 (H3K9me3) neste sítio. Essa modificação de histona resulta no remodelamento da cromatina para compactação desta região, levando a repressão transcricional de *CRLF2*. Além disso, ensaios *in vitro* com linhagens celulares humanas, demonstraram que o silenciamento da expressão de *IKZF1* a nível de mRNA é capaz de elevar os níveis transcricionais de *CRLF2* (Figura 1.10) (GE *et al.*, 2016).



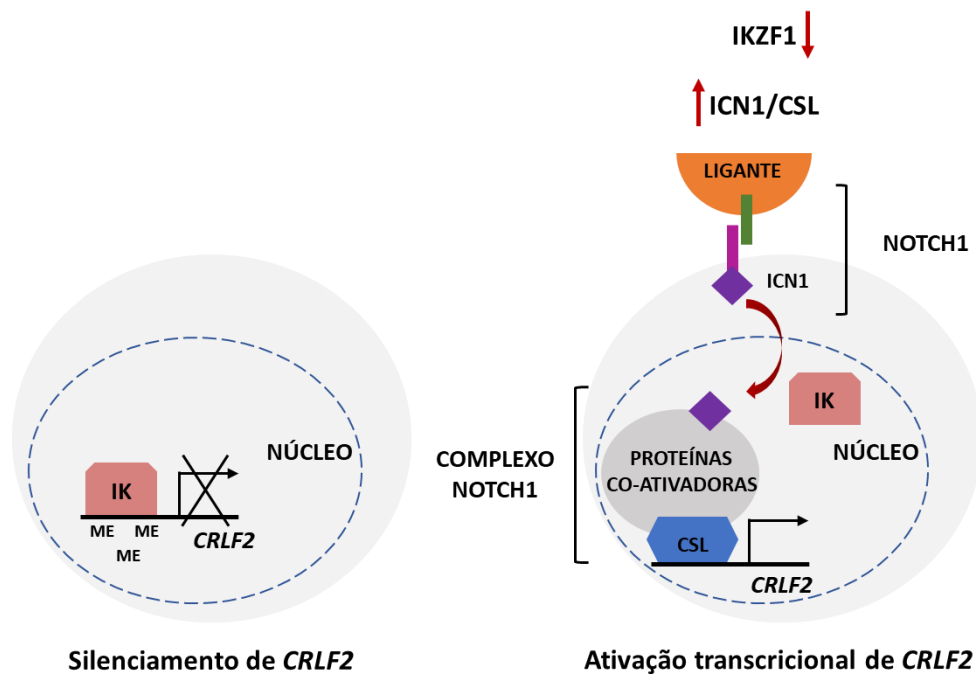
**Figura 1.10.** Modelo sugerido por Ge Z e cols. para regulação de *CRLF2* por *IKZF1*. Ao se ligar a região promotora de *CRLF2*, IKAROS induz a compactação da cromatina no local, através da trimetilação da lisina 9 na histona 3 (H3K9me<sup>3</sup>) Esta modificação leva a repressão transcricional deste gene (modificado de GE *et al.*, 2016).

## 2. Justificativa do estudo

Como apresentado anteriormente, a LLA-T representa um subtipo menos frequente e de pior prognóstico quando comparada às LLA-B. Ainda, não há marcadores moleculares que possam auxiliar na prática clínica destes pacientes, possibilitando uma melhor estratificação de risco, nos protocolos terapêuticos vigentes.

Um potencial marcador para estes pacientes é a superexpressão de *CRLF2*, que foi identificada em quase 15% de casos diagnosticados com LLA-T em dois estudos diferentes (PALMI *et al.*, 2016; SCHMÄH *et al.*, 2017). Foi observado que a maior parte destes pacientes respondiam mal ao tratamento inicial com corticoide, tinham uma pior sobrevida livre de eventos e uma maior incidência cumulativa de recaída quando comparados aos pacientes com baixa expressão de *CRLF2*. Porém, nenhuma alteração molecular foi descrita como mecanismos promotor desta desregulação gênica nestes pacientes (PALMI *et al.*, 2016; SCHMÄH *et al.*, 2017). Desta forma, sugerimos a importância da melhor compreensão da leucemogênese nestes casos de LLA-T, por seu potencial como marcador molecular para estratificação de risco destes pacientes. Como a via NOTCH1 é crucial para o desenvolvimento normal e patogênico das células-T e, sabe-se que esta via é antagonizada por IKAROS, um repressor transcricional de *CRLF2*, sugerimos que a associação destes fatores pode estar relacionada com a superexpressão de *CRLF2*.

Desta forma, hipotetizamos que a superexpressão de *CRLF2* está associada à baixa atividade de IKAROS, seja pela redução da sua expressão gênica ou pela ativação aberrante da via NOTCH1 (aumento da disponibilidade de ICN1 no núcleo celular) (Figura 2.1).



**Figura 2.11.** Modelo sugerido para explicar a superexpressão de *CRLF2* nas LLAs-T. Fisiologicamente, IKAROS se liga a região promotora de *CRLF2* levando a sua repressão transcricional. CSL, a proteína ligadora de DNA do complexo transcricional de NOTCH1, é capaz de reconhecer o mesmo motivo de ligação de IKAROS. IK, IKAROS; ICN1, subunidade intracelular de NOTCH1.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo principal**

- Investigar a relação entre a disfunção de IKAROS causada pela sua baixa expressão gênica ou pela presença de mutações em *NOTCH1/FBXW7* com a desregulação de *CRLF2* em pacientes com LLA-T.

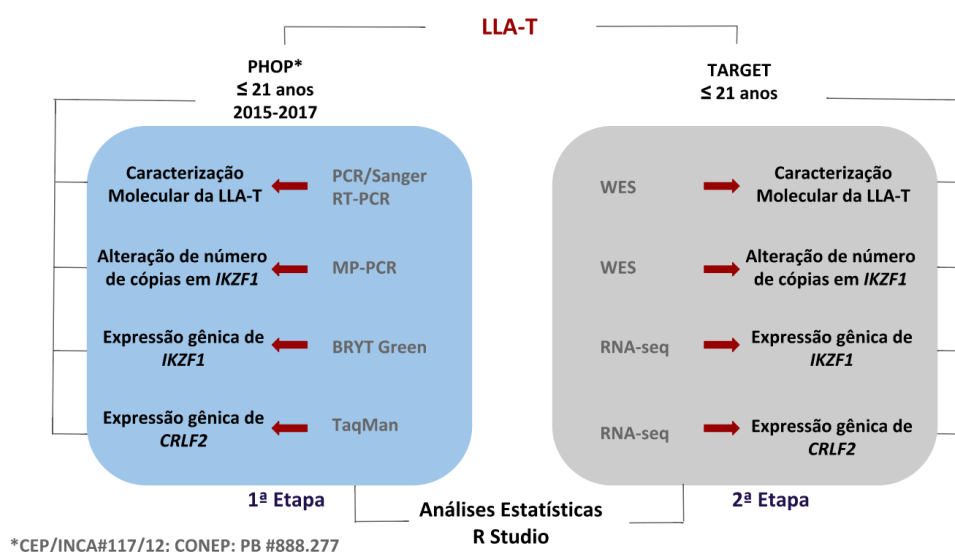
#### **3.2. Objetivos secundários**

- Estabelecer o ponto de corte de maior acurácia e mais adequado para a análise da expressão do mRNA de *CRLF2* nas amostras incluídas no estudo;
- Rastrear a presença de alterações moleculares (deleções e mutações) em *IKZF1*;
- Avaliar uma possível correlação entre as expressões de *CRLF2* e *IKZF1* na LLA-T;
- Caracterizar os pacientes das coortes avaliadas de acordo com os grupos de expressão de *CRLF2*;
- Investigar o impacto da presença de mutações ativadoras em *NOTCH1/FBXW7* na expressão de *CRLF2* nos pacientes diagnosticados com LLA-T.

#### 4. Materiais e métodos

Para alcançar os objetivos propostos neste estudo, foram avaliadas duas coortes independentes. A primeira formada pelos pacientes cadastrados no Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico (PHOP) do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA e, a segunda coorte, que contempla as amostras que tiveram seus dados disponibilizados através da iniciativa do *National Cancer Institute (NCI): Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments (TARGET)* acessível no endereço eletrônico <https://ocg.cancer.gov/programs/target> (LIU *et al.*, 2017).

Para melhor compreensão do trabalho, essas coortes serão denominadas coorte PHOP e coorte TARGET e, todos os procedimentos realizados para cada uma serão descritos separadamente (Figura 4.1).



**Figura 4.12.** Desenho esquemático de estudo. A primeira etapa do projeto consistiu na análise das amostras da coorte PHOP, onde foram rastreadas alterações moleculares características da LLA-T, por PCR e sequenciamento e rastreamento de deleções em *IKZF1* por MP-PCR. Ainda, foram analisados os níveis de transcritos de *IKZF1* e *CRLF2* por RT-qPCR. A segunda etapa do estudo foi transcorrida com as amostras depositadas no TARGET, onde os dados de WES foram utilizados para caracterização molecular da LLA-T e avaliação de alteração de número de cópias de *IKZF1*. Os dados processados de RNA-seq foram aplicados para avaliação da expressão gênica de *CRLF2* e *IKZF1*. A partir dos dados gerados nas duas etapas do estudo, foram realizadas as análises estatísticas utilizando o ambiente estatístico R. MP-PCR, PCR Multiplex; WES, sequenciamento completo do exoma, RNA-seq, sequenciamento de RNA.

#### **4.1. Coorte PHOP - casuística**

Foram incluídos pacientes com idade  $\leq 21$  anos diagnosticados com LLA-T entre os anos de 2015 - 2017. Pacientes com tratamento prévio com corticoide e/ou quimioterápicos e portadores de síndromes genéticas/congênitas foram excluídos do estudo, bem como amostras com percentual de blastos inferior a 30% ou inviáveis para as análises laboratoriais. As amostras de aspirado de MO ou de sangue periférico (SP) foram caracterizadas morfolologicamente e imunofenotipicamente como LLA-T seguindo critérios previamente descritos (ARBER DA, 2016; BÉNÉ, 2005; CATOVSKY *et al.*, 1991; POMBO DE OLIVEIRA *et al.*, 2009). Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa (CEP) do INCA sob o número de protocolo CEP/INCA#117/12; CONEP: PB #888.277 (Anexo 9.1).

#### **4.2. Coorte PHOP - extração e preparação de ácidos nucleicos**

##### **4.2.1. Extração de ácido ribonucleico (RNA) e síntese do DNA complementar (cDNA)**

O RNA das amostras foi extraído de aspirados de MO ou de SP coletado em EDTA com o uso do reagente TRIzol™ (Invitrogen) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Em resumo, após o procedimento de lise de hemácias das amostras,  $5-10 \times 10^6$  células em suspensão foram homogeneizadas em 750  $\mu\text{L}$  do reagente TRIzol™ (Invitrogen). Subsequentemente, adicionou-se a esta mistura de células com TRIzol 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, homogeneizando vigorosamente por alguns segundos. Após incubação por 3 min à temperatura ambiente, as amostras foram submetidas a 12000 g por 15 min a 4°C na centrífuga 5804 R (Eppendorf). Ao final da centrifugação, ocorreu a separação da mistura em três camadas: a orgânica, a intermediária e a aquosa (transparente). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo devidamente identificado e foi a partir desta fase que extraímos o RNA propriamente dito.

Na primeira etapa pós-separação de fases, realizamos a precipitação do RNA por adição de 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol 100% gelado seguida de incubação à temperatura ambiente por 15-20 min e posterior centrifugação a 12000 g por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi, então, descartado e, iniciou-se a etapa de lavagem do precipitado através da adição de 1 mL de etanol 75% gelado ao *pellet*. Os tubos foram agitados brevemente e novamente centrifugados a 7500 g por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e os tubos foram mantidos abertos por 5-10 min para secagem do precipitado por evaporação do etanol remanescente. Após esta secagem, os precipitados foram diluídos em 20-50  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase,

homogeneizados e incubados em banho seco à 55-60°C por 10-15 min. Ao final estas amostras foram, então, armazenadas a -80°C.

Após a extração, o RNA foi quantificado através da leitura em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) utilizando 1 µL de cada amostra. A concentração foi dada em ng/µl, medida na absorbância de 260 nm que fornece o conteúdo total de ácido nucleico na amostra. Para verificar a pureza do RNA extraído, foram considerados como valores de referência razões próximas a 2,0, quando considerando os comprimentos de onda 260 nm e 280 nm e valores entre 2,0 e 2,2 quando considerados 260 nm e 230 nm.

Avaliamos também a integridade destas amostras de RNA através de eletroforese em gel de agarose 1% pós-corado com solução de brometo de etídio (Invitrogen) e visualizados com o auxílio do transiluminador UV ChemiDoc™ (BioRad). Pelo menos 200 ng de RNA foram aplicados no gel.

Para a síntese do DNA complementar (cDNA), 1µg de RNA foi utilizado utilizando o ensaio comercial SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen). O RNA foi inicialmente tratado com Ambion™ DNase I (RNase-free) (Invitrogen) para a retirada de qualquer contaminação possível com DNA genômico. Adicionamos 1 µl de DNase para cada 1 µg de RNA + 1 µl de tampão 10x (Invitrogen). Após incubação por 15 min a temperatura ambiente, a reação foi interrompida através da adição de 1 µl de EDTA (25mM) seguida de incubação a 65°C por 15 min.

Para iniciar a etapa de síntese de cDNA propriamente dita, foi adicionado 1,7 µl de Oligo dT a uma concentração de 50µM e 1 µl de dNTP a 10 µM. Após mais uma incubação de 5 min a 65°C, foi adicionado 4 µL de tampão 5x (Invitrogen), 2 µl de DTT (0,1M) e 1 µL de água livre de RNase. Esta mistura foi então colocada no termociclador por 2 min à 42°C. Finalmente, foi adicionado a enzima, 1 µL *SuperScript* (Invitrogen) e o tubo foi incubado por 50 min a 42°C seguido de um período de 15 min a 70°C. Ao final da reação, foram adicionados 20 µL de água livre de RNase. O cDNA foi então armazenado a -30°C.

