



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

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

*DANIELLE TAVARES VIANNA*

**Padrão de Rearranjos Gênicos dos Receptores de Células  
T e B em Leucemias Imaturas:  
*Leucemia Linfoide Aguda de Precursor Precoce de Células T,  
Leucemia de Fenótipo Misto T/ Mieloide e  
Leucemia Mieloide Aguda com Diferenciação Mínima***

**Orientador (as):** Prof. Dra. Ilana Zalberg Renault e Dra. Bárbara C. R. Monte-Mór  
**Co-Orientadora:** Prof. Dra. Elaine Sobral da Costa

**RIO DE JANEIRO  
2021**



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

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

*DANIELLE TAVARES VIANNA*

**Padrão de Rearranjos Gênicos dos Receptores de Células  
T e B em Leucemias Imaturas:  
*Leucemia Linfóide Aguda de Precursor Precoce de Célula T,  
Leucemia de Fenótipo Misto T/ Mieloide e  
Leucemia Mieloide Aguda com Diferenciação Mínima***

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como  
parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em  
Oncologia

**Orientador (as):** Prof. Dra. Ilana Zalberg Renault e Dra. Bárbara C. R. Monte-Mór  
**Co-Orientadora:** Prof. Dra. Elaine Sobral da Costa

**RIO DE JANEIRO  
2021**

V617p Vianna, Danielle Tavares

Padrão de Rearranjos Gênicos dos Receptores de Células T e B em Leucemias Imaturas: Leucemia Linfóide Aguda de Precursor Precoce de Célula T... / Danielle Tavares Vianna. – Rio de Janeiro, 2021.  
95 f.: il.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2021.

Orientador: Prof. Dra. Ilana Zalberg Renault e Prof. Dra. Bárbara C. R. Monte-Mór.  
Co-Orientadora: Prof. Dra. Elaine Sobral da Costa.

1. Leucemia-Linfoma Linfoblástico de Células Precursoras. 2. Leucemia Eritroblástica Aguda. 3. Codificadores dos Receptores de Linfócitos T. I. Renault, Ilana Zalberg (Orient.). II. Monte- Mór, Bárbara C. R. (Orient.). III. Costa, Elaine Sobral da (Co-Orient.). IV. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. V. Título.

Catálogo na fonte  
Kátia Simões CRB7/5952

*Aos meus pais: Iara Tavares Vianna e  
Dejalmir Vianna*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu mestre e melhor amigo, Jesus, o Cristo.

Aos meus pais, Iara e Dejalmir, por me amarem tanto e sempre estarem perto.

Ao meu pedacinho de céu, minha princesa Letícia, simplesmente por existir.

Ao Alessandro, por sempre me ajudar a manter o foco.

À Fabiane, minha irmã e amiga fiel.

À Dra. Ilana Zalberg, por ser tão inspiradora e admirável.

À Dra. Bárbara Monte-Mór, pela sincera amizade e pelos incontáveis ensinamentos.

À Dra. Elaine Sobral, pelo imenso carinho e incentivo constante.

À Dra. Maria do Socorro, pela confiança e generosidade.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do CEMO – Telma, Natália, Andréia, Fátima, Luciana, Leandro e Simone que foram fundamentais para tornar esse projeto real.

Aos colegas do Laboratório do Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrica do CPQ – Francianne, Vítor e Ingrid pela intensa colaboração durante todo o projeto.

Aos colegas do Laboratório de Citometria de Fluxo do IPPMG/UFRJ – Daniela, Elen, Fabiana, Patrícia e Rafael, pela disponibilidade incessante em ajudar.

Às minhas queridas amigas – Eunice, Débora, Roberta, Fernanda, Bianca e Ourinda, pelas orações e pelo apoio em todo o tempo.

Aos meus queridos amigos do IPPMG/UFRJ – Ana Paula, Alice, Adriana, Daniel, Renata, Taís e Marcelo, pelo carinho e companheirismo.

Aos meus amados familiares e amigos, pelo apoio constante.

Aos pacientes e seus responsáveis, pela confiança e esperança.



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

## **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

**Padrão de Rearranjos Gênicos dos Receptores de Células T e B em Leucemias Imaturas:  
Leucemia Linfóide Aguda de Precursor Precoce de Células T, Leucemia de Fenótipo  
Misto T/ Mieloide e Leucemia Mieloide Aguda com Diferenciação Mínima**

### **RESUMO**

#### **TESE DE DOUTORADO**

Danielle Tavares Vianna

Apesar do grande avanço na compreensão da biogênese das leucemias agudas (LA), ainda existem subgrupos que permanecem como verdadeiros desafios tanto diagnósticos quanto terapêuticos. Esses subtipos de LA, descritos como mais imaturos e mais raros, apresentam perfis imunofenotípicos com certo grau de sobreposição expressando uma significativa quantidade de marcadores comuns a linhagens celulares distintas. Essas entidades não apresentam alterações citogenéticas características conhecidas e tendem a se comportar de forma mais agressiva, com prognóstico incerto. Dentre esses subgrupos de LA, destacam-se a *Leucemia Linfóide Aguda de Precursor Precoce de Célula T (ETP-ALL)*, a *Leucemia Aguda de Fenótipo Misto T/ Mieloide (MPAL T/M)* e a *Leucemia Mieloide Aguda com Diferenciação Mínima (LMA M0)*. Recentemente, novas tecnologias revelaram a presença de uma certa sobreposição biológica entre essas entidades, com a identificação de alterações moleculares que parecem co-existir nesses três subgrupos. Com o objetivo de contribuir para melhor compreensão do panorama molecular dessas entidades clínicas e da estreita relação biológica entre elas, investigamos a presença de rearranjos nos genes dos receptores de células T e B nesses 3 subgrupos de LA, identificando os segmentos gênicos envolvidos nos rearranjos – V, (D) e J – e a composição da região juncional entre esses segmentos. Além disso, essa coorte também foi investigada quanto à presença de mutações do tipo *FLT3-ITD*. Neste estudo, foram analisadas amostras diagnósticas de medula óssea ou sangue periférico de 41 pacientes pediátricos, sendo 21 de ETP-ALL, 8 de MPAL T/M e 12 de LMA M0. Para análise dos rearranjos V(D)J, foram realizadas múltiplas PCR alelo-específicas, seguidas pela análise de heteroduplex dos produtos em gel de poliacrilamida e pelo sequenciamento direto das bandas monoclonais, primeiramente em um estudo-piloto com linhagens celulares para implementação da metodologia e, posteriormente, nas amostras-alvo do estudo. Rearranjos V(D)J foram identificados em 71,4% (15/21), 25% (2/8) e 25% (3/12) dos casos de ETP-ALL, MPAL T/M e LMA M0, respectivamente. Na ETP-ALL, foram encontrados 44 rearranjos monoclonais/bi-alélicos envolvendo os 4 *loci* gênicos estudados (*TCRG*, *TCRD*, *TCRB* e *IGH*). Sessenta e dois por cento dos pacientes com ETP-ALL apresentaram pelo menos um rearranjo envolvendo o *locus* *TCRD*, sendo este o locus mais comumente rearranjado. As LMA M0 apresentaram rearranjos nos *loci* *TCRB* e *IGH*, e as MPAL T/M, nos *loci* *TCRG* e *IGH*. O perfil molecular dos rearranjos TCR dos pacientes ETP-ALL revelou-se diferente daquele descrito na LLA-T, enquanto que pareceu ser semelhante entre os casos de MPAL T/M e LMA M0. *FLT3-ITD* foi encontrada em 19% dos casos de ETP-ALL, enquanto apenas 10% das LMA M0 abrigaram a mutação. Sendo assim, os resultados encontrados corroboram com a existência de concordâncias genômicas nos subtipos de LA avaliadas e sugerem que estudos moleculares possam contribuir para o entendimento da biogênese dessas entidades clínicas.



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

## **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

### **Pattern of Gene Rearrangements of T and B Cell Receptors in Immature Leukemias: Early T Precursor Acute Lymphoid Leukemia, Mixed-Phenotype Acute Leukemia T/Myeloid and Acute Myeloid Leukemia with Minimal Differentiation**

#### **ABSTRACT**

#### **TESE DE DOUTORADO**

Danielle Tavares Vianna

Despite the great advance in the understanding of the biogenesis of acute leukemias (LA), there are still subgroups that remain as true diagnostic and therapeutic challenges. These subtypes of LA, described as more immature and rare, have immunophenotypic profiles with a certain degree of overlap expressing a significant number of markers common to different cell lines. These entities do not present known cytogenetic changes and tend to behave more aggressively, with an uncertain prognosis. Among these subgroups of LA, we highlight the Early T-Cell Precursor Early Lymphoid Leukemia (ETP-ALL), the T-Myeloid Mixed Phenotype Acute Leukemia (MPAL T/M) and the Acute Myeloid Leukemia with Minimal Differentiation (AML M0). Recently, new technologies have revealed the presence of a certain biological overlap between these entities, with the identification of molecular changes that seem to co-exist in these three subgroups. In order to contribute to a better understanding of the molecular panorama of these clinical entities and the close biological relationship between them, we investigated the presence of rearrangements in the T and B cell receptor genes in these 3 LA subgroups, identifying the gene segments involved in the rearrangements - V, (D) and J - and the composition of the junctional region between these segments. In addition, this cohort was also investigated for the presence of *FLT3-ITD*-type mutations. In this study, diagnostic samples of bone marrow or peripheral blood from 41 pediatric patients were analyzed, 21 of ETP-ALL, 8 of MPAL T/M and 12 of AML M0. For the analysis of the V(D)J rearrangements, multiple allele-specific PCRs were performed, followed by the heteroduplex analysis of the products in polyacrylamide gel and by direct sequencing of the monoclonal bands, first in a pilot study with cell lines to implement the methodology and, later, in the target samples of the study. V(D)J rearrangements were identified in 71.4% (15/21), 25% (2/8) and 25% (3/12) of the cases of ETP-ALL, MPAL T/M and LMA M0, respectively. In ETP-ALL, 44 monoclonal / bi-allelic rearrangements were found involving the 4 studied genic loci (*TCRG*, *TCRD*, *TCRB* and *IGH*). Sixty-two percent of patients with ETP-ALL had at least one rearrangement involving the *TCRD* locus, this being the most commonly rearranged *locus*. The LMA M0 showed rearrangements in the *TCRB* and *IGH loci*, and the MPAL T/M, in the *TCRG* and *IGH loci*. The molecular profile of the TCR rearrangements of the ETP-ALL patients proved to be different from that described in the T-ALL, while it appeared to be similar between the cases of MPAL T/M and AML M0. *FLT3-ITD* was found in 19% of ETP-ALL cases, while only 10% of AML M0 harbored the mutation. Thus, the results found corroborate the existence of genomic concordances in the evaluated LA subtypes and suggest that molecular studies may contribute to the understanding of the biogenesis of these clinical entities.

## Lista de Figuras

Figura 2.1. Hierarquia atualizada da hematopoiese .....	6
Figura 2.2. Esquema das fases do desenvolvimento dos precursores das células T no timo....	10
Figura 2.3. Vias de sinalização iniciadas pela ativação de NOTCH na LLA-T.....	11
Figura 2.4. Esquema das três fases do desenvolvimento das células T precoces.....	13
Figura 2.5. Estrutura do Receptor de Célula T.....	15
Figura 2.6. Estrutura da proteína e dos genes do TCR.....	16
Figura 2.7. Complexos Gênicos dos Receptores de Células T.....	17
Figura 2.8. Diagrama das etapas da Recombinação Somática no locus TCRB.....	19
Figura 2.9. Diagrama das principais vias de sinalização intracelular induzidas pelo pré-TCR.....	21
Figura 2.10. Diagrama esquemático das Sequências de Sinal de Recombinação (RSS).....	22
Figura 2.11. Processamento das regiões juncionais V(D)J.....	23
Figura 2.12. Processamento das regiões juncionais V(D)J.....	24
Figura 2.13. Blastos da Leucemia Aguda de Fenótipo Misto.....	40
Figura 5.1. Análise Heteroduplex dos rearranjos dos genes de TCR/Ig.....	54
Figura 5.2. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos das PCR do Estudo-Piloto.....	57
Figura 5.3. Análise Heteroduplex dos rearranjos dos genes da Ig/TCR.....	58
Figura 5.4. Análise do sequenciamento direto da amostra 5 e identificação dos segmentos V(D)J rearranjados e da região juncional.....	62
Figura 5.5. Resultado da análise de fragmento para pesquisa de FLT3-ITD no caso 1 portador de ETP-ALL.....	67
Figura 5.6. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos das PCR do Estudo-Principal.....	68
Figura 5.7. Análise Heteroduplex dos rearranjos TCR/BCR do Estudo Principal.....	69
Figura 5.8. Resultado da Análise Heteroduplex dos rearranjos TCR/ BCR do Estudo Principal .....	70
Figura 5.9. Análise do sequenciamento direto da amostra 7 no PCR C.....	74
Figura 6.1 Representação Esquemática do impacto da caracterização molecular dos rearranjos de TCR/BCR e da presença de FLT3-ITD na definição de linhagem na ETP-ALL, na MPAL T/Mieloide e na LMA M0.....	84

## Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Sistema de pontuação de Catvosky e col. para diagnóstico de Leucemia Aguda Bifenotípica.....	33
Tabela 2.2. Sistema de pontuação revisado pelo grupo EGIL para Leucemia Aguda Bifenotípica.....	34
Tabela 2.3. Painel de marcadores recomendado pelo grupo EGIL para caracterização de Leucemia Aguda Bifenotípica.....	34
Tabela 2.4. Critérios para assegurar mais do que uma linhagem em uma única população de blastos.....	36
Tabela 2.5. Classificações da WHO para Leucemias Agudas de Linhagem Ambígua em 2001, 2008 e 2016.....	37
Tabela 5.1. Distribuição dos 41 casos analisados no Estudo Principal por sexo e idade.....	64
Tabela 5.2. Distribuição dos 41 casos analisados no Estudo Principal por leucometria.....	65

## Lista de Quadros

Quadro 4.1. Combinação de <i>primers</i> usada para detecção de rearranjos dos genes do TCR/Ig no Estudo-Piloto e no Estudo Principal.....	51
Quadro 4.2. Sumário dos reagentes e volumes utilizados para cada reação de PCR.....	52
Quadro 4.3. Sumário dos reagentes e volumes utilizados para cada reação de sequenciamento direto.....	55
Quadro 5.1. Sumário da Análise Heteroduplex do Estudo-Controle.....	61
Quadro 5.2. Rearranjos V(D)J e Regiões Juncionais identificados.....	63
Quadro 5.3. Perfil imunofenotípico dos pacientes com ETP-ALL.....	65
Quadro 5.4. Perfil imunofenotípico dos pacientes com MPAL T/Mieloide.....	66
Quadro 5.5. Perfil imunofenotípico dos pacientes com LMA M0.....	66
Quadro 5.6. Distribuição das mutações FLT3-ITD e razão alélica entre os pacientes com ETP-ALL, MPAL T/mielóide e LMA M0.....	67
Quadro 5.7. Distribuição dos rearranjos monoclonais e bi-alélicos na ETP-ALL.....	72
Quadro 5.8. Número de rearranjos monoclonais ou bi-alélicos por paciente na ETP-ALL.....	72
Quadro 5.9. Distribuição dos rearranjos monoclonais ou bi-alélicos na ETP-ALL de acordo com o locus rearranjado.....	72
Quadro 5.10. Rearranjos monoclonais e bi-alélicos e Regiões Juncionais identificados na ETP-ALL.....	75
Quadro 5.11. Rearranjos oligoclonais identificados na ETP-ALL.....	76
Quadro 5.12. Distribuição dos rearranjos monoclonais ou bi-alélicos completos e incompletos na ETP-ALL .....	76
Quadro 5.13. Segmentos gênicos rearranjados por locus de TCR e IGH na ETP-ALL.....	77
Quadro 5.14. Segmentos gênicos rearranjados por locus de TCR e IGH na MPAL T/Mielóide .....	78
Quadro 5.15. Segmentos gênicos rearranjados por locus de TCR e IGH na LMA M0.....	78
Quadro 6.1. Distribuição dos subtipos de rearranjos TCRD na ETP-ALL e na LLA-T.....	82
Quadro 6.2. Distribuição dos subtipos de rearranjos TCRG na ETP-ALL e na LLA-T.....	82

# Índice

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>3</b>
2.1. Origem e desenvolvimento das células sanguíneas.....	3
2.1.1. Desenvolvimento mielóide.....	6
2.1.2. Desenvolvimento linfóide.....	9
2.1.2.1. Rearranjo dos genes do receptor de células T.....	15
2.2. Leucemias agudas na infância.....	27
2.2.1. Leucemia Linfóide Aguda de Preccursores T Precoces.....	30
2.2.2. Leucemia Aguda de Fenótipo Misto (MPAL).....	32
2.2.2.1. Leucemia Aguda de Fenótipo Misto T/ Mielóide (MPAL T/M).....	40
2.2.3. Leucemia Mielóide Aguda Com Diferenciação Mínima (LMA M0).....	42
2.3. Achados imuno-genéticos similares entre as ETP-ALL, MPAL T/M e LMA.....	44
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>47</b>
<b>4. Materiais e Métodos.....</b>	<b>48</b>
4.1. Pacientes e amostras.....	48
4.2. Processamento das amostras.....	48
4.3. Análise semi-quantitativa de <i>FLT3-ITD</i> .....	49
4.4. Identificação de rearranjos completos e incompletos dos TCR.....	50
4.4.1. PCR V(D)J.....	50
4.4.2. Análise Heteroduplex.....	53
4.4.3. Sequenciamento Direto.....	54
4.5. Análise Estatística.....	56
<b>5. Resultados.....</b>	<b>57</b>
5.1. Estudo-Piloto.....	57
5.1.1. PCR V(D)J e eletroforese em gel de agarose a 1%.....	57
5.1.2. Análise Heterodúplex.....	57
5.1.3. Sequenciamento Direto.....	62
5.2. Estudo Principal.....	64
5.2.1. Casuística.....	64
5.2.2. Pesquisa de <i>FTL3-ITD</i> .....	66
5.2.3. Pesquisa de rearranjos V(D)J.....	68
5.2.3.1. PCR V(D)J e Eletroforese em gel de agarose a 1%.....	68

5.2.3.2	Análise Heteroduplex.....	68
5.2.3.2.1	Análise Heteroduplex na ETP-ALL.....	71
5.2.3.2.2	Análise Heteroduplex na MPAL T/Mielóide.....	73
5.2.3.2.3	Análise Heteroduplex na LMA M0.....	73
5.2.3.3	Sequenciamento Direto das amostras com rearranjos V(D)J.....	73
5.2.3.3.1	Sequenciamento Direto das amostras de ETP-ALL com rearranjos.....	74
5.2.3.3.2	Sequenciamento Direto das amostras de MPAL T/Mielóide com rearranjos.....	77
5.2.3.3.3	Sequenciamento Direto das amostras de LMA M0 com rearranjos.....	78
<b>6.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>79</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>85</b>
<b>8.</b>	<b>Referências Bibliográfica.....</b>	<b>86</b>
<b>9.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>93</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

-	Ausência
+	Positividade
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ASO	<i>Allele-specific oligonucleotide</i>
BCR	<i>B cell receptor</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
CEMO	Centro de Transplantes de Medula Óssea
CNV	<i>Copy Number Variation</i>
Ch	Cromossomo
CTH	Célula Tronco Hematopoiética
CTH-LP	Célula Tronco Hematopoiética de longo prazo
CTH-CP	Célula Tronco Hematopoiética de curto prazo
Del	Deleção
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA-metiltransferase
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DRM	Doença Residual Mínima
dsDNA	DNA dupla-fita
FAB	<i>French-American-British group</i>
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
FLT3	<i>FMS-like tyrosina kinase 3</i>
FLT3L	<i>FMS-like tyrosina kinase 3 ligand</i>
FT	Fator tecidual
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GAB2	<i>GRB2-associated binder 2</i>

GRB2	<i>Growth Factor Receptor-Bound Protein-2</i>
HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen - DR</i>
IG	Imunoglobulina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ITD	<i>Internal tandem duplications</i>
LA	Leucemias Agudas
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMA M0	Leucemia Mielóide Aguda com diferenciação mínima
M <sub>3</sub> V	Variante microgranular
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MEK	<i>MAPK/ERK Kinases</i>
MG	Miligrama
mL	Mililitro
mm <sup>3</sup>	Milímetro
MPAL T/M	Mixed-Phenotype Acute Leukemia T/Myeloid
MO	Medula óssea
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
NB4	<i>Human APL cell line</i>
Ng	Nanograma
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	<i>phosphoinositol-3-Kinase</i>
pM	Picomolar
QT	Quimioterapia

q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
RQ-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo-real
SLE	Sobrevida livre de eventos
SP	Sangue periférico
STAT	<i>Signal transducer and activators of transcription</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
TKD	Domínio tirosina quinase
WT	<i>Wild type</i>

## I. Introdução

As leucemias agudas (LA) são um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas malignas agressivas, que se caracterizam pelo bloqueio da diferenciação celular e pela expansão clonal de precursores hematopoiéticos na medula óssea. Essas células malignas (blastos) ocupam a medula óssea e inibem a hematopoiese normal, gerando repercussões clínicas consequentes à anemia, à leucopenia e à plaquetopenia decorrentes dessa condição. As LA acometem indivíduos em todas as faixas etárias, com picos de incidência entre as crianças e indivíduos mais idosos (HOFFMAN, 2018).

Nas últimas décadas, muito se avançou no entendimento da patogênese das LA e, em grande parte, pelo desenvolvimento e aperfeiçoamento de ferramentas na esfera da biologia molecular. Novas abordagens diagnósticas e terapêuticas foram desenvolvidas, como terapias para alvos moleculares específicos, por exemplo, permitindo um notório ganho na sobrevida dos pacientes. Entretanto, apesar dos excelentes resultados alcançados para alguns subtipos de LA, ainda existem subgrupos da doença que estão bem distantes dessa realidade, permanecendo como verdadeiros desafios tanto diagnósticos como terapêuticos.

Embora seja possível uma classificação imunofenotípica acurada de grande parte dos casos de LA, ainda existem entidades que apresentam perfis imunofenotípicos com certo grau de sobreposição, expressando uma significativa quantidade de marcadores comuns a linhagens distintas. Essas entidades clínicas são descritas como leucemias mais imaturas que, além de mais raras, não têm até o momento alterações citogenéticas características descritas. Clinicamente, tendem a se comportar de forma mais agressiva, com impacto prognóstico incerto – apesar do tratamento altamente intensivo e tóxico ao qual os pacientes são submetidos. Dentre esses subgrupos de LA, destacam-se a *Leucemia Linfóide Aguda de Precursor Precoce de Célula T (ETP-ALL)*, a *Leucemia Aguda de Fenótipo Misto T/ Mieloide (MPAL T/M)* e a *Leucemia Mielóide Aguda com Diferenciação Mínima*, também denominada **LMA M0** pela classificação FAB (ALEXANDER *et al.*, 2018).

Recentes estudos apontam para uma certa sobreposição biológica entre essas entidades clínicas, com a identificação de alterações moleculares que parecem co-existir nesses três subgrupos. Embora poucos trabalhos tenham investigado essa questão – sobretudo na população pediátrica, os rearranjos dos genes dos receptores das células T (TCR) e das imunoglobulinas (Ig), característicos de células linfóides em desenvolvimento, já foram descritos em alguns subtipos de leucemias mielóides agudas. Inversamente, mutações em genes

classicamente presentes nas leucemias mieloides, como *FLT3-ITD*, também parecem ocorrer em uma significativa frequência dos casos de ETP-ALL (ZHANG *et al.*, 2012).

Esses são exemplos de achados genômicos que corroboram para existência de uma estreita relação biológica entre esses subgrupos de LA. Essa concordância sugere que eles possam ser agrupados em uma mesma categoria – o que poderia trazer impactos relevantes nas estratégias atuais de tratamento adotadas. Dessa forma, o melhor entendimento das bases moleculares dessas entidades clínicas pode contribuir significativamente para o estabelecimento de uma abordagem diagnóstica mais acurada, assim como para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes (GUTIERREZ e KENTISIS, 2018).

A fim de cooperar para elucidação do complexo panorama genético dessas raras e pouco compreendidas entidades clínicas, nós investigamos a presença de rearranjos dos genes de TCR/BCR e de mutações no gene *FLT3*, tipo *ITD*, em uma coorte de 41 pacientes pediátricos portadores de um desses três subtipos de leucemias agudas: Leucemia Linfóide Aguda de Precursor Precoce de Célula T, Leucemia Aguda de Fenótipo Misto T/ Mieloide e Leucemia Mieloide Aguda Indiferenciada – que serão mais profundamente descritas nas seções subsequentes.

## II. Revisão Bibliográfica

### 2.1 Origem e Desenvolvimento das Células Sanguíneas

Apesar das extremas diferenças estruturais e funcionais entre as células que compõem o tecido sanguíneo, existem fortes evidências que todas elas se originam a partir de um precursor comum, indiferenciado, a *célula tronco-hematopoiética* (CTH), e, o processo pelo qual a CTH dá origem a essa ampla gama de células é conhecido como *hematopoiese*. A hematopoiese é um processo intensamente complexo, finamente regulado pela ativação e silenciamento de grupos gênicos, que ocorre ao longo de toda a vida do indivíduo e se inicia muito precocemente durante a embriogênese, na fase de gastrulação, mais especificamente no saco vitelínico extra-embriônico. Cerca de 1 a 2 dias depois de iniciada, a hematopoiese, até então conhecida como primitiva, dá lugar à chamada *hematopoiese definitiva*, com a produção das células sanguíneas ocorrendo nos recém-surgidos tecidos hematopoiéticos – oriundos dos tecidos mesodérmicos localizados na porção anterior da região da aorta-gônada-mesonéfrons (AGM) do embrião. Nessa fase, conhecida como *terceira onda*, ocorre o surgimento das primeiras células com características de CTH (KAUSHANSKY, 2016; HOFFMAN, 2018). Essas células são conhecidas como células-tronco hematopoiéticas de repopulação a longo prazo (CTH-RLP ou apenas CTH-LP). Elas possuem uma importante capacidade de autorrenovação, que é controlada por fatores de transcrição conhecidos, como IKAROS e E2A (ALVAREZ-ERRICO *et al.*, 2015). Além disso, apresentam a expressão de muitos marcadores moleculares encontrados nas células endoteliais que formam a vasculatura, como CD34, FLT3 ligante, FLK-1, TAL-1, GATA-2, LMO-2, AML-1 e CD31. Por volta de 5 semanas de gestação, o fígado fetal torna-se a principal fonte de células sanguíneas e, aproximadamente na 8ª semana de gestação, a medula óssea começa a povoar-se com células hematopoiéticas. Da 6ª semana até 6-7 meses de vida fetal, o baço e o fígado são os principais sítios de hematopoiese, e após esse período, esse posto passa a ser ocupado pela medula óssea, sobretudo pelos ossos chatos. Já na fase pós-natal, toda a medula óssea se torna hematopoiética e, posteriormente, os ossos longos, mais especificamente o esqueleto central e as extremidades proximais do fêmur e do úmero, assumem exclusivamente a função de produzir as células sanguíneas nos indivíduos adultos (KAUSHANSKY, 2016; HOFFMAN, 2018).

Para entendermos mais profundamente a origem das células hematopoiéticas e o estabelecimento de suas *linhagens celulares* (*linfóide* – incluem os progenitores e precursores linfóides, os linfócitos e os plasmócitos – e *mieloide* – incluem os demais leucócitos, além dos setores eritróide e megacariocítico), é importante a compreensão mais minuciosa da

hematopoiese e da conseqüente diferenciação iniciada na CTH. Nos últimos anos, com o desenvolvimento de novas tecnologias, o entendimento desse intrigante processo tem sido aprofundado e algumas questões têm sido levantadas. A idéia de um processo rigidamente hierarquizado em diferentes etapas tem sido substituída pela hipótese de um fluxo contínuo de diferenciação celular sem limites tão precisamente definidos, como outrora se imaginava. A imunofenotipagem tem sido uma importante ferramenta para que os estágios dinâmicos desse caminho de diferenciação possam ser reconhecidos, permitindo o estabelecimento da fase de maturação celular e a linhagem com a qual a célula tronco se comprometeu (BUENROSTRO *et al.*, 2018; LAURENTI; GÖTTGENS, 2018; ZHANG *et al.*, 2018).

A hematopoiese é minuciosamente regulada pela atuação orquestrada de grupos específicos de fatores de transcrição em momentos cruciais da diferenciação celular, induzindo a ativação ou o silenciamento de outros genes linhagem-específicos e, por conseguinte, acabando por direcionar a diferenciação celular. Células tronco hematopoiéticas precoces podem expressar marcadores de múltiplas linhagens e, sob o efeito complexo desses fatores de transcrição, podem ter suprimida sua programação gênica alternativa, o que restringe o potencial de diferenciação da célula precursora a uma linhagem específica (ORKIN, 2003; PAUL *et al.*, 2015; BUENROSTRO *et al.*, 2018; LAURENTI; GÖTTGENS, 2018; ZHANG *et al.*, 2018).

Além disso, ao contrário do proposto pelo modelo clássico de hematopoiese hierarquizada, as CTH têm se revelado uma população de células heterogêneas, tanto em suas habilidades de autorrenovação quanto no seu potencial de diferenciação em uma linhagem específica (ZHANG *et al.*, 2018). As CTH apresentam uma assinatura de expressão gênica semelhante, porém com variação na arquitetura de cromatina e conseqüente acessibilidade diferenciada a diferentes *loci* gênicos relacionados às linhagens. Dessa forma, as CTH já parecem revelar algum grau de programação linhagem-específica, demonstrando que o comprometimento com uma determinada linhagem parece acontecer ainda em etapas bem precoces da diferenciação hematopoiética (TANG *et al.*, 2017; BUENROSTRO *et al.*, 2018).

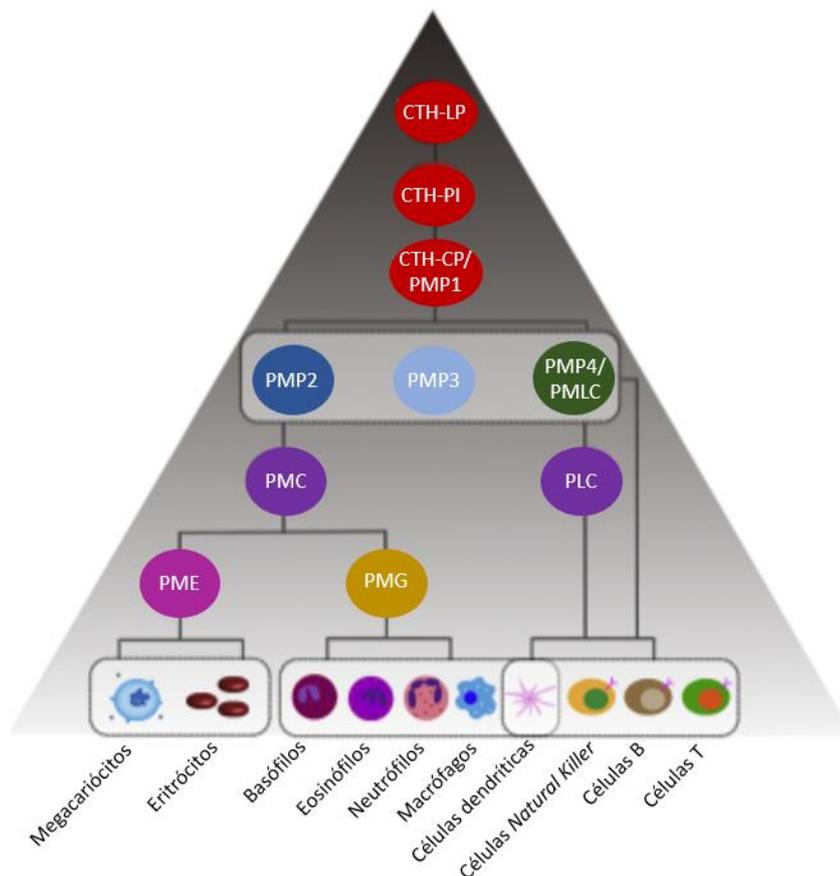
Classicamente, de acordo com a duração e o nível de reconstituição multilinhagem que elas proporcionam, as CTH podem ser classificadas em duas subpopulações: CTH de longo prazo (CTH-LP) e CTH de curto prazo (CTH-CP). Como citado anteriormente, as CTH-LP são as primeiras CTH a surgirem na hematopoiese e apresentam perfil imunofenotípico classicamente definido como: Lin<sup>-</sup>cKit<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>Flt3<sup>-</sup> (KOCH; RADTKE, 2011). São uma população rara na medula óssea, caracterizando-se pela capacidade permanente de autorrenovação e de reconstituição do tecido hematopoiético. Encontram-se num estado quiescente e, quando expostas a um estímulo de estresse, as CTH-LP entram no ciclo celular.

Já quando são expostas a estímulos de diferenciação, as CTH-LP transformam-se nas CTH-CP, identificadas como Lin<sup>-</sup>cKit<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>. Estas são células capazes de restaurar rapidamente o sistema hematopoiético, por até cerca de 6-8 semanas após um transplante de medula óssea, porém apresentam um menor potencial de autorrenovação. Além disso, as CTH-CP podem se diferenciar nos chamados progenitores multipotentes (PMP) (BUENROSTRO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018).