Para avaliação da qualidade e integridade dos cDNAs sintetizados, a técnica de RT-PCR foi empregada para amplificação do segmento do gene constitutivamente expresso, *GAPDH*. As condições para a reação com volume final de 20 µL foram: 2,5 µl de cDNA, oligonucleotídeos 0,2 µM, dNTPs 0,2 µM; e solução tampão 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM e 1U de Taq DNA polimerase, reagentes disponibilizados pelo ensaio comercial Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Em um termociclador, foi programada a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 30 s; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 60°C por 30 s e extensão a 72°C por 45 s; e extensão final a 72°C por 10 min. As sequências dos oligonucleotídeos do *GAPDH* são as seguintes: GAPDH senso - 5'-

TGACCCCTTCATTGACCTCA-3' e GAPDH anti-senso - 5'AGTCCTTCCACGATACCAAA-3'. A separação dos amplicons provenientes dessa reação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, pós-corado com solução de brometo de etídio e visualizado com o auxílio do transiluminador UV ChemiDoc™ (BioRad). O tamanho do amplicon esperado era de 419 pares de base (pb).

#### **4.2.2. Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA)**

Como descrito no item 4.2.1., a fase orgânica obtida pelo processo de separação das células armazenadas em TRIzol™ (Invitrogen) com clorofórmio, foi conduzida para extração do DNA genômico.

Inicialmente, foi realizada a etapa de precipitação em que a amostra é diluída em 300 µL de etanol 100%, incubada por 3 min e centrifugada a 2000 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seguiu para a etapa de lavagem em 1 mL de solução de citrato de sódio 0,1M em etanol 10%. Esta mistura foi incubada à temperatura ambiente por 30 min, sendo periodicamente misturada por inversão e, então, conduzida para mais uma etapa de centrifugação a 2000 g por 5 min a 4°C, descartando o sobrenadante ao final desse processo. Essa etapa de lavagem com solução de citrato de sódio foi repetida. Após o descarte do sobrenadante obtido ao final da segunda etapa de lavagem, o precipitado foi ressuspensão em 1,5-2 mL de etanol 75% e incubado por 15 min à temperatura ambiente, sendo misturado por inversão periodicamente. Seguiu-se mais uma centrifugação a 2000 g G por 5 min a 4°C e descarte do sobrenadante e, os tubos contendo os precipitados foram deixados abertos à temperatura ambiente para retirada do máximo de etanol presente. Após a secagem do tubo, o precipitado foi eluído em 50 µL do tampão de eluição TE Buffer 1X (Tris-EDTA – Promega) e incubado 6 min no banho seco a 68°C. Centrifugou-se os tubos a 12000 g por 10 min para que o material insolúvel fosse removido e em seguida, o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo tubo identificado. Ao final, o DNA foi então armazenado a uma temperatura de -30°.

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

#### **4.3. Coorte PHOP - Caracterização molecular das amostras de LLA-T**



A detecção do rearranjo gênico *STIL-TAL1* e da presença de *TLX3* (alterações moleculares características da LLA-T) foram realizadas rotineiramente na chegada das amostras ao laboratório. As mutações em *NOTCH1/FBXW7* foram rastreadas posteriormente durante os projetos de pesquisa realizados no laboratório.

A identificação do rearranjo *STIL-TAL1* foi realizada pela técnica de RT-PCR, segundo critérios propostos pelo protocolo *BIOMED-1 Concerted Action* (DONGEN; MACINTYRE, 1999). Algumas adequações foram feitas na reação e, a padronização foi a seguinte para um volume final de 20 µl; 3µl de cDNA; 200µM de concentração final de dNTP; 0,5µM de concentração final dos oligonucleotídeos; tampão para PCR 10X; concentração de 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 unidade da enzima Taq polimerase. Os ciclos e as temperaturas da reação foram: desnaturação inicial à 95°C por 3min; temperatura de desnaturação 94°C por 30s; temperatura de anelamento 68°C por 60s; temperatura de extensão 72°C por 60s; e depois de 35 ciclos uma extensão final à 72°C por 5min. O par de oligonucleotídeos utilizado na primeira reação foi STIL-A senso 5'TCCCGCTCCTACCCTGCAA-3' e TAL1-B anti-senso 5'-CGCGCCAGTTCGATGAC-3', e, posteriormente, foi realizado um *semi-nested*, a partir do produto da primeira reação, com os oligonucleotídeos STIL-A senso 5'-TCCCGCTCCTACCCTGCAA-3' com TAL1-D anti-senso 5'-CCGCGTCCCGTCCCTCTA-3'. A reação de *semi-nested* foi realizada com a finalidade de aumentar a sensibilidade na detecção da fusão de interesse (Van Dongen *et al.*, 1999). Os casos positivos para esse rearranjo podem exibir três tipos de transcritos com diferentes tamanhos devido à grande ocorrência de *splicings* alternativos, podendo conter 111 pb, 267 pb ou 315 pb. O protocolo utilizado para detectar a expressão do gene *TLX3* seguiu os critérios já descritos (Bernard *et al.*, 2001). A padronização final da reação foi a seguinte: para um volume final de 20µl; 3µl de cDNA; 200µM de concentração final de dNTP; 1µM de concentração final dos oligonucleotídeos; tampão para PCR 10X; concentração de 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 unidade da enzima Taq polimerase. Os ciclos e as temperaturas da reação foram: desnaturação inicial à 95°C por 5min; temperatura de desnaturação 95°C por 30s; temperatura de anelamento 61°C por 60s; temperatura de extensão 72°C por 60s; e depois de 35 ciclos uma extensão final à 72°C por 5min. Os oligonucleotídeos utilizados foram HOX11L2 senso 5'-GCGCATCGGCCACCCCTACCAGA-3' e HOX11L2 anti-senso 5'-CCGCTCCGCCTCCCGCTCCTC-3'. A revelação de ambas reações de RT-PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado pelo transiluminador UV ChemiDoc™ (BioRad).

A técnica de PCR seguida de sequenciamento do DNA genômico foram empregadas para rastreamento de mutações em *NOTCH1* e *FBXW7*. Os éxons 26, 27 e 34 de *NOTCH1* foram

amplificados de acordo com os critérios estabelecidos por Weng e cols. (WENG *et al.*, 2004). Estes éxons codificam os domínios HD (heterodimerização), PEST (domínio polipeptídico rico em prolina, glutamina, serina e treonina) e TAD (domínio de transativação) e, são as regiões onde são descritas as mutações ativadoras deste gene. Para a amplificação do domínio HD foram necessários 3 PCRs, cada um seguido de um *nested*, totalizando 6 reações para amplificação dessa região. Para o domínio PEST foram realizados 3 PCRs (sendo um com *nested* e um simples). E para o TAD, apenas 2 PCRs - sendo o segundo *nested* do primeiro. É importante ressaltar que os domínios PEST e TAD são ditos como sendo únicos por serem codificados pela sequência localizada no éxon 34, chamados em conjunto de PEST (WENG *et al.*, 2004). Para avaliação do *FBXW7* foram realizadas duas reações de PCR para amplificação dos éxons 9 e 10 (KOX *et al.*, 2010). Os produtos destas reações foram purificados utilizando o ensaio comercial *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band purification* (GE Healthcare) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para a reação de sequenciamento de ambas as fitas de DNA foi utilizado o ensaio comercial BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). O volume de purificado foi proporcional ao tamanho do amplicon do PCR original, nesse caso os produtos utilizados tinham tamanho entre 200-500 pb, logo foram necessários de 3-10ng. O pGEM®-3Zf (+) foi utilizado como DNA controle para a reação. Então, os purificados e respectivos oligonucleotídeos a 10 µM foram distribuídos na placa de 96 poços, juntamente com 1 µl de BigDye (Applied Biosystems) e 1,5 µl de tampão de sequenciamento 5x (Applied Biosystems). A placa seguiu para o termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Lifetechnologies) e foi submetida ao protocolo de sequenciamento a seguir: 94°C por 10s, 50°C por 5s e 60°C por 4min; com 40 repetições desse mesmo ciclo. Após essa etapa, a placa passou por um processo de precipitação das amostras para retirada de dNTPs livres que podem interferir na leitura da sequência de DNA. A precipitação consistiu na centrifugação breve da placa contendo os produtos da reação, seguida da adição de 30 µL de isopropanol 75% em cada poço. A placa foi agitada vigorosamente por 10s e mantida em repouso por 15 min sob o abrigo da luz. Após esse período, centrifugou-se a placa por 45 min a uma rotação de 600 g à 4°C e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de etanol 75% e o tubo foi centrifugado por 15 min a 600 g à 4°C. O sobrenadante foi desprezado para eliminar qualquer resquício de etanol e a placa foi aquecida em um bloco a 60° por 10 min no escuro. Após este processo, os produtos de sequenciamento foram desnaturados através da adição de 10 µL Formamida HiDi (Lifetechnologies), e aquecidos a 95°C por 5 min. A eletroforese capilar foi realizada no sequenciador automático ABI3130xl (Applied Biosystems). Os eletroferogramas foram analisados com o auxílio dos programas *BioEdit Sequence Alignment*

*Editor e Mutation Surveyor*, utilizando como referência as sequências disponíveis no NCBI, do genoma GRCh38.p7.

#### 4.4. Coorte PHOP - Detecção de deleções em *IKZF1*

Para detecção das deleções no gene *IKZF1* foram utilizadas às técnicas de PCR Multiplex (MP-PCR) com uso do DNA genômico.

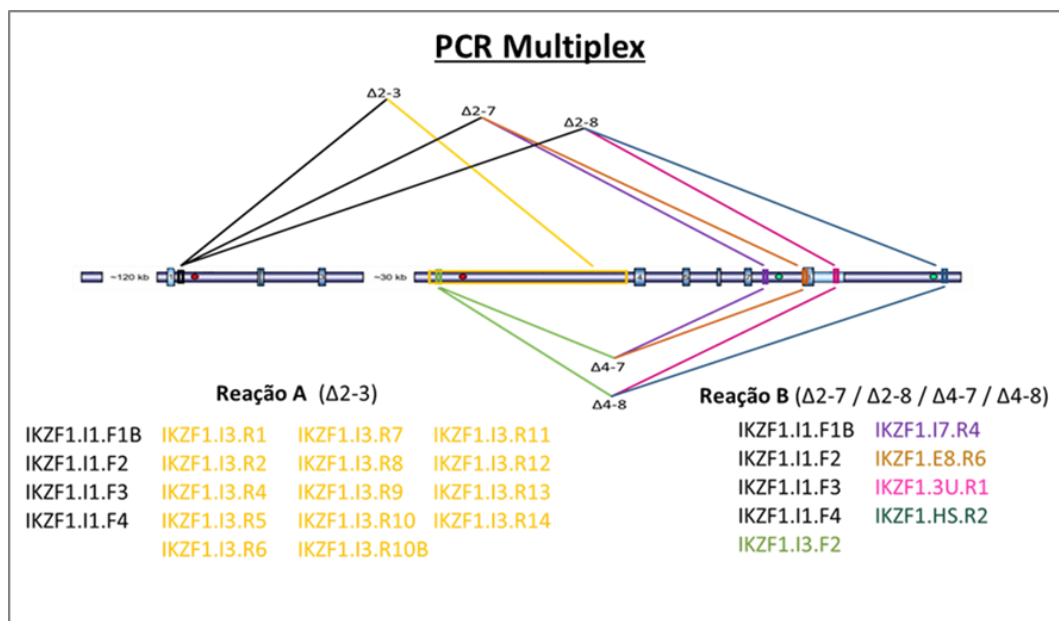
A técnica de MP-PCR é uma variante da PCR que permite a amplificação de várias regiões de interesse em uma única reação através do uso de mais de um par de oligonucleotídeos. A MP-PCR foi dividida em duas reações, denominadas A e B, conforme previamente descrito por Meyer *et al.* Resumidamente, a reação A é capaz de detectar deleções dos éxons 2-3 ( $\Delta 2-3$ ), enquanto a reação B detecta deleções dos éxons 2 a 7 ( $\Delta 2-7$ ), 2 a 8 ( $\Delta 2-8$ ), 4 a 7 ( $\Delta 4-7$ ) ou 4 a 8 ( $\Delta 4-8$ ) (Figura 4.2) (MEYER *et al.*, 2013). Os oligonucleotídeos utilizados nas reações estão listados no quadro 1. Para a reação A, os oligonucleotídeos foram agrupados em 3 diferentes misturas: i) *MP-F*: oligonucleotídeos de sentido direto; ii) *MP-R1*: oligonucleotídeos de sentido reverso numerados ímpares; iii) *MP-R2*: oligonucleotídeos de sentido reverso numerados pares. Os oligonucleotídeos da reação A foram utilizados na concentração de 4  $\mu\text{M}$  e da reação B, 10  $\mu\text{M}$ . Para ambas as reações, foi utilizado o ensaio comercial *Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Fisher Scientific) nas seguintes concentrações: 10X High Fidelity Buffer,  $\text{MgSO}_4$  2,5 mM e 1U da enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity*, dNTP 0,2  $\mu\text{M}$ . 200 ng de DNA foram utilizados para cada reação. A estratégia de ciclagem empregada foi de PCR de longa distância (LD-PCR) com duração média de 13 horas. Inicialmente as amostras passaram por uma etapa de desnaturação inicial a 93°C por 3 min, seguida de 10 ciclos a 93°C por 15 s, anelamento a 62°C por 30 s e extensão a 68°C por 18 min. Em seguida, foram realizados 32 ciclos a 93°C por 15 s, anelamento a 62°C por 30 s e extensão a 68°C por 18 min, sendo que nesta última são acrescentados 20 s por ciclo e, extensão final a 68°C por 10 min. A revelação destas reações foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (Invitrogen) e visualizada no transiluminador UV ChemiDoc™ (Bio-Rad).