Recentemente, novas subpopulações de CTH têm sido descritas. Uma dessas populações é a de células-tronco hematopoiéticas de prazo intermediário (CTH-PI). Trata-se de uma grupo transitório de células, que apresentam capacidade de autorrenovação e situam-se entre as CTH-LP e CTH-CP (BENVENISTE *et al.*, 2010). Além disso, já foi descrita uma subpopulação de CTH comprometida preferencialmente com a diferenciação linfóide e imunofenotipicamente semelhante aos PMP do subgrupo 4 (descritos mais a frente), porém com alta expressão do gene FLT3 (Lin<sup>-</sup>cKit<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>). Essa subpopulação de CTH foi denominada precursores multipotentes linfóide-comprometidos (PMLC ou, do inglês, *Lymphoid-Primed Multipotent Progenitors* – LPMP) (ADOLFSSON *et al.*, 2005). Por outro lado, já foi identificada em murinos, uma outra subpopulação de CTH comprometida com a linhagem mieloide. Esse subgrupo possui capacidade de autorrenovação por mais de 8 semanas revelando vias alternativas de repopulação mieloide que poderiam ser essenciais nas respostas rápidas à ablação transplante-induzida. Da mesma forma, esse achado corrobora com a idéia de que a perda do potencial de autorrenovação e a progressão gradual nos estágios de diferenciação não são essenciais para o comprometimento das CTH com linhagens específicas (YAMAMOTO *et al.*, 2013).

Oriundos das CTH, os progenitores multipotentes (PMP) ainda possuem algumas características imunofenóticas comuns às suas células progenitoras, como a positividade para CD34<sup>+</sup> e ausência de CD38, CD90 CD45RA, CD49f e LIN. Os PMP possuem capacidade de autorrenovação limitada ou não detectável, ou seja, permitem uma regeneração multilinhagem apenas de curto prazo (até 8 semanas), mas apresentam maior atividade mitótica quando comparados às CTH (MORRISON *et al.*, 1997; YAMAMOTO 2013). Atualmente, os PMP podem ser categorizados em subpopulações (PMP1, PMP2, PMP3 e PMP4) de acordo com o seu perfil imunofenotípico, seu status no ciclo celular, sua capacidade de diferenciação e sua abundância na medula óssea (WILSON *et al.*, 2008; PIETRAS *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2018). Nesse contexto, os PMP1 estão mais próximos das CTH-CP enquanto as outras subpopulações de PMP parecem estar um passo a frente no processo de diferenciação, atuando para sustentar a produção normal do tecido sanguíneo (PIETRAS *et al.*, 2015). Os PMP2 e PMP3 diferenciam-se nos chamados progenitores mieloides comuns (PMC) que podem se

diferenciar em progenitores megacariocíticos/ eritróides (PME) e progenitores granulocíticos/ de macrófagos (PMG). Já os PMP4 são geralmente mais raros e diferenciam-se nos progenitores linfóides comuns (PLC) que dão origem aos linfócitos. Interessantemente, foi demonstrado que durante as fases de regeneração do tecido hematopoiético, os PMP4 podem ser transitoriamente superproduzidos pelas CTH e direcionados à diferenciação mieloide (PIETRAS *et al.*, 2015). (Figura 2.1)



**Figura 2.1. Hierarquia atualizada da hematopoiese.** CTH-LP: Célula tronco hematopoiética – longo prazo; CTH-PI: Célula tronco hematopoiética – prazo intermediário; CTH-CP: Célula tronco hematopoiética – curto prazo; PMP: Progenitor multipotente; PMC: Precursor mielóide comum; PME: Progenitor de megacariócitos/ eritrócitos; PMG: Progenitor dos macrófagos/ granulócitos; PMLC: Precursor multipotente linfóide-comprometido; PLC: Progenitor linfóide comum. Fonte: Adaptado de (Zhang *et al.*, 2018).

### 1.2.2 Diferenciação Mielóide

A chamada linhagem mielóide inclui células do tecido sanguíneo originadas na medula óssea e que possuem uma ampla variedade de funções, incluindo os eritrócitos, megacariócitos, monócitos, células dendríticas e granulócitos. Estas são células efetoras cruciais da resposta imune inata e são importantes reguladoras da imunidade adaptativa (ALVAREZ-ERRICO *et al.*, 2015; KAUSHANSKY, 2016; HOFFMAN, 2018).

A diferenciação e ativação de progenitores mielóides a partir de células-tronco hematopoiéticas (CTH) indiferenciadas é um processo complexo, envolvendo vários reguladores transcricionais, como PU.1 e CEBP $\alpha$ , a expressão de fatores específicos de linhagem e de receptores de citocinas, além de mecanismos epigenéticos que levam a modificações de histonas e a metilação do DNA. Os passos iniciais desse processo ocorrem na medula óssea e são determinados por sinais de citocinas fornecidos principalmente pelas células estromais, promovendo a ativação progressiva de um programa de transcrição gênica mielóide-específico (CHEN *et al.*, 2014; ALVAREZ-ERRICO *et al.*, 2015; WILSON *et al.*; 2016).

Nas fases mais iniciais, a progressão das CTH pluripotentes para tipos celulares cada vez mais comprometidos com a linhagem mielóide depende, em grande parte, da intensidade da expressão do fator de transcrição PU.1. Este por sua vez, interage com enzimas que promovem a metilação do DNA, como a metilcitosina dioxigenase TET2 e DNA metiltransferase 3B (DNMT3B). Outro importante fator de transcrição nesta fase é a proteína de ligação  $\alpha$  potenciadora - CCAAT (CEBP $\alpha$ ) que coopera com PU.1 para promover a identidade mielóide da célula (ALVAREZ-ERRICO *et al.*, 2015).

Como descrito previamente, as CTH diferenciam-se em progenitores multipotentes (PMP) e as subpopulações PMP2 e PMP3 originam principalmente os chamados precursores mielóides comuns (PMC), com perfil imunofenotípico CD34+CD117+HLADR+. Dependendo do estímulo recebido, os PMC podem originar os progenitores dos granulócitos/macrófagos (PMG) ou os progenitores dos megacariócitos/eritrócitos (PME). (LAIOSA; STADTFELD; GRAF, 2006; ZHANG *et al.*, 2018). Existem fatores de crescimento específicos que direcionam e sustentam o caminho a ser seguido pelos PMC. Sabe-se, por exemplo, que quando a expressão da histona deacetilase 1 (HDAC1) é sustentada pela proteína de ligação GATA1, o PMC caminha para diferenciação em PME, produzindo eritrócitos e plaquetas. Já quando a expressão de HDAC1 é regulada negativamente pelos fatores de transcrição CEBP, os PMC se diferenciam em PMG, originando os monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos e as células dendríticas (WADA *et al.*, 2008).

As etapas finais de diferenciação, que geram células mielóides maduras, ocorrem no sangue ou em tecidos periféricos e também são dependentes da exposição das células precursoras a outros estímulos, como citocinas, antígenos, entre outros (CHEN *et al.*, 2014; ALVAREZ-ERRICO *et al.*, 2015; WILSON *et al.*; 2016). Os monócitos por exemplo, em tecidos inflamados, sofrem diferenciação terminal em macrófagos – processo controlado pelo fator de transcrição MAFB – ou em células dendríticas inflamatórias – cujo processo é controlado pela expressão do fator regulador de interferon- 8 (IRF8). O IRF8 também bloqueia programas de transcrição granulocítica (ALVAREZ-ERRICO *et al.*, 2015).

A diferenciação em neutrófilos envolve 6 fases bem definidas morfológica e imunofenotípica (mieloblastos, promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastões e neutrófilos maduros ou segmentados). Do ponto de vista imunofenotípico, cursam com a perda progressiva da expressão da mieloperoxidase citoplasmática (cyMPO) e CD33 – que estão fortemente expressas até a fase de promielócitos. A molécula de superfície CD15 começa a ser expressa nas células comprometidas com a diferenciação de neutrófilos que já perderam a expressão de CD34 (mieloblastos CD34-), enquanto o CD11b começa ser expresso em mielócitos, o CD16 na fase seguinte até o aparecimento de CD10 em neutrófilos maduros. A expressão de superfície de CD13 é intensa nas fases mais imaturas de diferenciação a neutrófilos, diminui na passagem de promielócitos para mielócitos e depois volta a aumentar em neutrófilos maduros. (ELGHETANY, 2002; VAN LOCHEM *et al.*, 2004).

Todo esse complexo processo de diferenciação é finamente orquestrado pela transcrição de genes específicos e a perda dessa minuciosa regulação pode levar ao desenvolvimento de doenças hematológicas mielóides, como síndrome mielodisplásica e leucemia mieloide aguda (LMA) (WILSON *et al.*, 2016).

### 1.2.3 Diferenciação Linfóide T

Os linfócitos T (LT) são células altamente especializadas que compõem o sistema imunológico, sendo os principais mediadores da imunidade mediada por célula, a chamada imunidade adquirida ou adaptativa. Além do importante papel na defesa do organismo contra vírus e bactérias invasoras, os linfócitos T também são fundamentais na vigilância imunológica contra células tumorais e tecidos estranhos, subdividindo-se em grupos ainda mais especializados – células T CD4, células T CD8, células T *Natural Killer* e Células T regulatórias (DALEY *et al.*, 2017; HOSOKAWA; ROTHENBERG, 2018).

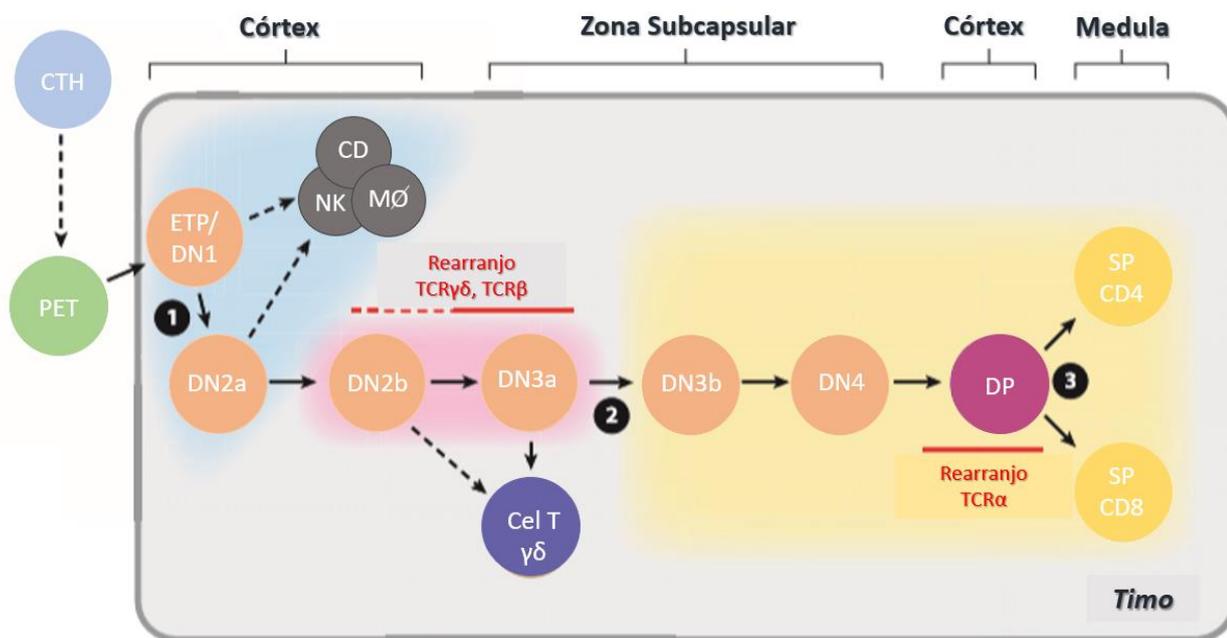
O desenvolvimento dessas células tão especializadas ocorre por um mecanismo complexo com etapas que transcorrem na medula óssea ou fígado fetal e no timo. Como descrito

na seção anterior, o desenvolvimento dos linfócitos T inicia-se na medula óssea/fígado fetal, com a diferenciação e o subsequente comprometimento de uma célula tronco-hematopoiética indiferenciada nos chamados progenitores multipotentes (PMP). O subtipo 4 dos PMP diferencia-se no precursor linfóide comum (PLC) que dará origem aos linfócitos (PIETRAS *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2018).

Em uma próxima etapa, guiadas por uma cascata de interações ligantes-receptores, sendo as interações mais críticas a CD62P/P-selectina-ligante-1 e a CCR9/CCL25, os progenitores que vão dar origem às células T seguem pela circulação sanguínea para o timo, a fim de completar seu processo de diferenciação (KRUEGER; VON BOEHMER, 2007; KRUEGER *et al.*, 2010). Todavia, o grau de diferenciação e de definição de linhagem das células precursoras que chegam ao timo ainda permanece incerto (KOCH; RADTKE, 2011; HOSOKAWA; ROTHENBERG, 2018). Alguns estudos demonstraram que trata-se de progenitores multipotentes com algum potencial para diferenciação mielóide (ALLMAN *et al.*, 2003; SCHWARZ; BHANDoola, 2004; BENZ; BLEUL, 2005) e outros revelaram que, na verdade, são precursores já com restrição linfóide (KONDO; WEISSMAN; AKASHI, 1997; MARTIN *et al.*, 2003; SCIMONE *et al.*, 2006; INLAY *et al.*, 2009) ou até precursores definitivamente comprometidos com as células T (KRUEGER; VON BOEHMER, 2007). O fato é que, no timo, ocorre a diferenciação final desses progenitores em direção à linhagem linfóide T (HOSOKAWA; ROTHENBERG, 2018).

O timo é um órgão linfóide primário localizado no tórax, no mediastino superior, que se desenvolve a partir da 5ª semana de gestação e atinge sua formação completa após o nascimento. No início da puberdade, inicia-se sua involução devido à infiltração gordurosa da região do córtex, porém a glândula segue mantendo a sua função protetora (HOFFMAN, 2018). É composto por 4 compartimentos com papéis diferenciados na maturação dos progenitores T: *i. zona subcapsular*: composta principalmente por células epiteliais tímicas corticais; *ii. córtex*: contém um misto de células corticais, fibroblastos e macrófagos; *iii. medula*: possui uma rede estromal composta por células dendríticas (CD) e células epiteliais tímicas medulares; e *iv. junção corticomedular*: possui uma rede de células endoteliais que facilita a entrada e saída de timócitos para o sangue. Em uma visão geral, as fases mais precoces da diferenciação dos timócitos (timócitos duplamente negativos e, posteriormente, duplamente positivos) assim como o rearranjo dos genes dos receptores de células T (TCR) – também chamado de rearranjo V(D)J – ocorrem na região do córtex tímico. À medida que os timócitos tornam-se mais maduros, já na fase da expressão isolada de CD4 ou de CD8, eles migram para medula tímica, onde permanecem cerca de 4-5 dias antes de serem enviados para periferia (DALEY *et al.*, 2017).

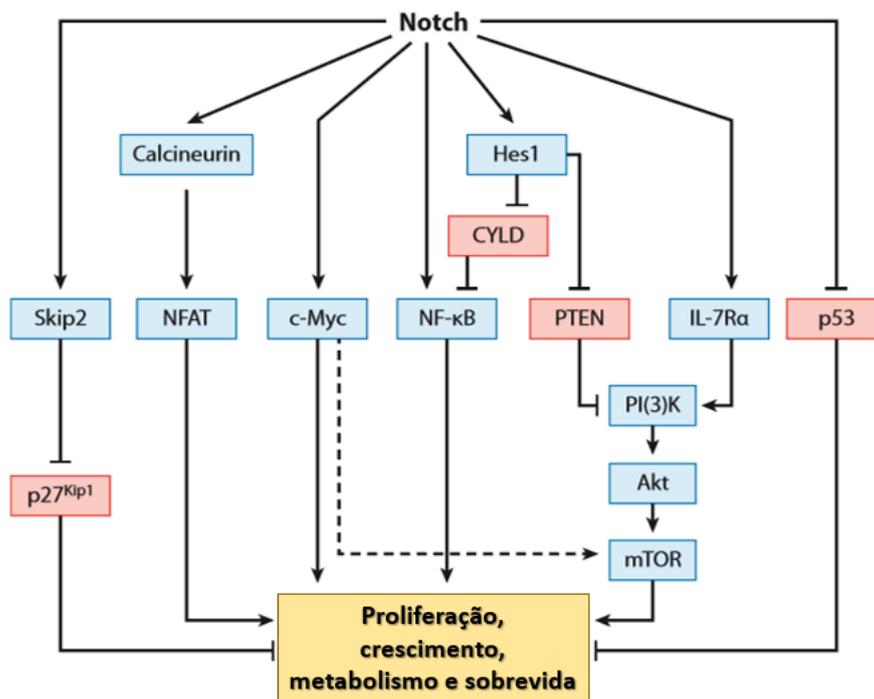
Seguindo uma análise mais detalhada desse processo, a maturação linfóide T no timo inicialmente se dá pela chegada de um pequeno número de progenitores de células T oriundos da medula óssea. Esses progenitores encontram células epiteliais na região subcapsular e cortical do órgão, recebendo estímulos que os diferenciam nos chamados *precursores T precoces* (PTP ou, do inglês, Early T Precursors – **ETP**). Dentro de regiões tímicas definidas, as ETPs então passam por etapas sequenciais de maturação bem caracterizadas a fim de produzir células T totalmente maduras (KOCH; RADTKE, 2011). Didaticamente, as células T imaturas são classificadas de acordo com a expressão dos co-receptores CD4 e CD8 em suas superfícies. As células CD4-CD8- são chamadas *duplicamente negativas* (DN), representam cerca de 2% das células tímicas e dão origem às células CD4+CD8+, chamadas *duplicamente positivas* (DP) – que passam a representar 80-85% da população das células tímicas. As células DN também são subdivididas baseadas na expressão das moléculas de adesão CD44 e CD25 (cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2), sendo chamadas DN1 (CD44+CD25-), DN2 (CD44+CD25+), DN3 (CD44-CD25+) ou DN4 (CD44-CD25-) (KOCH; RADTKE, 2011; YUI; ROTHENBERG, 2014; DALEY *et al.*, 2017) (Figura 2.2).



**Figura 2.2.** Esquema das fases do desenvolvimento dos precursores das células T no timo. CTH: Célula tronco hematopoiética; PET: Precursor enviado ao timo; ETP: Precursor T precoce; DN: Duplamente negativo; DP: Duplamente positivo; SP: *single* positivo; NK: *Natural Killer*; MØ: Macrófago; CD: Células dendríticas; TCR: Receptor de células T; Fonte: Adaptado (de Koch *et al.*, 2011).

Os ETP são DN1 (CD4-CD8- CD44+CD25-) e possuem alta expressão de KIT (CD117) – importante na proliferação celular. Além disso, expressam uma grande quantidade do receptor

transmembrana NOCTH1, que interage primeiramente com o ligante Delta-like 4 (LDL4) (HOSOKAWA e ROTHENBERG, 2017). Essa interação NOTCH1-LDL4 é fundamental para gradual indução de um programa genético, caracterizado pela ativação e silenciamento de genes, que determina a diferenciação para o fenótipo linfóide T. As vias de sinalização ativadas pelo receptor NOTCH1 nesta fase (precursores recém-chegados ao timo / ETP) inibem outras vias que levariam a múltiplos destinos de diferenciação celular, como diferenciação mielóide e/ou linfóide B, sendo um ponto crucial para o compromisso da população DN1 inicial com a linhagem de células T (WADA *et al.*, 2008; KOCH; RADTKE, 2011) (Figura 2.3).



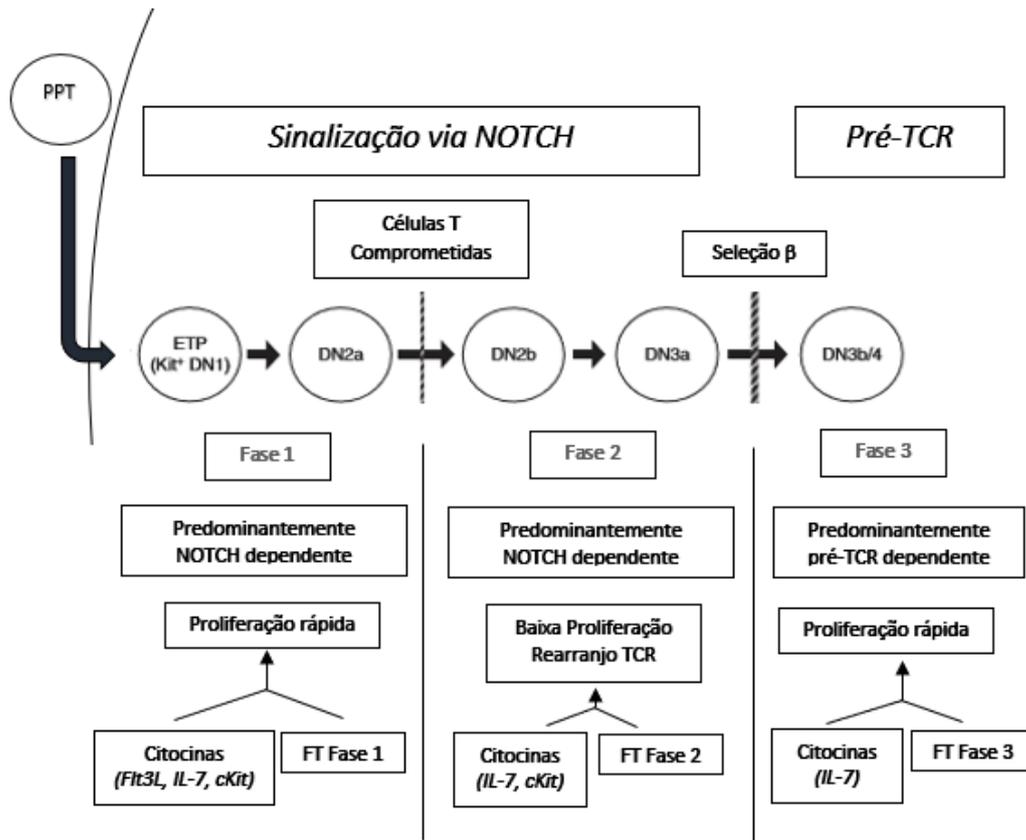
**Figura 2.3.** Vias de sinalização iniciadas pela ativação de NOTCH na LLA-T. As setas indicam interações positivas e as linhas de inibição mostram interações regulatórias negativas contribuindo para o desenvolvimento e / ou manutenção da LLA-T. As moléculas ou vias de promoção do crescimento estão em azul, enquanto as moléculas inibidoras do crescimento estão em vermelho. c-Myc: mielocitomatose celular; CYLD: gene de susceptibilidade à cilindromatose; mTOR: alvo de rapamicina em mamero; NFAT: fator nuclear de células T ativadas; NF-κB: factor nuclear potenciador da cadeia leve kappa de células B ativadas; p27<sup>Kip1</sup>: p27 proteína inibidora de Kinase1; PI(3)K: fosfoinositíde 3-quinase; PTEN: homólogo de tensina e fosfatase; Skip2: proteína de interação com kinase fase-S; LLA-T: Leucemia linfóide aguda T. Fonte: Adaptado de (Koch *et al.*, 2011).

A diferenciação dos progenitores T pode então ser didaticamente dividida em 3 fases, sendo as duas primeiras altamente dependentes das vias de sinalização ativadas pelo receptor NOCTH1 e a terceira, dependente da sinalização dos pré-receptores de células T (pré-TCR) (YUI; ROTHENBERG, 2014; HOSOKAWA e ROTHENBERG, 2017) (Figura 2.4). Na primeira fase, NOTCH-dependente, as células DN1/ETP progridem para DN2a – que são precursores de células T ainda com algum potencial para diferenciação mielóide, mas não para células linfóides B – e são chamados globalmente de *pró-T*. As células DN2a possuem uma grande expressão de receptores de *IL-7*, *Flt3* e *cKit* que apoiam a intensa atividade proliferativa

dessas células. A via de sinalização NOTCH, além de ativar genes canônicos, como *Hes1*, também inicia a transcrição de genes específicos da linhagem T, como *Gata3* e *Tcf7* (codifica a proteína específica de células T-1, TCF1) (HOSOKAWA e ROTHENBERG, 2017).

Na etapa seguinte, ainda NOTCH-dependente, as células DN2a sofrem um processo de diferenciação que gera comprometimento definitivo com a linhagem linfóide T, originando as células DN2b. Nesta fase, ocorre uma intensa regulação positiva e negativa de vários genes, destacando-se a ativação do gene *Bcl11b*. A proteína BCL11b é um repressor da transcrição gênica e é fundamental para completar, nessas células pró-T, o processo de exclusão do potencial para diferenciação não-T, ou seja, para estabelecer o comprometimento definitivo das células com a linhagem linfóide T. Além disso, BCL11b induz a redução da expressão do receptor cKit, diminuindo a proliferação das células DN2b. Essas células também vão sendo dessensibilizadas à ação de IL-7, via mecanismo induzido pela proteína E, e passam a ficar altamente dependentes da via de sinalização ativada por NOTCH para sobreviverem. No estágio seguinte, DN3a, ocorre o pico da expressão dos genes dependentes da sinalização NOTCH e proteína E, como o gene ativador da recombinação gênica 1 (*Rag1*) e 2 (*Rag2*), que codifica o pré-TCR alfa (*PTCra*) e o CD3e (*CD3e*) (HOSOKAWA e ROTHENBERG, 2017).

A terceira e última fase é dependente da sinalização via pré-TCR. Sendo assim, as células DN3a que tiveram sucesso no rearranjo VDJ das cadeias  $\beta$  do TCR, expressam os pré-TCR e seguem para diferenciação em DN3b. É importante ressaltar que nas células em que houve a produção de um TCR $\gamma\delta$  funcional, um outro caminho de diferenciação é seguido, tema que será abordado mais adiante. Então, nas células com produção do pré-TCR funcional (fase DN3a), ocorre uma mudança na regulação gênica, com o silenciamento dos genes dependentes da via NOTCH e redução da expressão de IL7, tornando as células DN3a em DN3b e em seguida DN4. As células DN4 sofrem um novo período de intensa proliferação na região subcapsular do timo. Proliferação esta provavelmente relacionada à ação de citocinas como CXCL12 / CXCR4 (JANAS *et al.*, 2010; TUSSIWAND *et al.*, 2011) e à atuação das proteínas TCF1 e LEF1 na via Wnt canônica (YU; SHARMA; SEN, 2010), mas essa questão ainda não foi totalmente elucidada. Por fim, as células DN4 deixam de expressar os últimos genes da fase DN, como ERG e *Hes1*, começam a expressar novos fatores transcripcionais, como IKZF3, e cessam a fase proliferativa, entrando num estado de quiescência transcripcional. Além disso, após uma curta fase de expressão isolada do co-receptor CD8, ocorre a expressão simultânea dos 2 co-receptores, CD4 e CD8, e as DN4 tornam-se células duplamente positivas (DP) (HOSOKAWA e ROTHENBERG, 2017).



**Figura 2.4.** Esquema das três fases do desenvolvimento das células T precoces. PPT: Precursor pré-tímico; TCR: Receptor de células T; ETP: Precursor precoce T; DN: Duplamente negativo; IL-7: Interleucina-7. Fonte: Adaptado de (Hosakawa *et al.*, 2017).

As células T DP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, seguem o seu desenvolvimento, movendo-se mais profundamente no córtex tímico e expressando uma pequena quantidade de receptores de antígenos completos (TCR $\alpha\beta$ ). Esses recém-sintetizados TCR $\alpha\beta$  serão avaliados quanto a sua especificidade e a sua avidéz (ou força) de interação com as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Aquelas células T cujos receptores não sejam capazes de reconhecer as moléculas de MHC sofrerão apoptose em aproximadamente 3 dias (DALEY *et al.*, 2017; MURPHY, 2012). Já as células que são capazes de reconhecer as moléculas de MHC sofrem um “despertar transcripcional” e são resgatadas da morte, ou seja, recebem sinais de sobrevivência, na chamada *seleção positiva*. Essas células T DP seguem no processo de desenvolvimento e passam a expressar apenas um co-receptor, CD4 ou CD8. Essa transição também envolve a determinação de subtipos de linfócitos T, uma vez que as células que expressam um TCR $\alpha\beta$  responsivo ao MHC classe I tornam-se CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> e as que expressam um TCR $\alpha\beta$  responsivo ao MHC classe II, tornam-se CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (DALEY *et al.*, 2017; MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015)

No entanto, a ligação do TCR $\alpha\beta$  ao complexo MHC:auto-antígenos também pode induzir outro destino às células T DP. As células que apresentam uma intensa afinidade com as moléculas do MHC falham em ativar o fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) e regulam positivamente proteínas pró-apoptóticas, como BIM/PUMA, levando a célula à apoptose, na chamada *seleção negativa*. Uma minoria das células T CD4<sup>+</sup> sobrevive e se diferencia em um subtipo denominado pré-Treg que podem se tornar células Treg maduras, caracterizadas pela expressão de superfície de CD4 e CD25 na ausência de CD127 e na presença intracelular de FOXP3. (DALEY *et al.*, 2017). Ao final dessa dupla triagem, cerca de 2% das células T, inicialmente duplamente positivas, sobrevivem e amadurecem, sendo gradualmente exportadas do timo para formar o repertório de células T periféricas. (DALEY *et al.*, 2017; MURPHY, 2012)

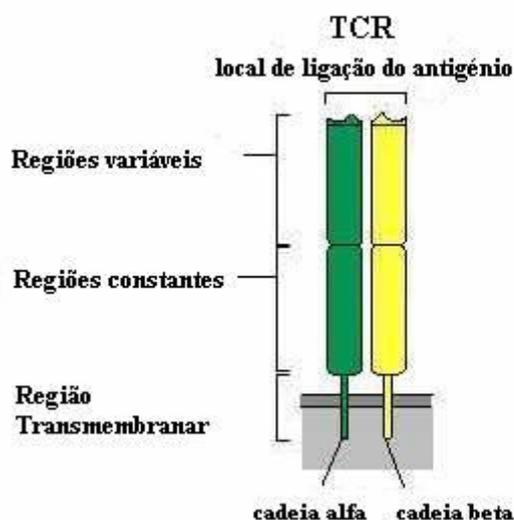
#### 1.2.3.1. Rearranjo dos genes dos Receptores dos Linfócitos T

Os genes que codificam os receptores das células T (TCR) e das células B (Imunoglobulinas – Ig) encontram-se sob uma forma não funcional na linhagem germinativa das células T e B, respectivamente, e, em fases precoces da diferenciação dessas células, esses genes sofrem um processo de rearranjo, denominado **rearranjo** ou **recombinação somática** (MURPHY, 2012).

Ao longo do seu desenvolvimento, as células T maduras podem originar 2 tipos distintos de TCR – frutos da combinação de 4 tipos diferentes de cadeias polipeptídicas ( $\alpha$  e  $\beta$  ou  $\gamma$  e  $\delta$ ) codificadas em 4 *loci* gênicos: TCRB, TCRA, TCRG e TCRD. Os TCR $\alpha\beta$  são constituídos por uma cadeia polipeptídica  $\alpha$  e outra  $\beta$  e os timócitos TCR $\alpha\beta$  são os mais comumente encontrados. Já os TCR $\gamma\delta$  possuem uma cadeia  $\gamma$  e outra  $\delta$  e representam uma pequena população das células T, preservando algumas peculiaridades. A via precisa de diferenciação das células  $\gamma\delta$  ainda não é tão bem definida e eles parecem atuar de forma a complementar e a regular as atividades das células T  $\alpha\beta$ , particularmente nos tecidos (HAYDAY; PENNINGTON, 2007). Essas células  $\gamma\delta$  são encontradas principalmente em locais de epitélio e mucosa, não expressam os co-receptores CD4 e CD8, não reconhecem antígenos restritos ao MHC e, em comparação com as células T TCR $\alpha\beta$ , pouco se sabe sobre seus ligantes. (HAYDAY; PENNINGTON, 2007; MURPHY, 2012; DALEY *et al.*, 2017).

Cada cadeia polipeptídica do TCR é composta por uma *região constante*, que demonstra muito pouca variação entre os receptores e está associada às suas funções efetoras e propriedades físico-químicas, e uma outra região, chamada *variável*, que é o local de ligação e

reconhecimento do antígeno que, por sua vez, é apresentado à célula T em associação a uma molécula de MHC (complexo de histocompatibilidade maior) por uma célula apresentadora de antígenos (APC) (MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015) (Figura 2.5).



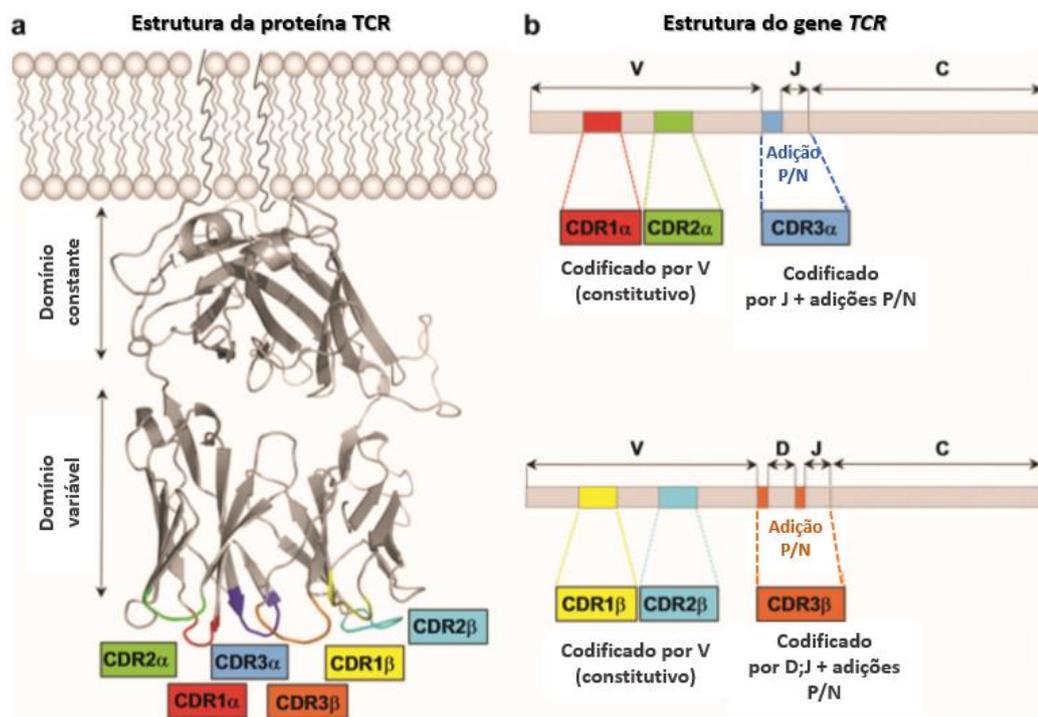
**Figura 2.5. Estrutura do Receptor de Célula T.** Diagrama esquemático de uma molécula de TCR $\alpha\beta$ . As duas cadeias polipeptídicas são representadas em verde (cadeia alfa) e em amarelo (cadeia beta). Cada uma delas com seus domínios constantes e variáveis, estes últimos localizados mais externamente. As regiões de ligação ao antígeno são formadas pela justaposição dos domínios variáveis das duas cadeias. Fonte: Adaptado de (Murphy, 2012).