Caso a reação A do MP-PCR seja positiva, a amostra testada possui  $\Delta 2-3$  de *IKZF1*, porém, caso seja positiva pela reação B, eram realizadas quatro diferentes reações para detectar quais éxons estavam acometidos nessa amostra (Figura 4.2). As novas combinações de oligonucleotídeos eram submetidas ao mesmo protocolo descrito anteriormente.

**Quadro 1.** Oligonucleotídeos utilizados para detecção de deleções em *IKZF1* pelo MP-PCR

Reação A			Reação B	
Oligonucleotídeos	Sequência		Oligonucleotídeos	Sequência
IKZF1.I1.F1B	5'-AGTTCACCTCTGTCAAGCGTCTGTTGCTCT-3'	MP-F	IKZF1.I1.F1B	5'-AGTTCACCTCTGTCAAGCGTCTGTTGCTCT-3'
IKZF1.I1.F2	5'-TGGATGTGTGTGTTTCATGCGTGGTTAATA-3'		IKZF1.I1.F2	5'-TGGATGTGTGTGTTTCATGCGTGGTTAATA-3'
IKZF1.I1.F3	5'-TCATGTGGACCATGGCTTCTTGATTCT-3'		IKZF1.I1.F3	5'-TCATGTGGACCATGGCTTCTTGATTCT-3'
IKZF1.I1.F4	5'-TGGCTGAAAATGGGTCCTAATTAGTGAAAA-3'		IKZF1.I1.F4	5'-TGGCTGAAAATGGGTCCTAATTAGTGAAAA-3'
IKZF1.I3.R1	5'-CCCAATTGATGTTAAAATTGGACTGGACCT-3'	MP-R1	IKZF1.I3.F2	5'-GAATTGCTTCACGATCACATAACCAATGC-3'
IKZF1.I3.R5	5'-CTGTTACTGCCTGCAGGATAGACTTCTGGA-3'		IKZF1.I7.R4	5'-ACAGACCATAGAGTCCCTCTAGGGGAAAA-3'
IKZF1.I3.R7	5'-GGTACCCCAACCCATCCTTATACATGACAC-3'		IKZF1.E8.R6	5'-TTCATATTCGTTCTCTCTCTGTAGCTG-3'
IKZF1.I3.R9	5'-CTTCCGGGTCCAGGATCTCCATATAACAAT-3'		IKZF1.3U.R1	5'-CTTCTCCCTCTCATATTGGGATCTCATTGG-3'
IKZF1.I3.R11	5'-TATTCTCTTTCACAGGACAGTTTCCCAGCA-3'		IKZF1.HS.R2	5'-TGTCTCTCTGTGCTTCAACCAGACACAATG-3'
IKZF1.I3.R13	5'-TGACTGAGACATAATGGACAAGGCCCAAT-3'			
IKZF1.I3.R2	5'-GATGGCACTGGCAGTCATTCTCTATGTCT-3'	MP-R2		
IKZF1.I3.R4	5'-TCTAGGAAGGACTTGGGCACATTGAAGAAT-3'			
IKZF1.I3.R6	5'-TCTGGCACTTACACACACTCTTTAGGC-3'			
IKZF1.I3.R8	5'-CTGGCACTTCTGTCAAACCTCACATCTCT-3'			
IKZF1.I3.R10	5'-TTTCATATAAAATGCTGCGAACACCTTGA-3'			
IKZF1.I3.R10B	5'-GCAAGCAGCCAGTTTACAATAACCTTTGC-3'			
IKZF1.I3.R12	5'-AATGTACACTGTTAGTCCCACTGACCAA-3'			
IKZF1.I3.R14	5'-CAAGGACTCTATGACTCGGTACCCTTGA-3'			

Os oligonucleotídeos da reação A foram divididos em três misturas: MP-F, que contém todos os oligonucleotídeos de sentido direto; MP-R1 e MP-R2, que contém todos aqueles de sentido inverso utilizados na reação. Os oligonucleotídeos da reação B foram aplicados diretamente para a reação. Legenda do nome de cada oligonucleotídeo: nome do gene, seguido do local de anelamento (I – íntron; E – éxon; 3U – 3-UTR; HS – *hotspot*) e da direção da fita (F – direto/ R – reverso) (MEYER *et al.*, 2013).



**Figura 4.2.** Desenho esquemático das regiões de *IKZF1* cobertas pelo MP-PCR. O PCR Multiplex (MP-PCR) utilizado neste estudo é dividido em duas reações: reação A, que é capaz de detectar deleções dos éxons Δ2-3 (representada nas cores amarelo e preto) e reação B, que

detecta  $\Delta 2-7$  (cores preto, laranja e roxo),  $\Delta 2-8$  (cores preto, azul e rosa),  $\Delta 4-7$  (verde, roxo e laranja) e  $\Delta 4-8$  (verde, rosa e azul) de *IKZF1* (MEYER *et al.*, 2013).

#### **4.5. Coorte PHOP - Quantificação relativa dos níveis de transcritos de *CRLF2* e *IKZF1***

Para a quantificação da expressão gênica de *CRLF2* e *IKZF1* por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foram utilizados os cDNAs dos pacientes. O gene de referência utilizado nas duas reações foi o *18s rRNA*, identificado através de análises pelo programa *Normfinder* dados previamente obtidos no nosso grupo (BARBOSA, 2017; LOPES *et al.*, 2017).

A quantificação dos níveis de transcrito de *CRLF2* foi realizada com sondas hidrolisáveis do tipo *TaqMan*® em um ensaio duplex, onde é realizada a quantificação dos genes de referência e alvo do estudo no mesmo poço. Foram utilizados os ensaios Hs00845692\_m1 *TaqMan*® assay FAM-labelled para *CRLF2* e VIC-labelled primer limited *18SHs99999901\_s1* para o *18S rRNA* (Applied Biosystems). Para esta reação foram utilizados 10  $\mu$ L de *TaqMan Fast Advanced Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), 1  $\mu$ L da sonda para *CRLF2* e 0,5  $\mu$ L para *18S rRNA* acrescentando água livre de nucleases para atingir um volume final de 20  $\mu$ L. Foram realizadas duplicatas para todas as amostras seguindo o programa de ciclagem sugerido por *TaqMan*® *Gene Expression Assay - FAST conditions*: incubação inicial a 50°C por 2 min seguido de 95°C por 20 s para ativação da enzima polimerase. Então são iniciados 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 segundo seguido de anelamento e extensão da fita a 60°C por 20 s.

Para a quantificação relativa dos níveis de transcrito de *IKZF1* foi utilizado um agente intercalante de fita-dupla, o *BRYT Green* (Promega), 100 ng de cDNA, 7,5  $\mu$ L de *GoTaq qPCR master mix* (Promega), 2,5  $\mu$ L de água livre de nucleases e 0,75  $\mu$ L oligonucleotídeos de sentido direto e reverso para ambos *IKZF1* (gene de interesse) e *18s rRNA* (gene de referência). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados foram as seguintes: 18S rRNA E1F1 5'- AAACGGCTACCACATCCAAG - 3', 18S rRNA E1R1 5'- CCTCCAATGGATCCTCGTTA - 3', *IKZF1* E4S 5'- GATGAAGGAATGGGCGTGC - 3', e *IKZF1* E4AS 5'- CATTCATTTTCTCTCCCGAGGC - 3'. O volume final da reação foi de 30  $\mu$ L e a ciclagem utilizada foi: 50°C por 2 min seguida de 95° por 10 min; são iniciados 40 ciclos de 72°C por 20 s, 95°C por 10 s e 60°C por 30 s; segue para 95°C por 16 s, 60°C por 1 min e finalmente, 95°C por 15 s. As reações foram realizadas em duplicata.

As corridas de RT-qPCR foram realizadas no aparelho ViiA 7 RealTime PCR System (Applied Biosystems) e analisadas usando o programa QuantStudio Real-Time PCR versão

1.2 (Applied Biosystems). A partir do gráfico gerado, o *threshold*, ou seja, o limiar de detecção do início da fase exponencial de amplificação foi determinado para cada ensaio (0,04 e 0,08 para quantificação de *CRLF2* e *IKZF1*, respectivamente). O valor do *threshold cycle* (Ct), que representa o número de ciclos necessários para o gerar uma quantidade de sinais fluorescentes necessários para alcançar o *threshold*, foi determinado para cada amostra, permitindo a quantificação relativa dos genes de interesse. Para cada amostra foi calculada a média do Cts das duplicatas e, subsequentemente, para determinar a expressão relativa calculou-se o  $\Delta Ct$  através da fórmula:  $\Delta Ct = Ct_{\text{gene de interesse}} - Ct_{\text{gene de referência}}$ . O valor utilizado para análise de expressão foi o de  $1/\Delta Ct$  (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

#### **4.6. Coorte TARGET - Casuística**

Esta etapa do estudo foi realizada em colaboração com a doutoranda Caroline Poubel que desenvolve as análises de bioinformática no Laboratório de Bioinformática e Ciência Computacional do INCA, coordenado pela Dra. Mariana Boroni. Os dados disponibilizados pelo projeto TARGET foram utilizados para testar a mesma hipótese em uma coorte independente. Os dados já processados foram obtidos do projeto TARGET Acute Lymphoblastic Leukemia que objetiva a melhor compreensão da caracterização molecular das LLAs para determinar as alterações genéticas que promovem a iniciação e progressão das leucemias pediátricas de difícil tratamento. Esse projeto gerou dados em fases de descoberta distintas, a *ALL Pilot Phase*, ou Fase I, a *ALL Expansion Phase*, Fase II, ou *Ambiguous Lineage*, que é a Fase III. No presente estudo, foram avaliados apenas as amostras de pacientes alocados na Fase II desse projeto, na qual foram inclusas 264 amostras de pacientes com diagnóstico de LLA-T. Todos estes pacientes estavam incluídos em um único protocolo do *Children's Oncology Group* (COG).

A partir do arquivo *.xlsx* contendo as características clínicas dos pacientes, foi possível selecionar apenas os casos diagnosticados com LLA-T. Todas as amostras utilizadas nas análises eram de MO e/ou SP colhidas ao diagnóstico dos pacientes. Os casos incluídos possuíam idade  $\leq 21$  anos e não possuíam diagnóstico de síndromes genéticas/congênicas. Os detalhes sobre a manipulação dos materiais e dos dados gerados estão depositados no endereço eletrônico do projeto, com o título *TARGET Project Experimental Methods* (<https://ocg.cancer.gov/programs/target/target-methods>).

#### **4.7. Coorte TARGET - Caracterização molecular das amostras e investigação dos genes de interesse**

Os dados processados disponíveis de sequenciamento do exoma (WES) e sequenciamento de RNA (RNA-seq) foram utilizados para a caracterização molecular dos pacientes a partir da presença de mutações, alterações de número de cópias (CNA) e expressão gênica. Os dados de WES e de RNA-seq foram obtidos pelo modo *paired-end* através da plataforma HiSeq 2000 (Illumina). Os dados de RNA-seq foram baixados diretamente do TARGET, como descrito anteriormente, para avaliação dos níveis de transcritos de *CRLF2* e *IKZF1*. As caracterizações laboratoriais de cada paciente de acordo com seu perfil de expressão gênica e estado maturativo dos blastos leucêmicos e, ainda, os dados de WES foram disponibilizados pela plataforma *Pediatric Cancer Data Portal* (PeCan - através do link <https://pecan.stjude.cloud/bubble/HM-TALL>). As sequências avaliadas foram alinhadas ao genoma de referência GRCh37 e, estes dados já processados foram disponibilizados em arquivo *.txt* e trabalhados utilizando o ambiente estatístico R. A categorização das amostras de acordo com o seu perfil de expressão gênica e estágio maturativo dos blastos leucêmicos foi obtida a partir dos dados laboratoriais previamente caracterizados e disponibilizados. A partir destes dados, foi possível classificar os pacientes em *NOTCH1/FBXW7* selvagens ou mutados e ainda distinguir os domínios mutados de *NOTCH1* nesse segundo grupo. Adicionalmente, rastreamos a presença de mutações ou alterações de número de cópia em *IKZF1* e *CRLF2* (LIU *et al.*, 2017).

#### **4.8. Estabelecimento de ponto de corte para análises de expressão gênica**

Com a finalidade de categorizar os pacientes em grupos de acordo com os níveis de expressão gênica de *CRLF2*, foi utilizada a ferramenta *online Cutoff Finder*, disponibilizada no endereço eletrônico <http://molpath.charite.de/cutoff/>, que é uma ferramenta capaz de otimizar a definição do ponto de corte para biomarcadores. Foi preparado um arquivo *.txt* separado por tabulações para submissão na plataforma, contendo os valores em  $1/\Delta CT$  e outro em FPKM para os pacientes das coortes PHOP e TARGET, respectivamente. Para ambos arquivos foi aplicado o teste *Fit of mixture model* que é baseado na distribuição Gaussiana dos valores submetidos (BUDCZIES *et al.*, 2012).

#### **4.9. Análises estatísticas**

Todos os gráficos e análises apresentados neste trabalho foram realizados no ambiente estatístico R, através do pacote Ggplot2 versão 3.5.1 (CRAN-R). O teste de Pearson para avaliar a correlação entre os níveis de transcritos de *CRLF2* e *IKZF1* e o teste de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram aplicados para análise comparativa dos dados de expressão gênica com os dados clínico-laboratoriais e moleculares e, para as variáveis categóricas foram

aplicados os testes Exato de Fisher ou Qui-quadrado através do pacote Ggpubr versão 0.1.6 (CRAN-R). Os resultados com  $p$  valor  $<0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.