As regiões variáveis das cadeias do TCR são codificadas por segmentos gênicos (éxons) denominados V (*variable*, variável) e J (*joining*, junção), sendo que as cadeias  $\beta$  e  $\delta$ , também são codificadas por um terceiro tipo de segmento gênico, denominado D (*diversity*, diversidade). Durante a recombinação somática, esses éxons são aleatoriamente selecionados e aproximados e as regiões não codificantes (íntrons) que os separam são eliminadas, ocorrendo a junção dos segmentos gênicos V(D)J. Nesse processo, podem ser adicionados nucleotídeos aleatórios nas regiões juncionais, entre os segmentos gênicos aproximados, ampliando a diversidade das proteínas codificadas e, conseqüentemente, dos TCR. Este assunto será abordado mais minuciosamente a diante (MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Interessantemente, a maior parte das diferenças na sequência de aminoácidos das regiões variáveis concentra-se em 3 pequenas regiões, denominadas *regiões hipervariáveis* ou *regiões determinantes da complementaridade (CDR)* – porque são complementares à estrutura tridimensional do antígeno ligado. Existem 3 CDR na região variável de cada cadeia polipeptídica do TCR. Das regiões hipervariáveis, a CDR3 é a região mais variável pois engloba a região de junção de um segmento V e um J nas cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$  ou de um segmento V com um D e do D com um J, no caso das cadeias  $\beta$  e  $\delta$  (Figura 2.6). A diversidade da CDR3 é

significativamente aumentada justamente pela deleção e adição de nucleotídeos na formação da região de junção entre os segmentos (MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; ATAFF *et al.*, 2015).

Essas regiões são formadas por aproximadamente 10 aminoácidos e são flanqueadas por sequências mais conservadas, denominadas regiões *framework* (FR). No TCR, as 3 regiões hipervariáveis das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  ou das cadeias  $\gamma$  e  $\delta$  aproximam-se tridimensionalmente para formar uma superfície de ligação ao MHC:antígeno (Figura 2.6) (MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; ATAFF *et al.*, 2015).



**Figura 2.6. Estrutura da proteína e dos genes do TCR.** TCR: Receptor de células T; CDR: Região determinante de complementaridade. Fonte: Adaptado de (Attaf *et al.*, 2015)

Os genes que codificam as cadeias  $\alpha$  (*TCRA*),  $\beta$  (*TCRB*) e  $\gamma$  (*TCRG*) encontram-se em 3 *loci* gênicos diferentes, enquanto que o *locus* que codifica a cadeia  $\delta$  (*TCRD*) encontra-se entremeadado ao *locus* da cadeia  $\alpha$ . Como citado anteriormente, esses 4 *loci* (*TCRA*, *TCRB*, *TCRD* e *TCRG*) são constituídos por diferentes segmentos gênicos codificantes – segmentos V, D (apenas nos *loci* *TCRB* e *TCRD*) e J, que codificam a região variável dessas cadeias, e os segmentos C, que codificam suas regiões constantes – além dos íntrons que os separam quando na linhagem germinativa (MURPHY, 2012; ATAFF *et al.*, 2015) (Figura 2.7).



gênico encontrado em células T maduras, uma vez que rearranjos no *locus TCRB* podem ser encontrados em células T  $\gamma\delta$  (embora cerca de 80% desses rearranjos sejam improdutivos) e rearranjos no *locus TCRG* são frequentes em células T  $\alpha\beta$  maduras, mas com a maioria sendo “out-of-frame” – que impedem ou prejudicam gravemente a transcrição gênica (MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; ATAFF *et al.*, 2015).

O mais provável é que ocorra primeiro a síntese de um pré-TCR funcional pois só depende do rearranjo produtivo de um *locus (TCRB)* enquanto que a síntese de um receptor funcional TCR $\gamma\delta$ , depende do rearranjo produtivo de 2 *loci, TCRG e TCRD*. Uma vez expressos na membrana celular, ambos os receptores possuem a capacidade de ativar uma cascata de sinalização intracelular que gera o comprometimento da célula T com a linhagem  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ . Sabe-se que, em comparação com os TCR $\alpha\beta$ , os TCR $\gamma\delta$  provocam uma fosforilação mais intensa da quinase ERK mitógeno-ativada, induzindo a expressão do fator de transcrição ID3, culminado com o comprometimento do timócito com a linhagem  $\gamma\delta$ , e sua posterior saída do timo sem a expressão de CD4 ou CD8 e sem que seja submetido aos processos de seleção positiva e seleção negativa, já descritos na seção anterior (MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Uma vez iniciada a recombinação somática na fase DN2b, algum segmento D é rearranjado aleatoriamente com um segmento J $\beta$ , com remoção dos íntrons entre os segmentos gênicos selecionados. Em seguida, as células T, já DN3a, continuam o rearranjo, agora de um segmento aleatório V com DJ já rearranjado. Essa sequência de rearranjos dos segmentos gênicos (D-J e depois V-DJ) é conservada em outros *loci* do TCR/Ig e, no caso da ausência de segmentos D no *locus* a ser recombinado, o rearranjo se inicia diretamente do segmento V para o segmento J (Figura 2.8) (MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Na extremidade 5', a jusante de cada segmento V, existe uma região promotora (P) que é seguida pelo segmento V propriamente dito. Este é composto por um éxon líder na sua extremidade 5' que codifica 20-30 aminoácidos moderadamente hidrofóbicos na extremidade N-terminal da proteína traduzida, sendo conhecido como um peptídeo sinal (L), além do éxon V. A região promotora (P), ao se aproximar de uma região ativadora (*enhancer*, E) localizada entre as regiões J e C, torna o segmento V transcricionalmente ativo (MURPHY, 2012; ATAFF *et al.*, 2015) (Figura 2.8).

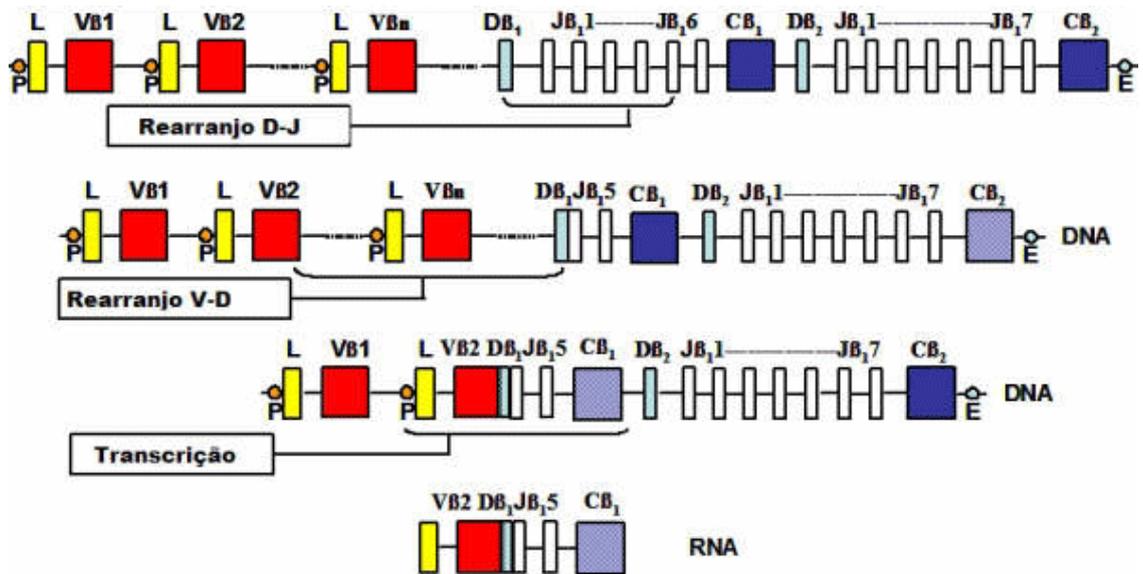


Figura 2.8. Diagrama das etapas da Recombinação Somática no locus *TCRB*. Fonte: Mayer, 2017.

É importante lembrar que existe uma ordem pela qual os genes das cadeias do TCR são expressos. Apesar dos *loci TCRB*, *TCRG* e *TCRD* iniciarem a recombinação somática quase simultaneamente, na maioria dos timócitos, o *TCRB* se reorganiza com sucesso antes que ocorram rearranjos produtivos nos *loci TCRG* e *TCRD*. Além disso, inicialmente, ocorre o rearranjo do *locus* em apenas um alelo e, caso não haja um rearranjo produtivo, só então o outro alelo é rearranjado. Vale ressaltar que a recombinação somática é um processo complexo com a maior parte dos rearranjos iniciais não sendo produtivos. No *locus TCRB*, em cerca de 2/3 dos rearranjos, há uma interrupção do quadro de leitura translacional pela inserção ou deleção de bases na junção entre os segmentos gênicos em um número diferente de múltiplos de 3, gerando uma cadeia polipeptídica  $\beta$  não funcional. Quando isso ocorre, segue-se, então, o rearranjo do *locus TCRB* do outro alelo. Mesmo assim, quase metade das células T nesse estágio falham no rearranjo em ambos os alelos e, se também não conseguirem gerar rearranjos produtivos nos *loci TCRG* e *TCRD* para a síntese de um TCR $\gamma\delta$  funcional, morrem nesta etapa, DN3 (CD4-CD8-CD44-CD25+). Esse é um importante ponto de seleção no desenvolvimento dos linfócitos T, conhecido como *checkpoint de seleção  $\beta$* . Apenas os pró-timócitos com rearranjos *TCRB* produtivos seguem as etapas de maturação e entram nos processos de seleção positiva e negativa (KOCH; RADTKE, 2011; MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; XING *et al.*, 2019).

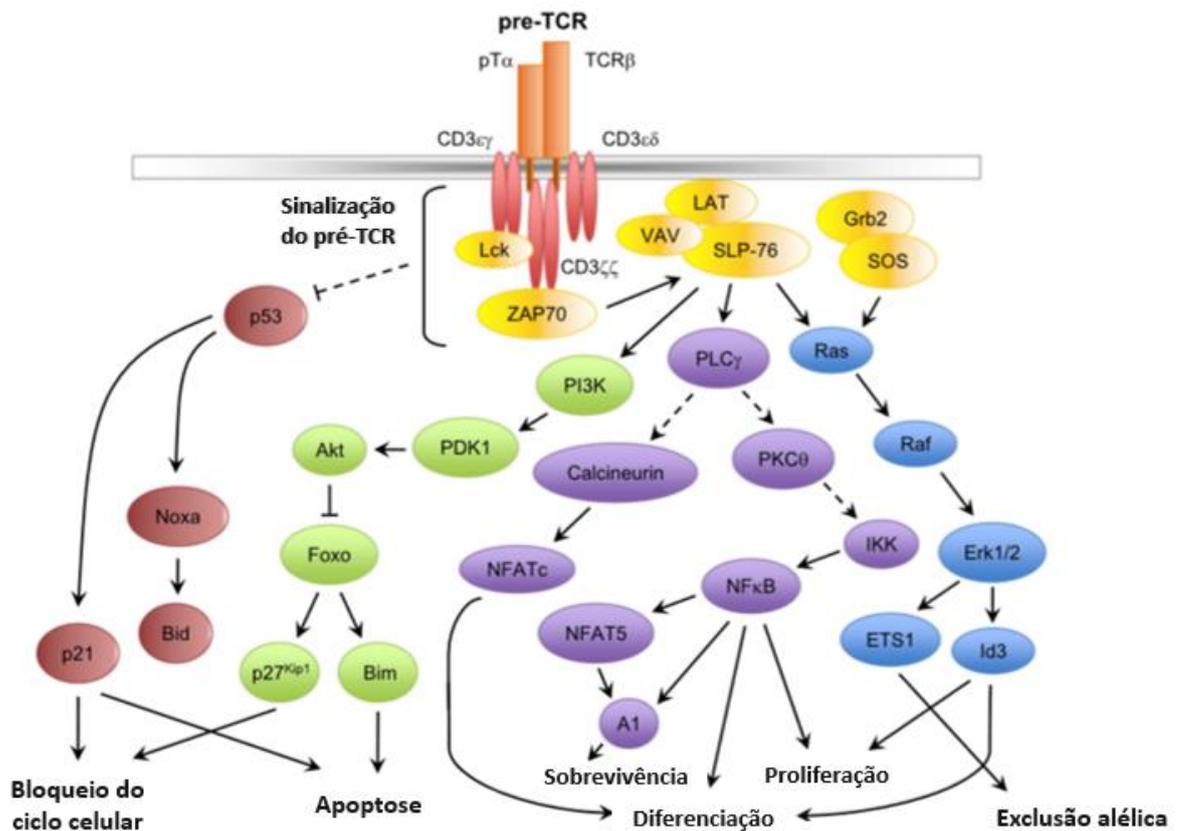
No caso de um rearranjo produtivo, a cadeia  $\beta$ , recém-sintetizada, é expressa na membrana da célula pró-T em associação a uma proteína constante, pré-T $\alpha$ , e a moléculas de sinalização (CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  e CD $\zeta$ ), formando o chamado *receptor pré-T (pré-TCR)*.

Nesse estágio, os pró-timócitos passam a ser denominados pré-timócitos ou células pré-T. A proteína pré-T $\alpha$  do pré-TCR então se liga a um domínio altamente conservado da cadeia V $\beta$  da outra molécula pré-TCR, permitindo a dimerização de dois pré-TCR diferentes, independente de ligante (MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Caso o pré-TCR seja funcional, ocorre a ativação de uma complexa cascata de sinalização intracelular que regula diversos desfechos biológicos (Figura 2.9). Em geral, o pré-TCR funcional gera sinais de sobrevivência e proliferação celular, além de promover diminuição da expressão de CD25 e a expressão dos co-receptores CD4 e CD8, impulsionando as células DN3 para o estágio duplamente positivos (CD4+CD8+). Além disso, ocorre a inibição de rearranjos posteriores do *locus TCRB*, limitando a acessibilidade da engrenagem de recombinação ao outro alelo – a chamada **exclusão alélica**. Esse processo se dá por meio da redução da expressão da RAG-1 e RAG-2, da marcação de RAG-2 para degradação e da alteração da estrutura da cromatina no *locus* do *TCRB* (MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Os sinais do pré-TCR funcional também iniciam o rearranjo no *locus TCRA*. A estrutura do *TCRA* permite múltiplas tentativas sucessivas de rearranjo, de modo que na maioria dos pre-timócitos em desenvolvimento é possível a ocorrência de um rearranjo com sucesso. Essas funções únicas do pré-TCR também são importantes na eliminação, via apoptose, das células que não conseguiram gerar rearranjos *TCRB* produtivos em ambos os alelos, como descrito anteriormente (MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; XING *et al.*, 2019).

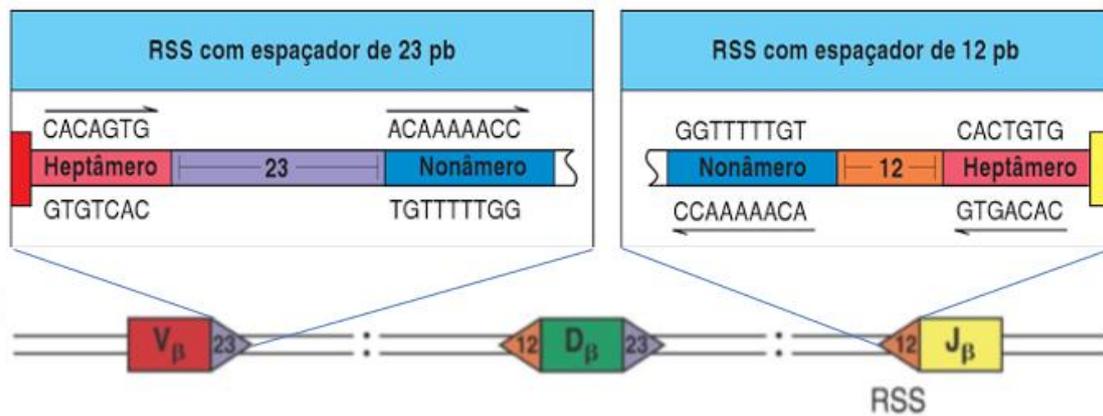
Interessantemente, os rearranjos iniciais envolvendo os segmentos gênicos D e J ocorrem em ambos os alelos, embora o rearranjo completo V-DJ ocorra apenas em um alelo. Esse fato é importante porque esses rearranjos incompletos ou mesmo os rearranjos improdutivos/não funcionais também podem servir de marcador de clonalidade da célula T (VAN DER VELDEN; VAN DONGEN, 2009; MAYER, 2017).



**Figura 2.9.** Diagrama das principais vias de sinalização intracelular induzidas pelo pré-TCR. Em amarelo são evidenciadas as proteínas de sinalização mais proximais que iniciam a sinalização mais distal. A via *PI3K*, em verde, inibe a apoptose e o bloqueio do ciclo celular. A via *PLCγ*, em lilás, promove proliferação, diferenciação, sobrevivência e exclusão alélica. A via *Ras/Raf*, em azul, promove a proliferação e a diferenciação das células DN3. A sinalização do pré-TCR também inibe *p53* (em vermelho), que seria a causa do bloqueio do ciclo celular e de apoptose das células que não tivessem sucesso em produzir um rearranjo *TCRB* funcional. TCR: Receptor de célula T. Fonte: Adaptado de (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2015).

Molecularmente, quando uma célula comprometida com a linhagem linfocítica T inicia a recombinação do complexo gênico da cadeia polipeptídica β, primeiramente um dos segmentos codificantes D é aproximado de um segmento J e, em seguida, um segmento V é aproximado da região DJ já rearranjada.

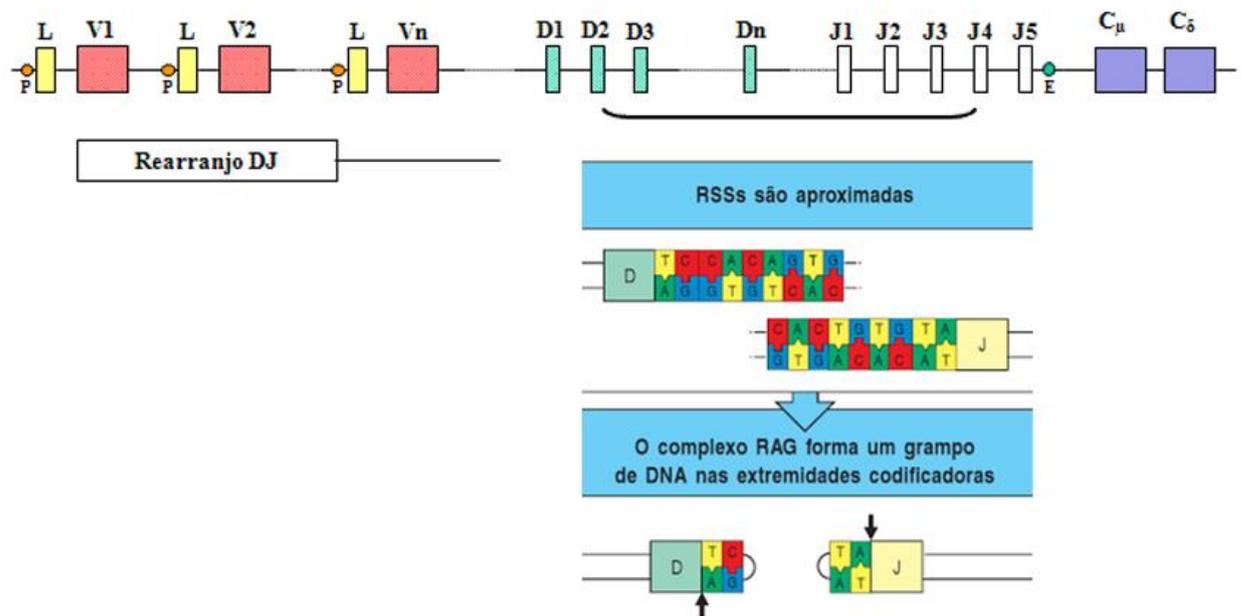
Na extremidade 3' de cada segmento gênico V, na extremidade 5' de cada segmento gênico J e em ambos os lados do segmento gênico D existe uma sequência altamente conservada de 7 nucleotídeos (*heptâmero*), geralmente CACAGTC, adjacentes à sequência codificadora, seguida por uma região conhecida como *espaçador* e novamente uma sequência altamente conservada composta por 9 nucleotídeos (*nonâmero*), rico em AT – ACAAAAACC. Essa região é conhecida como **Sequências de Sinais de Recombinação (RSS)** (MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015) (Figura 2.10).



**Figura 2.10.** Diagrama esquemático das Sequências de Sinal de Recombinação (RSS). RSS são sequências conservadas de heptâmeros e nonâmeros que flanqueiam os segmentos gênicos codificadores das regiões V, D e J das imunoglobulinas. Fonte: Adaptado de (Murphy, 2012).

O espaçador contém exatamente 12 ou 23 nucleotídeos não conservados que correspondem a aproximadamente a 1 ou 2 voltas da hélice de DNA e presumivelmente colocam 2 heptâmeros diferentes em posições simultaneamente acessíveis às enzimas que catalisam o processo de recombinação. Interessantemente, a recombinação entre dois segmentos gênicos só ocorre se um dos segmentos é ladeado por um espaçador de 12 nucleotídeos e o outro por um espaçador de 23 (MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O complexo enzimático tetramérico formado pela RAG1/RAG2 (recombinase VDJ) reconhece a sequência de DNA na junção entre o heptâmero e o gene codificador (V, D ou J), clivando a dupla hélice de DNA como uma endonuclease de restrição. Adjacente ao segmento codificante, a hidroxila na extremidade 3' de uma das fitas duplas do DNA clivado ataca a ligação fosfodiéster da outra fita, formando um grampo (*hairpin*), enquanto que as extremidades adjacentes ao heptâmero também são ligadas e todas as sequências de DNA entre os segmentos codificantes é eliminada sob a forma de um DNA circular (*joint signal*) (MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015) (Figura 2.11).



**Figura 2.11.** *Processamento das regiões juncionais V(D)J.* Fonte: Adaptado de (Murphy, 2012).

Outras enzimas, como Ku70, Ku80, DNA-PK e Artemis, atuam na abertura do grampo permitindo que as extremidades das fitas de DNA possam ser processadas. Nesse momento, ocorre a remoção ou adição de nucleotídeos entre os segmentos codificantes (D e J, por exemplo), levando à chamada **diversidade juncional** – *evento responsável por gerar a maior contribuição à enorme diversidade entre os receptores de antígenos* (MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Quando a enzima Artemis cliva aleatoriamente e assimetricamente os grampos, a fita que ficou mais curta precisa ser estendida com nucleotídeos complementares à fita matriz – são os chamados *nucleotídeos P*. Além disso, podem ser adicionados até 20 nucleotídeos **aleatórios** – *nucleotídeos N* – pela enzima TdT (*desoxinucleotidil-transferase terminal*) entre as sequências dos segmentos codificantes que posteriormente serão reunidas pela DNA ligase IV, entre outras enzimas (Figura 2.12). A inserção de nucleotídeos também pode interromper a leitura da sequência codificadora, por meio da geração de um códon de parada, dando origem a uma proteína não funcional. Isso ocorre em 2 de 3 eventos recombinatórios (MURPHY, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

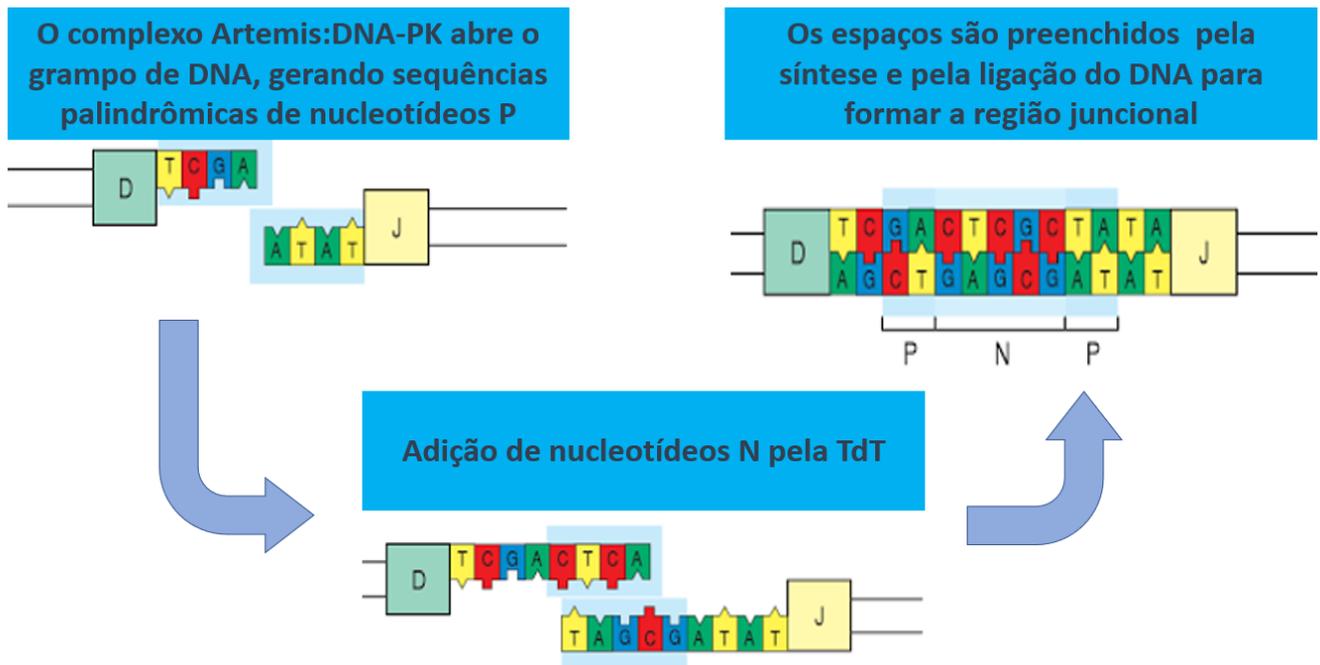


Figura 2.12. Processamento das regiões juncionais V(D)J. Fonte: Adaptado de (Murphy, 2012).

Como as leucemias e os linfomas linfóides podem ser considerados contrapartes malignas das células linfóides normais em seus vários estágios de diferenciação, a maioria das doenças malignas originadas dessas células contém genes de TCR e de Ig rearranjados. Semelhantemente a outras neoplasias, as doenças malignas das células linfóides são derivadas de uma única célula malignamente transformada, o que implica que os rearranjos dos genes do TCR e da Ig são idênticos em todas as células malignas, servindo como um importante marcador de clonalidade (LANGERAK *et al.*, 1997).

A análise molecular desses genes nas neoplasias linfóides é, portanto, uma importante estratégia utilizada para provar ou excluir clonalidade. Os achados e os eventos genéticos descritos na seção anterior envolvendo os genes de TCR e de Ig – presença de múltiplos segmentos gênicos V, a ocorrência da diversidade combinatória (seleção VDJ e VJ aleatórias), da diversidade juncional (deleção e inserção de nucleotídeos N) e a presença de rearranjos incompletos de TCR em LLA de origem B e de Ig em LLA de origem T – compõem uma ampla diversidade de alvos moleculares específicos que podem ser utilizados para identificar e monitorar o clone leucêmico na LLA (VAN DONGEN *et al.*, 2015).

Até a década de 90, as diferentes combinações dos segmentos VDJ rearranjados – repertório combinatório – eram frequentemente utilizadas para assegurar clonalidade na LLA e monitorar a doença residual mínima (DRM) pela técnica de *Southern Blot*. Entretanto, apesar deste ser um método confiável, se combinações adequadas de sonda/enzimas de restrição forem utilizadas, o advento da **Reação em Cadeia da Polimerase – oligonucleotídeo alelo-**

**específico** (ASO-PCR) – uma metodologia mais sensível e mais rápida – permitiu uma análise molecular mais apurada das regiões juncionais entre os segmentos rearranjados, substituindo a técnica de Southern Blot.

Uma vez que as **regiões juncionais (RJ)** são uma verdadeira “impressão digital” de uma determinada célula, ou seja, são altamente linfócito-específicas e são conservadas em mais de 98% das malignidades de origem linfóide, elas passaram a ser usadas como alvo-específicos da célula leucêmica para o monitoramento de DRM, resultando em exames com sensibilidades maiores (VAN DONGEN *et al.*, 2015). Todavia, para assegurar clonalidade, os produtos de PCR precisam ser analisados por métodos que permitam distinguir se esses produtos são derivados de populações de células linfóides policlonais ou monoclonais e, um desses métodos é análise de heterodúplex, melhor descrito na seção 4, *Materiais e Métodos*.

## 2.2 *Leucemias Agudas na Infância*

As leucemias agudas são neoplasias hematológicas malignas bastante heterogêneas oriundas do acúmulo de uma sequência de mutações somáticas em uma célula hematopoiética multipotente primitiva. Essas células hematopoiéticas mutantes (blastos leucêmicos) adquirem características de uma célula-tronco leucêmica, sendo capazes de se auto-renovarem e bloquearem o processo de diferenciação e maturação normal da célula. Sendo assim, os blastos leucêmicos ganham uma significativa vantagem proliferativa e de sobrevivência em relação às outras células-tronco hematopoiéticas normais e acabam por ocupar parcial ou totalmente a medula óssea, inibindo a hematopoiese normal (KAUSHANSKY, 2016; HOFFMAN, 2018).

O primeiro caso descrito de leucemia data de 1845, quando o jovem patologista alemão Rudolph Virchow identificou uma expressiva redução de células vermelhas e um excesso de células “brancas” ou “incolores” no esfregaço de sangue periférico de uma cozinheira de 50 anos, falecida após 4 meses de internação. Virchow utilizou o termo “*Leukämie*” (em alemão *Patlak*) ou “sangue branco” para descrever a condição clínica da paciente e, desde então, muito se tem avançado no entendimento da biologia da doença assim como no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes (VIRCHOW, 1845).

Sabe-se que a leucemia é o tipo de câncer mais comum em crianças e adolescente, sendo responsável por 25-35% de todas as neoplasias pediátricas. As leucemias agudas podem se originar de precursores mutantes da linhagem linfóide (células B ou T) ou da linhagem mieloide e, na população pediátrica, a Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é o subtipo de leucemia mais frequente, respondendo por aproximadamente 80% das leucemias agudas (HEIKAMP; PUI, 2018). A utilização de protocolos de tratamento direcionados pela estratificação de risco de recaída dos pacientes juntamente com os avanços nos cuidados de suporte elevaram as taxas de cura da LLA pediátrica de menos de 10% na década de 60 para mais de 85% nos dias atuais. Entretanto, como a LLA é o câncer mais comum na infância, a LLA recidivada continua sendo a principal causa de morte por doença na população pediátrica (SMITH *et al.*, 2014; PUI *et al.*, 2015; HOFFMAN, 2018).

O pico de incidência de LLA ocorre por volta dos 3 a 5 anos de idade com mais de 50% dos casos nesta faixa etária apresentando hiperdiploidia (> 50 cromossomos) e/ou gene de fusão *ETV6-RUNX1* (também conhecido como *TEL-AML1*), também estando associados a polimorfismos genéticos específicos na linha germinativa. Acredita-se que esses polimorfismos poderiam explicar a ampla diferença na incidência e proporção de subtipos genéticos de LLA entre os diferentes grupos raciais ou étnicos (HUNGER; MULLIGHAN, 2015; HOFFMAN,

2018). A LLA pode-se originar de precursores de células B ou T, sendo as primeiras mais comuns (cerca de 85% dos casos). As LLA de células T representam cerca de 12 a 15% dos casos de LLA e podem ser classificadas em vários subgrupos genéticos distintos que correspondem a estágios específicos do desenvolvimento de células T e frequentemente estão associadas a translocações envolvendo os genes dos receptores de células T (TCR) no cromossomo 14q11 ou 7q34 com outros parceiros genéticos (KAUSHANSKY, 2016; HOFFMAN, 2018).

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) corresponde a aproximadamente 20% dos casos de leucemia em indivíduos menores de 20 anos e apresenta picos de incidência variáveis, com alguns subtipos sendo mais comum em crianças mais jovens, como a leucemia megacariocítica aguda, enquanto outros subtipos ocorrem principalmente entre adolescentes, como a leucemia promielocítica aguda. A sobrevida atual em 5 anos das crianças de até 15 anos com LMA é de 68% e de 57% para adolescentes entre 15 e 19 anos, com novamente alguns subgrupos alcançado sobrevidas significativamente melhores, próximas a 90%, como no caso da leucemia promielocítica aguda e da leucemia megacariocítica aguda associada a Síndrome de Down (TSUKIMOTO *et al.*, 2009; SUNG *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2014; HOFFMAN, 2018).

Clinicamente, as leucemias agudas se caracterizam pelos sinais e sintomas decorrentes da incapacidade da medula óssea em produzir as células sanguíneas, com a consequente queda do nível das hemácias, dos leucócitos e das plaquetas no sangue. Como consequência da anemia, podem ocorrer palidez, cansaço, fraqueza e taquicardia. A leucopenia, sobretudo a neutropenia e a monocitopenia, tornam o paciente mais susceptível a infecções, embora seja incomum a ocorrência de infecções graves ao diagnóstico. Entretanto, isso pode ocorrer em casos avançados da doença ou decorrente da aplasia provocada pelos quimioterápicos, ao longo do tratamento. Sangramentos cutâneos e mucosos são comuns como resultado da trombocitopenia. Outros achados comuns são dor óssea como consequência da expansão dos blastos na medula óssea, além de febre, irritabilidade e mal-estar. Manifestações neurológicas decorrentes do acometimento do sistema nervoso central ao diagnóstico são incomuns, porém células blásticas podem ser detectadas em até 20% dos casos de pacientes com LLA sem manifestações neurológicas. Ao exame físico, podem ser encontradas linfonodomegalias, hepatoesplenomegalia, infiltração de gengiva, além de sinais de sangramentos cutâneos e/ou mucosos, como petéquias, equimoses e enantemas (KAUSHANSKY, 2016; HOFFMAN, 2018).

Atualmente, o plano terapêutico para as leucemias agudas tem sido estruturado na estratificação dos pacientes em diferentes grupos de risco de recaída. Esta tem sido uma ferramenta fundamental para definição da estratégia terapêutica a ser utilizada no combate à

doença e, conseqüentemente, tem tido um papel importante na melhora de sobrevida desses pacientes. Critérios clínico-laboratoriais, como idade e leucometria, achados cito-moleculares, como presença de mutações específicas (*FLT3-ITD*, por exemplo), genes de fusão ou translocações cromossômicas características, como cromossomo *Philadelphia* originando o gene de fusão *BCR-ABL1*, assim como a resposta do paciente à terapia em marcos específicos do tratamento são utilizados para estratificar os pacientes com LA. Sendo assim, a escolha dos quimioterápicos, a dose administrada e a duração da terapia podem ser adaptadas de acordo com a intensidade da terapia que se deseja ofertar, a fim de que maiores taxas de remissão da doença possam ser alcançadas, sem a ocorrência de toxicidades desnecessárias (TSUKIMOTO *et al.*, 2009; HEIKAMP; PUI, 2018).

Todavia, apesar de todas as estratégias de sucesso desenvolvidas e do notável ganho na sobrevida dos pacientes, alguns subgrupos de LA ainda não possuem critérios diagnósticos tão bem definidos e apresentam uma maior taxa de falência de indução de remissão, como no caso das ETP-ALL (PATRICK *et al.*, 2014; WOOD *et al.*, 2014), e taxas de sobrevida significativamente menores do que os outros grupos de LA, como no caso das MPAL M/T (WOLACH *et al.*, 2015) e LMA M0 (BARBARIC *et al.*, 2007). Por essa razão, essas entidades clínicas são alvos do nosso estudo e serão melhor detalhadas nas seções subseqüentes.

### 2.2.1 *Leucemia Linfoblástica Aguda de Precusores de Células T Precoces (ETP-ALL)*

Há aproximadamente uma década, foi descrito um novo subgrupo de LLA-T denominado **Leucemia linfoblástica aguda de precursor precoce de célula-T** (do inglês, ***Early T-cell Precursor – Acute Lymphoblastic Leukemia, ETP-ALL***) (COUSTAN-SMITH *et al.*, 2009). Trata-se de uma neoplasia hematológica maligna rara, acometendo cerca de 10-13% dos pacientes pediátricos com LLA-T e cerca de 5-10% dos casos de LLA em adultos (WELTGESUNDHEITSORGANISATION, 2017; HOFFMAN, 2018).

Por definição, a ETP-ALL se caracteriza pela presença de blastos com um perfil imunofenotípico único, caracterizados por um bloqueio de diferenciação das células-T em estágios bem precoces, ETP/DN1. As ETP são células T jovens, recém-oriundas da medula óssea para o timo, e ainda guardam um potencial de diferenciação multi-linhagem, sugerindo uma origem direta das células tronco hematopoiética (vide seção 1.1.1). Os blastos da ETP-ALL expressam CD7, não expressam CD8 e CD1a e são positivos para um ou mais marcadores mieloides e/ou de células tronco, como CD34, CD117 (KIT), HLA-DR, CD13, CD33, CD11b e CD65, porém com MPO negativa, uma vez que uma ETP-ALL com positividade para MPO provavelmente se enquadraria nos critérios para MPAL linfóide T/ Mieloide, como será descrito na seção seguinte. Os blastos também expressam CD3 citoplasmático, ou, mais raramente, CD3 de superfície, e podem expressar CD2 e/ou CD4. CD5 é frequentemente negativo; quando positivo, está presente em <75% da população dos blastos (COUSTAN-SMITH *et al.*, 2009).

A partir da definição de ETP-ALL, outras entidades imunofenotípicas já têm sido descritas. Tem sido sugerido que as leucemias que expressam CD5 de uma forma mais intensa ou mais uniforme, mas que não correspondam aos critérios para ETP-ALL, sejam chamadas de *near-ETP-ALL* (WOOD *et al.*, 2014). Da mesma forma, existe a descrição de um único caso no qual um homem de 25 anos apresentou uma imunofenotipagem típica de ETP-ALL, com MPO negativa, mas com a presença de bastões de Auer. Nesse caso, também houve a ocorrência de trissomia do 4 e t(6;14)(q27;q22) (GAJENDRA *et al.*, 2014).

Além do perfil imunofenotípico distinto, os blastos dos pacientes com ETP-ALL revelam tanto uma instabilidade genômica marcadamente aumentada (COUSTAN-SMITH *et al.*, 2009), como perfis de expressão gênica característicos. Observa-se que os genes superexpressos na ETP-ALL incluem muitos que são tipicamente característicos da linhagem mielóide e das células-tronco hematopoiéticas, como CD44, CD34, CD117 (KIT), GATA2 e CEBPA. Da mesma forma, as mutações mais comuns na ETP-ALL também são mais frequentes nas leucemias mielóides do que nas leucemias de origem linfóide T, como mutações nos genes

*FLT3, NRAS, IDH1, IDH2, DNMT3A* (NEUMANN *et al.*, 2013a; VAN VLIERBERGHE *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012).

Algumas poucas séries têm avaliado a frequência de mutações no gene *FLT3* na ETP-ALL. Em uma série de 12 pacientes adultos, Zhang e colaboradores encontraram apenas 1 caso de *FLT3* mutado, com a mutação do tipo domínio tirosina-kinase (ZHANG *et al.*, 2012). Séries maiores, entretanto, encontraram uma incidência maior de mutações em *FLT3*. Em 29 pacientes com ETP-ALL, 5 (17%) apresentaram *FLT3* mutado (VAN VLIERBERGHE *et al.*, 2011) e, em uma série com 68 pacientes adultos, 35% (24) apresentaram mutações no gene *FLT3*, sendo a maior parte dos casos (n:15, 22%), com mutações do tipo duplicação interna in tandem (*FLT3-ITD*) (Neumann 2013). Além disso, esse subgrupo de doentes com *FLT3* mutado, apresentou um perfil imunofenotípico característico (CD2+CD5-CD13+CD33-), com um padrão de expressão gênica (expressão aberrante de *IGFBP7, WTI, GATA3*) e um status mutacional (ausência de mutações em *NOTCH1* e baixa frequência – 21% – de rearranjos clonais de TCR) específicos. Sendo assim, o grupo de pesquisadores propôs que ETP-ALL com mutações em *FLT3* definiria um subtipo molecular distinto de leucemia, no qual a transformação leucêmica ocorreria em estágios bem precoces da diferenciação linfóide T, antes da fase pró-timócito, gerando uma “leucemia de células-tronco-like”. Também é sugerido que esses pacientes possam se beneficiar do uso de inibidores tirosina-kinase específicos, uma vez que os pesquisadores obtiveram sucesso com uso desses inibidores em testes *in vitro* (NEUMANN *et al.*, 2013b).

Nesta mesma série, a ocorrência de rearranjos nos genes do TCR não se revelou baixa apenas no subgrupo de ETP-ALL com *FLT3* mutado, mas nas ETP-ALL como um todo quando comparadas às LLA-T não ETP-ALL (41% vs 78%, respectivamente). Esses achados confirmam a imaturidade da ETP-ALL – visto que os rearranjos dos TCR são raros no estágio de pró-timócitos (NEUMANN *et al.*, 2013a).

Outro achado interessante é que a assinatura gênica da ETP-ALL tem se revelado mais semelhante a encontrada nos timócitos precursores normais do que a encontrada nos blastos da LLA-T típica – que apresentam estágios mais tardios de diferenciação. Mutações típicas da LLA-T, como as ativadoras do gene *NOTCH1* (encontradas em mais de 60% dos casos de LLA-T) e mutações nos genes *CDKN1/2* foram menos frequentemente encontradas na ETP-ALL do que na LLA-T típica (VAN VLIERBERGHE *et al.*, 2011). Em 2019, 27 pacientes pediátricos brasileiros com ETP-ALL foram molecularmente investigados em comparação com outros 7 subtipos imunofenotípicos de LLA de células T. A frequência de mutação em *NOTCH1* nas

ETP-ALL foi de 37%, enquanto na LLA-T cortical precoce foi de 71%. Além disso, deleção CDKN2A/B foi raramente encontrada na ETP-ALL ( $p < 0.001$ ) (NORONHA *et al.* 2019). Apesar disso, o perfil de expressão gênica não parece ser forte o suficiente para permitir uma clara distinção entre os casos de ETP-ALL e LLA-T típica (VAN VLIERBERGUE *et al.*, 2011).

Clinicamente, os pacientes com ETP-ALL não parecem diferir dos pacientes com LLA-T típica (INUKAI *et al.*, 2012). Além disso, apesar de inicialmente ter sido relatado uma pobre resposta à quimioterapia, com os pacientes com ETP-ALL apresentando um prognóstico mais sombrio (INUKAI *et al.*, 2012), séries maiores e mais recentes nas quais os pacientes receberam quimioterapia mais intensiva não confirmaram esses primeiros achados. (WOOD *et al.*, 2014; PATRICK *et al.*, 2014).

Apesar da cinética de resposta à quimioterapia parecer ser mais lenta na ETP-ALL quando comparada à encontrada na LLA-T típica, a evolução dos pacientes diagnosticados com qualquer uma das duas entidades clínicas tem se mostrado similar. Wood e colaboradores investigaram as taxas de remissão completa, sobrevida global e sobrevida livre de eventos em 1440 crianças com LLA-T incluídas no estudo COG AALL0434 entre janeiro de 2007 e junho de 2014, classificando-as em ETP-ALL (n=130; 11.3%), *Near*-ETP-ALL (ETP mas com elevada expressão de CD5; n=195; 17%) ou não-ETP (n=819; 71.6%). Apesar dos pacientes com ETP-ALL e *near*-ETP-ALL terem apresentado uma maior taxa de falência de indução quando comparados aos pacientes não-ETP-ALL (respectivamente 7,8%, 6,7% e 1,1%,  $P < 0.0001$ ), os 3 grupos mostraram uma excelente sobrevida livre de eventos e sobrevida global em 5 anos, sem diferença estatística entre eles (ETP-ALL: 87.0%; 93.0%, *Near*-ETP: 84.4%; 91.6% e não-ETP: 86.9%; 92.0%) (WOOD *et al.*, 2014). Da mesma forma, uma outra coorte com 222 crianças com LLA-T tratadas com o protocolo UKALL-2003, sendo 11 ETP-ALL e 184 LLA-T típica, também não encontrou diferença estatística na SLE e na SG em 5 anos entre pacientes com ETP-ALL e com LLA-T típica (SLE: 76.7% vs. 84,6%,  $P = 0.2$  e SG: 82.4% vs. 90.9%,  $P = 0.1$ , respectivamente) (PATRICK *et al.*, 2014).

### ***2.2.2 Leucemia Aguda de Fenótipo Misto (MPAL)***

Apesar do grande avanço na classificação das leucemias, ainda existe uma pequena parcela que possui uma significativa dificuldade em ser categorizada. Cerca de menos de 4% das leucemias agudas (2-3% das leucemias agudas pediátricas) podem apresentar blastos com marcadores imunofenotípicos que co-existem nas linhagens linfóide B, linfóide T e/ou mielóide, a um grau tal que não é possível atribuir à leucemia uma diferenciação em apenas uma linhagem, dificultando sua classificação. Por essa razão, as leucemias agudas que se encontram nessa situação já receberam diferentes nomes, como leucemias indiferenciadas, leucemias híbridas, leucemias bifenotípicas, leucemias de linhagem ambígua e leucemias agudas de fenótipo misto (do inglês, ***Mixed Phenotypic Acute Leukemia***, MPAL) (WEINBERG; ARBER, 2010).

No fim dos anos 70 e início dos anos 80, a utilização de anticorpos monoclonais permitiu a melhor caracterização dos blastos leucêmicos e surgiram as primeiras publicações relatando a existência das chamadas **leucemias agudas bifenotípicas**. Em 1981, McGraw e colaboradores descreveram 3 pacientes com LMA, diagnosticados segundo critérios morfológicos e citoquímicos, que apresentavam a co-expressão de mieloperoxidase (MPO) e da desoxinucleotidil-transferase terminal (TdT) – este último, um clássico marcador de leucemia linfóide aguda (MCGRAW *et al.*, 1981).

Já no início dos anos 90, alguns sistemas de pontuação começaram a ser construídos a fim de permitir uma melhor definição desse novo subgrupo de leucemias agudas. Catovsky e colaboradores propuseram a construção de um *score* baseado na quantidade e na especificidade dos marcadores expressos ao diagnóstico pelas células blásticas. Marcadores considerados mais específicos para uma determinada linhagem recebiam uma pontuação mais alta, como no caso do CD3 citoplasmático para linhagem linfóide T, CD22 citoplasmático para linhagem linfóide B e MPO para linhagem mielóide (tabela 2.1). Uma pontuação maior ou igual a 2 assegurava a ocorrência de uma linhagem fenotípica e a presença de 2 linhagens definia a existência de leucemia aguda bifenotípica (CATOVSKY *et al.*, 1991).

**Tabela 2.1. Sistema de pontuação de Catovsky e col. para diagnóstico de Leucemia Aguda Bifenotípica**

<b>Pontuação</b>	<b>Linhagem B</b>	<b>Linhagem T</b>	<b>Linhagem mielóide</b>
<b>2</b>	cCD22 cadeia $\mu$	cCD3	MPO
<b>1</b>	CD10 CD19 CD24	CD2 CD5 Rearranjo TCR ( <i>TCRB</i> ou <i>TCRD</i> )	CD33 CD12 CD14  Morfologia ou citoquímica de LMA (outras além de MPO)
<b>0.5</b>	TdT Rearranjo IGH	CD5	CD11b CD11c CD15

LMA: Leucemia Mielóide Aguda; MPO: Mieloperoxidases; TCR: Recetor de células T; TdT: desoxinucleotidil terminal transferase.  $\geq 2$  pontos são requeridos para assegurar a linhagem. Fonte: Adaptado de (Weinberg e Arber, 2010).

Alguns anos depois, os critérios de Catovsky foram aprimorados pelo *Grupo Europeu para Caracterização Imunológica das Leucemias* (EGIL) por meio da adição de novos marcadores linhagem-específicos ao sistema de pontuação, como CD79a para linhagem linfóide B (Tabela 2.2). O Grupo EGIL também estabeleceu que pelo menos 20% dos blastos deveriam expressar um determinado marcador para que o mesmo fosse considerado positivo – exceto nos casos de marcadores considerados altamente linhagem-específicos, como CD3, CD79a, MPO e TdT, onde o *cut-off* era de 10%. Foram definidas as técnicas pelas quais a avaliação dos marcadores poderia ser realizada, como citometria de fluxo, imunofluorescência indireta e imunocitoquímica. Além disso, a presença de uma linhagem passou a ser definida pela presença de mais de 2 pontos, quando pelos critérios de Catovsky, uma pontuação maior ou igual a 2 já assegurava a ocorrência de uma linhagem fenotípica, como descrito no parágrafo anterior. Posteriormente, o próprio grupo EGIL revisou seu sistema de pontuação, adicionando o marcador CD117 como altamente específico para linhagem mielóide, e sugeriu um painel mínimo de anticorpos para a definição de cada uma das linhagens de leucemia aguda (BENE *et al.*, 1995, 1998) (Tabela 2.3).

**Tabela 2.2. Sistema de pontuação revisado pelo grupo EGIL para Leucemia Aguda Bifenotípica**

Pontuação	Linhagem B	Linhagem T	Linhagem mielóide
2	CD79a	CD3 (cit/m)	anti-MPO
	CD22 cit	anti-TCR $\alpha/\beta$	(anti-lisozima)
	cadeia $\mu$ cit	anti-TCR $\gamma/\delta$	
1	CD10	CD2	CD13
	CD19	CD5	CD33
	CD20	CD8	CDw65
		CD10	CD117
0.5	TdT	TdT	CD14
	CD24	CD7	CD15
		CD1a	CD64

cit: citoplasmática; m: membrana; MPO: Mieloperoxidases; TCR: Recetor de células T; TdT: desoxinucleotidil terminal transferase. >2 pontos são requeridos para assegurar a linhagem. Fonte: Adaptado de (Weinberg e Arber, 2010).

**Tabela 2.3. Painel de marcadores recomendado pelo grupo EGIL para caracterização de Leucemia Aguda Bifenotípica**

Rastreamento	Linhagem	Marcadores
Primeiro painel	Linfóide B	CD19, CD22cit, CD79a, Cd10
	Linfóide T	CD3cit, CD2, CD7
	Mielóide	anti-MPO, CD13, CD33, CDw65, CD117
	Não linhagem específica	TdT, CD34, HLA-DR
Segundo painel	Se LLA linhagem B	IgM cit, $\kappa$ , $\lambda$ , CD20, CD24
	Se LLA linhagem T	CD1a, mCD3, Cd4, CD5, CD8, anti-TCR $\alpha/\beta$ , anti-TCR $\gamma/\delta$
	Se LMA	anti-lisozima, CD14, CD15, CD41, CD61, CD64, anti-glicoforina A

LMA: leucemia mielóide aguda; LLA: leucemia linfóide aguda; cit: citoplasmática; m: membrana; MPO: Mieloperoxidases; TCR: Recetor de células T; TdT: desoxinucleotidil terminal transferase. >2 pontos são requeridos para assegurar a linhagem. Fonte: Adaptado de (Weinberg e Arber, 2010).

Em 2001, a classificação das neoplasias linfóides e hematopoiéticas da Organização Mundial de Saúde (do inglês, WHO) incluiu uma nova categoria, denominada **leucemia aguda de linhagem ambígua**, baseada nos critérios diagnósticos previamente estabelecidos pelo grupo EGIL (JAFFE 2001). Essa nova categoria abrangia 3 subgrupos: *i. leucemia aguda indiferenciada* – na qual marcadores definidores de linhagem não eram identificados; geralmente, os blastos leucêmicos apresentavam positividade para CD34, HLDR e/ou CD38; *ii. leucemia aguda bilinhagem* – na qual duas populações de blastos imunofenotipicamente

distintas podiam ser identificadas; *iii. leucemia aguda bifenotípica* – onde marcadores linhagem-específicos podiam ser identificados na mesma população de blastos. Entretanto, algumas questões tornaram essa classificação não tão clara, como a descrição de que alguns casos de leucemia aguda bilinhagem poderiam evoluir para bifenotípica, não deixando bem definida a relação entre as duas entidades; a possibilidade de inclusão de casos de leucemia aguda com troca de linhagem na categoria de leucemia aguda bilinhagem, uma vez que poderia se tratar da expansão de um subclone imunofenotipicamente distinto do clone majoritário inicial, mas já presente ao diagnóstico; além disso, um erro tipográfico na segunda versão impressa da publicação, considerou que a presença de 2 ou mais pontos permitiam a caracterização de uma linhagem, quando na classificação EGIL, eram necessário mais de 2 pontos para que a presença da linhagem fosse definida.

Na revisão de 2008, a WHO manteve a categoria **leucemia aguda de linhagem ambígua**, mas uma nova subdivisão foi feita. Os subgrupos leucemia aguda bilinhagem e leucemia aguda bifenotípica deixaram de existir, dando lugar às **leucemias agudas de fenótipo misto** (*do inglês*, MPAL). Estas poderiam ser classificadas em Linfóide T/ Mielóide (MPAL T/M) e Linfóide B/ Mielóide (MPAL B/M) de acordo com os marcadores imunofenotípicos identificados, independentemente se havia presença de uma ou mais populações de blastos. Além disso, as leucemias agudas com alterações genéticas específicas, como a  $t(8;21)(q22;q22)$ , a  $inv(16)$  e a  $t(15;17)(q22;q12)$  deveriam ser excluídas da categoria MPAL, exceto as que possuíssem rearranjo do gene *MLL* ou gene de fusão *BCR-ABL1* – nesse último caso, era importante a exclusão de LMC em fase blástica. Esses cuidados devem-se ao fato de que, quando os critérios de EGIL são aplicados, alguns casos clássicos de LMA podem ser erroneamente classificados como MPAL. Por exemplo, a expressão de marcadores de linhagem B, como CD19 e PAX5, é comum na LMA com  $t(8;21)(q22;q22)$ , enquanto que a presença de CD2, um marcador de linhagem T, também é comum na LMA que abriga  $t(15;17)(q22;q12)$ , podendo gerar uma classificação inadequada das referidas leucemias. Na verdade, a intensidade da expressão do marcador também é importante para definição da linhagem e isso não estava tão bem representado pelos critérios de EGIL. Sendo assim, a classificação WHO estabeleceu novos critérios para definição das linhagens das leucemias agudas, como descrito na tabela 2.4. Além disso, uma entidade provisória *Leucemia/linfoma linfoblástico de células Natural Killer (NK)* também foi alocada na categoria de leucemias agudas de linhagem ambígua devido a sua definição imunofenotípica ainda permanecer incerta.

**Tabela 2.4. Critérios para assegurar mais do que uma linhagem em uma única população de blastos**

<b>Linhagem Mielóide</b> MPO (por citometria de fluxo, imuno-histoquímica ou citoquímica) ou Diferenciação monocítica ( $\geq 2$ dos seguintes: esterase não específica, CD11c, CD14, CD64, lisozima)
<b>Linhagem Célula-T</b> CD3 citoplasmática (por citometria de fluxo com anticorpos para cadeia CD3 epsilon; imuno-histoquímica usando anticorpo anti-CD3 policlonal pode detectar cadeia CD3 zeta, que não é célula T – específica) ou CD3 de superfície (rara em leucemias agudas de fenótipo misto)
<b>Linhagem Célula-B (múltiplos antígenos requeridos)</b> Forte CD19 Com $\geq 1$ dos seguintes fortemente expressos: CD79a, CD22 citoplasmático, CD10 ou Fraco CD19 Com $\geq 2$ dos seguintes fortemente expressos: CD79a, CD22 citoplasmático, CD10

CD: *cluster of differentiation*; MPO: Mieloperoxidase. Fonte: Adaptado de (Weltgesundheitsorganisation, 2017).

Recentemente, em 2016, a WHO realizou uma nova revisão da classificação das neoplasias linfóides e hematopoiéticas, excluindo a entidade provisória *Leucemia/linfoma linfoblástico de células Natural Killer (NK)* e criando 2 novos subgrupos: *ii. MPAL, NOS, tipos raros* – na qual, ocorre a rara presença de marcadores de linhagem T e B simultaneamente; *iii. leucemias agudas de linhagem ambígua, NOS* – onde a combinação dos marcadores expressos não permite a classificação da leucemia em indiferenciada nem em MPAL (Tabela 2.5) Casos de leucemia com rearranjos do gene *FGFR1* também não poderiam ser considerados MPAL. Todos os casos de leucemia mielóide crônica em crise blástica, de LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia e LMA relacionada à terapia deveriam ser classificados principalmente como tal, com uma notação secundária de que eles teriam um fenótipo misto, se aplicável.

Mais uma vez, é importante ressaltar, que a leucemia aguda que apresenta o envolvimento bem definido de uma determinada linhagem, mas expressa um ou mais antígenos associados a uma linhagem diferente, deve ser considerada leucemia aguda com expressão de antígeno aberrante, ao invés de MPAL. Para ser classificada com MPAL, não basta que a leucemia apresente marcadores que co-ocorram em linhagens linfóide B, linfóide T e/ou mielóide. A expressão desses marcadores precisa ter peso suficiente para não permitir a definição com certeza de apenas uma linhagem.

**Tabela 2.5. Classificações da WHO para Leucemias Agudas de Linhagem Ambígua em 2001, 2008 e 2016**

WHO 2001	WHO 2008	WHO 2016
<b>Leucemias agudas de linhagem ambígua</b>	<b>Leucemias agudas de linhagem ambígua</b>	<b>Leucemias agudas de linhagem ambígua</b>
<b>Leucemia aguda indiferenciada</b>	Leucemia aguda indiferenciada	Leucemia aguda indiferenciada
<b>Leucemia aguda bilinhagem</b>	MPAL com t(9;22)(q34;q11.2);	MPAL com t(9;22)(q34;q11.2);
<b>Leucemia aguda bifenotípica</b>	BCR-ABL1	BCR-ABL1
	MPAL com t(v;11q23); MLL rearranjado	MPAL com t(v;11q23); MLL rearranjado
	MPAL, B/mielóide, NOS	MPAL, B/mielóide, NOS
	MPAL, T/mielóide, NOS	MPAL, B/mielóide, NOS
	<i>Entidade Provisória: Leucemia/linfoma linfoblástico de células NK</i>	MPAL, T/mielóide, NOS
		MPAL, NOS, tipos raros
		Leucemias agudas de linhagem ambígua, NOS

Recentemente, a análise de uma coorte de 115 crianças com diagnóstico de leucemia aguda de linhagem ambígua (49 casos de MPAL T/M, 35 MPAL B/M, 16 MPAL com *KMT2A* rearranjado, 2 MPAL *BCR-ABL1*, 8 MPAL sem outra especificação e 5 leucemias agudas indiferenciadas) revelou que os subtipos MPAL T/M e MPAL B/M apresentam perfis genéticos distintos. O rearranjo do gene *ZNF384* foi comumente encontrado nos casos de MPAL B/M (15/35 casos, 48%), enquanto que alterações bialélicas do gene *WT1* foram frequentes na MPAL T/M (20/49, 41%). Alterações em genes que codificam fatores transcricionais foram detectadas em 100% dos casos de MPAL T/M, com alterações mutuamente exclusivas em *WT1*, *ETV6*, *RUNX1* e *CEBPA* em 82% dos casos. A MPAL T/M também compartilhou características genômicas com a leucemia linfoblástica aguda de células T precursoras precoces (ETP-ALL), com vários genes sendo encontrados mutados em frequências similares em ambas entidades, incluindo *ETV6*, *EZH2*, *WT1* e *FLT3* (ALEXANDER *et al.*, 2018).

Do ponto de vista clínico, as MPAL em geral parecem apresentar um curso clínico mais agressivo, com uma leucometria mais alta e mais infiltração extramedular ao diagnóstico do que são encontrados nos casos de LLA e LMA, além de um prognóstico mais reservado quando comparadas às outras leucemias. Isso tem sido confirmado por algumas séries, apesar do número relativamente pequeno de casos devido à baixa incidência da doença.

As taxas relatadas de sobrevivência para crianças e adultos com MPAL são de 47-75% e 20-40%, respectivamente, e ainda não há consenso sobre o regime terapêutico ideal (LMA ou LLA) (RUBNITZ *et al.*, 2009; GERR *et al.*, 2010; MATUTES *et al.*, 2011; YAN *et al.*, 2012;

WOLACH *et al.*, 2015). As duas maiores séries de pacientes adultos com MPAL que seguiram os critérios da OMS 2008 incluem as séries europeias publicadas por Matutes *et al.* em 2011, com 100 pacientes (28% crianças), e a experiência da República da China publicada por Yan *et al.* em 2012, com 117 pacientes (RUBNITZ *et al.*, 2009).

Dentre as raras coortes pediátricas, destaca-se a análise de 35 crianças com leucemia de linhagem mista (bifenotípica linfóide T/mielóide: 20 casos, bifenotípica linfóide B/mielóide: 12 casos, trifenotípica: 2 casos e indiferenciada: 1 caso) tratadas no St. Jude Hospital entre os anos de 1985 e 2006. Nesta coorte não foi encontrada diferença nas taxas de SG em 5 anos dessas crianças quando comparadas às taxas apresentadas pelos pacientes com LMA, assim como as taxas de SG encontradas entre os subtipos de leucemia bifenotípica linfóide B/mielóide e linfóide T/mielóide ( $36.0\% \pm 16.6\%$  vs.  $54.0 \pm 13.8\%$ ,  $P < 0.67$ ) também foram similares. Entretanto, revelou uma menor SG dos pacientes com leucemia bifenotípica quando comparados aos pacientes com LLA ( $84.6\% \pm 1.1\%$ ,  $P < 0.001$ ) (RUBNITZ *et al.*, 2009).

Em 2010, Gerr e colaboradores publicaram o resultado de uma coorte exclusivamente pediátrica, na qual foram avaliadas 92 crianças diagnosticadas com leucemia aguda de linhagem ambígua (LALA) incluídas nos protocolos do grupo BFM para tratamento de LMA e de LLA entre os anos de 1998 e 2006. Dezenove pacientes foram tratados de acordo com os protocolos para LMA (AML-BFM 98 e 2004) (CREUTZIG *et al.*, 2005), 46 de acordo com os protocolos para LLA (ALL-BFM 95 e 2000) (MORICKE *et al.*, 2008) e 27 pacientes receberam uma combinação de protocolos para LLA e LMA. 33 pacientes (35,9%) foram submetidos a transplante alogênico de células tronco hematopoiética. Os pacientes foram agrupados de acordo com a classificação mais atual da WHO na ocasião (WHO 2008): 78 casos foram classificados como bifenotípicos, sendo 45 casos (57,7%) com imunofenótipo linfóide B/mielóide, 27 (34,6%) linfóide T/ mielóide e 6 casos (7,7%) com fenótipo trilingagem. Seis casos foram classificados como bilinhagem, sendo 4 linfóide B/ mielóide e 2 casos, como linfóide T/ melóide. Oito casos apresentaram troca de linhagem durante o tratamento (7 de linhagem linfóide B para mielóide e 1 caso de linfóide T para mielóide). Nessa coorte, as crianças com LALA apresentaram significativamente uma média de idade maior (8,9 anos) e maior frequência de hiperleucocitose (18,5%) do que as crianças não LALA do protocolo ALL-BFM 95 (média de idade de 5 anos e 10,9% com hiperleucocitose). O acometimento inicial do sistema nervoso foi significativamente mais frequente entre as crianças com LALA (24,1%) do que entre as crianças tratadas nos protocolos AML-BFM 98 (11,5%) e ALL -BFM 95 (3,2%). As alterações citogenéticas mais comumente encontradas foram a presença do gene de fusão *ETV6/RUNX1* (16%) e de trissomia do cromossomo 8 (14,6%). A taxa de remissão completa entre os pacientes com LALA foi significativamente menor do que a taxa encontrada entre os

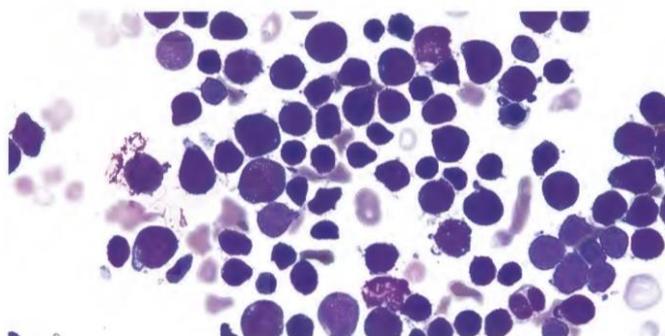
pacientes não LALA do protocolo BFM-ALL 95 (91,8% vs. 99,1%,  $P < 0.001$ , respectivamente), enquanto que não houve significância estatística em relação a taxa dos pacientes não LALA do BFM AML 98 (87,9%). A sobrevida livre de eventos (SLE) e a sobrevida global (SG) em 5 anos foram baixas, ambas de  $62 \pm 5\%$ . SLE em 5 anos dos pacientes com LALA foi significativamente melhor do que para os pacientes com LMA ( $49 \pm 2\%$ ,  $P = 0,027\%$ ), enquanto que a SG foi similar (LMA:  $63 \pm 2\%$ ,  $P = 0,86$ ). Já os pacientes com LLA apresentaram tanto SLE quanto SG significativamente melhores do que os pacientes com LALA (LLA: SLE  $80 \pm 1\%$ ; SG  $88 \pm 1\%$ ,  $P < 0,001$ ). Quando foram analisados os diferentes grupos de risco, os pacientes com LALA apresentaram taxas de SLE semelhantes aos pacientes com LLA alto risco e LMA baixo risco, porém significativamente melhores do que os pacientes com LMA alto risco (SLE  $40 \pm 3\%$ ,  $P = 0,0005$ ) e piores do que os pacientes com LLA médio e baixo riscos ( $80 \pm 1\%$ ,  $P < 0,001$  e  $90 \pm 1\%$ ,  $P < 0,001$ , respectivamente). A SLE em 5 anos dos pacientes com LALA tratados somente com protocolos direcionados para LMA foi significativamente pior do que a de pacientes que receberam somente protocolos para tratamento de LLA ( $n=19$ ,  $41 \pm 12\%$  vs.  $n=46$ ,  $81 \pm 6\%$ ,  $P = 0,0009$ , respectivamente). A evolução comparativa entre os subgrupos de LALA demonstrou que os pacientes com fenótipo linfóide B/ mielóide ( $n=45$ ) tenderam a apresentar uma SLE em 5 anos melhor do que os pacientes com fenótipo linfóide T/ mielóide ( $n=45$ ,  $74 \pm 7\%$  vs.  $n=27$ ,  $53 \pm 10\%$ ,  $P = 0,06$ ) e semelhante aos pacientes com fenótipo trilinear (GERR *et al.*, 2010).