## 5. Resultados

### 5.1. Caracterização dos pacientes

Inicialmente, os pacientes de ambas as coortes analisadas foram caracterizados de acordo com dados clínico laboratoriais, como idade, sexo, leucometria, classificação de risco prognóstico (NCI), estágio maturativo e alterações moleculares (Tabela 1).

Foram incluídos no estudo 57 pacientes da coorte PHOP e 264 da coorte TARGET, todos diagnosticados com LLA-T com idade  $\leq 21$  anos. Em ambas as coortes houve um predomínio de pacientes com idade  $< 10$  anos (57,89 e 55,68% nas coortes PHOP e TARGET, respectivamente) e do sexo masculino (77,19 e 76,51%). Enquanto na coorte PHOP 73,68% dos pacientes apresentavam leucometria  $\geq 50 \times 10^9$  células/L, na coorte TARGET apenas 27,65% dos casos eram hiperleucocitários. De acordo com os critérios do NCI para a classificação de risco das LLAs, 84,21% dos pacientes da coorte PHOP e 60,98% da coorte TARGET foram categorizados como alto-risco. Em relação a caracterização do estágio maturativo dos blastos leucêmicos, na coorte PHOP apenas um paciente foi classificado como ETP, enquanto na coorte TARGET, 10,05% dos pacientes eram ETP, 77,25% não-ETP e 12,70% foram categorizados como *nearETP*, que são aqueles casos que preencheram os critérios para classificação como ETP, porém possuem expressão normal de CD5.

Na coorte PHOP, 50% (18/36) dos pacientes analisados, apresentavam mutações em *NOTCH1/FBXW7*, 23,68% (9/38) a fusão *STIL-TALI* e 6,52% (3/46) a presença de *TLX3*. Já nos pacientes da coorte TARGET, foi identificada uma frequência de 79,16% para mutações em *NOTCH1/FBXW7*, 49,24% de superexpressão de *TALI* e 17,80% de *TLX3* anormalmente expresso.

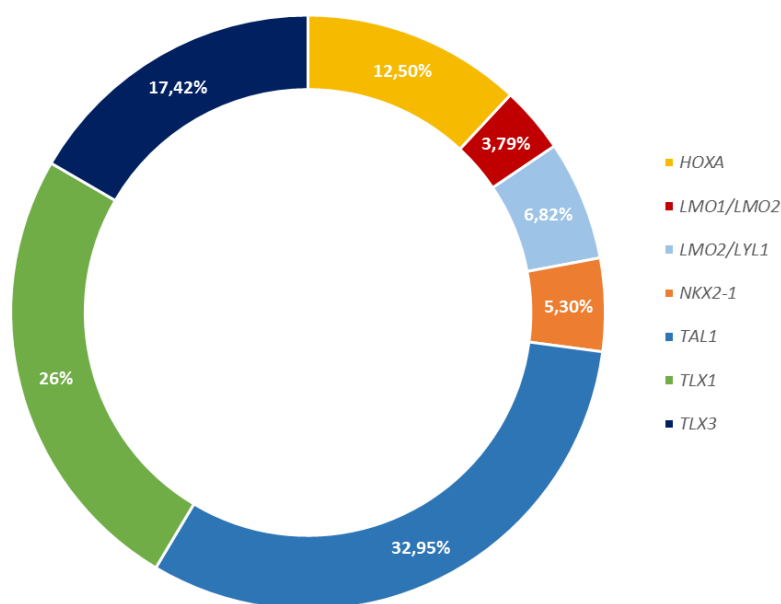
**Tabela 1.** Dados clínico-demográficos dos pacientes incluídos no estudo.

	Coorte PHOP (n = 57)		Coorte TARGET (n = 264)	
	n	%	n	%
<b>Idade (Anos)</b>				
<10	33	57,89	147	55,68
10-21	24	42,11	117	44,32
<b>Sexo</b>				
Feminino	13	22,81	62	23,48
Masculino	44	77,19	202	76,51
<b>Leucometria (<math>\times 10^9</math> céls/L)</b>				
<50	15	26,32	191	72,35
$\geq 50$	42	73,68	73	27,65
<b>Classificação de risco (NCI)</b>				
Padrão	9	15,79	103	39,02
Alto	48	84,21	161	60,98
<b>Estágio Maturativo*</b>				
ETP	1	1,75	19	10,05
<i>near</i> ETP	0	0,00	24	12,70
não-ETP	56	98,25	146	77,25
<b>Caracterização Molecular**</b>				
<i>NOTCH1/FBXW7</i> mut	18	50,00	209	79,16
<i>TAL1</i> +***	9	23,68	87	32,95
<i>TLX3</i> +	3	6,52	47	17,80
<i>IKZF1</i> alterado	1	1,76	11	4,17
<i>CRLF2</i> alterado	NA	NA	0	0

\* na coorte TARGET, 189 dos 264 pacientes foram classificados em subtipos maturativos de acordo com o perfil imunofenotípico, as porcentagens foram calculadas a partir desse número. As amostras que apresentavam ausência de CD1a e CD8, CD5 fraco e positividade para marcadores de células tronco ou de linhagens mieloides foram categorizadas como ETP, aquelas que preenchiam os critérios porém apresentavam forte positividade para CD5, *near*ETP e, o restante, não-ETP (COUSTAN-SMITH *et al.*, 2009; INUKAI *et al.*, 2012); \*\*

na coorte PHOP, n=36 pacientes foram analisados para mutações em *NOTCH1/FBXW7*, n= 38 para *STIL-TAL1* e n=46 para *TLX3*; \*\*\*, *TAL1+* na coorte PHOP representa os pacientes positivos para a fusão *STIL-TAL1*, enquanto na coorte TARGET se refere aos casos com *TAL1* superexpressos; NA; Não avaliado; NCI, *National Cancer Institute*; Pelos critérios do NCI, os pacientes com leucometria  $\geq 50$  ou idade  $\geq 10$  anos são categorizados como alto risco e, aqueles com leucometria  $< 50$  e com idade  $< 10$  anos, risco padrão; Na tabela, *IKZF1* ou *CRLF2* alterado representa os casos com deleções ou mutações nestes genes.

Adicionalmente, os pacientes da coorte TARGET foram categorizados de acordo com seu perfil de expressão gênica em 7 subgrupos oncogênicos característicos da LLA-T, a partir dos dados obtidos neste banco (Figura 5.1). A frequência observada destes subgrupos foi: *HOXA* (12,50%), *LMO1/2* (3,79%), *LMO2/LYL1* (6,82%), *NKX2-1* (5,30%), *TAL1* (32,95%), *TAL2* (3,03%), *TLX1* (26%) e *TLX3* (17,42%). Não foi possível realizar essa categorização em 22 dos 264 pacientes, que foram então categorizados como “indeterminado” (8,33%).

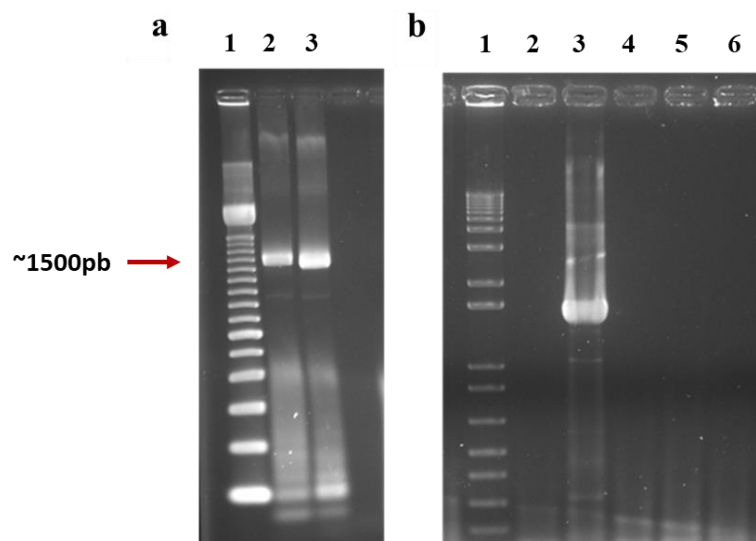


**Figura 5.13.** Frequência dos subgrupos oncogênicos característicos da LLA-T na coorte TARGET. Os subgrupos oncogênicos mais frequentes desta coorte são aqueles caracterizados pela expressão de *TAL1*, *TLX1* e *TLX3* e mais raramente os caracterizados pela expressão de *LMO1/LMO2*.

## 5.2. Identificação de alterações em *IKZF1*

Todos os pacientes da coorte PHOP foram avaliados pela reação de MP-PCR para rastreamento das deleções gênicas envolvendo *IKZF1*. Essa análise resultou na identificação

de um único paciente com *IKZF1* deletado, onde foram acometidos os éxons 4-7 ( $\Delta 4-7$ ) (Figura 5.2a e b).

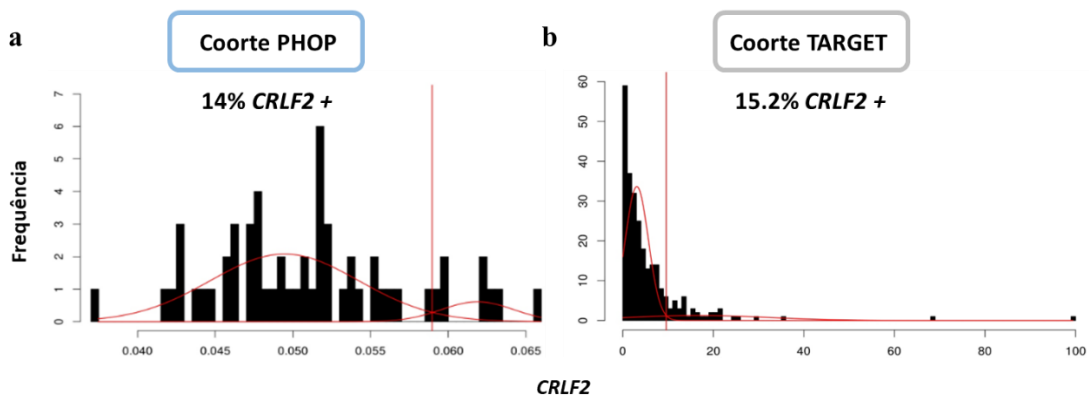


**Figura 5.2.** Deleção em *IKZF1* detectada por MP-PCR. Eletroforese em gel de agarose 1,5% com brometo de etídeo para visualização dos produtos obtidos das reações PCR multiplex (MP-PCR). **a.** Reação B do MP-PCR, no poço 1 foi aplicado o peso molecular de 100 pb, no poço 2 foi aplicado o controle positivo (CP) para esta reação e no 3, a amostra testada com deleção de *IKZF1*. **b.** Reação para identificar quais éxons de *IKZF1* foram acometidos. No poço 1 foi aplicado o peso molecular de 1 kilobase (kb), no poço 2, o controle negativo, no 3 a amostra que foi positiva para a deleção dos éxons 4-7 ( $\Delta 4-7$ ) e, nos subsequentes a mesma amostra testada para os outros tipos de deleção  $\Delta 4-8$ ,  $\Delta 2-7$  e  $\Delta 2-8$ . Em ambas as reações, a amplificação resultou em banda de aproximadamente 1500 pb.

Todos os pacientes da coorte TARGET foram avaliados para a presença de deleções gênicas e mutações em *IKZF1*, a partir dos dados de WES depositados. Destes, 11/264 pacientes (4,17%) apresentaram alterações neste gene, sendo 6 deleções e 5 mutações (4 pacientes com mutações do tipo *missense* e 1 do tipo *frameshift*).

### 5.3. Determinação dos níveis de expressão gênica de *CRLF2*

Após a determinação do ponto de corte para categorização dos pacientes de acordo com os níveis de expressão gênica de *CRLF2* através da ferramenta *Cutoff Finder*, identificamos 14,03% (8/57) de pacientes da coorte PHOP e 16,29% (43/264) da coorte TARGET com alta expressão de *CRLF2* (Figura 5.3a e b).



**Figura 5.3.** Distribuição dos valores de expressão de *CRLF2* para a determinação dos pontos de corte pelo *Cutoff Finder*. O modelo *fit of mixture models* resultou em duas distribuições gaussianas para cada um dos histogramas (linhas vermelhas). As linhas vermelhas verticais designam os pontos de corte ideais derivados deste modelo para as diferentes coortes (a) PHOP e (b) TARGET.

#### 5.4. Caracterização dos pacientes de acordo com os níveis de expressão gênica de *CRLF2*

Usando os pontos de corte previamente determinados, os pacientes foram estratificados em grupos de acordo com expressão de *CRLF2* (alto e baixo). Após essa categorização foi possível avaliar a associação dos mesmos com dados clínicos e laboratoriais dos pacientes nas duas coortes (Tabela 2).