Um estudo retrospectivo internacional, iBFM-AMBI2012, que analisou 233 crianças entre 1 e 12 anos diagnosticada com LALA entre 2002 e 2015, relatou uma sobrevida livre de eventos (SLE) em 5 anos superior para os pacientes tratados com terapia primariamente voltada para LLA em relação a SLE dos pacientes tratados com protocolo combinado ou direcionado para LMA ( $80 \pm 4\%$ ,  $36 \pm 7,2\%$  e  $50 \pm 12\%$ , respectivamente). Quando os casos com fusões gênicas específicas para LLA ou LMA foram excluídos da análise, a SLE em 5 anos para os casos de LALA com CD19 positivo foi de  $83 \pm 5,3\%$  no tratamento primário para LLA comparada a  $0 \pm 0\%$  e  $28 \pm 14\%$  nos casos de tratamento primário combinado e direcionado para LMA, respectivamente. Sendo assim, o tratamento com protocolos do tipo LLA foi recomendado para a maioria dos pacientes pediátricos com LALA, incluindo casos com CD19 positivo. Foi sugerido que o tratamento direcionado para LMA fosse preferido em uma minoria de casos de LALA com CD19 negativo e nenhum outro aspecto linfóide. Além disso, nessa série, não foi encontrado nenhum benefício global do transplante de células tronco hematopoiéticas, podendo o mesmo ser introduzido para alguns pacientes com uma resposta pobre ao tratamento (HRUSAK *et al.*, 2018).

Em suma, ainda não existem ensaios clínicos prospectivos, controlados que ajudem a guiar a terapia. Os limitados dados sugerem que um esquema terapêutico direcionado para leucemia linfóide aguda seguido por transplante de células tronco hematopoiéticas, em alguns casos, pode ser aconselhável. Além disso, a adição de inibidores tirosina-quinase para os pacientes com MPAL que possuem o gene de fusão *BCR-ABL1* tem sido recomendado. (WOLACH *et al.*, 2015)

### **2.2.2.1 Leucemia Aguda de Fenótipo Misto T/ Mielóide (MPAL T/M)**

MPAL T/M é uma doença bem rara, respondendo por < 1% das leucemias, acometendo adultos e crianças. Como descrito anteriormente, a MPAL linfóide T/ Mielóide apresenta blastos que possuem critérios para que as duas linhagens (linfóide T e mielóide) sejam definidas, sem outras anormalidades genéticas recorrentes. Os blastos mielóides são positivos para MPO e junto com os monoblastos também costumam expressar outros marcadores mielóides como CD13, CD33 e CD117 (KIT). Além da expressão do marcador CD3 (principalmente o citoplasmático) para definição da linhagem T, costumam ser encontrados CD2, CD7 e CD5. Morfologicamente, os blastos podem se assemelhar aos encontrados na leucemia linfóide aguda e/ou pode existir uma população mista, com aspectos linfóides e outra com aspectos mielóides (Figura 2.13).



**Figura 2.13. Blastos da Leucemia Aguda de Fenótipo Misto.** Existe uma população dismórfica de blastos, com muitos linfoblastos pequenos. Também podem ser vistos blastos maiores com uma relação núcleo/citoplasma alta, cromatina fina e nucléolo imperceptível. Fonte: Fonte: Weltgesundheitsorganisation, 2017.

O status mutacional e assinatura gênica da MPAL M/T ainda são desconhecidos devido ao reduzido número de casos descritos. Em uma série de 31 pacientes com MPAL foram pesquisadas mutações em 17 genes relacionados a LLA. Foi encontrada mutação em *NOTCH1* em apenas um dos 31 pacientes, sendo o mesmo do subtipo M/T, assim como a mutação em *ETV6* também só foi identificada em um dos 31 casos, também com MPAL M/T. Três casos

apresentaram mutação em *EZH2*, sendo 2 deles MPAL M/T (YAN *et al.*, 2012). Outro estudo com 18 pacientes com MPAL T / M revelou uma frequência de 56% de mutações em *DNMT3A* (KERN *et al.*, 2012). Em outra série, mutações no gene *FLT3* foram encontradas em 7 de 15 pacientes com MPAL T/M, podendo indicar um possível alvo terapêutico (HOEHN *et al.*, 2012).

A MPAL linfóide T/mielóide é considerada uma leucemia de prognóstico reservado, embora os dados comparando esses casos com os outros subtipos de MPAL sejam escassos. Nas poucas séries existentes, assim como nos casos de MPAL em geral, os pacientes com MPAL T/mieloide não foram tratados uniformemente, recebendo várias combinações e administração sequencial de terapias ora dirigidas para blastos linfóides, ora para blastos mielóides e alguns pacientes parecem responder a um ou a outro esquema. Em geral, as propostas terapêuticas para MPAL T/M são semelhantes às dos outros subgrupos de MPAL (RUBNITZ *et al.*, 2009; WOLACH *et al.*, 2015).

### 2.2.3 Leucemia Mielóide Aguda com Diferenciação Mínima (LMA-M0)

A leucemia mielóide aguda com diferenciação mínima (LMA-M0, pela classificação FAB) é uma neoplasia hematológica rara, ocorrendo em menos de 5% dos casos de LMA. Acomete indivíduos de qualquer idade, principalmente lactentes e idosos (HOFFMAN, 2018).

Essa entidade clínica caracteriza-se pela presença de blastos sem alterações morfológicas e citoquímicas comuns aos blastos da linhagem mielóide. Menos de 3% dos blastos apresentam coloração positiva para mieloperoxidase (MPO), para Sudan-Black B ou para naftol AS-D cloro-acetato esterase (CAE). Os blastos possuem um tamanho médio, com núcleos redondos ou levemente indentados com cromatina dispersa, um ou dois nucléolos, citoplasma agranular com variados graus de basofilia e ausência de bastonetes de Auer. Raramente podem ser encontrados pequenos blastos com cromatina condensada e escasso citoplasma que podem assemelhar-se a linfoblastos (HOFFMAN, 2018).

A LMA M0 só pode ser diagnosticada pela imunofenotipagem do blasto, por meio da identificação de marcadores mielóides. Além disso, a doença não pode possuir critérios diagnósticos para outros grupos de neoplasias mielóides aguda – LMA com anormalidades genéticas recorrentes, LMA com alterações relacionadas a mielodisplasia e LMA relacionada a terapia (WELTGESUNDHEITSORGANISATION, 2017).

Para que o diagnóstico de LMA M0 seja confirmado é necessária a presença de pelo menos 2 *marcadores mielóides* pela imunofenotipagem, sendo CD13 e CD117 (cKIT) os mais frequentemente encontrados (THALHAMMER-SCHERRE *et al.*, 2002). Em cerca de 60% dos casos, ocorre a presença de CD33 (KALEEN *et al.*, 2001). Ocorre a expressão variável de marcadores como MPO, SBB, CD16/ 56. Outros marcadores frequentemente identificados nas células mielóides e monocíticas, como CD11b, CD15, CD14 e CD65, não são comumente achados na LMA M0 (DUNPHY; TANG, 2007). Entretanto, é comum o achado de marcadores imunofenotípicos encontrados em células tronco hematopoiéticas ou células hematopoiéticas precursoras precoces, como CD34, CD38 e HLA-DR. Além disso, embora marcadores específicos de linhagem linfóide B, como cCD79 e CD22, e de linhagem linfóide T, cCD3, sejam ausentes (KALLEN *et al.*, 2001), a presença de desoxinucleotidil-transferase terminal (TdT) nuclear pode ser encontrada em até 50% dos casos e parece indicar um melhor prognóstico (PATEL *et al.*, 2013). A expressão de CD7 também tem sido relatada em cerca de 40% dos casos (SWERDLOW *et al.*, 2016).

Dentre as alterações genéticas, é frequente o achado de anormalidades cromossômicas complexas e anormalidades cromossômicas não-balanceadas, como -5/del(5q),-7/del(7q), +8 e del(11q) (SHANMUGAN *et al.*, 2018). A trissomia 21 não constitucional e hipodiploidia

também têm sido mais frequentemente encontradas na LMA-M0 do que nos outros subtipos de LMA. Na mesma série, 6 de 36 pacientes com LMA-M0 apresentaram mutações *FLT3-ITD* (17%), mas esse achado não apresentou impacto na evolução dos pacientes. (BARBARIC *et al.*, 2007). Mutações em *RUNX1* têm sido relatadas em cerca de 30% dos casos e apresentam uma forte associação com a trissomia 13, com esses casos apresentando uma expressão aumentada de *FLT3* (SILVA *et al.*, 2007). Mais recentemente, uma série de 28 pacientes com LMA-M0 revelou a presença de 5 casos (18%) com mutação no gene *FLT3* (PATEL *et al.*, 2013).

Ao longo dos anos, a incidência de rearranjos dos genes do TCR/Ig na LMA, além de pouco investigada, tem apresentado resultados divergentes. Em 1987, uma série de 38 casos de LMA M1-M5 (13 casos positivos para TdT e 25 casos com TdT negativo) revelou a ocorrência de rearranjo no *locus* TCRB em 6 casos (5 nos casos com TdT + e 1 nos casos TdT-). Nos 4 casos de LMA indiferenciada analisados todos eram TdT positivos e tiveram rearranjos identificados, tanto no *locus* TCRB quanto no *locus* IGH (SEREMETIS *et al.*, 1987). Em uma série de 40 casos de LMA em geral, foi identificado rearranjo do *locus* TCRG em apenas um caso – uma paciente de 8 anos com LMA-M0 com marcadores imunofenotípicos linfóides (TdT e CD7) (PARREIRA *et al.*, 1992). No mesmo ano, foi publicada a investigação de 100 casos de LMA (32 crianças e 68 adultos), com a presença de rearranjo no *locus* TCRD em 9 pacientes, sendo que em 8 deles havia expressão de antígenos linfóides T associados. Pela classificação FAB, 6 casos foram categorizados com M1 e 2 casos com M2 (SCHMIDT *et al.*, 1992). Mais recentemente, em 2013, a presença de rearranjos nos *loci* TCRG e/ou TCRB foi identificada em 33,4% (11/23) dos casos de LMA-M0 (PATEL *et al.*, 2013).

Clinicamente, a LMA M0 manifesta-se por sinais e sintomas decorrentes da falência medular, frutos da anemia, neutropenia e plaquetopenia, comuns nos casos de leucemia aguda em geral. O prognóstico parece ser mais reservado entre as crianças e adultos com LMA-M0 quando comparado aos outros subtipos de LMA (BENE *et al.*, 2001; BARBARIC *et al.*, 2007). A sobrevida livre de eventos (23%±11% vs 41%±3%; P <0.018) e a sobrevida livre de doença (31%±14% vs 52%± 3%; P<0.009) em 8 anos parecem ser significativamente menores entre as crianças com LMA-M0 quando comparadas às com LMA não-M0. (BARBARIC *et al.*, 2007).

## 2.3 Achados imuno-genéticos similares entre as ETP-ALL, MPAL T/M e LMA-M0

As entidades clínicas e imunofenóticas descritas acima nos trazem questões relevantes e intrigantes sobre a origem clonal dessas leucemias. Seja na leucemia mielóide com diferenciação mínima, seja na MPAL T/mielóide ou na ETP-ALL, a significativa expressão simultânea de marcadores imunofenóticos definidores de linhagem mielóide e linfóide T acompanhada de alterações genômicas que corroboram esses achados, como perfis de expressão gênica e mutacionais similares aos encontrados nas leucemias mieloides agudas mesmo tratando-se de uma ETP-ALL, apontam para que o evento gerador da clonalidade nessas entidades clínicas tenha ocorrido ainda em etapas bem precoces da diferenciação celular. Há evidências crescentes de uma possível relação entre o desenvolvimento de células T e mieloides, sugerindo o envolvimento de um precursor comum ou um precursor linfóide que reativou um programa de diferenciação mielóide nesse processo. (GUTIERREZ e KENTZIS, 2018).

Ainda durante os anos 80, duas hipóteses principais foram levantadas para explicar a expressão bifenotípica na leucemia. Uma delas, conhecida como *promiscuidade de linhagem* (GREAVES *et al.*, 1986) sugere que células progenitoras hematopoiéticas normais com potencial de diferenciação em múltiplas linhagens podem possuir esse potencial preservado, como uma verdadeira relíquia, quando a transformação leucêmica ocorre nessa fase, gerando uma população de blastos com bloqueio maturativo nesse estágio de diferenciação celular e, por conseguinte, expressando marcadores fenotípicos de diferentes linhagens (Greaves 1986). Outra hipótese, denominada *infidelidade de linhagem* (MCCULLOCH *et al.*, 1983; SMITH *et al.*, 1983, 1984) suporta a idéia de que uma expressão gênica anormal nas células blásticas, ou seja, uma programação defeituosa oncogeneticamente originada, levaria à produção de blastos com expressão de marcadores de múltiplas linhagens.

Desde a descrição dessas hipóteses até os dias atuais, cerca de 3 décadas se passaram e houve muito progresso no conhecimento da biogênese das leucemias e dos diversos fatores que interferem e direcionam a diferenciação das células sanguíneas na medula óssea. Entretanto, ainda é difícil definir qual das duas teorias poderia justificar o aparecimento de leucemias agudas com fenótipo misto ou mesmo com significativa expressão de marcadores de uma outra linhagem. Talvez a combinação das duas idéias seja o mais provável e, cada vez mais, reforça-se a importância da atuação orquestrada dos fatores de transcrição nesse processo.

No contexto das leucemias agudas, várias alterações genômicas e epigenéticas patológicas podem ocorrer, culminando com a desregulação e a expressão aberrante dos fatores

de transcrição, com a subsequente desorganização do processo de diferenciação celular. (ORKIN *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2012; REGALO *et al.*, 2012). Como exemplo desta situação, temos a expressão de *NOTCH1*. Como melhor descrito na seção anterior, *NOTCH1* é um fator de transcrição crucial para diferenciação dos precursores linfóides T normais e mutações ativadoras do gene são encontradas em mais de 50% das LLA-T. Por outro lado, a ausência de *NOTCH1* parece permitir a diferenciação mielóide da até então célula linfóide T (WADA *et al.*, 2008; SULTANA *et al.*, 2010; DE OBALDIA *et al.*, 2013). Palomero e colaboradores identificaram mutações ativadoras em *NOTCH1* em amostras de LMA-M0, M1 e M2 e nos clones de recaída nos casos em que houve troca de linhagem de LMA, ao diagnóstico, para LLA-T, no momento da recidiva. Isso reforça o potencial que mutações nos genes dos fatores de transcrição podem ter para gerar reprogramação de células linhagem-específicas (PALOMERO *et al.*, 2006). Da mesma forma, a análise do perfil de expressão gênica de um grande grupo de pacientes com LMA identificou um subgrupo com um perfil de expressão diferenciado, baseado na presença de hipermetilação do promotor do gene *CEBPA* – com consequente silenciamento do gene – e expressão aberrante de marcadores imunofenotípicos de linhagem linfóide T, como CD7. Nesse grupo, foi comum a identificação de mutações pontuais ativadoras de *NOTCH1* e a sua via de sinalização estava aberrantemente ativada (WOUTERS *et al.*, 2007).

De fato, as mutações podem superar o fenótipo e os achados na ETP-ALL também corroboram para isso. Na ETP-ALL, sabe-se que a origem da doença se encontra em um subconjunto de células precursoras jovens que ainda não estão irreversivelmente comprometidas com a linhagem linfóide T e retêm o potencial para diferenciação em células dendríticas/mielóides (WHO 2016). Como relatado, a doença está associada a mutações recorrentes tipicamente observadas em neoplasias mielóides como *DNMT3A*, *IDH1* e *IDH2*, estando transcricionalmente relacionada a progenitores mielóides (COUSTAN-SMITH *et al.*, 2009; VAN VLIERBERGUE *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012). Esses achados ressaltam a promiscuidade entre as células T precursoras imaturas e a linhagem mielóide, apoiando a hipótese da existência de progenitores linfocitários precoces multipotentes (REN *et al.*, 2011).

Na MPAL T/M, a sobreposição de alterações genéticas comuns às linhagens linfóide e mielóide também tem sido demonstrada. Em uma coorte pediátrica recente, foi realizada a comparação dos achados genômicos de 49 casos de MPAL T/M com aqueles relatados na literatura para LLA-T na infância (LLA-T; n = 245) (Liu 2017), ETP-ALL (n = 19) (LIU *et al.*, 2017) e LMA (n = 197) (Bolouri 2018). Ao contrário do que se esperaria, alterações comuns na LLA-T, como mutações em *TAL-1*, amplificação de *MYB*, deleção de *LEF1*, deleções de *CDKN2A* e *CDKN2B* e amplificação do *enhancer MYC* dirigido por *NOTCH1*, foram raras na

MPAL T/M e na ETP-ALL. Em contraste, as alterações no *WT1* foram comuns em MPAL T/M (41%) e ETP-ALL (42%), mas não na LLA-T (9%;  $P < 0,001$ ). Mutações na via de sinalização Ras e JAK-STAT foram comuns em MPAL T/M e ETP-ALL e as mutações da via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) foram comuns na LLA-T. Vários genes foram mutados em frequências similares na MPAL T/M e ETP-ALL, incluindo *ETV6*, *EZH2*, *WT1* e *FLT3*. Assim, MPAL T/M e ETP-ALL foram descritas como entidades semelhantes no espectro das leucemias imaturas (ALEXANDER *et al.*, 2018)

Baseado nesses achados, Gutierrez e Kentsis propuseram recentemente a criação de uma nova categoria para classificação das leucemias agudas, denominada **Leucemia Linfoblástica T/ Mieloide Aguda (LTMA)**. Essa nova categoria abrigaria as ETP-ALL, as MPAL T/M e um subtipo específico de LMA com características típicas de células linfóides T, como presença de rearranjos nos genes dos TCR/Ig. Esse subtipo de LMA, não megacariocítica, tende a apresentar positividade para TdT e de outros marcadores linfóides T típicos, como CD7, CD2 e CD4, além de mutações tipicamente encontradas nos casos de LLA-T típica, como *WT1*, *PHF6*, *RUNX1* e *BCL11B* (GUTIERREZ e KENTISIS, 2018).

Sendo assim, apesar da notória ampliação no entendimento das alterações genômicas nas leucemias conquistada nos últimos anos, alguns subtipos leucêmicos ainda carecem de uma definição precisa, prejudicando seu diagnóstico correto e a instituição de medidas terapêuticas mais específicas. Por essa razão, indubitavelmente, investigações mais profundas nessa área precisam ser realizadas, de sorte que possam contribuir significativamente para desvendar o complexo panorama da biogênese da doença e, por conseguinte, para o desenvolvimento de terapias alvo-direcionadas e potencialmente mais eficazes.

### III. Objetivos

**Principal:** Identificar a presença de rearranjos completos e incompletos dos genes do Receptor de Células T e B nos casos de ETP-ALL, MPAL T/Mieloide e LMA M0 em uma coorte de pacientes pediátricos brasileiros.

**Secundários:** *i.* Identificar possíveis padrões de rearranjos de segmentos gênicos V(D)J que caracterizem os casos de ETP-ALL, MPAL T/Mieloide e LMA-M0; *ii.* Avaliar a presença de mutação do tipo *ITD* no gene *FLT3* nas ETP-ALL, MPAL T/Mieloide e LMA M0 pediátricas; *iii.* correlacionar a presença de rearranjos dos genes do TCR/BCR e de mutações *FLT3-ITD* nas ETP-ALL, MPAL T/Mieloide e LMA M0 pediátricas com achados clínico-laboratoriais.

## **IV. Materiais e Métodos**

### ***4.1. Pacientes e amostras***

Esse é um estudo transversal descritivo realizado por meio da análise de amostras de medula óssea ou de sangue periférico de 41 pacientes pediátricos (0 – 21 anos) enviadas para o Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrica do INCA e para o Laboratório de Citometria de Fluxo do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG)/ UFRJ, recém-diagnosticados com ETP-ALL, MPAL T/Mieloide ou LMA-M0. Foram analisadas 21 amostras de pacientes com diagnóstico *de novo* de ETP-ALL, 8 de MPAL T/Mielóide e 12 de diagnóstico de LMA M0 entre os anos de 2005 e 2020.

O diagnóstico dessas três entidades clínicas foi estabelecido por imunofenotipagem de acordo com os critérios de Inukai *et al.* para diagnóstico de ETP-ALL (INUKAI *et al.*, 2012), com os critérios da classificação EGIL revisados pela Organização Mundial de Saúde em 2016 para o diagnóstico de MPAL T/Mieloide e LMA M0 (WELTGESUNDHEITSORGANISATION, 2017), além de estarem em concordância com os protocolos do Consórcio Euroflow para os procedimentos de calibração e compensação do citômetro, processamento das amostras, painéis de anticorpos utilizados e estratégias de análise (BEISHUIZEN *et al.* , 1991; SZCZEPANSKI *et al.*, 2002). O perfil imunofenotípico de cada um dos casos estudados está descrito na seção 5.2.1, nos quadros 5.3, 5.4 e 5.5 (pag.64 e 65). Todos os pacientes que não atenderam aos critérios acima descritos foram excluídos do estudo.

Como estudo piloto para padronização no nosso laboratório da técnica de detecção dos rearranjos dos genes dos Receptores de Células T (TCR) e dos Receptores de Células B (BCR ou imunoglobulinas), inicialmente foi investigada a presença desses rearranjos em 10 amostras ao diagnóstico de pacientes pediátricos com LLA de precursores B e em 3 linhagens celulares também oriundas de casos de LLA de precursores B: SUP-B15 – linhagem de LLA-pB com cromossomo Philadelphia; Nalm6: linhagem de LLA-pB com t(5;12); e SEM: linhagem de LLA-pB com t(4;11). A execução deste trabalho segue as normas da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP - 3.164.004).

### ***4.2. Processamento das amostras***

As amostras de medula óssea foram submetidas à extração de DNA a partir dos leucócitos totais, de acordo com os seguintes procedimentos abaixo relacionados:

1) *Isolamento de células mononucleares de medula óssea ou de sangue periférico por centrifugação em gradiente de Ficoll-Histopaque (Sigma).*

2) *Extração de DNA a partir de células mononucleares:*

As amostras de SP e/ou MO, ao diagnóstico, foram processadas para obtenção de DNA total. A extração de DNA foi realizada por método automatizado no equipamento Maxwell® 16 (Promega), que utiliza como princípio a recuperação do DNA por microesferas ferromagnéticas. Para a quantificação e avaliação do grau de pureza do DNA, 1 ul do material extraído foi mensurado por leitura espectrofotométrica (NanoDrop®), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Uma amostra foi considerada adequada sempre que a razão DNA/proteína: 260/280 foi maior que 1,8.

#### **4.3. Análise semi-quantitativa de FLT3-ITD:**

As amostras foram avaliadas quanto à presença da mutação *FLT3-ITD* e, sendo positivas, foram semi-quantificadas por meio da análise de fragmento, utilizando-se uma PCR multiplex alelo-específica e a plataforma 3130xl (Applied Biosystems®) para corrida de eletroforese capilar. A reação de PCR foi realizada segundo Noguera *et al.* e os resultados são analisados no software Peak Scanner V1.0® (Applied Biosystems®) (NOGUEIRA *et al.*, 2005).

Nesta reação foi utilizado o oligonucleotídeo iniciador não marcado (2pmol/μL) 5'GGTGTCGAGCAGTACTCTAAACAGGTGTC 3' e o iniciador marcado com FAM (2pmol/μL) 5'GATCCTAGTACCTTCCCAAACCTC 3'. O perfil térmico consistiu em desnaturação inicial de 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30s, temperatura de anelamento de 53°C durante 30s e temperatura de extensão de 72°C durante 45s e extensão final de 20 min. O produto observado é um fragmento de 366 - 369 pb correspondente ao alelo selvagem, além de possíveis bandas adicionais de até aproximadamente 450 pb (*FLT3-ITD*).

Para a análise, consideramos apenas as corridas que foram aprovadas no critério de qualidade do marcador de peso molecular e também que apresentam picos principais com intensidade superior a 1000 rfu (unidades relativas de fluorescência) e inferior a 8000 rfu; assim como ruído inferior a 30 rfu e picos secundários iguais ou superiores a 100 rfu. A altura de cada pico de fluorescência, nos tamanhos de fragmentos demarcados no painel, foi registrada pelo software Chimer Marker.

#### ***4.4. Identificação de rearranjos completos e incompletos dos TCR /BCR***

Para identificação dos segmentos gênicos e da região juncional dos rearranjos nos genes de TCR/BCR, realizamos múltiplas Reações em Cadeia da Polimerase – Oligonucleotídeo Alelo-Específico (ASO-PCR). Em seguida, para determinar a clonalidade dos produtos de PCR, utilizamos o método de análise heteroduplex com posterior sequenciamento direto dos casos com rearranjos monoclonais ou bi-alélicos.

##### ***4.4.1. PCR V(D)J***

Para a realização do estudo-piloto, as amostras diagnósticas de 10 pacientes pediátricos com LLA-B derivada e de 3 linhagens celulares de leucemias linfóides B foram investigadas para a presença de rearranjos clono-específicos completos e incompletos nos *loci IgH, IGK, IGL, TCRD* e *TCRB*. Foram realizadas 26 PCR, uni e multiplex, para cada uma das amostras estudadas, sendo que em 4 amostras de pacientes com LLA-B derivada também foi possível a investigação de rearranjos no *loci TCRG*, totalizando 32 PCR em cada um desses casos.

As amostras diagnósticas de ETP-ALL, MPAL T/M e LMA M0 do estudo principal foram analisadas para identificação de rearranjos clono-específicos completos e incompletos nos *loci* codificadores *TCRG, TCRD, TCRB* e *IgH*. Foram realizadas 19 PCR uni e multiplex em cada um dos 44 casos analisados.

Todas as PCR V(D)J foram realizadas segundo protocolo utilizado no *Molecular Biology Laboratory de Erasmus MC – Universitair Medisch Centrum Rotterdam* (VAN DER VELDEN; VAN DONGEN, 2009). A combinação utilizada de *primers* e de reagentes em cada reação de PCR estão representados nos quadros 4.1 e 4.2

**Quadro 4.1 – Combinação de primers usada para detecção de rearranjos dos genes do TCR/Ig no Estudo-Piloto e no Estudo Principal**

ESTUDO-PILOTO – PCR VDJ para LLA-pB				ESTUDO PRINCIPAL – PCR VDJ para LLA-T			
Tubo	Primer Forward	Primer Reverse	Produto (pb)	Tubo	Primer Forward	Primer Reverse	Produto (pb)
A	V $\gamma$ I-F1-B1	J $\gamma$ 1.1/2.1-R1-B1	129	A	V $\gamma$ I-F1-B1	J $\gamma$ 1.1/2.1-R1-B1	329
B	V $\gamma$ I-F1-B1	J $\gamma$ 1.3/2.3-R1-B1	533	B	V $\gamma$ I-F1-B1	J $\gamma$ 1.3/2.3-R1-B1	533
C	V $\gamma$ II-F1-B1	J $\gamma$ 1.1/2.1-R1-B1	318	C	V $\gamma$ II-F1-B1	J $\gamma$ 1.3/2.3-R1-B1	522
D	V $\gamma$ II-F1-B1	J $\gamma$ 1.3/2.3-R1-B1	522	D	V $\gamma$ III-F1-B1	J $\gamma$ 1.3/2.3-R1-B1	522
E	V $\gamma$ IV-F1-B1	J $\gamma$ 1.1/2.1-R1-B1	353	E	V $\gamma$ IV-F1-B1	J $\gamma$ 1.3/2.3-R1-B1	557
F	V $\gamma$ IV-F1-B1	J $\gamma$ 1.3/2.3-R1-B1	557	F	V $\delta$ 1-F1-B1	J $\delta$ 1-R1-B1	452
G	V $\delta$ 2-F1-B1	D $\delta$ 3-R1-B1	501	G	V $\delta$ 2-F1-B1	D $\delta$ 3-R1-B1	501
H	D $\delta$ 2-F1-B1	D $\delta$ 3-R1-B1	608	H	V $\delta$ 2-F1-B1	J $\delta$ 1-R1-B1	443
I	V $\kappa$ I-F1-B1	Kde-R1-B1	433	I	V $\delta$ 3-F1-B1	J $\delta$ 1-R1-B1	440
J	V $\kappa$ II-F1-B1	Kde-R1-B1	443	J	D $\delta$ 2-F1-B1	D $\delta$ 3-R1-B1	608
K	V $\kappa$ III-F1-B1	Kde-R1-B1	429	K	D $\delta$ 2-F1-B1	J $\delta$ 1-R1-B1	550
L	V $\kappa$ IV-F1-B1	Kde-R1-B1	445	M	23x V $\beta$ -F1-B2: 2, 4, 5, 6a, 6b, 6c, 7a, 8a, 9, 10, 11, 13a, 13b, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	9x J $\beta$ -R1-B2: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 2.2, 2.6, 2.7	240-280
M	Intron-F1-B2	Kde-R1-B1	511	N	23x V $\beta$ -F1-B2: 2, 4, 5, 6a, 6b, 6c, 7a, 8a, 9, 10, 11, 13a, 13b, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	4x J $\beta$ -R1-B2: 2.1, 2.3, 2.4, 2.5	240-280
N	VH1/7-F1-CLB	JH-R1-CLB	300-400	O	D $\beta$ 1-F1-B2 + D $\beta$ 2-F1-B2	13x J $\beta$ -R1-B2: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7	170-200 (D $\beta$ 1) 290-310 (D $\beta$ 2)
O	VH2-F1-CLB	JH-R1-CLB	300-400	AA	DH1-F1-EUR	JH-R1-CLB	130
P	VH3-F1-CLB	JH-R1-CLB	300-400	BB	DH2-F1-EUR	JH-R1-CLB	240
Q	VH4/6-F1-CLB	JH-R1-CLB	300-400	CC	DH3-F1-EUR	JH-R1-CLB	160
R	VH5-F1-CLB	JH-R1-CLB	300-400	DD	DH4-F1-EUR	JH-R1-CLB	180
S	23x V $\beta$ -F1-B2: 2, 4, 5, 6a, 6b, 6c, 7a, 8a, 9, 10, 11, 13a, 13b, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	9x J $\beta$ -R1-B2: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 2.2, 2.6, 2.7	240-280	EE	DH5-F1-EUR	JH-R1-CLB	300
T	23x V $\beta$ -F1-B2: 2, 4, 5, 6a, 6b, 6c, 7a, 8a, 9, 10, 11, 13a, 13b, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	4x J $\beta$ -R1-B2: 2.1, 2.3, 2.4, 2.5	240-280	FF	DH6-F1-EUR	JH-R1-CLB	200

<b>U</b>	Dβ1-F1-B2 + Dβ2-F1-B2	13x Jβ-R1-B2: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7	170-200 (Dβ1) 290-310 (Dβ2)	<b>GG</b>	DH7-F1-EUR	JH-R1-CLB	230
<b>V</b>	Vδ2-F1-B2	Jα29-R1-EUR	200-350				
<b>W</b>	Vδ2-F1-B2	12x Jα-R1-EUR: 9, 30, 48, 49, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61	200-350				
<b>AA</b>	DH1-F1-EUR	JH-R1-CLB	130				
<b>BB</b>	DH2-F1-EUR	JH-R1-CLB	240				
<b>CC</b>	DH3-F1-EUR	JH-R1-CLB	160				
<b>DD</b>	DH4-F1-EUR	JH-R1-CLB	180				
<b>EE</b>	DH5-F1-EUR	JH-R1-CLB	300				
<b>FF</b>	DH6-F1-EUR	JH-R1-CLB	200				
<b>GG</b>	DH7-F1-EUR	JH-R1-CLB	230				
<b>TT</b>	6x VK-F1-B2:1/6, 2, 3, 4, 5, 7	2x JK-R1-B2: 1- 4, 5	130				
<b>UU</b>	VL ½ -F1-B2 + VL3-F1-B2	JL1,2,3-R1-B2	240				

Fonte: VAN DER VELDEN; VAN DONGEN, 2009

#### Quadro 4.2 – Sumário dos reagentes e volumes utilizados para cada reação de PCR

Reagentes e volumes para 1 reação de PCR por tubo									
Reagentes	<i>A-R e AA-GG</i>	<i>S</i>	<i>T</i>	<i>U</i>	Reagentes	<i>V</i>	<i>W</i>	<i>TT</i>	<i>UU</i>
Perkin Elmer buffer II (10x)	5	5	5	5	Perkin Elmer buffer II (10x)	5	5	5	5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3	6	6	3	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4	4	3	3
Milli-Q H <sub>2</sub> O	33,9	16,1	18,6	27,8	Milli-Q H <sub>2</sub> O	33,2	27,7	31,3	33,8
dNTP (20mM)	0,5	0,5	0,5	0,5	dNTP (20mM)	0,5	0,5	0,5	0,5
BSA (20mg/ml)	1	1	1	1	BSA (20mg/ml)	1	1	1	1
F primer (10 pmol/ul)	0,7				F primer (20 pmol/ul)	0,5	0,5		
R primer (10 pmol/ul)	0,7				R primer (20 pmol/ul)	0,5	6		
Primermix Bt1 (23x VB + 9x JB) (20 pmol/ul, 0,5 ul cada)		16			VK-JK Primermix TT (6x VK + 2x JK) (20 pmol/ul, 0,5 ul cada)			4	
Primermix Bt2 (23x VB + 4x JB) (20 pmol/ul, 0,5 ul cada)			13,5		VL-JL Primermix UU (2xVL + 1x JL) (20 pmol/ul, 0,5 ul cada)				1,5
Primermix Bt3 (2x DB + 13x JB) (20 pmol/ul, 0,5 ul cada)				7,5					
TaqGOLD (5U/ul)	0,2	0,4	0,4	0,2	TaqGOLD (5U/ul)	0,3	0,3	0,2	0,2
DNA (10 ng/ ul)	5	5	5	5	DNA (10 ng/ ul)	5	5	5	5
Volume Final	50	50	50	50	Volume Final	50	50	50	50

Fonte: VAN DER VELDEN; VAN DONGEN, 2009

Os primers utilizados foram confeccionados de acordo com os protocolos descritos por van der Velden e van Dongen, 2009. Para cada reação foram utilizados dois controles negativos:

H<sub>2</sub>O e *no template control* (NTC) – pool de DNA de medula óssea de 20 indivíduos saudáveis.