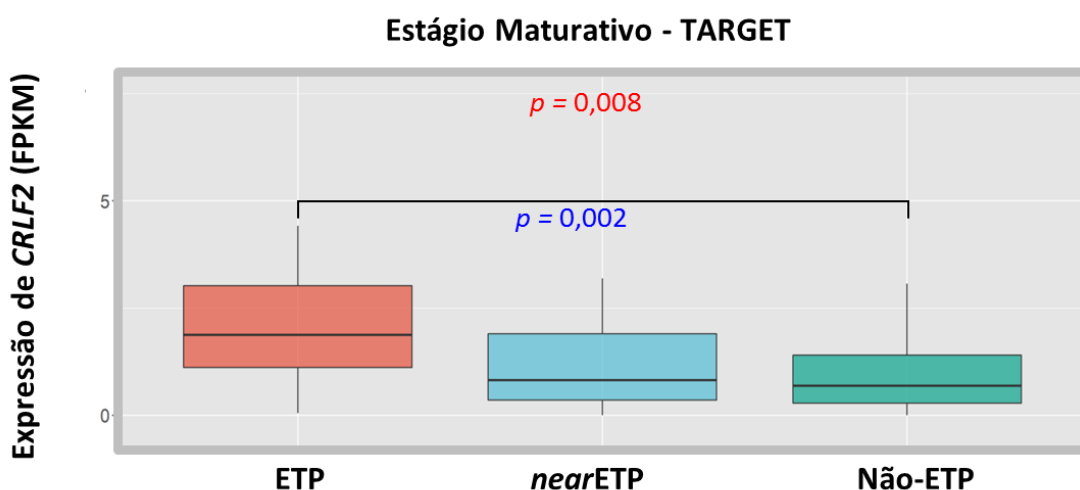
**Tabela 2.** Características clínico-laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo categorizados de acordo com os níveis de expressão de *CRLF2*

	PHOP			TARGET		
	<i>CRLF2</i> n(%)		<i>p</i>	<i>CRLF2</i> n(%)		<i>p</i>
	Alto	Baixo		Alto	Baixo	
<b>Idade (Anos)</b>			0,446			0,338
<10	6 (75,00)	27 (55,10)		19 (47,50)	128(57,14)	
10-21	2 (25,00)	22 (44,90)		21 (52,50)	96 (42,86)	
<b>Sexo</b>			1,00			0,966
Feminino	2 (25,00)	11 (22,45)		10 (25,00)	52 (23,21)	
Masculino	6 (75,00)	38 (77,55)		30 (75,00)	172(76,78)	
<b>Leucometria (x10<sup>9</sup>cels/L)</b>			0,187			1,000
<50	4 (50,00)	11 (22,45)		29 (72,50)	162(72,32)	
≥50	4 (50,00)	38 (77,55)		11 (27,50)	62 (27,68)	
<b>Classificação de Risco (NCI)</b>			0,004			0,459
Padrão	3 (37,50)	6 (12,24)		13 (32,50)	90 (40,18)	
Alto	5 (62,50)	43 (87,75)		27 (67,50)	134(59,82)	
<b>Estágio Maturativo *</b>			1,000			0,005
ETP	0 (0,00)	1 (2,50)		7 (21,88)	12 (7,64)	
<i>near</i> ETP	0 (0,00)	0 (0,00)		6 (18,75)	18 (11,46)	
Não-ETP	7 (10,00)	39 (97,5)		19 (59,36)	127 (80,89)	
<b>Caracterização Molecular**</b>						
<i>NOTCH1/FBXW7</i> mut	2 (33,3)	16 (53,3)	0,658	33 (82,50)	176(78,57)	0,725
<i>TALI</i> +***	1 (25,0)	8 (23,53)	0,616	14 (35,00)	116(51,78)	0,744
<i>TLX3</i> +	0 (0)	3 (7,69)	1,000	5 (12,50)	42 (18,75)	0,467
<i>IKZF1</i> alterado	0 (0)	1 (2,04)	1,000	3 (7,50)	8 (3,57)	0,474
<i>CRLF2</i> alterado	NA	NA	-	0 (0)	0 (0)	-

\* na coorte TARGET, 189 dos 264 pacientes foram classificados em subtipos maturativos de acordo com o perfil imunofenotípico, as porcentagens foram calculadas a partir deste número. As amostras que apresentavam ausência de CD1a e CD8, CD5 fraco e positividade para marcadores de células tronco ou de linhagens mieloides foram categorizadas como ETP, aquelas que preenchiam os critérios porém apresentavam forte positividade para CD5,

*nearETP* e, o restante, não-ETP (COUSTAN-SMITH *et al.*, 2009; INUKAI *et al.*, 2012); \*\* na coorte PHOP, n= 36 pacientes foram analisados para mutações em *NOTCH1/FBXW7*, n= 38 para *STIL-TAL1* e n= 46 para *TLX3*; \*\*\*, *TAL1+* na coorte PHOP representa os pacientes positivos para a fusão *STIL-TAL1*, enquanto na coorte TARGET se refere aos casos com superexpressão de *TAL1*; NCI, *National Cancer Institute*; Pelos critérios estabelecidos pelo NCI, os paciente com leucometria  $\geq 50$  ou maiores de 10 anos de idade são considerados como de alto risco e, aqueles com leucometria  $< 50$  e com idade menor que 10 anos, risco padrão; Apenas um paciente da coorte INCA apresentava deleção em *IKZF1* e, mutações nesse gene não foram rastreadas. Esse paciente apresentava baixa expressão de *IKZF1* e *CRLF2*. Na coorte TARGET, foram encontrados 11 pacientes com deleções ou mutações em *IKZF1*, porém não houve associação dessas alterações com a expressão dos genes avaliados: 7,50% (3/43) vs 3,57% (8/221) e 6,94% (5/72) vs 3,12% (6/192) nos grupos de *CRLF2* e *IKZF1* alto ou baixo, respectivamente.

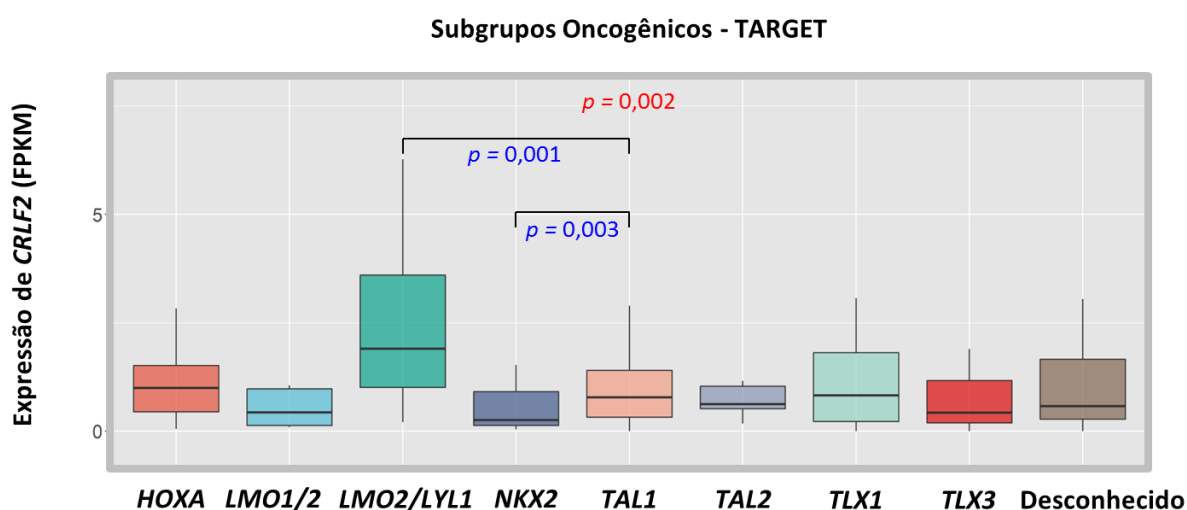
Como observado na tabela acima, não identificamos associação estatística entre os grupos com alta e baixa expressão de *CRLF2* e as variáveis como idade, sexo, leucometria e caracterização molecular. Na coorte PHOP, 37,50% dos pacientes com alta expressão de *CRLF2* foram categorizados como de risco padrão segundo os critérios NCI, enquanto apenas 12,24% dos pacientes com baixa expressão de *CRLF2* se enquadravam nesta categoria. Em relação ao perfil maturativo das amostras, foi observado que na coorte TARGET havia uma maior frequência de pacientes classificados como ETP e *nearETP* no grupo *CRLF2*-alto na coorte TARGET ( $p = 0,005$ ) (Figura 5.4).



**Figura 5.4.** Expressão de *CRLF2* de acordo com o estágio maturativo dos blastos leucêmicos. Categorizando os pacientes de acordo com o estágio maturativo dos blastos leucêmicos, foi possível observar que a expressão de *CRLF2* é maior dos grupos mais imaturos de LLA-T. O

$p$  valor representado em cor vermelha é relativo ao obtido no teste estatístico Kruskal Wallis e, em azul, Mann-Whitney. ETP, *early T precursor*.

Para uma melhor caracterização deste subgrupo de LLA-T, avaliamos os níveis de transcritos de *CRLF2* dos pacientes da coorte TARGET de acordo com os grupos oncogênicos anteriormente categorizados. A expressão de *CRLF2* foi maior nos pacientes com perfil de expressão oncogênico *LMO2/LYL1* (Figura 5.5).

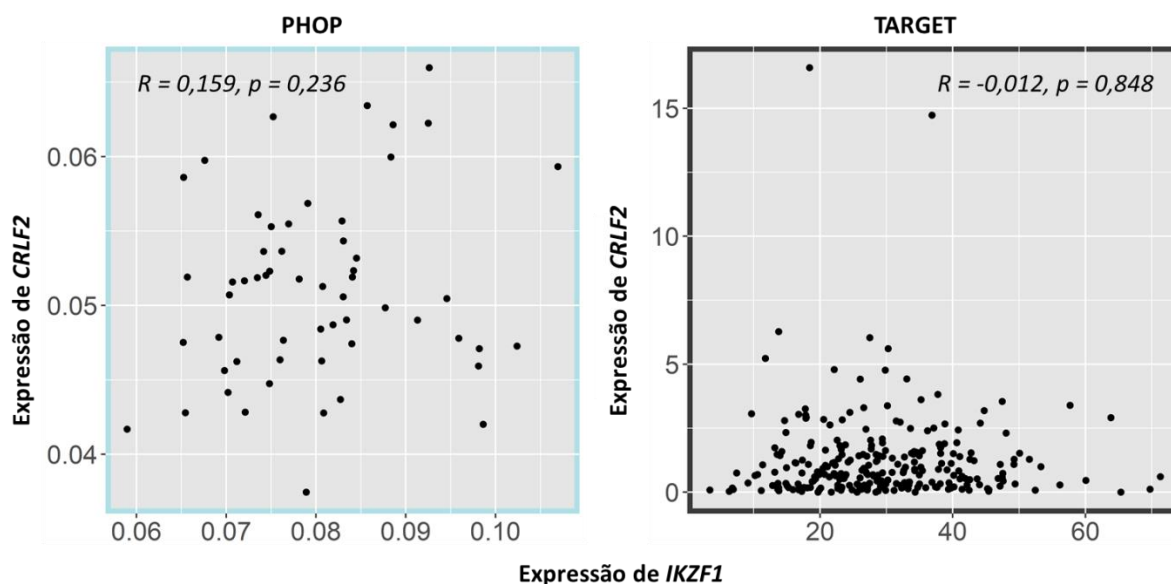


**Figura 5.5.** Expressão de *CRLF2* nos subgrupos oncogênicos da LLA-T. A expressão de *CRLF2* varia nos diferentes subgrupos categorizados de acordo com o perfil de expressão oncogênico da LLA-T. O subgrupo caracterizado pela expressão de *LMO2/LYL1* apresenta maior expressão deste gene. O  $p$  valor representado em cor vermelha é relativo ao obtido no teste estatístico Kruskal Wallis e, em azul, Mann-Whitney.

### 5.5. Correlação entre as expressões de *CRLF2* e *IKZF1*

Para testar a nossa hipótese de que a expressão gênica de *IKZF1* teria papel na superexpressão de *CRLF2* na LLA-T, foi realizada a análise de correlação entre estas duas variáveis nas coortes analisadas e não houve correlação significativa entre a expressão gênica de *CRLF2* e *IKZF1* nos pacientes (Figura 5.6).

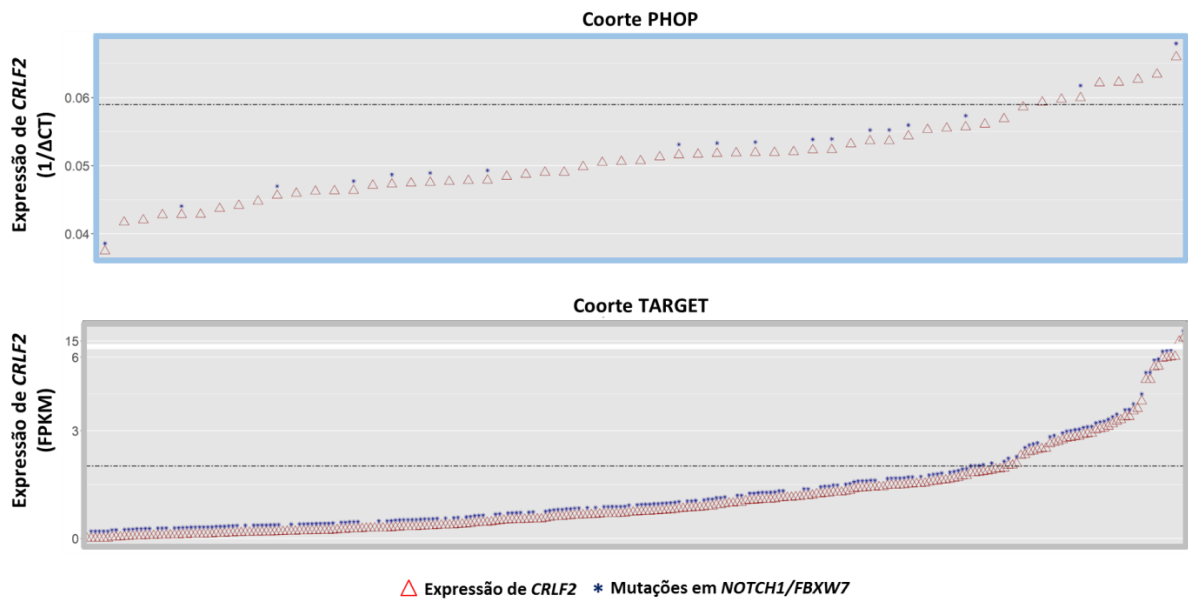




**Figura 5.6.** Análise de correlação entre a expressão de *CRLF2* e *IKZF1*. A expressão de *CRLF2* e *IKZF1* não possui correlação direta nos pacientes diagnosticados com LLA-T em ambas as coortes (modificado de MACIEL, *et al.*, 2018).

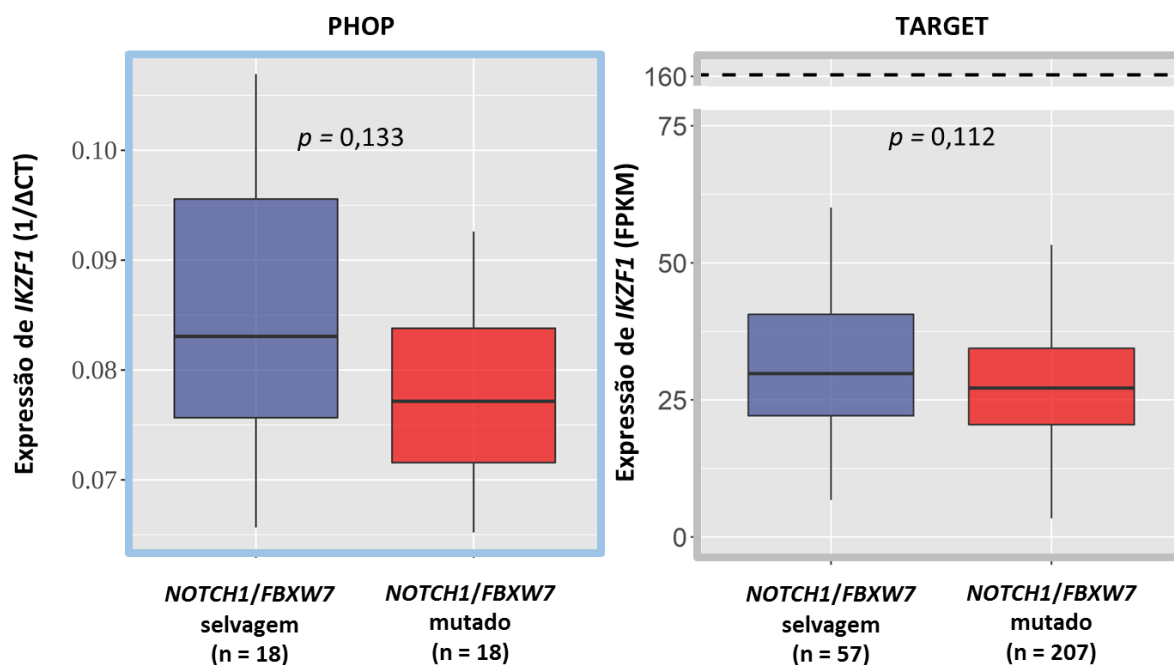
#### 5.6. Expressão de *CRLF2* e *IKZF1* associada com o status de *NOTCH1/FBXW7*

Com o objetivo de testar a segunda hipótese deste estudo, na qual consideramos que a atividade de *IKZF1* pode ser prejudicada devido a competição pela mesma sequência de DNA com *CSL*, foi avaliado se o aumento de *ICN1* causado por mutações em *NOTCH1/FBXW7* estava associado com a superexpressão de *CRLF2* nestes pacientes. Nossas análises demonstraram que a presença de mutações ativadoras da via *NOTCH1* ocorriam de forma similar nos grupos com alta e baixa expressão de *CRLF2* (Figura 5.7).



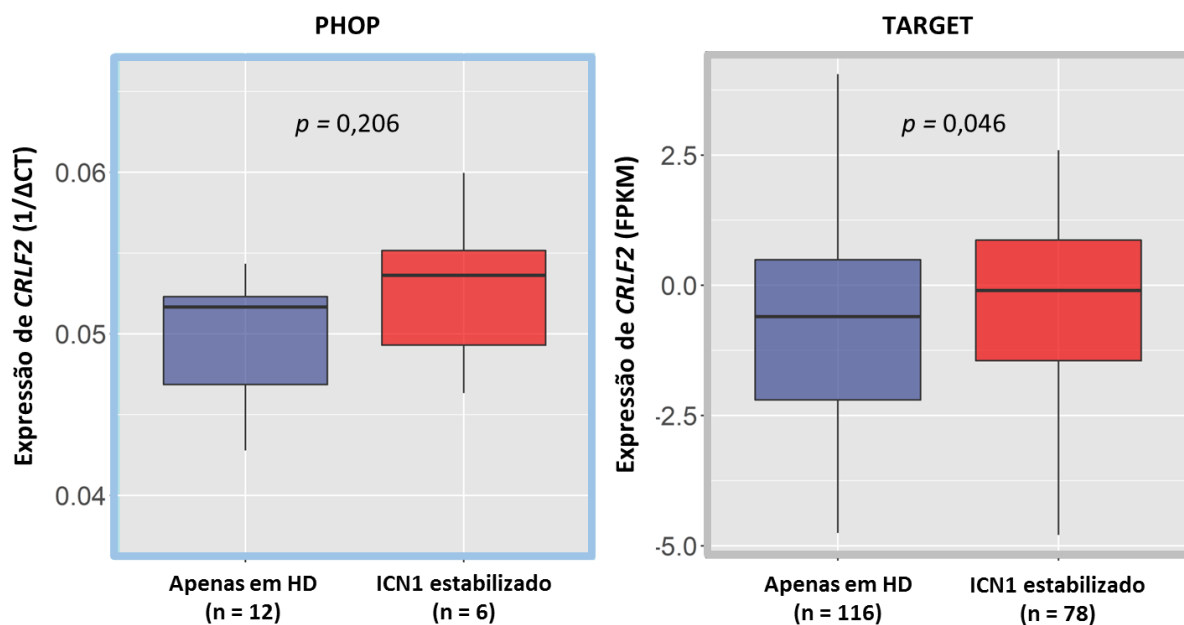
**Figura 5.7.** Expressão gênica de *CRLF2* em amostras de diagnóstico de LLA-T. As duas diferentes coortes estão representadas na figura, PHOP e TARGET. Estas análises demonstraram que 8 (14%) e 43 (16%) de pacientes com superexpressão de *CRLF2* nas coortes PHOP e TARGET, respectivamente. As linhas tracejadas representam o ponto de corte estabelecido para cada coorte, cada triângulo representa um paciente e cada asterisco representa mutação em *NOTCH1/FBXW7* (modificado de MACIEL, *et al.*, 2018).

A expressão gênica de *IKZF1* foi avaliada em pacientes de ambas as coortes, de acordo com a presença de mutações em *NOTCH1/FBXW7*. Para a coorte TARGET, foi possível comparar estes dados com a expressão normal observada em amostras de timo saudável. Dessa forma, foi constatado que a nível de mRNA não há diferença de expressão de *IKZF1* nesses dois grupos de pacientes, porém essa expressão foi significativamente menor na LLA-T de forma geral comparado com as amostras de timo saudável (Figura 5.8).



**Figura 5.8.** Expressão gênica de *IKZF1* de acordo com o status de *NOTCH1/FBXW7*. *IKZF1* não é diferentemente expresso nos pacientes com ativação aberrante de NOTCH1 (mutação em *NOTCH1/FBXW7*) em ambas as coortes. Porém, sua expressão é significativamente menor na LLA-T de forma geral quando comparado a sua expressão em amostras de timo saudável. Na figura, a linha tracejada representa a expressão normal de *IKZF1* em amostras de timo saudável (modificado de MACIEL, *et al.*, 2018).

Posteriormente, categorizamos os pacientes com mutações na via NOTCH1 de acordo com o resultado biológico de cada tipo de mutação, ou seja, aqueles que apresentavam mutações no domínio PEST ou em *FBXW7* foram categorizadas no grupo com estabilização de ICN1 e, estratificados daqueles que apresentavam apenas mutações no domínio HD. Interessantemente, analisando a expressão de *CRLF2* nestes dois grupos, vimos que, na coorte TARGET, os pacientes com mutações estabilizadoras de ICN1 possuem uma expressão gênica de *CRLF2* significativamente maior ( $p = 0,046$ ) (Figura 5.9).



**Figura 5.9.** Expressão de *CRLF2* de acordo com os tipos de mutação na via NOTCH1. Os pacientes das coortes PHOP e TARGET foram categorizados de acordo com o efeito funcional da mutação na via NOTCH1 em “Somente HD”, aqueles com mutações apenas neste domínio e, “Estabilização de ICN1”, aqueles com mutações no domínio PEST de *NOTCH1* e/ou em *FBXW7*. A expressão de *CRLF2* foi significativamente maior nos pacientes com estabilização da proteína intracelular de NOTCH1 nos pacientes da coorte TARGET ( $p = 0,046$ ) (modificado de MACIEL, *et al.*, 2018).

## 6. Discussão

A ferramenta *online Cutoff Finder* foi utilizada para a definição de um ponto de corte para estratificação dos pacientes em subgrupos de acordo com a expressão de *CRLF2* (BUDCZIES *et al.*, 2012). A frequência de pacientes com a superexpressão de *CRLF2* foi semelhante a dos estudos anteriores, sendo ~15% na LLA-T (PALMI *et al.*, 2016; SCHMÄH *et al.*, 2017). Assim como Schnah e cols., identificamos que um terço dos pacientes com LLA-T da coorte PHOP categorizados como de risco padrão pelos critérios do NCI apresentavam esta desregulação gênica. Este achado é relevante pois estes pacientes poderiam ser melhor categorizados de acordo com o risco genético para receberem um tratamento mais adequado.

Interessantemente, na coorte TARGET identificamos uma maior frequência de pacientes com subtipos mais imaturos de LLA-T no grupo com *CRLF2*-alto. Corroborando com este achado, vimos que a expressão de *CRLF2* era maior nos pacientes *LMO2/LYL1*, que é um subgrupo oncogênico normalmente característico de timócitos mais imaturos (FERRANDO; LOOK, 2003). Uma explicação inicial para este achado poderia ser a maior frequência de deleções em *IKZF1* no subgrupo LLA-ETP relatado por outro estudo, porém este resultado não foi corroborado em nossa investigação (3/11 pacientes com LLA-ETP e 1/11 com *nearETP* apresentavam alterações em *IKZF1* na coorte TARGET) (ZHANG *et al.*, 2012). De uma forma geral, estas alterações em *IKZF1* são raramente encontradas na LLA-T humana. Portanto, como previsto, este evento foi raramente identificado neste estudo, sendo mais expressivo na coorte TARGET, onde, além das deleções, foram investigadas também as mutações envolvendo este gene. Estudos *in vivo* em camundongos demonstraram que a perda de Ikaros promove o desenvolvimento de leucemia e linfoma de células-T nestes modelos, o que sugere que Ikaros age como um supressor tumoral no processo leucemogênico (BEVERLY; CAPOBIANCO, 2003). Em humanos, como estas deleções e mutações constituem um raro evento, ainda não se sabe a relevância da perda de IKAROS para a desregulação do desenvolvimento das células-T (KASTNER; CHAN, 2011).

O papel de *CRLF2* no desenvolvimento normal dos linfócitos em humanos ainda não é completamente compreendido, entretanto alguns estudos apontam que sua sinalização possa ter importância no desenvolvimento dos timócitos mais imaturos (CD4-CD8-) (SIMS *et al.*, 2000). Este achado poderia justificar a expressão aumentada de *CRLF2* nos subtipos mais imaturos de LLA-T. Vale ressaltar que o valor prognóstico da LLA-ETP não é consensual, apesar de alguns estudos terem apontado que esta classificação impacta negativamente no prognóstico dos pacientes (ASNAFI *et al.*, 2017; COUSTAN-SMITH *et al.*, 2009; INUKAI *et al.*, 2012; PATRICK *et al.*, 2014; SANDA *et al.*, 2012). Uma possível explicação para a

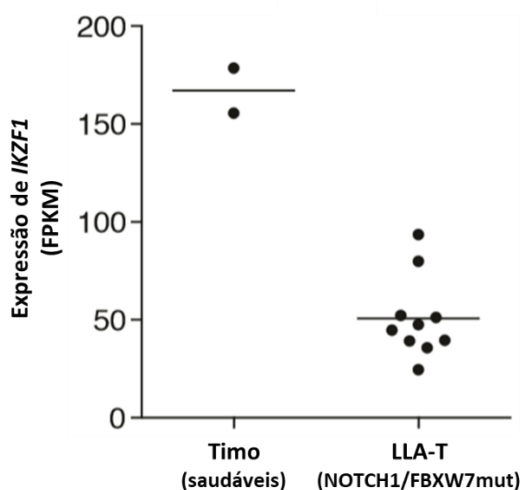
dificuldade na definição do fator prognóstico deste grupo é a presença de alterações moleculares como por exemplo deleções no *IKZF1* e a alta expressão de *CRLF2*, que podem conferir um pior desfecho para estes pacientes. Ainda, de acordo com os estudos anteriores, as alterações moleculares que foram previamente associadas com a superexpressão de *CRLF2* na LLA-B, como as fusões *P2RY8-CRLF2*, *IGH@-CRLF2* e mutações em *CRLF2*, não foram identificadas em pacientes com LLA-T em coortes distintas (MULLIGHAN *et al.*, 2009; PALMI *et al.*, 2016; RUSSELL *et al.*, 2009; SCHMÄH *et al.*, 2017; YODA *et al.*, 2010). A partir dos dados disponíveis na iniciativa TARGET, confirmamos a ausência de alterações envolvendo este gene.