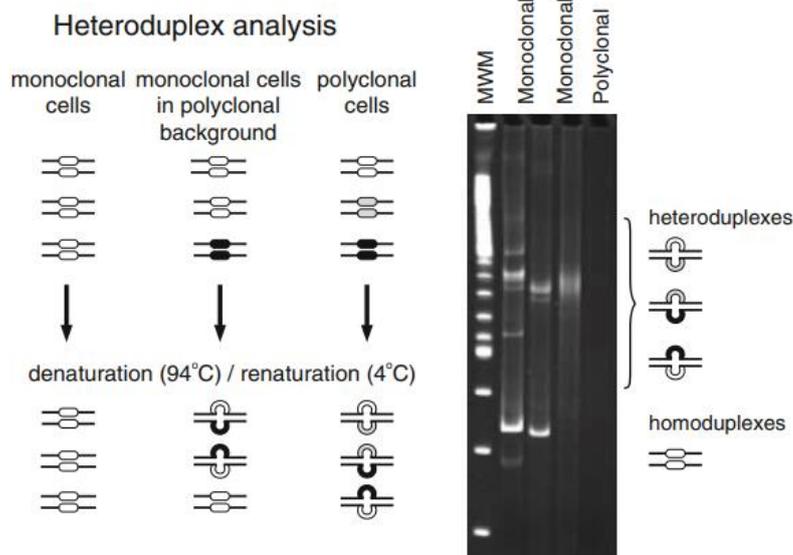
As condições de PCR foram: 95°C por 7 min; 35 ciclos de 94°C por 30 s; 60°C por 45 s; 72°C por 90 s; 72°C por 10 min; manter 15°C.

Para determinação do sucesso da amplificação, os produtos de PCR assim como dos controles negativos foram analisados em gel de agarose 1% (1,5g de agarose em 150 mL de TAE 1X) previamente corado com 10 µL de GelRed™ 10.000X (Uniscience -Biotium). Foram aplicados 4 µL da reação de PCR no gel de agarose distribuído em cuba de eletroforese horizontal e submetido a 100 V e 60 mA por 1 hora. Em seguida, foram analisados sob luz ultravioleta. No caso de não haver amplificação em nenhuma das amostras avaliadas, a PCR foi repetida.

#### 4.4.2. Análise de Heteroduplex

Após as PCR, os produtos das reações foram submetidos à análise de heteroduplex. Nessa metodologia, os produtos de PCR são desnaturados em alta temperatura e subsequentemente renaturado (baixa temperatura) para induzir formação de homo ou heteroduplex que, posteriormente, são aplicados em géis de poliacrilamida não desnaturante para que possam ser separados com base em suas conformações.

Os homoduplexes são formados a partir de produtos de PCR com regiões juncionais idênticas, perfeitamente complementares, e que correm mais rapidamente na eletroforese em gel do que os chamados heteroduplexes – oriundos de produtos de PCR com regiões juncionais heterogêneas. (LANGERAK *et al.*, 1997). Os rearranjos homoduplexes são caracterizados pela presença de uma banda única no gel após este ser revelado, correspondendo a rearranjos monoclonais. Já os rearranjos heteroduplexes, geram um aspecto de esfregaço no gel, conforme ilustrado na figura 5.1, e correspondem a rearranjos policlonais. Em alguns casos, é possível a identificação de ambos, rearranjos homoduplexes e heteroduplexes, na mesma amostra, podendo corresponder a rearranjos bi-alélicos. Por vezes, também é possível a identificação de um padrão oligoclonal, com a presença de vários heteroduplexes na mesma reação de PCR.



**Figura 5.1. Análise Heteroduplex de rearranjos nos genes de TCR/Ig.** Fonte: van der Velden e van Dongen, 2009.

Sendo assim, após as PCR, os produtos das reações foram aquecidos a 94°C por 5 min e resfriados a 4°C por 60 minutos no termociclador. Foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% dos produtos de cada uma das reações, seguida pela coloração com GelRed™ 10.000X (Uniscience -Biotium) e análise heteroduplex sob luz ultravioleta. Os rearranjos foram identificados como monoclonal (forte, fraco ou muito fraco), bi-alélico, oligoclonal ou policlonal, como critério para definição da quantidade e da origem do material que seria utilizado na etapa seguinte, a etapa de sequenciamento (VAN DER VELDEN; VAN DONGEN, 2009).

#### 4.4.3 Sequenciamento Direto

Os rearranjos cujas bandas foram consideradas monoclonais fortes no gel tiveram 1 µL retirado diretamente do tubo de PCR para ser utilizado na reação de sequenciamento; rearranjos cujas bandas monoclonais foram consideradas fracas e muito fracas no gel tiveram 2 µL e 3 µL retirados diretamente do tubo, respectivamente; no caso de rearranjos oligoclonais ou bi-alélicos, as bandas mais bem definidas foram cortadas do gel e postas em tubos separados, sendo mantidas overnight a -20°C em uma solução de 400 µL de EtOH 100% gelado + 4 µL Acetato de Sódio 3M. Em seguida, foram submetidas a precipitação por centrifugação na velocidade máxima por 15 min. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 500 µL EtOH 75% seguido por centrifugação por 2 minutos em velocidade máxima. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet foi seco em ar ambiente e ressuspensão em 10 µL de Milli-Q

H<sub>2</sub>O. Foram retirados 5 µL de cada tubo para a realização da reação de sequenciamento direto (VAN DER VELDEN; VAN DONGEN, 2009).

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se Big Dye V3., segundo as seguintes condições: 96°C por 1 min; 25 ciclos de 96°C por 10 seg, 50°C por 5 seg, 60°C por 30 min. A corrida eletroforética capilar foi realizada em aparelho 3130xl (Applied Biosystems). Os eletroferogramas foram analisados por meio dos softwares CLC Main Workbench 7.6.2 (Qiagen Bioinformatics) e BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Therapeutics). (Quadro 3)

A sequência nucleotídica dos segmentos analisados foi checada segundo informações obtidas em documentos confidenciais do Departamento de Imunologia da University Medical Center Rotterdam e em banco de dados disponíveis nos sites: *IMGT/V-Quest*, *NCBI* e *VBase/DNA PLOT*. A sequência analisada foi considerada sequência válida quando da presença de homologia de pelo menos 1/3 dos nucleotídeos entre a sequência alvo e a sequência identificada pelo site. As regiões juncionais foram identificadas em cada uma das sequências analisadas.

**Quadro 4.3 – Sumário dos reagentes e volumes utilizados para cada reação de sequenciamento direto**

Material – concentração inicial	Quantidade a ser pipetada (µl)		
	1	2	5
<b>Produto PCR (µl)</b>	1	2	5
<b>Primer 3.2 pmol (µl)</b> VgI, VgII, VgIV, Jg1.1/2.1, Jg1.3/2.3 Vd1, Vd2, Vd3, Jd1, Dd2, Dd3, Ja29, Ja's tube2 Vkl, VklI, VklII, VklIV, Intron, Kde VH1/7, VH2, VH3, VH4/6, VH5, JH DH1, DH2, DH3, DH4, DH5, DH6, DH7	1.3	1.3	1.3
<b>Primer 1 pmol (µl)</b> All Vb's Jb's tube1, Jb's tube2, All Jb's	1	1	1
Db1+Db2	0.5+0.5	0.5+0.5	0.5+0.5
<b>Primer 3.2 pmol (µl)</b> Vk, Jk, VI, JI	1	1	1
<b>H2O (µl)</b>	5.7	4.7	1.7
<b>BDT mix (µl)</b>	0.5	0.5	0.5
<b>Buffer seq (µl)</b>	1.5	1.5	1.5

Fonte: VAN DER VELDEN; VAN DONGEN, 2009

#### ***4.5. Análise Estatística***

Além da análise de frequência e mediana, utilizou-se o teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, para comparar entre si, os grupos de variáveis categóricas ou qualitativas. O teste de Fisher bi-caudal é indicado quando o tamanho de duas amostras independentes é pequeno e consiste em determinar a probabilidade exata de ocorrência de uma frequência observada. A associação será considerada estatisticamente significativa sempre que o erro alfa for menor do que 0,05 ( $p < 0,05$ ). Todas as análises e gráficos foram realizados no software SPSS (IBM, 2020).

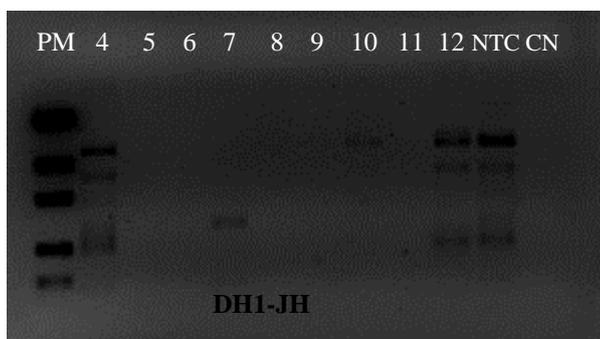
## V. Resultados

### 5.1 Estudo-Piloto

Como parte do estudo piloto para identificação de rearranjos clonais, foram realizados 26 tipos de reações de PCR diferentes por amostra estudada, cobrindo os segmentos gênicos V(D)J dos *loci IGH, IGK, IGL, TCRG, TCRD* e *TCRB*, seguidas pelas etapas de análise heteroduplex e de sequenciamento direto. Nesse estudo, foram analisadas amostras de 10 pacientes pediátricos portadores de LLA B-derivada e 3 linhagens celulares linfoides B (SUP-B15, Nalm-6 e SEM). Em 4 das amostras de pacientes, além dos 26 PCR V(D)J, outros 6 PCR diferentes foram realizados para avaliação do *locus TCRG*, totalizando 32 PCR por amostra, nestes casos.

#### 5.1.1 PCR V(D)J e eletroforese em gel de agarose a 1%

Após amplificação, os produtos das 26 PCR V(D)J dos 10 pacientes e das 3 linhagens e os produtos das 6 PCR *TCRG* dos 4 casos foram aplicados em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídeo, submetidos à eletroforese, e posterior visualização sob luz ultravioleta, como descrito anteriormente. (Figura 5.2)



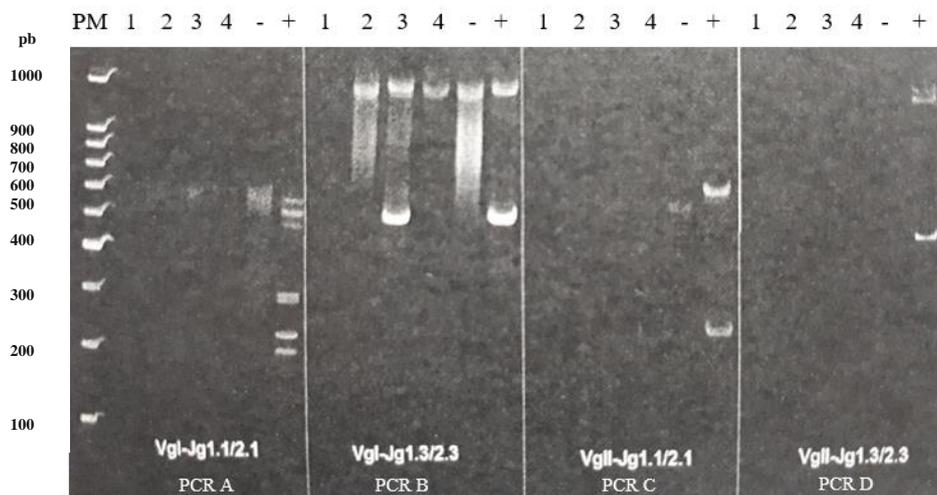
**Figura 5.2.** *Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos das PCR do Estudo-Piloto.* Representação dos produtos da PCR DH1-JH. Os números 4-9 representam as amostras dos pacientes; 10-12 representam as linhagens utilizadas (Nalm-6, SEM e SUP-B15, respectivamente); NTC: *no template control*; CN: Controle negativo; PM: Peso Molecular de 100 pares de base.

#### 5.1.2 Análise Heteroduplex

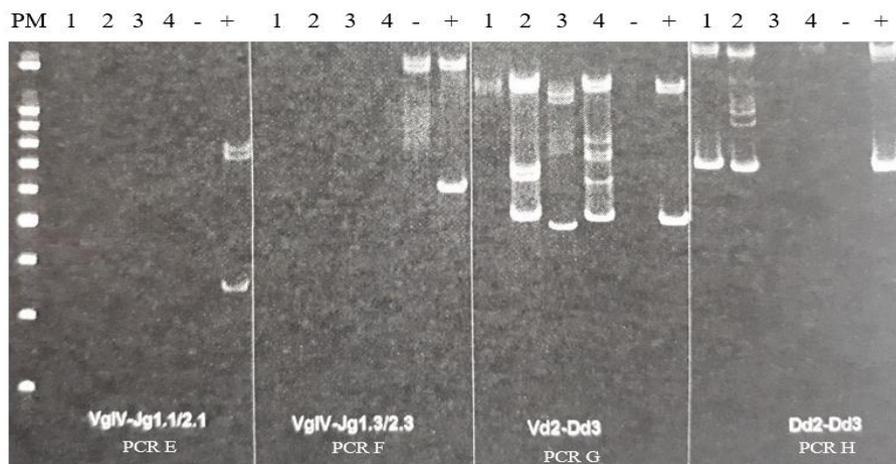
Após os produtos de PCR terem sido aquecidos e resfriados, conforme descrito na seção anterior, eles foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corados e

visualizados sob luz ultravioleta para detecção de homo e heteroduplexes. A fim de exemplificação, na figura abaixo, (Figura 5.3), estão demonstradas as 32 análises de heteroduplex realizadas para cada uma das amostras 1, 2, 3 e 4.

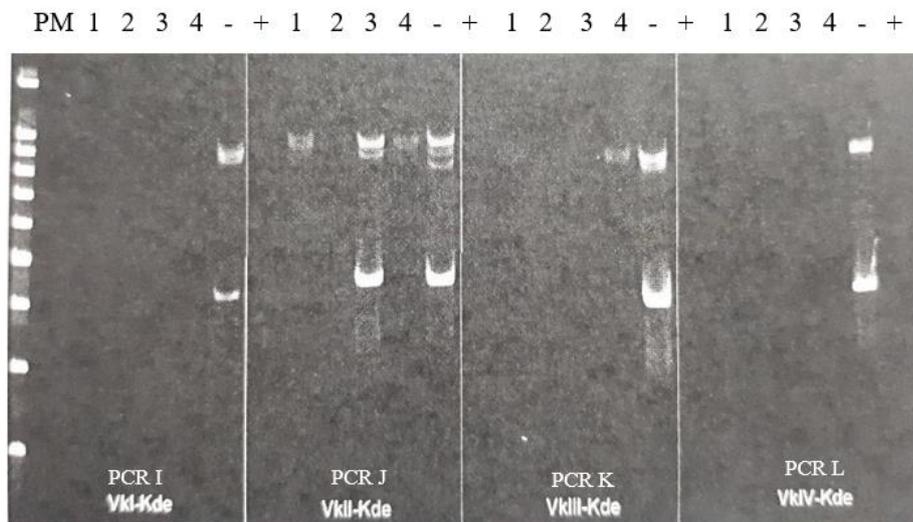
A)

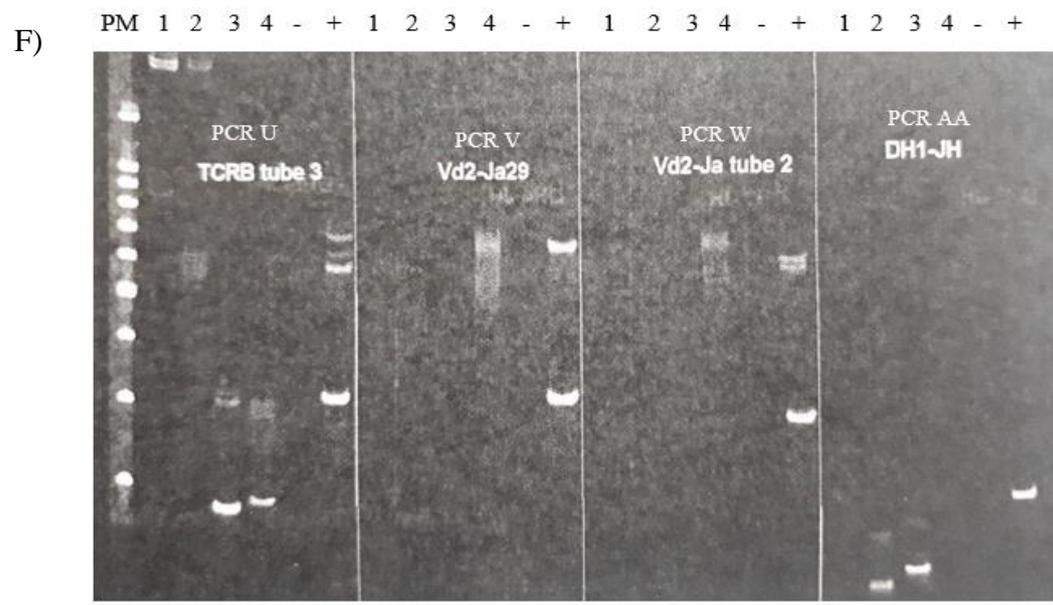
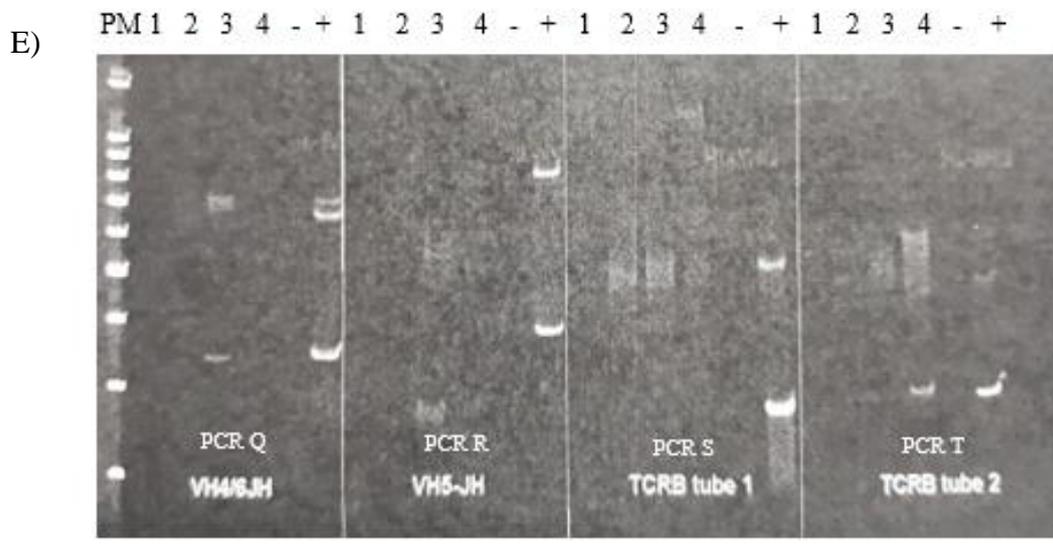
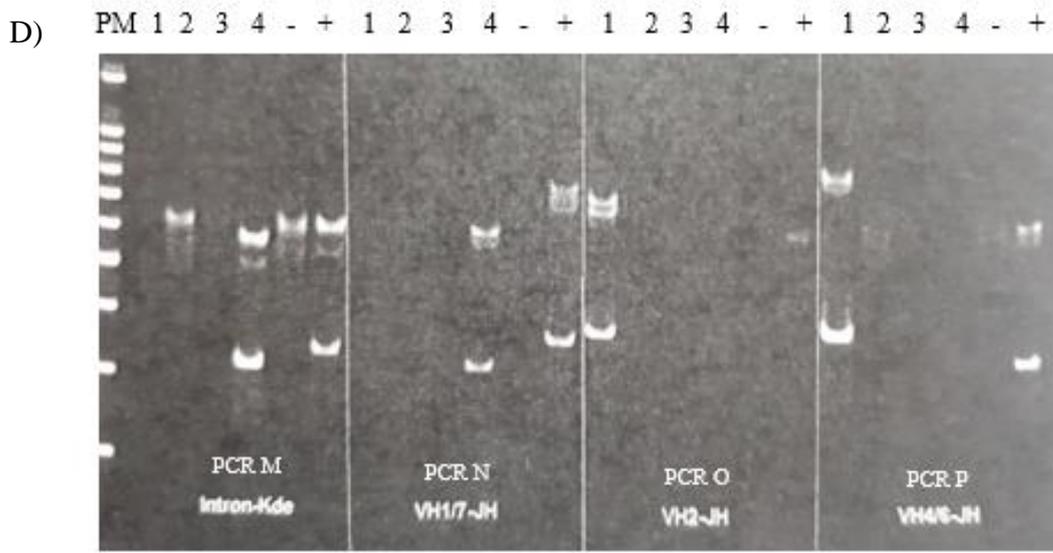


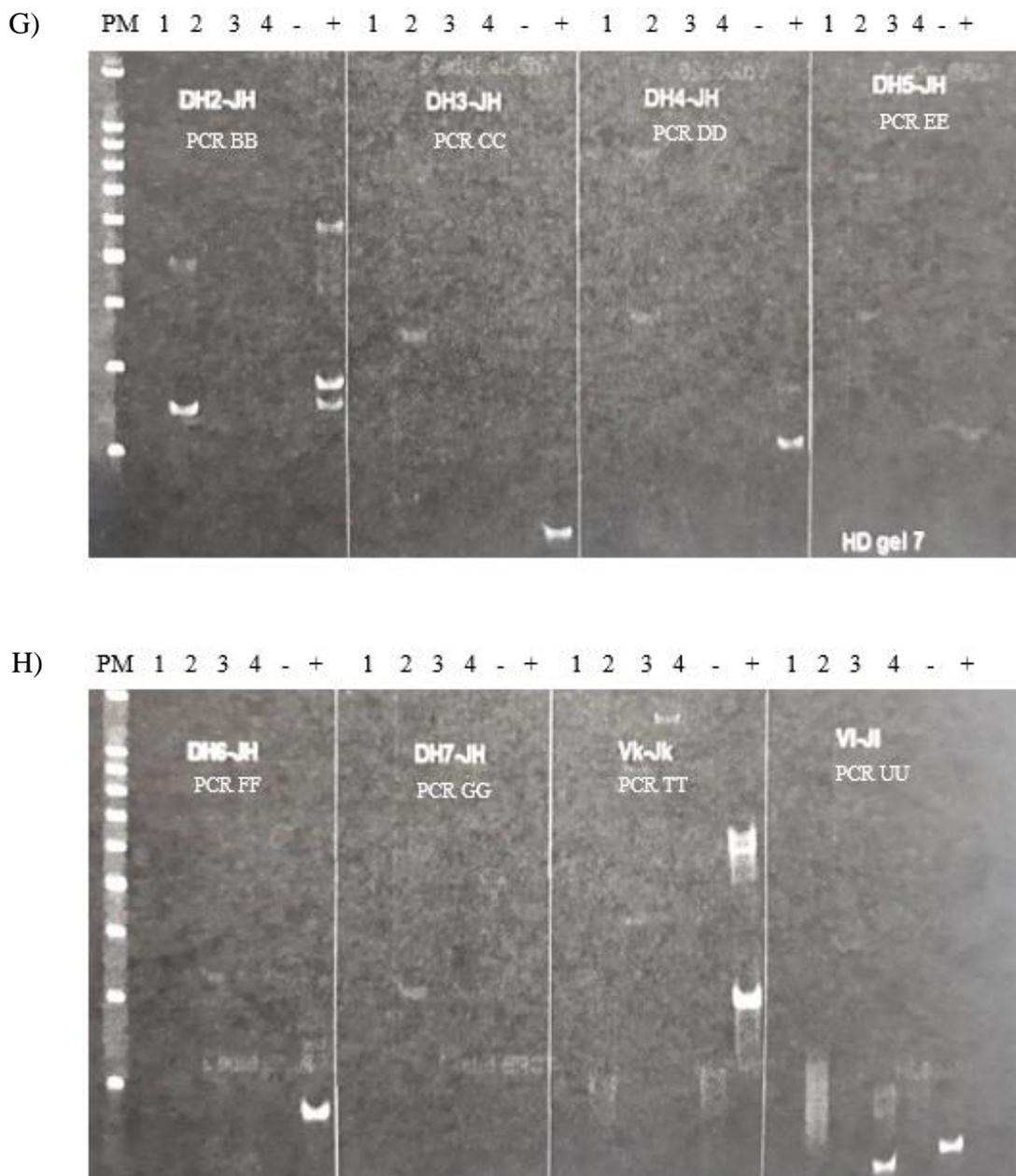
B)



C)







**Figura 5.3. Análise Heteroduplex dos rearranjos dos genes do TCR/BCR.** A-H. Na figura A, são identificados os tamanhos, em pares de base, dos fragmentos formados a partir do uso do marcador de peso molecular de 100 pb. Foi o utilizado o mesmo marcador de peso molecular em todos os experimentos. As amostras são representadas pelos números 1-4; - : controle negativo; +: controle positivo; PM: Peso Molecular; pb: pares de base.

Com base no padrão de duplexes apresentado, a amostra foi classificada como policlonal (P), oligoclonal (OL), bi-alélico (Bi) ou monoclonal (M) para cada PCR avaliado. Foram encontrados 35 rearranjos monoclonais, 12 bi-alélicos, 9 oligoclonais e 3 monoclonais em um fundo policlonal (M/P). O resultado da análise heteroduplex está sumarizado no quadro 5.1.

**Quadro 5.1 – Sumário da Análise Heteroduplex do Estudo-Piloto**

Amostras	PCR																			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
1	P	P	P	P	P	P	P	M	P	P	P	P	P	P	M	M	P	P	P	P
2	P	P	P	P	P	P	BI	OL	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
3	P	M	P	P	P	P	M	P	P	P	P	P	P	P	P	P	M	P	P	P
4	P	P	P	P	P	P	BI	P	P	M	P	P	M	M	P	P	P	P	P	M <sup>W</sup>
5	-	-	-	-	-	-	P	P	P	M/P	P	M/P	P	BI	P	P	P	M <sup>W</sup>	P	P
6	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P	P	M/P	P	P	P	P	OL	P	P	P
7	-	-	-	-	-	-	P	P	P	BI	P	OL	P	BI	P	P	OL	P	P	P
8	-	-	-	-	-	-	P	BI	P	P	P	P	P	P	P	P	OL	P	P	P
9	-	-	-	-	-	-	BI	M	P	M	P	BI	P	P	P	OL	OL	P	P	P
10	-	-	-	-	-	-	M	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
11	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P	P	M <sup>WW</sup>	BI	M	P	P	P	P	P	P
12	-	-	-	-	-	-	M <sup>WW</sup>	P	P	P	P	P	P	P	P	M	P	P	M <sup>W</sup>	P
13	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P	P	P	M <sup>WW</sup>	P	P	M	P	P	P	P

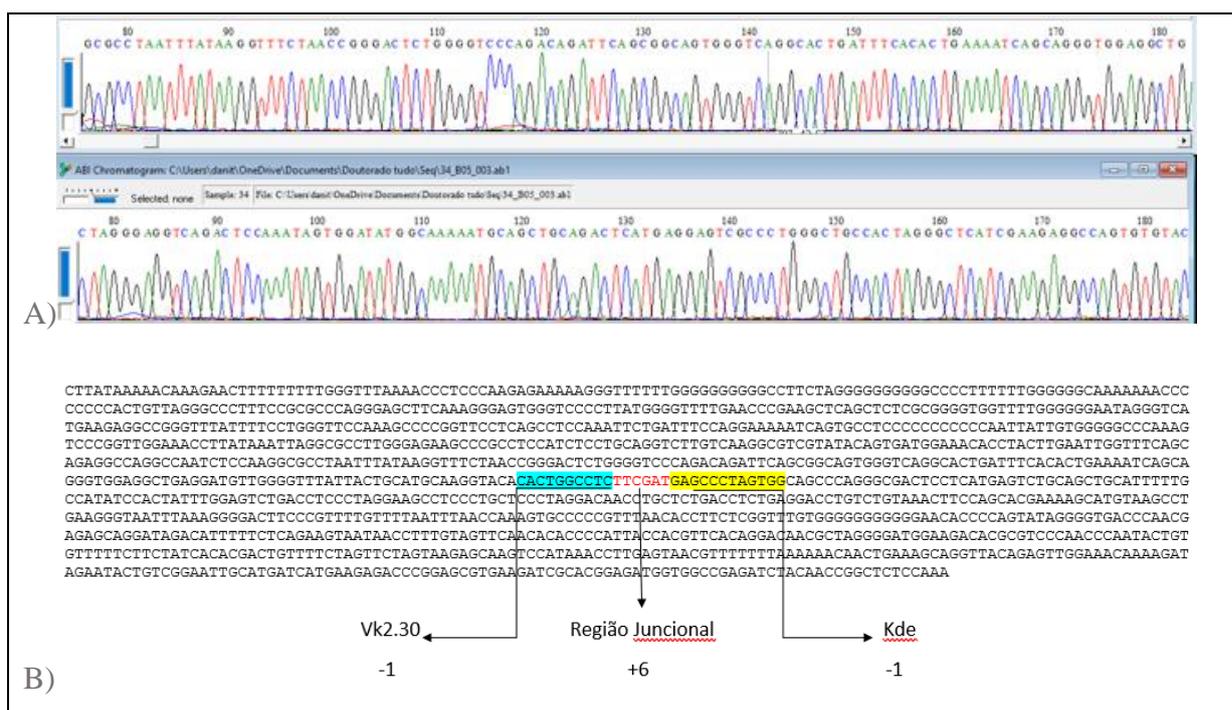
Amostras	PCR											
	U	V	W	AA	BB	CC	DD	EE	FF	GG	TT	UU
1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	P	P	P	P	M	M	P	P	P	P	P	P
3	M	P	P	M	P	P	P	P	P	P	P	P
4	M	P	M <sup>WW</sup>	P	P	P	P	P	P	P	P	M
5	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	M	P
6	P	BI	M <sup>W</sup>	P	P	P	P	P	P	P	P	P
7	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
8	M	P	P	OL	P	P	P	P	P	P	P	M <sup>WW</sup>
9	P	BI	P	M	P	P	P	P	P	P	P	P
10	P	BI	P	M	P	P	P	P	P	P	P	P
11	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
12	P	P	P	OL	P	P	P	P	P	P	P	P
13	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	M	P

P: policlonal; M: monoclonal; OL: oligoclonal; Bi: Bi-alélico; M<sup>W</sup>: mono *weak*; M<sup>WW</sup>: mono *weak weak*  
 - : não realizado. A descrição dos rearranjos investigados em cada PCR (A-U; AA-GG;TT;UU) encontra-se no quadro 4.1, pag. 52 e 53, e também na figura 5.3, pag.58

### 5.1.3 Sequenciamento Direto

A seguir, após purificação dos produtos, foram realizadas um total de 248 reações de sequenciamento (124 no sentido 3'-5' e 124 no sentido 5'-3'), sendo 140 delas com amostras originárias de bandas extraídas do gel de poliácridamida a 6% no volume de 5 µL e outras 108 provenientes diretamente do tubo de PCR, com volumes variando entre 1 µL, 2 µL e 3 µL, de acordo com a intensidade da banda monoclonal visualizada no gel, conforme descrito na seção anterior.

As reações de sequenciamento foram precipitadas e submetidas à eletroforese capilar. Os eletroferogramas foram analisados por meio dos softwares CLC Main Workbench 7.6.2 (Qiagen Bioinformatics) e BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Therapeutics). Assim, foi obtida uma sequência consenso gerada pelo alinhamento entre as sequências *forward* e *reverse*, permitindo a identificação dos segmentos V(D)J envolvidos no rearranjo e a composição das regiões juncionais (Figura 5.4).



**Figura 5.4. Análise do sequenciamento direto da amostra 5 e identificação dos segmentos V(D)J rearranjados e da região juncional.** A) Eletroferograma da sequência forward e da sequência reverse do produto do PCR J (VKII-Kde). B) Sequência consenso com a região do segmento VK2.30 identificada pela cor azul, apresentando a deleção de 1 nucleotídeo na extremidade 5', a região juncional em vermelho composta por 6 nucleotídeos e a região do segmento Kde identificada pela cor amarela, com a deleção de 1 nucleotídeo.

Os resultados que permitiram uma correta identificação do rearranjo V(D)J (24) envolvido assim como uma boa definição da região juncional (RJ) são descritos no Quadro 5.2. Para descrição da RJ foi utilizada a estrutura *a/b/c*, onde *a*= número de nucleotídeos deletados

na extremidade 5' do segmento V, D ou J imediatamente antes do início da RJ; **b**= número de nucleotídeos inseridos na RJ; **c**= número de nucleotídeos deletados na extremidade 3' do segmento V, D ou J imediatamente após o fim da RJ. O símbolo (+) foi utilizado para indicar inserção de nucleotídeos e o símbolo (-) para indicar deleção.

**Quadro 5.2 – Rearranjos V(D)J e Regiões Juncionais identificados**

Amostra	PCR	Rearranjo V(D)J identificado	Região Juncional (5'del/Ins/3'del)
1	H	Dd2 – Dd3	-2/+9/-2
1	O	VH2.26 – DH6.6 – J6b	0/+8/-5 -4/+9/-4
1	P	VH3.9 – DH2.2 – DH 3.10 – JH6b	-3/+9/-4 -6/+26/-1 -9/+5/-5
2	BB	DH2.15 – JH5b	-6/+6/-6
2	G	Vd2 – Dd3	-3/+8/-3
3	B	Vg3 – Jg1.3	0/+8/-5
3	G	Vd2 – Dd3	-24/+15/-25
3	Q	VH6.1 – JH5b	-14/+34/-13
3	AA	DH1.7 – JH5b	-10/+28/-13
3	U	Db2 – Jb2.2	-5/+2/-2
4	G	Vd2 – Dd3	0/+2/0
4	J	VK2.30 – Kde	-5/+5/-1
4	M	Intron-Kde	-2/0/-9
4	N	VH1.1 – DH4.11 – J5b	-13/+9/-8 0/+1/-3
4	T	Vb27.1 – Db2 – Jb2.3	-4/+9/0 0/+6/-6
4	U	Db2 – Jb2.3	+/+6/-6
4	UU	VL2.5 – JL1	-6/+3/-4
5	R	VH1.18 – DH6.13 – JH5b	-1/+5/-9 -1/+8/-19
6	I	VK1.6 – Kde	-3/+1/-1
7	J	VK2.30 – Kde	-1/+3/-9
8	AA	DH1.20 ou 1.7 – JH4b	-3/+12/0
9	H	Dd2 – Dd3	-2/+3/-1
9	J	VK2.30 – Kde	-1/+6/-1
10	G	Vd2 – Dd3	-6/+5/0

## 5.2 Estudo Principal

Tendo sido estabelecida a metodologia e os parâmetros para análise dos dados e identificação dos rearranjos clonais por meio do estudo-piloto, passamos então ao estudo principal envolvendo os 41 casos de leucemias imaturas – ETP-ALL, MPAL T/Mieloide e LMA M0.

### 5.2.1 Casuística

O perfil clínico dos 41 pacientes estudados (21 com diagnóstico de ETP-ALL, 8 com MPAL T/Mieloide e 12 LMA M0) está descrito nas tabelas 5.1 e 5.2. A presença de pacientes maiores do que 10 anos de idade foi mais frequente no grupo de ETP-ALL do que nas outras duas entidades clínicas ( $p=0,03$ , Teste Exato de Fisher bi-caudal) (Tabela 5.1).

**Tabela 5.1 – Distribuição dos 41 casos analisados no Estudo Principal por sexo e idade**

Variável	Subtipos Clínicos			Total	p-valor
	ETP-ALL	MPAL T/M	LMA M0		
<b>Sexo (n pacientes)</b>					
Feminino	9 (43%)	3 (37,5%)	6 (50%)	18 (44%)	0.84
Masculino	12 (57%)	5 (62,5%)	6 (50%)	23 (56%)	
<b>Idade (anos)</b>					
Mediana	11,0	8,0	12,0	11,0	0.33
Range	2,0-19,0	2,0-15,0	0,9-18,0	0,9-19,0	
<10	6 (29%)	6 (75%)	5 (42%)	17 (41,5%)	0.07
≥10	15 (71%)	2 (25%)	7 (58%)	24 (58,5%)	

Variável	Subtipos Clínicos		p-valor
	ETP-ALL	MPAL T/M	
<b>Idade (anos)</b>			
<10	6 (29%)	6 (75%)	0.03
≥10	15 (71%)	2 (25%)	

A leucometria mais alta ( $\geq 100.000/\text{mm}^3$ ) ao diagnóstico foi mais prevalente entre os pacientes com ETP-ALL do que entre os pacientes com MPAL T/Mieloide e LMA M0 ( $p=0.005$ , Teste Exato de Fisher bi-caudal) (Tabela 5.2).

**Tabela 5.2 – Distribuição dos 41 casos analisados no Estudo Principal por leucometria**

Variável	Subtipos Clínicos				p-valor
	ETP-ALL	MPAL T/M	LMA M0	Total	
<b>Leucometria</b> (x10 <sup>3</sup> /μ)					
<b>Mediana</b>	102.330	29.170	39.900	49.200	0.53
<b>Range</b>	1.000-800.000	500-640.000	2.330-93.000	500-800.000	
<b>&lt;50</b>	9 (43%)	5 (62,5%)	7 (58%)	21 (51%)	<b>0.005</b>
<b>50-100</b>	1 (5%)	1 (12,5%)	5 (42%)	7 (17%)	
<b>≥100</b>	11 (52%)	2 (25%)	0	13 (32%)	

O perfil imunofenotípico dos 41 pacientes estudados está descrito nos quadros 5.3, 5.4 e 5.5.

**Quadro 5.3 – Perfil imunofenotípico dos pacientes com ETP-ALL**

Amostra	CD1a	CD2	CD3	CD4	CD5	CD8	CD10	CD13	CD33	CD34	CD56	HLA-DR	MPO	Percentual de Blastos (%)
1	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo	positivo	NI	negativo	>25
2	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	>25
3	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	NI	NI	positivo	NI	NI	negativo	>25
4	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	>25
5	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	>25
6	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	>25
7	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	NI	NI	negativo	negativo	negativo	negativo	>25
8	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo	NI	NI	positivo	negativo	negativo	negativo	>25
9	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	>25
10	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	NI	negativo	negativo	>25
11	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	>25
12	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	NI	negativo	negativo	87
13	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	NI	NI	negativo	NI	negativo	negativo	>25
14	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	NI	negativo	negativo	70
15	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	NI	negativo	negativo	70
16	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	73
17	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	75
18	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	78
19	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	92
20	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	96
21	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	71,5

NI: não informado

**Quadro 5.4 – Perfil imunofenotípico dos pacientes com MPAL T/Mieloide**

Amostra	CD1a	mCD3	cyCD3	CD2	CD4	CD5	CD7	CD13	CD33	CD34	CD117	HLA-DR	MPO	Percentual de Blastos (%)
22	negativo	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo	66						
23	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	positivo	62
24	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	89
25	positivo	negativo	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	>20
26	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	90
27	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo	97						
28	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	66,7
29	NI	NI	positivo	positivo	NI	NI	positivo	83						

NI: não informado

**Quadro 5.5 – Perfil imunofenotípico dos pacientes com LMA M0**

Amostra	cyCD3	CD10	CD19	cyCD22	CD79	CD7	TdT	CD13	CD33	CD34	CD117	HLA-DR	Percentual de Blastos (%)
30	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	positivo	71
31	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	positivo	63						
32	negativo	negativo	negativo	positivo	NI	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	92
33	negativo	negativo	negativo	positivo	NI	positivo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	90
34	negativo	negativo	negativo	NI	negativo	positivo	NI	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	88,9
35	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo	60
36	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	89,1
37	negativo	NI	negativo	NI	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	NI	82
38	negativo	negativo	negativo	NI	positivo	positivo	NI	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	34,5
39	negativo	NI	negativo	positivo	negativo	positivo	NI	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo	92
40	negativo	negativo	negativo	NI	NI	positivo	NI	positivo	positivo	positivo	NI	positivo	>20
41	negativo	negativo	negativo	NI	NI	positivo	NI	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	>20

NI: não informado

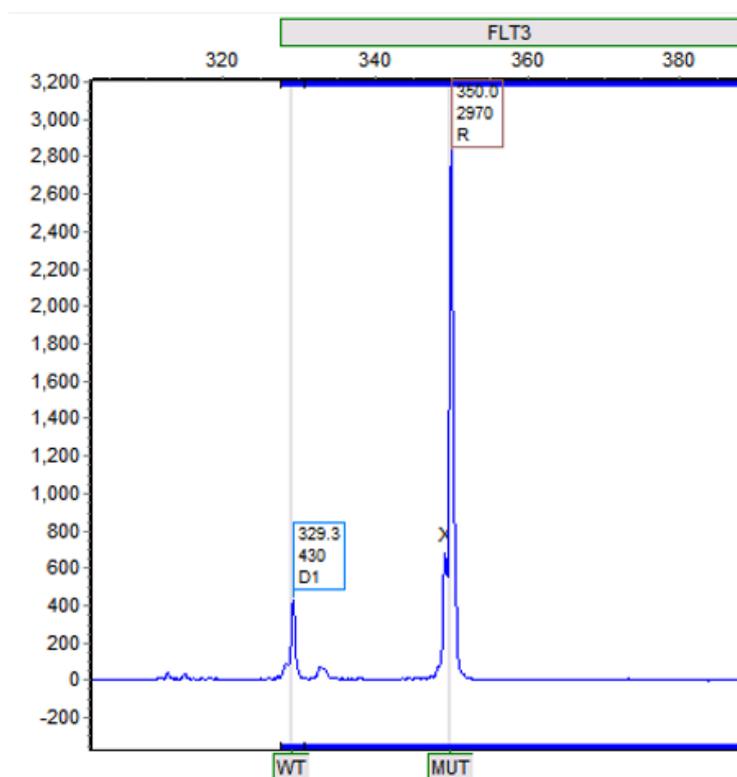
### 5.2.2 Pesquisa de *FTL3-ITD*

A pesquisa de mutações no gene *FLT3*, do tipo *ITD*, pôde ser realizada em 39 dos 41 casos analisados, sendo 21/21 casos de ETP-ALL, 8/8 de MPAL T/mieloide e 10/12 de LMA M0. Em 2 casos de LMA M0 não houve amplificação identificável (Figura 5.5).

*FLT3-ITD* foi encontrada em 17% dos casos (7/41). Na ETP-ALL, 4 de 21 amostras foram positivas para a mutação (19%); na MPAL T/mieloide foram encontrados 2 casos mutados em 8 pacientes (25%); e na LMA M0 apenas 1 paciente abrigou a mutação em 10 analisados (10%) (Quadro 5.6).

**Quadro 5.6 – Distribuição das mutações *FLT3-ITD* e carga alélica entre os pacientes com *ETP-ALL*, *MPAL T/mielóide* e *LMA M0***

<b>ETP-ALL</b> 4/21 amostras	<b>LMA M0</b> 1/10 amostras	<b>MPAL T/Mielóide</b> 1/8 amostras
Amostra	Amostra	Amostra
1	36	22
5		26
8		
19		



**Figura 5.5. Resultado da análise de fragmento para pesquisa de *FLT3-ITD* no caso 1 portador de *ETP-ALL*. WT: *wild-type* (selvagem; sem mutação); MUT: mutado.**

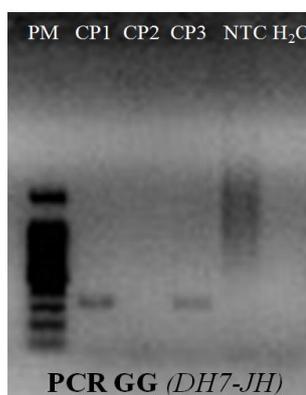
Do ponto de vista imunofenotípico, todos os pacientes (4/4) com *FLT3-ITD* da nossa coorte de *ETP-ALL* foram positivos para expressão do antígeno CD117, enquanto que apenas 53% dos pacientes negativos para a mutação apresentaram CD117. O Perfil TdT+CD7+CD13+CD34+CD117+ foi significativamente mais frequente nos pacientes com *ETP-ALL FLT3-ITD+* do que nos pacientes *ETP-ALL FLT3-ITD-* ( $p=0,005$  pelo Teste Exato de Fisher bi-caudal), com uma sensibilidade de 100% e especificidade de 93% para prever os pacientes com *ETP-ALL* com *FLT3-ITD*.

Os 2 pacientes com MPAL T/Mieloide positivos para mutação *FLT3-ITD* apresentaram os marcadores linfoides CD2, CD7 e cyCD3 e os marcadores de precursores hematopoiéticos CD34 e CD117. O único paciente com LMA M0 positivo para mutação *FLT3-ITD* não expressou o antígeno CD7, enquanto que esse antígeno linfóide pôde ser identificado em 8 dos outros 9 casos (89%) de LMA M0 com *FLT3-ITD* negativo.

### **5.2.3 Pesquisa de rearranjos V(D)J**

#### **5.2.3.1 PCR V(D)J e Eletroforese em gel de agarose a 1%**

Foram realizadas 21 reações de PCR para cada uma das 41 amostras. Os produtos dos possíveis controles positivos e dos dois controles negativos (NTC e H<sub>2</sub>O) de cada uma das 21 PCR V(D)J foram avaliados em eletroforese de gel de agarose a 1% sob luz ultravioleta, evidenciando a presença de produtos de amplificação em todas as reações – o que confirma que as mesmas foram efetivas (Figura 5.6).

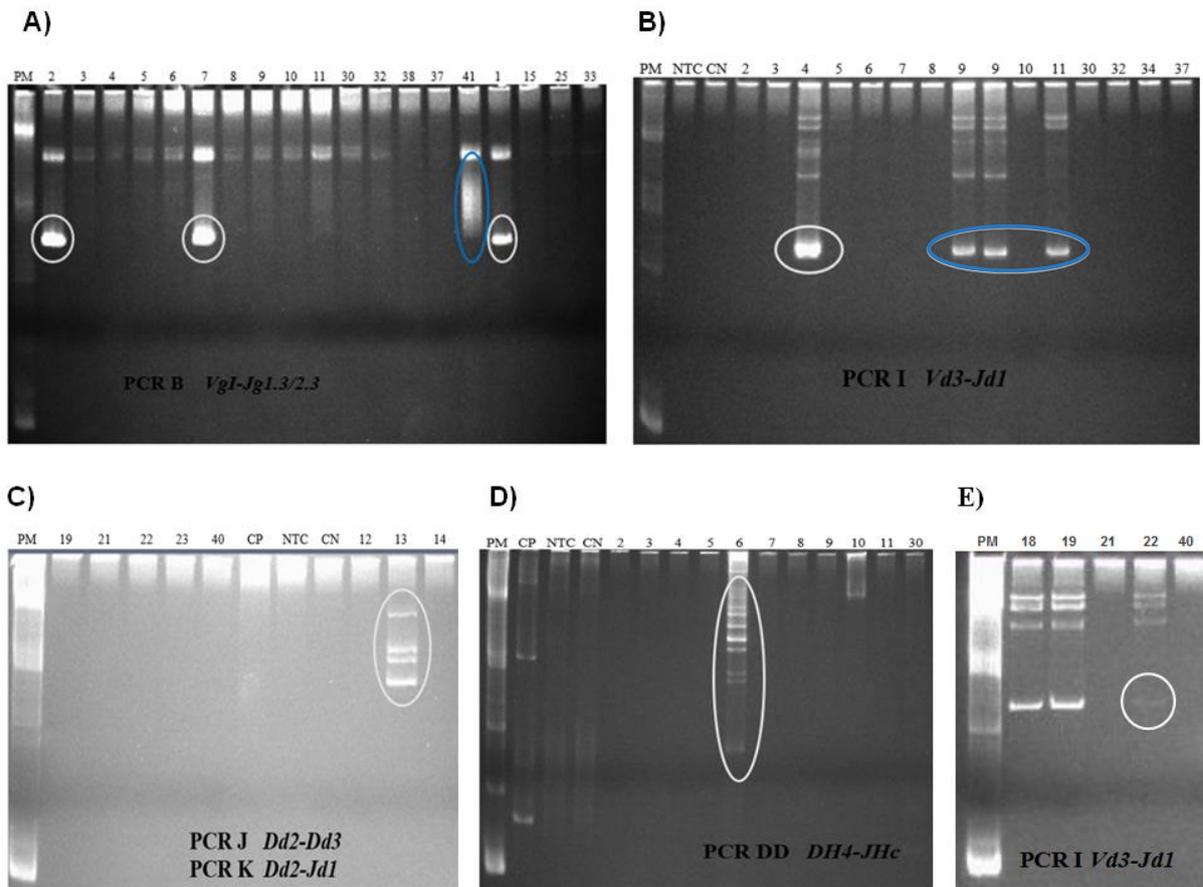


**Figura 5.6. Eletroforese em gel de agarose a 1% das PCR do Estudo-Principal.** Representação dos produtos de 3 possíveis controles positivos e dos dois controles negativos (NTC e H<sub>2</sub>O) da PCR GG (DH7-JH). Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de base. CP: controle positivo; NTC: *no template control*; PM: *Peso Molecular*

#### **5.2.3.2 Análise Heteroduplex**

Na etapa seguinte, todos os produtos de cada PCR foram submetidos a análise heteroduplex para identificação de arranjos clonais. Em 16 das 21 PCR, houve identificação de bandas monoclonais, bi-alélicas e/ou oligoclonais. O registro sob luz ultravioleta de alguns dos géis de poliacrilamida com bandas monoclonais (M), bi-alélicas (Bi), oligoclonais (OL) e

policlonais (P) são mostrados na figura 5.7. As bandas monoclonais e bi-alélicas foram subclassificadas em 3 categorias: monoclonais M, M<sup>w</sup> (*weak*=fraca) e M<sup>ww</sup> (*weak weak*=muito fraca); bi-alélica Bi, Bi<sup>w</sup> (*weak*=fraca) e Bi<sup>ww</sup> (*weak weak*=muito fraca) de acordo com a intensidade que as bandas reveladas apresentaram no gel de poliacrilamida.



**Figura 5.7. Análise heteroduplex dos rearranjos TCR/ BCR do Estudo Principal.** A) PCR B: três bandas monoclonais evidenciadas pelos círculos brancos e uma banda policlonal evidenciada pelo círculo azul; B) PCR I: banda monoclonal circulada de branco e três bandas monoclonais destacadas pelo círculo azul (M<sup>w</sup>); C) PCR K: rearranjo bi-alélico (Bi); D) rearranjo oligoclonal com múltiplas bandas (OL); E) banda monoclonal muito fraca circulada de branco (M<sup>ww</sup>). Em todos os experimentos, foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de base. CP: controle positivo; NTC: *no template control*.

Dentre as 21 PCR realizadas, a PCR I (Vd3-Jd1) revelou o maior número de rearranjos (9), sendo todos monoclonais (Figura 5.8).



**Tabela 5.3 – Distribuição dos 51 rearranjos no Estudo Principal por sexo e idade**

Rearranjo V(D)J	Subtipos Clínicos			Total
	ETP-ALL	MPAL T/M	LMA M0	
Monoclonal	41 (89%)	0	3 (100%)	44 (86%)
Monoclonal com fundo policlonal	1 (3%)	1 (50%)	0	2 (4%)
Bi-Alélico	2 (4%)	1 (50%)	0	3 (6%)
Oligoclonal	2 (4%)	0	0	2 (4%)
<b>Total de rearranjos</b>	<b>46</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>51</b>

A prevalência de rearranjos indicativos de clonalidade (monoclonal, bi-alélico e monoclonal com fundo policlonal) foi significativamente maior entre os pacientes com ETP-ALL do que nas outras entidades clínicas (Tabela 5.4).

**Tabela 5.4 – Distribuição dos 51 rearranjos no Estudo Principal por sexo e idade**

Rearranjo V(D)J	Subtipos Clínicos				p-valor
	ETP-ALL	MPAL T/M	LMA M0	Total	
Presente	15(71%)	2 (25%)	3 (25%)	20 (49%)	0.01
Ausente	6 (29%)	6 (75%)	9 (75%)	21 (51%)	
<b>Total de pacientes</b>	<b>21</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>41</b>	

#### 5.2.3.2.1 Análise Heteroduplex na ETP-ALL

A análise de heteroduplex dos produtos das PCR revelou a presença de 44 rearranjos monoclonais ou bi-alélicos em 15 pacientes com ETP-ALL (71% dos casos). Todos os 4 loci gênicos estudados – *TCRD*, *TCRG*, *TCRB* e *IGH* – apresentaram rearranjos em pelo menos um caso. Adicionalmente, foi observada a presença de 2 rearranjo oligoclonais – um na amostra 5, envolvendo o locus *IGH*, e outro na amostra 18, envolvendo o locus *TCRB*.

Sessenta e dois por cento dos pacientes com ETP-ALL apresentaram pelo menos um rearranjo envolvendo o locus *TCRD*, sendo este o locus mais comumente rearranjado. Em

seguida, observou-se rearranjos envolvendo os *loci* *TCRG* (43% dos pacientes), *IGH* (28%) e *TCRB* (24%), como descrito no quadro 5.7.

**Quadro 5.7 – Distribuição dos rearranjos monoclonais e bi-alélicos na ETP-ALL**

<i>Locus</i> rearranjado	<i>n</i> de pacientes (%)
<b><i>TCRD</i></b>	13 (62%)
<b><i>TCRG</i></b>	9 (43%)
<b><i>TCRB</i></b>	5 (24%)
<b><i>IGH</i></b>	6 (29%)

Na nossa coorte de ETP-ALL, 67% (10/15) dos pacientes com rearranjos apresentaram mais de um rearranjo monoclonal e/ou bi-alélico, sendo que em 4 deles (27%) foi possível a identificação de 5 ou mais rearranjos (Quadro 5.8).

**Quadro 5.8 – Número de rearranjos monoclonais ou bi-alélicos por paciente na ETP-ALL**

<i>n</i> rearranjos/ paciente	<i>n</i> de pacientes	Pacientes	<i>Locus</i> rearranjado
<b>1</b>	5	1,6,10,12,13	<i>TCRGD, TCRG</i>
<b>2</b>	3	5,15,16	<i>TCRD, IGH</i>
<b>3</b>	2	3,18	<i>TCRD, TCRG, TCRB</i>
<b>4</b>	1	7	<i>TCRD, TCRG, TCRB</i>
<b>≥5</b>	4	8,9,11,17	<i>TCRD, TCRG, TCRB, IGH</i>

Dos 44 rearranjos monoclonais ou bi-alélicos identificados na análise de heteroduplex, 20 (45%) ocorreram no *locus* *TCRD*. O *locus* *TCRD* foi novamente seguido, em ordem decrescente de frequência de rearranjos, pelos *loci* *TCRG*, *IGH* e *TCRB* (Quadro 5.9). Todos os 6 pacientes que apresentaram rearranjos no *locus* *IGH* também tinham rearranjos no *locus* *TCRD*. Quarenta e seis por cento (6/13) dos pacientes com *TCRD* rearranjado também apresentaram rearranjos *IGH*.

**Quadro 5.9 – Distribuição dos rearranjos monoclonais ou bi-alélicos na ETP-ALL de acordo com o *locus* rearranjado**

<i>Locus</i> rearranjado	<i>n</i> de rearranjos monoclonais ou bi-alélicos (%)
<b><i>TCRD</i></b>	20 (45%)
<b><i>TCRG</i></b>	11 (25%)
<b><i>TCRB</i></b>	6 (14%)
<b><i>IGH</i></b>	7 (16%)
<b>Total de rearranjos</b>	<b>44</b>

#### 5.2.3.2.2 Análise de Heteroduplex na MPAL T/mieloide

Dentre os 8 pacientes com MPAL T/mieloide, 2 (25%) apresentaram rearranjos: o paciente 23 apresentou um rearranjo bi-alélico no *locus TCRG* e o paciente 28 apresentou um rearranjo monoclonal em um fundo policlonal no *locus IGH*.

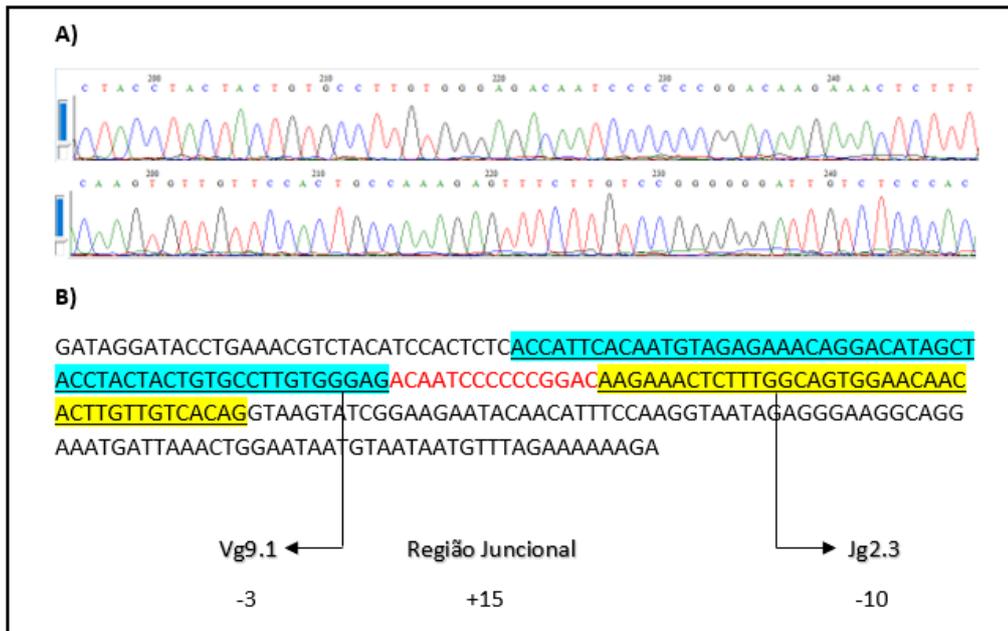
#### 5.2.3.2.3 Análise Heteroduplex na LMA M0

A prevalência de rearranjos nas LMA M0 foi de 12,5% (3/12). Todos os 3 pacientes com rearranjos identificados apresentaram rearranjos do tipo monoclonal. Esses rearranjos envolveram o *locus IGH* em um paciente e, em 2 pacientes, o *locus* rearranjado foi o *TCRB*. Nenhum dos 3 pacientes apresentou mais de 1 rearranjo identificado.

#### 5.2.3.3 Sequenciamento Direto das amostras com rearranjos V(D)J

Os 49 rearranjos V(D)J identificados pela análise de heteroduplex foram avaliados por sequenciamento direto. Foram realizadas 82 reações de sequenciamento (41 no sentido 3'-5' e 41 no sentido 5'-3'), utilizando os produtos retirados diretamente de cada tudo de PCR, com volumes variando entre 1 µL, 2 µL e 3 µL, de acordo com a intensidade da banda clonal visualizada no gel, conforme descrito na seção de *Materiais e Métodos*.

Os eletroferogramas foram analisados por meio dos softwares CLC Main Workbench 7.6.2 (Qiagen Bioinformatics) e BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Therapeutics). Foi obtida uma sequência consenso gerada pelo alinhamento entre as sequências *forward* e *reverse*, permitindo a identificação dos segmentos V(D)J envolvidos no rearranjo e a composição das regiões juncionais (Figura 5.9). Nos casos em que não foi possível a geração de uma sequência consenso, os segmentos e a região Juncional entre eles envolvidos no rearranjo foram identificados pela sequência *forward* e/ou *reverse* isoladamente.



**Figura 5.9. Análise do sequenciamento direto da amostra 7 no PCR C.** A) Eletroferograma da sequência forward e da sequência reverse do produto da PCR C (Vg9.1-Jg2.3). B) Sequência consenso com a região do segmento Vg9.1 identificada pela cor azul, apresentando a deleção de 3 nucleotídeos na extremidade 5', a região juncional em vermelho composta por 15 nucleotídeos e a região do segmento Jg2.3 identificada pela cor amarela, com a deleção de 10 nucleotídeos.

#### 5.2.3.3.1 Sequenciamento Direto das amostras de ETP-ALL com rearranjos

Dos 44 rearranjos monoclonais ou bi-alélicos demonstrados pela análise de heteroduplex, o sequenciamento direto permitiu a identificação dos segmentos gênicos envolvidos e das regiões juncionais em 39 rearranjos. Cinco rearranjos não conseguiram ser adequadamente sequenciados.

No quadro 5.10, encontra-se a descrição dos segmentos V(D)J e da região juncional (RJ) de cada um dos rearranjos monoclonais e bi-alélicos analisados. A estrutura **a/b/c** – onde **a**= número de nucleotídeos deletados na extremidade 5' do segmento V, D ou J imediatamente antes do início da RJ; **b**= número de nucleotídeos inseridos na RJ; **c**= número de nucleotídeos deletados na extremidade 3' do segmento V, D ou J imediatamente após o fim da RJ – foi utilizada para descrição da RJ. O símbolo (+) foi utilizado para indicar inserção de nucleotídeos e o símbolo (-) para indicar deleção.

**Quadro 5.10 – Rearranjos monoclonais e bi-aliélicos e Regiões Juncionais identificados na ETP-ALL**

Amostra	Gel	Locus rearranjado	Rearranjo V(D)J identificado	Região Juncional (5'del/Ins/3'del)
1	M	TCRG	VG9.1-JG2.3	-8/+5/-8
3	M <sup>w</sup>	TCRG	VG10.1-JG2.3	-8/+5/-12
3	M	TCRD	VD3.1-DD3.1-JD1.1	-2/+21/-2 -5/+8/-3
3	M <sup>w</sup>	TCRB	VB12.3.1-DB1-JB1.4.1	-3/+5/-3 -3/+5/-8
5	M <sup>w</sup>	TCRD	VD1.1-DD2.1-JD1.1	-1/+6/-2 0/+17/-3
5	M <sup>w</sup>	TCRD	VD2.3-DD3-JD1	0/+1/-2 -4/+16/-11
6	M	TCRG	VG9.1-JG2.3	-3/+15/-10
7	M	TCRG	VG11-JG2.3	-4/+12/-3
7	M <sup>w</sup>	TCRD	VD1-DD3-JD1	0/+9/-2 0/0/-1
7	M	TCRB	VB5.3.1-DB1.1-JB1.2.1	-4/2/-3 -2/-5/-2
7	M <sup>w</sup>	TCRB	DB2-JB2.3	-5/+6/-8
8	M	TCRG	VG10.1-JG2.3	-8/+9/-10
8	M <sup>w</sup>	TCRG	VG11.1-JG2.3	-3/+8/-4
8	M	IGH	DH1.26-JH4B	-4/+3/-9
8	M/P	TCRD	VD2.1-DD3	0/+1/-3
8	M <sup>w</sup>	IGH	DH7.27-JH3B	-1/+6/-4
8	M <sup>w</sup>	TCRD	VD3.2-DD2.1-JD1.1	-3 /+13/0 -3/+9/0
8	M <sup>wu</sup>	TCRB	VB15.2-DB1.1-DB2.1-JB1.4.1	-61 /+60/0 -2/+28/-2 -8/+86/-2
9	M	TCRG	VG10.1-JG1.3	-8/+15/-11
9	M	TCRD	VD1-DD2-JD1	0/+5/-1 -3/+10/0
9	Bi <sup>ww</sup>	IGH	IGHD6.13-JH4B IGHD6.19-JH6B	-6/+2/-6 0/+6/-6
9	M	TCRD	DD2-JD1	-1/+26/-6
9	M <sup>w</sup>	TCRB	-	-
10	M <sup>w</sup>	TCRD	VD3.2-DD3.1-JD1.1	-4/+9/-1 -1/+1/0
11	M <sup>w</sup>	TCRG	VG3.1-JG1.3	-1/+1/-2
11	M	TCRD	VD1.1-DD3.1-JD1.1	0/+11/-1 -5 /+6/-1
11	M	TCRD	VD2.2-DD3	0/+23/0
11	M <sup>w</sup>	TCRD	VD3.2-DD3.1-JD1.1	-5/+13/-1 -3/+12/-1
11	M <sup>w</sup>	TCRB	VB5.6.1-DB2.2-DB1-JB2.3.2	-1/+18/-3 -1/+10/-5 0 /0/-3
11	M <sup>w</sup>	IGH	-	-
12	Bi	TCRD	DD2-DD3-JD1 DD2-DD3-JD1	-2/0/-1 -1/+6/0 -3/+3/0 -3/+8/-1
13	M <sup>ww</sup>	TCRD	VD3.1-DD2.1-JD1.1	-2/6/-2 -3/13/-6
15	M <sup>ww</sup>	IGH	DH7.27-JH3B	0/+11/-1
15	M <sup>w</sup>	TCRD	-	-
16	M <sup>w</sup>	TCRD	VD3.1-DD2.1-JD1.1	0/+5/-1 -6/+14/-11
16	M	IGH	-	-
17	M	TCRG	VG5-JG1.3	0/+7/0
17	M <sup>w</sup>	TCRG	VG10.1ou10.2-JG1.3	-8/22/0
17	M <sup>w</sup>	TCRD	VD1-DD2-DD3-JD1	-5/+4/0 0/+5/-4 -3/+22/0
17	M <sup>w</sup>	TCRD	VD3.2-DD1.1-DD3.1-JD1.1	-8/+23/-4 0/+2/-5 -2/0/0
17	M <sup>ww</sup>	IGH	-	-
18	M <sup>w</sup>	TCRG	VG4.1-JG1.3	-6/9/-4
18	M	TCRD	VD1-DD2-JD1	-5/+18/-2 0/+11/0
18	M <sup>ww</sup>	TCRD	VD3.1-DD1.2-DD3.1-JD1.1	-4/+5/-4 0/+5/0 -2/+7/-11

Pela análise de Heteroduplex, foi possível a identificação de 2 rearranjos oligoclonais. Os produtos desses rearranjos foram reaplicados no gel de poliácridamida e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta foram extraídas e sequenciadas separadamente. Conseguimos identificar

pelo menos um dos rearranjos – seus segmentos gênicos e suas regiões juncionais – de cada rearranjo oligoclonal (Quadro 5.11).