Ge Z e cols. demonstrou que *IKZF1* é um importante regulador transcricional de *CRLF2*, entretanto não foi possível identificar correlação direta entre a expressão de ambos os genes. A ausência de correlação pode ser parcialmente explicada pelo fato de que os pacientes com LLA-T apresentam baixa expressão de *IKZF1* quando comparados com a expressão normal deste gene em células de timo saudável (Figura 5.8). Um estudo anterior sugeriu que a expressão de *IKZF1* significativamente reduzida na LLA-T era devido a ativação aberrante de NOTCH1 (WITKOWSKI *et al.*, 2015). Entretanto, esta afirmação foi baseada em um experimento comparando a expressão deste gene em 10 amostras LLA-T com mutações em *NOTCH1/FBXW7* e amostras de timo saudável (Figura 6.1). Nosso estudo avaliou pacientes *NOTCH1/FBXW7*-selvagem e mutado, comparando com timo saudável, e demonstrou que a expressão de *IKZF1* é baixa independente da presença destas mutações. Como discutido anteriormente, ainda não é bem compreendida a importância da perda de *IKZF1* neste subtipo-T e, ainda que mutações e deleções gênicas são um evento raro nestes pacientes. Porém, outros genes podem estar alterados nestes pacientes levando a repressão transcricional de *IKZF1* ou a desregulação do processo de *splicing* alternativo, que gera as diferentes isoformas de IKAROS. é importante ressaltar que outra possível explicação para falta de correlação entre a expressão de *IKZF1* e *CRLF2* nestes pacientes é que este estudo foi capaz de avaliar apenas a isoforma principal de *IKZF1* (isoforma funcional que mantém os domínios de ligação ao DNA e dimerização da proteína IKAROS). Sabendo que *IKZF1* é capaz de gerar até 13 isoformas diferentes, é possível que nossas análises tenham subestimado o papel das isoformas dominantes negativas nesta desregulação gênica. O aumento da produção das isoformas dominantes negativas seria capaz de prejudicar a atividade das isoformas funcionais de IKAROS na regulação de seus genes alvo. De fato, estudos demonstraram que as isoformas longas de IKAROS (por exemplo, Ik1, Ik2) antagonizam a atividade de ICN1 e, a presença da isoforma dominante negativa Ik6 sequestra estas primeiras isoformas, acentuando a atividade da via NOTCH1 (Figura 6.2). Consequentemente, as regiões regulatórias dos

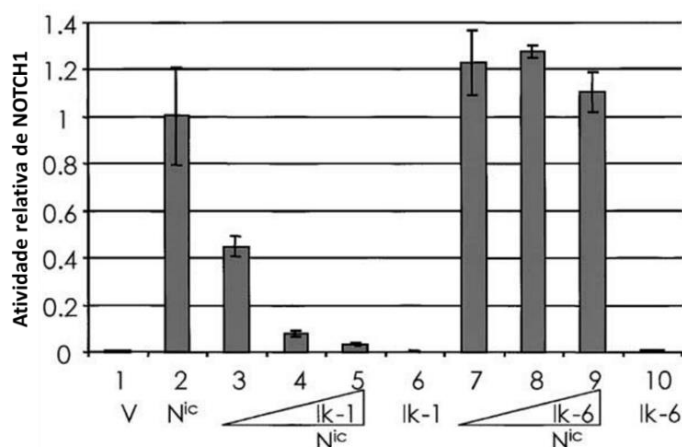
genes alvo de *IKZF1*, como Hes1, IL2R, Myc, Igf1r, e Ptcr, se tornam disponíveis (BEVERLY; CAPOBIANCO, 2003). Nós especulamos que este mecanismo mediado pela estabilização de ICN1 seja capaz de regular a superexpressão de *CRLF2* na LLA-T. Porém estudos funcionais são cruciais para afirmar essa suposição. Além disso, outra observação importante realizada neste estudo é que a expressão de *IKZF1* nos pacientes diagnosticados com LLA-T é significativamente mais baixa do que sua expressão normal em amostras de timo saudável.

Nossas análises mostraram que simplesmente ter ou não mutações na via NOTCH1 não estava associado a alta expressão de *CRLF2*, corroborando com os achados dos estudos anteriores (PALMI *et al.*, 2016; SCHMÄH *et al.*, 2017). Apesar das mutações em *NOTCH1/FBXW7* gerarem ativação constitutiva da via, dependendo do domínio afetado o resultado funcional é diferente. Mutações no domínio HD de *NOTCH1* desestabilizam este receptor que passa a ser ativado independentemente da presença do ligante. Mutações no domínio PEST e em *FBXW7* aumentam a meia-vida do domínio ICN1, levando a sua estabilização (WENG *et al.*, 2004). Desta forma, categorizamos os pacientes com mutações em *NOTCH1/FBXW7* em dois grupos, aqueles com mutações no domínio HD (apenas-HD) e aqueles com mutações no domínio PEST e/ou no gene *FBXW7* (estabilização de ICN1). De fato, pacientes com mutações estabilizadoras de ICN1 apresentaram um aumento significativo da expressão de *CRLF2* (TARGET). Na coorte PHOP, esta diferença não foi estatisticamente significativa, possivelmente devido ao menor número de casos. Além disso, 21/57 pacientes da coorte PHOP não foram caracterizados quanto à presença de mutações na via NOTCH1, o que pode ter influenciado o poder estatístico destas análises. As mutações em *NOTCH1/FBXW7* foram associadas ao um melhor prognóstico dos pacientes diagnosticados com LLA-T em estudos anteriores. Desta forma, a associação destas alterações com a superexpressão de *CRLF2* poderia ser considerada um achado contraditório quando relacionado ao desfecho clínico do paciente. Porém, o impacto prognóstico destas mutações não é consensual, sendo normalmente considerado positivo quando associado a boa resposta à terapia com glicocorticoides, que não garante um desfecho clínico superior (PAGANIN; FERRANDO, 2011). Entretanto, no cenário onde as mutações da via NOTCH1 conferem um melhor prognóstico ao paciente, a superexpressão de *CRLF2* poderia mitigar este efeito. Adicionalmente, já se sabe que os diferentes tipos de mutações (*NOTCH1*-HD ou PEST/TAD) podem resultar em diferentes desfechos clínicos. Por exemplo, Clappier e col. e Gao e col. demonstraram que pacientes com estabilização em ICN1 (mutações em PEST/TAD) possuem um maior risco de envolvimento no SNC (CLAPPIER *et al.*, 2010;

GAO *et al.*, 2014). Estes dados confirmam nossos achados que a presença de um tipo específico de mutação está associada a superexpressão de *CRLF2*.



**Figura 6.1.** Expressão de *IKZF1* na LLA-T. Um estudo realizado por WITKOWSKI e col. analisou a expressão de *IKZF1* em amostras de tímó saudável comparadas com a de 10 pacientes com LLA-T com mutações em *NOTCH1* e sugeriu que esta baixa expressão gênica era devido a presença das mutações na via NOTCH1 (modificado de WITKOWSKI *et al.*, 2015). Porém, nosso estudo revelou que independente da presença de mutações nesta via, a expressão de *IKZF1* era mais baixa na LLA-T.

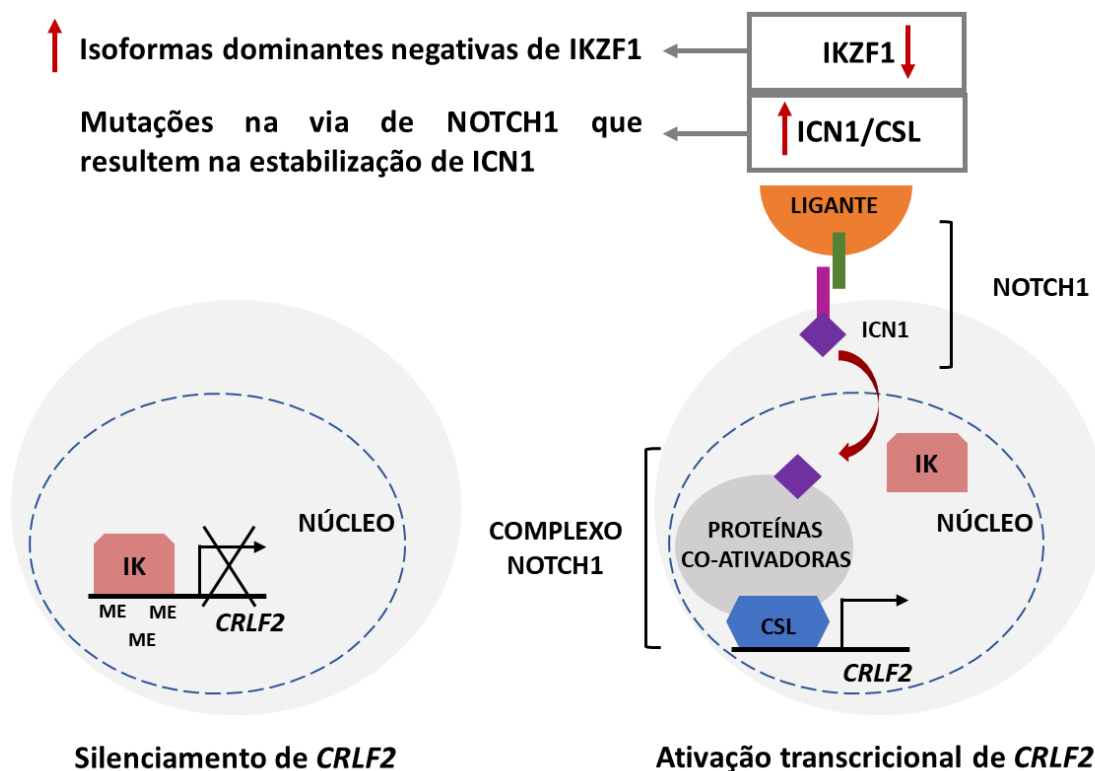


**Figura 6.2.** Ik1 reprime a atividade de ICN1 *in vitro* e a coexpressão de Ik6 impede esta repressão. Foi realizado um ensaio de luciferase utilizando um *reporter* contendo 8 cópias da sequência TGGGAA – sequência que pode ser reconhecida por CSL e IKAROS. Na presença do vetor vazio é possível ver uma atividade basal de ICN1 que é reduzida na presença do vetor com Ik1 (colunas 2-5) e aumentada na presença de Ik6 (colunas 7-9). Sozinhos, Ik1 e



Ik6 não ativam o *reporter* (colunas 5 e 10) (modificado de BEVERLY; CAPOBIANCO, 2003).

Após investigações realizadas neste estudo, uma nova hipótese surgiu para explicar a regulação da superexpressão de *CRLF2* na LLA-T. Assim como descrito para a regulação gênica de HES1, IKAROS e CSL poderiam competir pela mesma sequência de DNA na região promotora de *CRLF2*. Além disso, a desregulação no processo de *splicing* alternativo promoveria um aumento das isoformas dominante negativas, deixando a região promotora de *CRLF2* acessível para a ligação de CSL. Como resultado, ocorreria um efeito sinérgico entre a ausência de ligação de IKAROS e o aumento da via NOTCH1 promovendo a superexpressão de *CRLF2*. Porém, novos experimentos e análises funcionais são necessárias para avaliação desta proposta (Figura 6.3).



**Figura 6.3.** Novo modelo sugerido para elucidar a superexpressão de *CRLF2* nas LLAs-T. Fisiologicamente, IKZF1 se liga a região promotora de *CRLF2* levando a sua repressão transcricional. CSL, a proteína ligadora de DNA do complexo transcricional de NOTCH1, é capaz de reconhecer o mesmo motivo de ligação de IKZF1. Neste estudo conseguimos mostrar que a expressão de *CRLF2* é maior nos pacientes com mutações geradoras da estabilização da proteína intracelular de NOTCH1 (ICN1) Portanto, hipotetizamos que a partir da baixa expressão de *IKZF1* ou aumentos das isoformas dominantes negativas deste gene e

estabilização de ICN1 no núcleo da celular, CSL consegue se ligar a região promotora de *CRLF2*, promovendo a sua transcrição na LLA-T. IK, IKZF1; ICN1, subunidade intracelular de NOTCH1.

Não foi possível realizar análises de impacto prognóstico ou sobrevida global e livre de eventos neste estudo. Como as amostras PHOP eram provenientes de diversos centros especializados de diferentes regiões brasileiras, estes pacientes não foram tratados pelos mesmos protocolos, impossibilitando a uniformidade dos dados de seguimento. Além disso, muitos destes pacientes ainda estavam em tratamento durante o período de realização deste estudo. Já a coorte TARGET é composta de pacientes com LLA-T de alto risco que responderam mal ao tratamento inicial, o que adicionaria um viés de seleção às análises estatísticas.

A partir dos dados gerados neste estudo, temos como perspectivas avaliar a expressão das diferentes isoformas de *IKZF1* na LLA-T e a sua associação com a superexpressão de *CRLF2*, realizar ensaios funcionais para avaliar o perfil de regulação gênica de *CRLF2* (perfil de metilação do DNA e competição de IKZF1 e CSL pelo mesmo sítio de ligação na região promotora de *CRLF2*) e, ainda, avaliar o impacto destas alterações na sobrevida global e livre de eventos desses pacientes.

## 7. Conclusões

- O ponto de corte estabelecido para avaliação da expressão gênica de *CRLF2* possibilitou a identificação de 14 e 16% de pacientes com superexpressão de *CRLF2* nas coortes PHOP e TARGET, respectivamente, corroborando com os achados nos estudos anteriores.
- Apenas ~2 e 4% dos pacientes das coortes PHOP e TARGET apresentaram deleções e mutações em *IKZF1*, confirmando que estas alterações configuram um evento raro na LLA-T.
- Foi identificado que pacientes diagnosticados com subtipos mais imaturos de LLA-T possuem maior expressão de *CRLF2*.
- Foi demonstrado que a expressão da isoforma completa de *IKZF1* não está diretamente correlacionada com a expressão de *CRLF2* na LLA-T.
- Foi demonstrado pela primeira vez que mutações da via NOTCH1 que levam a estabilização de ICN1 está relacionada com a superexpressão de *CRLF2* em crianças com LLA-T.

## 8. Referências

- AIFANTIS, I. *et al.* Molecular pathogenesis of T- cell leukaemia and lymphoma. **Nat Rev Immunol**, v. 8, p. 380-90, 2008.
- ARBER D.A., ORAZI A., HASSERJIAN R. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, p. 2391-2405, 2016.
- ASNAFI, V. *et al.* Early response–based therapy stratification improves survival in adult early thymic precursor acute lymphoblastic leukemia: A Group for research on adult acute lymphoblastic leukemia study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 23, p. 2683–2691, 2017.
- BELL, J. J.; BHANDoola, A. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. **Nature**, v. 452, n. 7188, p. 764–767, 2008.
- BELVER, L.; FERRANDO, A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 8, p. 494–507, 2016.
- BEVERLY, L. J.; CAPOBIANCO, A. J. Perturbation of Ikaros isoform selection by MLV integration is a cooperative event in Notch. **Cancer Cell**, v. 3, n. June, p. 551–564, 2003.
- 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.
- BUDCZIES, J. *et al.* Cutoff Finder: A Comprehensive and Straightforward Web Application Enabling Rapid Biomarker Cutoff Optimization. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–7, 2012.
- CHEN, I. *et al.* Outcome modeling with. v. 119, n. 15, p. 3512–3523, 2015.
- CLAPPIER, E. *et al.* NOTCH1 and FBXW7 mutations have a favorable impact on early response to treatment, but not on outcome, in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) treated on EORTC trials 58881 and 58951. **Leukemia**, v. 24, n. 12, p. 2023–2031, 2010.
- COUSTAN-SMITH, E. *et al.* Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 2, p. 147–156, 2009.
- DE CAMARGO, B. *et al.* Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: First report of 14 population-based cancer registries. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 3, p. 715–720, 2010.
- DONGEN, J. VAN; MACINTYRE, E. acute leukemia for detection of minimal residual disease Report of the BIOMED-I Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. **Leukemia**, n. July, p. 1901–1928, 1999.
- ELLISEN, L. W. *et al.* TAN-1, the human homolog of the Drosophila Notch gene, is broken

by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. **Cell**, v. 66, n. 4, p. 649–661, 1991.

FERRANDO, A. A.; LOOK, A. T. Gene Expression Profiling in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Seminars in Hematology**, v. 40, n. 4, p. 274–280, 2003.

FUJIO, K. *et al.* Molecular cloning of a novel type 1 cytokine receptor similar to the common gamma chain Plenary paper Molecular cloning of a novel type 1 cytokine receptor similar to the common gamma chain. **Hematology**, v. 95, n. 7, p. 2204–2210, 2011.

GAO, C. *et al.* NOTCH1 mutations are associated with favourable long-term prognosis in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia: A retrospective study of patients treated on BCH-2003 and CCLG-2008 protocol in China. **British Journal of Haematology**, v. 166, n. 2, p. 221–228, 2014.

GE, Z. *et al.* High <i>CRLF2</i> expression associates with <i>IKZF1</i> dysfunction in adult acute lymphoblastic leukemia without <i>CRLF2</i> rearrangement. **Oncotarget**, v. 7, n. 31, 2016.

GEORGOPOULOS, K. *et al.* The ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. **Cell**, v. 79, n. 1, p. 143–156, 1994.

GIRARDI, T. *et al.* Europe PMC Funders Group The genetics and molecular biology of T-ALL. v. 129, n. 9, p. 1113–1123, 2017.

GREAVES, M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 8, p. 471–484, 2018.

GUPTA-ROSSI, N. *et al.* Functional Interaction between SEL-10, an F-box Protein, and the Nuclear Form of Activated Notch1 Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 37, p. 34371–34378, 2001.

HOMMINGA, I. *et al.* Integrated Transcript and Genome Analyses Reveal NKX2-1 and MEF2C as Potential Oncogenes in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer Cell**, v. 19, n. 4, p. 484–497, 2011.

HOMMINGA, I. *et al.* Characterization of a pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia patient with simultaneous LYL1 and LMO2 rearrangements. **Haematologica**, v. 97, n. 2, p. 258–261, 2012.

HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **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.

IACOBUCCI, I.; MULLIGHAN, C. G. Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 9, p. 975–983, 2017.

INUKAI, T. *et al.* Clinical significance of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Results of the Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15. **British Journal of Haematology**, v. 156, n. 3, p. 358–365, 2012.

IZRAELI, S. Leukaemia - A developmental perspective. **British Journal of Haematology**, v. 126, n. 1, p. 3–10, 2004.

KAUFMANN, C. *et al.* A complex network of regulatory elements in Ikaros and their activity during hemo-lymphopoiesis. **EMBO Journal**, v. 22, n. 9, p. 2211–2223, 2003.

KELLEY, C. M. *et al.* Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. **Current Biology**, v. 8, n. 9, p. 508-S1, 1998.

KLEINMANN, E. *et al.* Ikaros Represses the Transcriptional Response to Notch Signaling in T-Cell Development. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 24, p. 7465–7475, 2008.

KOCH, U.; RADTKE, F. Mechanisms of T Cell Development and Transformation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, n. 1, p. 539–562, 2011a.

KOCH, U.; RADTKE, F. **Notch in T-ALL: New players in a complex disease** **Trends in Immunology**, 2011b.

KOPAN, R.; ILAGAN, M. X. G. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. **Cell**, v. 137, n. 2, p. 216–233, 2009.

KOX, C. *et al.* The favorable effect of activating NOTCH1 receptor mutations on long-term outcome in T-ALL patients treated on the ALL-BFM 2000 protocol can be separated from FBXW7 loss of function. **Leukemia**, v. 24, n. 12, p. 2005–2013, 2010.

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.

LI, M. *et al.* Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 41, p. 14795–14800, 2005.

LIU, Y.-J. *et al.* TSLP: An Epithelial Cell Cytokine that Regulates T Cell Differentiation by Conditioning Dendritic Cell Maturation. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 193–219, 2007.

LIU, Y. *et al.* The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Nature Genetics**, v. 49, n. 8, p. 1211–1218, 2017.

LOPES, B. A. *et al.* IKZF1 gene in childhood b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Interplay between genetic susceptibility and somatic abnormalities. **Cancer Prevention Research**, v. 10, n. 12, p. 738–744, 2017.

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

MULLIGHAN, C. G. *et al.* Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor-and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. **Nature Genetics**, v. 41, n. 11, p. 1243–1246, 2009.

NAVARRO, J. M. *et al.* Site- and allele-specific polycomb dysregulation in T-cell leukaemia. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

OLSSON, L.; JOHANSSON, B. Ikaros and leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 169, n. 4, p. 479–491, 2015.

PALMI, C. *et al.* <i>CRLF2</i> over-expression is a poor prognostic marker in children with high risk T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Oncotarget**, v. 7, n. 37, 2016.

PARK, L. S. *et al.* Cloning of the Murine Thymic Stromal Lymphopoietin (Tslp) Receptor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 5, p. 659–670, 2000.

PATRICK, K. *et al.* Outcome for children and young people with Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia treated on a contemporary protocol, UKALL 2003. **British Journal of Haematology**, v. 166, n. 3, p. 421–424, 2014.

POMBO DE OLIVEIRA, M. S. *et al.* Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 42, n. 2, p. 121–125, 2009.

PUI, C.; EVANS, W. E. Simon-et-al-1994-mitoch-evo.pdf. 2013.

PUI, C.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute Lymphoblastic leukemia. *Lancet*, v. 371, 2008.

MULLIGHAN, C.G. *et al.* Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*, v. 360, p. 470–480, 2009.

RAETZ, E. A.; CARROLL, W. L. Refining prognosis in – positive ALL The DNA methylome : a novel biomarker. v. 123, n. 11, p. 2014–2016, 2015.

REBOLLO, A.; SCHMITT, C. Ikaros, Aiolos and Helios: Transcription regulators and lymphoid malignancies. **Immunology and Cell Biology**, v. 81, n. 3, p. 171–175, 2003.

RECHE, P. A. *et al.* Human Thymic Stromal Lymphopoietin Preferentially Stimulates Myeloid Cells. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 1, p. 336–343, 2001.

REFERENCES *et al.* An oncogenic superenhancer formed through somatic mutation of a noncoding intergenic element. **Science Biochim. Biophys. Acta Phys. Rev. Lett. Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys. Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys. Mol. Syst. Biol. Nature Biophys. J. Scienc**, v. 338, n. 387, p. 334335, 2012.

ROBERTS, K. G.; MULLIGHAN, C. G. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: Insights and treatment implications. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 6, p. 344–357, 2015.

- RUSSELL, L. J. *et al.* Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 114, n. 13, p. 2688–2698, 2009.
- SANDA, T. *et al.* Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Cell**, v. 9, n. 2, p. 75–87, 2012.
- SCHMÄH, J. *et al.* Molecular characterization of acute lymphoblastic leukemia with high CRLF2 gene expression in childhood. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 64, n. 10, p. 1–8, 2017.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.
- SIMS, J. E. *et al.* Molecular Cloning and Biological Characterization of a Novel Murine Lymphoid Growth Factor. **The Journal of Experimental Medicine @BULLET**, v. 192, n. 4, p. 671–680, 2000.
- SOULIER, J. *et al.* HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). **Blood**, v. 106, n. 1, p. 274–286, 2005.
- SOUMELIS, V. *et al.* Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. **Nature Immunology**, v. 3, n. 7, p. 673–680, 2002.
- TASIAN, S. K.; HUNGER, S. P. Genomic characterization of paediatric acute lymphoblastic leukaemia: an opportunity for precision medicine therapeutics. **British Journal of Haematology**, v. 176, n. 6, p. 867–882, 2017.
- TIEN, A. C.; RAJAN, A.; BELLEN, H. J. A notch updated. **Journal of Cell Biology**, v. 184, n. 5, p. 621–629, 2009.
- VAN VLIERBERGHE, P. *et al.* Molecular-genetic insights in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 143, n. 2, p. 153–168, 2008.
- VSHYUKOVA, V.; VALOCHNIK, A.; MELESHKO, A. Expression of aberrantly spliced oncogenic Ikaros isoforms coupled with clonal IKZF1 deletions and chimeric oncogenes in acute lymphoblastic leukemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 71, n. February, p. 29–38, 2018.
- WATANABE, N. *et al.* Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4<sup>+</sup> T cell homeostatic expansion. **Nature Immunology**, v. 5, n. 4, p. 426–434, 2004.
- WATANABE, N. *et al.* Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cells in human thymus. **Nature**, v. 436, n. 7054, p. 1181–1185, 2005.
- WENG, A. P. *et al.* Gain-of-function Notch1 mutations occur frequently in human T cell



acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 104, n. 11, p. 5A, 2004.

WINANDY, S.; WU, P.; GEORGOPOULOS, K. A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. **Cell**, v. 83, n. 2, p. 289–299, 1995.

WITKOWSKI, M. T. *et al.* Activated Notch counteracts Ikaros tumor suppression in mouse and human T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 29, n. 6, p. 1301–1311, 2015.

YAVROPOULOU, M. P.; YOVOS, J. G. The role of notch signaling in bone development and disease. **Hormones**, v. 13, n. 1, p. 24–37, 2014.

YODA, A. *et al.* Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 1, p. 252–257, 2010.

YOSHIDA, T. *et al.* Transcriptional regulation of the Ikzf1 locus. **Blood**, v. 122, n. 18, p. 3149–3159, 2013.



ZHANG, J. *et al.* The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 481, n. 7380, p. 157–163, 2012.

## 9. Anexos

### 9.1. Carta de aprovação do Comitê de ética

SERVIÇO PÚBLICO ESTADUAL	
PROCESSO: E-26/	/ /
DATA: / /	FOLHA: /
FUBRICA:	
ID FUNCIONAL:	

		SECRETARIA DE ESTADO DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
---	---	---

**TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE BOLSA** Rio de Janeiro, 16/04/2018,

**PROGRAMA** E\_01/2018 - Bolsa Nota 10 - Mestrado

**Nº DO PROCESSO** E-26/200.742/2018 - BOLSA **Nº DE MATRÍCULA** 2018.00733.0

**TÍTULO** Alterações moleculares associadas com a superexpressão de CRLF2 na leucemia linfoblástica aguda de células-T

**BOLSA DE** Mestrado-Bolsa Nota 10

**OUTORGANTE** Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

**OUTORGADO** Ana Luiza Tardem Maciel

**ENDEREÇO** Rua Senador Vergueiro, 224 Apt 905  
Flamengo Rio de Janeiro  
RJ 22230-001 TEL. 988015705

**E-MAIL** analuiza.tardem@gmail.com

**INSTITUIÇÃO** IN - Instituto Nacional de Cancer  
**UNIDADE** Centro de Pesquisa  
**DEPARTAMENTO** Pesquisa Clínica

**VALOR INICIAL** De acordo com tabela aprovada

**ORIENTADOR/COORDENADOR OU REPRESENTANTE OFICIAL DA INSTITUIÇÃO**  
Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá

**INÍCIO DA BOLSA:** 01/03/2018 **TÉRMINO:** 28/02/2019

**Duração:** 12 meses.

**Relatório Final em :** 28/02/2019

**OBS:** Caso o bolsista tenha direito e pretenda solicitar Renovação da Bolsa, o Relatório deverá ser apresentado com antecedência mínima de 2(dois) meses do término deste Termo, juntamente com o formulário de encaminhamento de relatório disponível na página da FAPERJ.

---

Avenida Erasmo Braga 118, 6º andar – Centro – Rio de Janeiro/RJ  
CEP: 20020-000 Telefone: 2333-2000

- 9.2. Termo de outorga para concessão de Bolsa Nota 10 – Mestrado -FAPERJ**
- 9.3. Artigo aprovado para publicação**
- 9.4. Trabalhos apresentados em Congressos**