**Quadro 5.11 – Rearranjos oligoclonais identificados na ETP-ALL**

Amostra	Gel	Locus rearranjado	Rearranjo V(D)J identificado	Região Juncional (5'del/Ins/3'del)
5	OL	<i>IGH</i>	IGHD4.4-JH5b	-2/+8/-8
18	OL	<i>TCRB</i>	DB1-JB1.1	-1/+3/0

Como já foi descrito na seção anterior sobre os resultados das análises de heterodúplexes, houve um predomínio de rearranjos envolvendo o *locus TCRD*. Os rearranjos completos *TCRD* ocorreram em mais da metade dos pacientes com ETP-ALL (52%). O rearranjo no *locus TCRG* foi o segundo mais comum, ocorrendo em 9 dos 21 pacientes analisados (43%) (Quadro 5.12).

**Quadro 5.12 – Distribuição dos rearranjos monoclonais ou bi-aliélicos completos e incompletos na ETP-ALL**

Locus rearranjado	Tipo de rearranjo	n de rearranjos	n de pacientes (%)
<b><i>TCRD</i></b>	Completo	15	11 (52%)
	Incompleto	4	4 (19%)
	NI	1	1 (5%)
<b><i>TCRB</i></b>	Completo	4	4 (19%)
	Incompleto	1	4 (19%)
	NI	1	1 (5%)
<b><i>TCRG</i></b>	Completo	11	9 (43%)
	NI	0	0
<b><i>IGH</i></b>	Incompleto	4	4 (19%)
	NI	3	3 (14%)
<b>Total</b>		44 rearranjos	21 pacientes

A identificação dos segmentos gênicos rearranjados e da região juncional foi possível em 39 de 44 rearranjos (89%). O segmento mais utilizado nos rearranjos em geral foi o Jd1, seguido pelos segmentos Dd3, Dd2 e Vd3 – todos integrantes do *locus TCRD*. No *locus TCRG*, o segmento mais rearranjado foi Jg2.3, seguido pelo Vg10. Os segmentos Vb rearranjados foram os mais próximos à porção 5' (*upstream*) do *TCRB*. Também foi possível observar um leve predomínio do segmento Db1 e dos segmentos da família Jb1 nos rearranjos envolvendo

o locus *TCRB*. No locus *IGH*, os segmentos *DH7.27*, *JH3b* e *JH4b* foram os mais utilizados (Quadro 5.13).

**Quadro 5.13 – Segmentos gênicos rearranjados por locus de TCR e IGH na ETP-ALL**

<b>TCRG</b>		<b>TCRD</b>		<b>TCRB</b>		<b>IGH</b>	
<b>Segmento</b>	<b>n</b>	<b>Segmento</b>	<b>n</b>	<b>Segmento</b>	<b>n</b>	<b>Segmento</b>	<b>N</b>
<i>Vg9</i>	2	<i>Vd1</i>	6	<i>Vb5</i>	2	<i>DH1.26</i>	1
<i>Vg10</i>	4	<i>Vd2</i>	3	<i>Vb12</i>	1	<i>DH6.13</i>	1
<i>Vg11</i>	2	<i>Vd3</i>	8	<i>Vb15</i>	1	<i>DH6.19</i>	1
<i>Vg3</i>	1	<i>Dd1</i>	2	<i>Db1</i>	4	<i>DH7.27</i>	2
<i>Vg4</i>	1	<i>Dd2</i>	9	<i>Db2</i>	3	<i>JH3b</i>	2
<i>Vg5</i>	1	<i>Dd3</i>	12	<i>Jb1.2</i>	1	<i>JH4b</i>	2
<i>Jg1.3</i>	5	<i>Jd1</i>	17	<i>Jb1.4</i>	2	<i>JH6b</i>	1
<i>Jg2.3</i>	6			<i>Jb2.3</i>	2		

A distribuição dos rearranjos V(D)J foi semelhante entre os pacientes com ETP-ALL positivos e negativos para mutação *FLT3-ITD* (75% vs 70%, respectivamente). Da mesma forma, também não foram encontradas diferenças imunofenóticas significativas entre os pacientes com ETP-ALL com e sem rearranjo V(D)J identificável.

#### 5.2.3.3.2 Sequenciamento Direto das amostras de MPAL T/Mieloide com rearranjos

A análise do sequenciamento direto dos 2 rearranjos encontrados em 2 pacientes com MPAL T/Mieloide permitiu a identificação apenas do rearranjo *IGH*, envolvendo os segmentos *DH1.26* e *JH4b*. Esse rearranjo não foi acompanhado de rearranjo no *TCRD*. Não foi possível identificar por sequenciamento os segmentos envolvidos no rearranjo que ocorreu no *TCRG*. Cada um dos 2 pacientes apresentou apenas 1 rearranjo e os 2 pacientes foram negativos para mutação *FLT3-ITD* (Quadro 5.14).

**Quadro 5.14 – Segmentos gênicos rearranjados por locus de TCR e BCR na MPAL T/Mieloide**

Amostra	Gel	Locus rearranjado	Rearranjo V(D)J identificado	Região Juncional (5'del/Ins/3'del)
23	Bi	<i>TCRG</i>	-	-
28	M/P	<i>IGH</i>	DH1.26-JH4b	0/+5/-11

5.2.3.3.3 Sequenciamento Direto das amostras de LMA M0 com rearranjos

Entre os pacientes com LMA M0, foram identificados 3 rearranjos monoclonais em 3 pacientes diferentes (25% dos casos) – um rearranjo no locus *IGH* e 2 no locus *TCRB*. A identificação dos segmentos gênicos rearranjados e da região juncional foi possível apenas no rearranjo que envolveu o locus *IGH*. Esse rearranjo também não foi acompanhado de rearranjo no locus *TCRD*, assim como na MPAL T/Mieloide. O segmento JH utilizado, *JH4b*, foi o mesmo utilizado no único rearranjo *IGH* encontrado na MPAL T/mieloide (Quadro 5.15).

**Quadro 5.15 – Segmentos gênicos rearranjados por locus de TCR e IGH na LMA M0**

Amostra	Gel	Locus rearranjado	Rearranjo V(D)J identificado	Região Juncional (5'del/Ins/3'del)
30	M	<i>IGH</i>	DH2.2-JH4b	-7/0/-6
32	M	<i>TCRB</i>	-	-
34	M	<i>TCRB</i>	-	-

Todos os 3 pacientes com LMA M0 e rearranjos nos genes de TCR/BCR expressaram o marcador de diferenciação linfoblástica T – CD7 e, 2 desses pacientes, também expressaram TdT. O único paciente com LMA M0 que apresentou *FLT3-ITD* não apresentou rearranjo V(D)J identificável e também não expressou o antígeno linfóide CD7.

## VI. Discussão

Nesse trabalho, buscamos avaliar do ponto de vista molecular, os rearranjos de TCR e de BCR presentes em amostras de pacientes com leucemias imaturas – ETP-ALL, MPAL T/Mieloide e LMA M0 – principalmente, a fim de avançar no conhecimento da biologia dessas neoplasias. A identificação e a descrição molecular desses rearranjos podem contribuir para o melhor entendimento da origem mieloide e/ou linfóide dessas doenças, assim como ajudar a compreender o perfil de imaturidade que essas entidades clínicas apresentam imunofenotipicamente. Adicionalmente, investigamos a presença de mutações do tipo *FLT3-ITD* – mutações classicamente identificadas em leucemias mielóides, mas que também parecem ocorrer em uma significativa frequência dos casos de ETP-ALL. Apesar da nossa coorte ser pequena, a mesma torna-se relevante por se tratar de doenças raras e por existirem pouquíssimos dados disponíveis na literatura sobre o tema.

A prevalência de mutações do tipo *FLT3-ITD* entre nossos pacientes com ETP-ALL foi de 19% – próximo aos 22% encontrados por Neumann e col e, ao mesmo tempo, distante dos 44% descritos por Liu e col. (NEUMANN *et al.*, 2013a; LIU *et al.*, 2017). Na primeira coorte descrita (Neumann e col.) foram encontrados 15 pacientes com *FLT3-ITD* em 68 pacientes com ETP-ALL, enquanto na segunda coorte (Liu e col.) foram encontrados 4 casos positivos para a mutação em 9 pacientes – um *n* menor do que os 21 pacientes com ETP-ALL investigados na nossa coorte. Interessantemente, a frequência de mutações *FLT3-ITD* na nossa coorte de ETP-ALL revelou-se bem acima dos 1-3% descritos nos casos de LLA de precursores T mais maduros (VAN DONGEN *et al.*, 1991; VAN DER VELDEN *et al.*, 2009).

Em todos os pacientes com *FLT3-ITD* da nossa coorte de ETP-ALL foi encontrada a expressão do antígeno CD117 (4/4), enquanto que apenas 53% dos pacientes negativos para a mutação *FLT3-ITD* apresentaram CD117, semelhantemente ao descrito na literatura. Da mesma forma, o perfil imunofenotípico TdT+CD7+CD13+CD34+CD117+, previamente descrito por Neumann e col. com 75% de sensibilidade e 93% de especificidade para detecção de pacientes com ETP-ALL *FLT3-ITD*+, também foi capaz de prever na nossa coorte os pacientes com ETP-ALL positivos para *FLT3-ITD*, com uma sensibilidade de 100% e especificidade de 93% (NEUMANN *et al.*, 2013a).

Já a prevalência de mutação do tipo *FLT3-ITD* entre os pacientes com MPAL T/mieloide (25%) foi menor do que a descrita na literatura (40% e 47%) (HOEHN *et al.*, 2012; ALEXANDER *et al.*, 2018). Essas diferenças talvez possam ser justificadas pelo pequeno

número de pacientes nas duas coortes anteriormente citadas (6 pacientes positivos em 7 pacientes investigados e 16 pacientes positivos em 34 pacientes investigados, respectivamente) e também pela aparente heterogeneidade da MPAL T/Mieloide, visto que seu componente mielóide pode apresentar padrões de diferenciação distintos, encontrando-se mais próximo de uma diferenciação neutrofílica, monocítica ou dendrítica, por exemplo. Além disso, nosso estudo limitou-se a pacientes de 0 a 21 anos de idade, enquanto na coorte descrita por Hohen e col. não parece ter havido limite de faixa etária. Por último, a existência de possíveis diferenças étnicas também podem ter impactado os resultados.

Nas LMA com diferenciação mínima, encontramos a mutação do tipo *FLT3-ITD* em 10% dos pacientes (1/10) – valor próximo ao relatado por Zwann e col. (11%) com 1 paciente positivo para mutação em 9 investigados e por Thiede e col (12%) que encontrou 8 pacientes positivos em 68 investigados (ZWANN *et al.*, 2003; THIEDE *et al.*, 2002). Na nossa coorte, o caso que abrigou a mutação *FLT3-ITD* não apresentou rearranjo nos genes dos TCR/BCR, enquanto que os 3 casos de LMA M0 que apresentaram rearranjo identificado foram negativos para a mutação *FLT3-ITD*. Interessantemente, esse único caso que foi positivo para mutação *FLT3-ITD* também não expressou o antígeno CD7. Esse antígeno linfóide foi encontrado em 8 dos outros 9 casos de LMA M0 negativos para *FLT3-ITD* (89%). Esses achados poderiam indicar uma maior proximidade com a diferenciação mielóide do caso *FLT3-ITD* positivo do que dos casos em que não foi encontrada a mutação.

Em relação aos rearranjos envolvendo os genes dos TCR/BCR, encontramos 71% de rearranjos entre os pacientes com ETP-ALL – resultado, este, abaixo dos 90-95% descritos nos casos de LLA de precursores T mais maduros (VAN DER VELDEN *et al.*, 2009). Além disso, a caracterização molecular dos rearranjos gênicos nos 21 casos de ETP-ALL realizada no nosso trabalho revelou padrões de recombinação diferentes dos que têm sido relatados em séries de LLA-T.

No nosso estudo, a maior parte dos pacientes apresentou rearranjo envolvendo o *locus TCRD* (62%), seguido pelos pacientes com rearranjos nos *loci TCRG* (43%), *IGH* (28%) e *TCRB* (24%). Esse resultado difere do que tem sido descrito na LLA-T, onde 95% dos pacientes apresentam rearranjos envolvendo o *locus TCRG*, 90% envolvendo o *locus TCRB* e 50-55%, o *TCRD* (VAN DER VELDEN *et al.*, 2009). Apesar dos poucos dados disponíveis na literatura, a frequência de rearranjos envolvendo o *locus TCRG* na nossa coorte de ETP-ALL (43%) assemelha-se aos 41% relatados por Neumann e col. (NEUMANN *et al.*, 2013a). Interessantemente, a distribuição percentual dos rearranjos de TCR que encontramos entre os pacientes da nossa coorte de ETP-ALL é semelhante à encontrada na LLA de precursores B –

*TCRD* (89%), *TCRG* (59%) e *TCRB* (35%). Além disso, embora alguns autores acreditem que o rearranjo dos *loci* gênicos dos TCR ocorra praticamente simultaneamente durante o desenvolvimento inicial da célula T, alguns outros acreditam que exista uma ordem hierárquica de recombinação, na qual o primeiro a ser rearranjado é o *locus TCRD*, para então ocorrer rearranjos nos *loci TCRG* e *TCRB* – uma sequência cronológica de recombinação gênica que também seria análoga à distribuição percentual dos rearranjos TCR encontrada na nossa população de ETP-ALL (SZCZEPANSKI *et al.*, 1999; VAN DER VELDEN *et al.*, 2009).

O estudo dos rearranjos no *locus TCRB* das ETP-ALL também evidenciou diferenças em relação aos rearranjos descritos na LLA-T. Observamos o uso de segmentos Vb mais próximos à porção 5' do gene (*upstream*) – *TCRVB5.1*, *TCRVB5.3*, *TCRVB12.3* e *TCRVB15.2* – quando na LLA-T parece haver o uso preferencial de segmentos Vb mais *downstream* (*TCRVB20.1*, *TCRVB19* e *TCRVB21.1*), ou seja, mais próximos à porção 3' do *TCRB*. Em relação aos segmentos Jb, encontramos um predomínio do segmento *TCRJB1* (60%), enquanto na LLA-T relata-se um predomínio de *TCRJB2*, ocorrendo em 70% dos casos. O segmento *TCRJB1.4*, que é raro na LLA-T e no sangue periférico de indivíduos saudáveis, foi um dos mais frequentes na nossa coorte de ETP-ALL. Foi observada também uma leve predominância do segmento *DB1* em relação ao *DB2* (1,3:1), enquanto na LLA-T é descrito uma distribuição similar entre *DB1* e *DB2*, de aproximadamente 28% cada. As regiões juncionais dos rearranjos incompletos no *locus TCRB* dos casos de ETP-ALL estudados também parecem ser menores (contêm de 0-6 nucleotídeos; média de 4 nucleotídeos) do que as previamente descritas na literatura nos casos de LLA-T (0-22 nucleotídeos; média de 7,2 nucleotídeos). (BRUGGERMMAN *et al.*, 2004).

A análise do *locus TCRD* nas ETP-ALL revelou um predomínio de rearranjos completos Vd-(Dd)-Jd (78%) em relação aos rearranjos incompletos Dd-Dd/Vd-Dd/Dd-Jd, assim como encontrado nas LLA-T. Entretanto, encontramos a maior prevalência de rearranjos do subtipo Vd3-Jd1 (42%) enquanto nas LLA-T esse subtipo foi descrito em apenas 6% dos rearranjos *TCRD* (Quadro 6.1) (SZCZEPANSKI *et al.*, 1998).

**Quadro 6.1 – Distribuição dos subtipos de rearranjos TCRD na ETP-ALL e na LLA-T**

Subtipos de Rearranjos TCRD	ETP-ALL n (%)	LLA-T descritas por Szczepanski <i>et al.</i> 1998 n (%)
<b>Vd1-Jd1</b>	6 (31%)	<b>9 (56%)</b>
<b>Vd2-Jd1</b>	1 (5%)	1 (6%)
<b>Vd3-Jd1</b>	<b>8 (42%)</b>	1 (6%)
<b>Vd2-Dd3</b>	2 (10%)	0
<b>Dd2-Jd1</b>	2 (10%)	4 (25%)
<b>Dd2-Dd3</b>	0	1 (6%)
<b>Total</b>	19 <sup>a</sup>	16

<sup>a</sup>: Não foi possível o sequenciamento de um rearranjo envolvendo o *locus TCRD*

Em relação ao *locus TCRG*, ao comparar nossos resultados com os descritos na literatura para LLA-T, além da frequência relativamente maior (43%) nas ETP-ALL, também observamos um predomínio de rearranjos envolvendo os segmentos Vg10 e Jg1.3/2.3 (36%) enquanto na LLA-T, os rearranjos Vg2/4-Jg1.3/2.3 foram mais comumente encontrados (Quadro 6.2) (SZCZEPANSKI *et al.*, 1998).

**Quadro 6.2 – Distribuição dos subtipos de rearranjos TCRG na ETP-ALL e na LLA-T**

Subtipos de Rearranjos TCRG	ETP-ALL n (%)	LLA-T descritas por Szczepanski <i>et al.</i> 1998 n (%)
<b>Vg2/4-Jg1.3/2.3</b>	1 (9%)	<b>14 (42%)</b>
<b>Vg3-Jg1.3/2.3</b>	1 (9%)	3 (9%)
<b>Vg5-Jd1.3-2.3</b>	1 (9%)	1 (3%)
<b>Vg8-Jd1.3-2.3</b>	0	8 (24%)
<b>VgII (9)-Jg1.3/2.3</b>	2 (4%)	2 (6%)
<b>VgIII (10)-Jg1.3/2.3</b>	<b>4 (36%)</b>	5 (15%)
<b>VgIV (11)-Jg1.3/2.3</b>	2 (18%)	0
<b>Total</b>	11	33

A prevalência de rearranjos *IGH* na nossa coorte de ETP-ALL, 29%, assemelha-se a descrita nas LLA-T (20-25%) e parece ser superior a encontrada nas LLA-B (10-15%) (VAN DONGEN *et al.*, 1991; VAN DER VELDEN *et al.*, 2009). Além disso, nossos resultados demonstraram a possibilidade de uma estreita relação entre rearranjos nos *loci IGH* e *TCRD*. Todos os pacientes com ETP-ALL da nossa coorte que apresentaram o *locus IGH* rearranjado também apresentaram rearranjos no *locus TCRD*. Seis de 13 (46%) pacientes com *TCRD* rearranjado também apresentaram rearranjos *IGH*. Essa relação foi observada por Szczepanski e colaboradores na LLA-T, com 32% dos pacientes portadores de rearranjos *TCRD*

apresentando *IGH* rearranjado. O segmento *DH7.27* foi encontrado em 40% dos rearranjos no *locus IGH*, sendo o mais comumente rearranjado, e também é descrito como um dos mais frequentemente rearranjados na LLA-T. O segmento *DH6.19*, que tem sido relatado como o segmento DH mais usado na LLA-T (45% dos rearranjos), também foi encontrado rearranjado na nossa coorte de ETP-ALL em 20% dos rearranjos *IGH* (SZCZEPANSKI *et al.*, 1999).

Esses resultados podem indicar que o perfil molecular dos rearranjos no *locus IGH* dos pacientes com ETP-ALL seja mais similar ao perfil descrito na LLA-T, do que quando comparamos o perfil dos rearranjos dos genes de TCR (*TCRD*, *TCRB* e *TCRG*). Os *loci* rearranjados *TCRD*, *TCRG* e *TCRB* das ETP-ALL parecem abrigar mais diferenças em relação à LLA-T, tanto do ponto de vista da prevalência dos rearranjos encontrados, quanto do uso preferencial dos segmentos gênicos em cada *locus* rearranjado.

Apesar do escasso relato de dados sobre o tema, os rearranjos nos genes dos TCR/BCR nas MPAL T/ mieloide no nosso estudo parece ser menos frequentes do que o relatado na literatura. Encontramos 25% de rearranjos (2/8), sendo 1 rearranjo no *locus TCRG* (12,5%) – Hohen e colaboradores encontraram 5 pacientes com rearranjos *TCRG* em 13 pacientes estudados (38%) (HOEHN *et al.*, 2012).

Semelhantemente, a prevalência de rearranjos entre os pacientes com LMA M0 (25% – 3/12) também parece ser menor do que a previamente relatada. Patel e col. investigaram a presença de rearranjos nos *loci IGH*, *TCRB* e *TCRG* em 23 pacientes com LMA M0, relatando 52% de rearranjos identificáveis (12/23), sendo 22% de rearranjos *IGH* (4/18) e 48% de rearranjos *TCRG* e/ou *TCRB* (11/23). Possíveis diferenças étnicas e o fato de nosso estudo ter investigado rearranjos em pacientes com até 21 anos de idade talvez possam ter influenciado a diferença de prevalência encontrada entre as duas coortes.

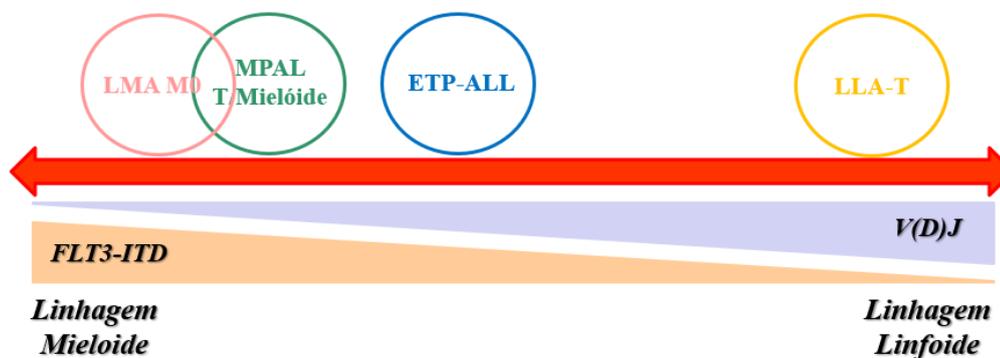
Além disso, assim como previamente relatado por Schmidt e col., nossos casos de LMA M0 que abrigaram rearranjos dos TCR/BCR também expressaram antígenos de diferenciação linfóide T. Todos os 3 casos expressaram CD7, marcador fenotípico de diferenciação linfoblástica T, e 2/3 deles (67%) co-expressaram TdT – um deles não teve a presença de TdT investigada. Isso corrobora com a hipótese de que as LMA com diferenciação mínima que abrigam rearranjos nos genes dos TCR/BCR possam integrar um grupo de leucemias agudas que compartilhem achados moleculares de diferenciação linfóide e mieloide simultaneamente.

É interessante ressaltar que a prevalência de rearranjos dos genes de TCR/BCR foi a mesma na LMA M0 e na MPAL T/mieloide, 25%. Além disso, tanto os pacientes com LMA M0 quanto os pacientes com MPAL T/mieloide que apresentaram rearranjo dos TCR/BCR demonstraram apenas um rearranjo cada, ou seja, não houve a ocorrência de mais de um

rearranjo por paciente. Adicionalmente, o perfil de recombinação gênica V(D)J nessas duas entidades clínicas também parece ser semelhante, visto que em ambas foi identificado rearranjo no *locus IGH*, que, como comentado, ocorreu isoladamente de outros rearranjos gênicos, além de ter ocorrido o uso do mesmo segmento gênico, *JH4b*, nas duas doenças.

Por outro lado, a frequência de rearranjos identificada na LMA M0 e na MPAL T/mieloide foi inferior aos 71% de rearranjos encontrados na ETP-ALL. Da mesma forma, todos os rearranjos *IGH* na ETP-ALL co-ocorreram com outros rearranjos, diferentemente do que encontramos nas outras duas entidades clínicas estudadas. Adicionalmente, o *locus* mais rearranjado na ETP-ALL, *TCRD*, não foi encontrado rearranjado nem nos casos de MPAL T/Mieloide, nem nos de LMA M0.

Sendo assim, a caracterização molecular dos rearranjos TCR/BCR na nossa coorte parece aproximar a MPAL T/mieloide e a LMA M0, enquanto contribui para afastar a ETP-ALL das outras duas entidades clínicas (Figura 6.1). Entretanto, nossos achados na ETP-ALL – menor frequência de rearranjos V(D)J e maior frequência de mutações *FLT3-ITD* em relação ao descrito para as LLA de precursores T mais maduros – apontam que a ETP-ALL possa possuir um perfil molecular mais distante das LLA-T e talvez mais próximo do perfil de leucemias de origem mieloide.



**Figura 6.1.** Representação esquemática do impacto da caracterização molecular dos rearranjos de TCR/BCR e da presença de *FLT3-ITD* na definição de linhagem na ETP-ALL, na MPAL T/Mieloide e na LMA M0.

## VII. Conclusão

As leucemias agudas (LA) ainda são causa relevante de morbi-mortalidade em crianças e adultos e, apesar de todo avanço nas estratégias diagnósticas e terapêuticas adotadas, ainda existem subgrupos da doença com perfis imunofenotípicos indefinidos. São subtipos mais imaturos que compartilham marcadores comuns a diferentes linhagens, mielóide, linfóide T e/ou B, e que tendem a apresentar um comportamento clínico mais agressivo, com prognóstico incerto. Entidades como a *Leucemia Linfóide Aguda de Precursores T Precoces (ETP-ALL)*, a *Leucemia Aguda de Fenótipo Misto T/ Mielóide (MPAL T/M)* e a *Leucemia Mielóide Aguda com Diferenciação Mínima (LMA M0)* compõem esse quadro e parecem apresentar algumas características biológicas semelhantes – que foram alvo de investigação na nossa coorte de pacientes pediátricos brasileiros.

A caracterização molecular dos rearranjos nos genes de TCR/BCR, assim como a investigação da presença de mutações do tipo *FLT3-ITD* nessas doenças, apontam para o compartilhamento de achados linfóides e mielóides e sugerem a existência de algum grau de concordância genômica entre esses subtipos de leucemias agudas, sugerindo que essas entidades clínicas possam ser oriundas de precursores hematopoiéticos em estágios semelhantes de diferenciação e ainda mais indiferenciados do que os que originam as LLA e LMA.

Esses resultados indicam a necessidade de estudos moleculares mais amplos e com número maior de pacientes para que haja um melhor entendimento do complexo panorama da biogênese dessas entidades clínicas, com consequente desenvolvimento de terapias alvo-direcionadas e potencialmente mais eficazes para os pacientes acometidos.

## VIII. Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. Eighth edition ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2015.

ADOLFSSON, J. et al. Identification of Flt3+ Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential. **Cell**, v. 121, n. 2, p. 295–306, abr. 2005.

ALEXANDER, T. B. et al. The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. **Nature**, v. 562, n. 7727, p. 373–379, out. 2018.

ALLMAN, D. et al. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. **Nature Immunology**, v. 4, n. 2, p. 168–174, fev. 2003.

ÁLVAREZ-ERRICO, D. et al. Epigenetic control of myeloid cell differentiation, identity and function. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 1, p. 7–17, jan. 2015.

ATTAF, M.; HUSEBY, E.; SEWELL, A. K.  $\alpha\beta$  T cell receptors as predictors of health and disease. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 12, n. 4, p. 391–399, jul. 2015.

BARBARIC, D. et al. Minimally differentiated acute myeloid leukemia (FAB AML-M0) is associated with an adverse outcome in children: a report from the Children's Oncology Group, studies CCG-2891 and CCG-2961. **Blood**, v. 109, n. 6, p. 2314–2321, 15 mar. 2007.

BEISHUIZEN, A. et al. Multiple rearranged immunoglobulin genes in childhood acute lymphoblastic leukemia of precursor B-cell origin. **Leukemia**, v. 5; n. 8; p. 657-667, 1991.

BENE, M. C. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). **Leukemia**, v. 9, n. 10, p. 1783–1786, out. 1995.

BENE, M. C. et al. The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). **Blood**, v. 92, n. 2, p. 596–599, 15 jul. 1998.

BENE, M. C. Biphenotypic, bilineal, ambiguous or mixed lineage: strange leukemias! **Haematologica**, v. 94, n. 7, p. 891–893, 1 jul. 2009.

BÉNÉ, M. C.; PORWIT, A. Acute leukemias of ambiguous lineage. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 29, n. 1, p. 12–18, fev. 2012.

BENE, M.-C. et al. Acute myeloid leukaemia M0: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. **British Journal of Haematology**, v. 113, n. 3, p. 737–745, jun. 2001.

BENZ, C.; BLEUL, C. C. A multipotent precursor in the thymus maps to the branching point of the T versus B lineage decision. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 1, p. 21–31, 4 jul. 2005.

BORGHESI, L. Hematopoiesis in Steady-State versus Stress: Self-Renewal, Lineage Fate Choice, and the Conversion of Danger Signals into Cytokine Signals in Hematopoietic Stem Cells. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 5, p. 2053–2058, 1 set. 2014.

BUENROSTRO, J. D. et al. Integrated Single-Cell Analysis Maps the Continuous Regulatory Landscape of Human Hematopoietic Differentiation. **Cell**, v. 173, n. 6, p. 1535- 1548.e16, maio 2018.

- CATOVSKY, D. et al. A classification of acute leukaemia for the 1990s. **Annals of Hematology**, v. 62, n. 1, p. 16–21, fev. 1991.
- CHEN, L. et al. Transcriptional diversity during lineage commitment of human blood progenitors. **Science**, v. 345, n. 6204, p. 1251033–1251033, 26 set. 2014.
- 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, fev. 2009.
- DALEY, S. R. et al. Cell death and thymic tolerance. **Immunological Reviews**, v. 277, n. 1, p. 9–20, maio 2017.
- DEFFIS-COURT, M. et al. Diagnosing and treating mixed phenotype acute leukemia: a multicenter 10-year experience in México. **Annals of Hematology**, v. 93, n. 4, p. 595–601, abr. 2014.
- DUNPHY, C. H.; TANG, W. The value of CD64 expression in distinguishing acute myeloid leukemia with monocytic differentiation from other subtypes of acute myeloid leukemia: a flow cytometric analysis of 64 cases. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 131, n. 5, p. 748–754, maio 2007.
- ELGHETANY, M. T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 28, n. 2, p. 260–274, abr. 2002.
- GAJENDRA, S. et al. Mixed-phenotypic acute leukemia: cytochemically myeloid and phenotypically early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood Research**, v. 49, n. 3, p. 196, 2014.
- GERR, H. et al. Acute leukaemias of ambiguous lineage in children: characterization, prognosis and therapy recommendations. **British Journal of Haematology**, v. 149, n. 1, p. 84–92, abr. 2010.
- GREAVES, M. F. et al. Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia. **Blood**, v. 67, n. 1, p. 1–11, jan. 1986.
- HAYDAY, A. C.; PENNINGTON, D. J. Key factors in the organized chaos of early T cell development. **Nature Immunology**, v. 8, n. 2, p. 137–144, fev. 2007.
- HEIKAMP, E. B.; PUI, C.-H. Next-Generation Evaluation and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **The Journal of Pediatrics**, v. 203, p. 14- 24.e2, dez. 2018.
- HOFFMAN, R. (ED.). **Hematology: basic principles and practice**. 7th edition ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2018.
- HOSOKAWA, H.; ROTHENBERG, E. V. Cytokines, Transcription Factors, and the Initiation of T-Cell Development. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 5, p. a028621, maio 2018.
- HRUSAK, O. et al. International cooperative study identifies treatment strategy in childhood ambiguous lineage leukemia. **Blood**, v. 132, n. 3, p. 264–276, 19 jul. 2018.
- HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 16, p. 1541–1552, 15 out. 2015.
- INLAY, M. A. et al. Ly6d marks the earliest stage of B-cell specification and identifies the branchpoint between B-cell and T-cell development. **Genes & Development**, v. 23, n. 20, p. 2376–2381, 15 out. 2009.
- 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: Clinical Significance of ETP-ALL in TCCSG L99-15 Study. **British Journal of Haematology**, v. 156, n. 3, p. 358–365, fev. 2012.

- JANAS, M. L. et al. Thymic development beyond  $\beta$ -selection requires phosphatidylinositol 3-kinase activation by CXCR4. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 1, p. 247–261, 18 jan. 2010.
- KALEEM, Z.; WHITE, G. Diagnostic Criteria for Minimally Differentiated Acute Myeloid Leukemia (AML-M0): Evaluation and a Proposal. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 115, n. 6, p. 876–884, jun. 2001.
- KAUSHANSKY, K. (ED.). **Williams hematology**. Ninth edition ed. New York: McGraw-Hill, 2016.
- KAWAMOTO, H. A close developmental relationship between the lymphoid and myeloid lineages. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 4, p. 169–175, abr. 2006.
- KHAN, M.; SIDDIQI, R.; NAQVI, K. An update on classification, genetics, and clinical approach to mixed phenotype acute leukemia (MPAL). **Annals of Hematology**, v. 97, n. 6, p. 945–953, jun. 2018.
- 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, 10 nov. 2011.
- KONDO, M.; WEISSMAN, I. L.; AKASHI, K. Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. **Cell**, v. 91, n. 5, p. 661–672, nov. 1997.
- KRUEGER, A. et al. CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. **Blood**, v. 115, n. 10, p. 1906–1912, 11 mar. 2010.
- KRUEGER, A.; VON BOEHMER, H. Identification of a T Lineage-Committed Progenitor in Adult Blood. **Immunity**, v. 26, n. 1, p. 105–116, jan. 2007.
- LAIOSA, C. V.; STADTFELD, M.; GRAF, T. DETERMINANTS OF LYMPHOID-MYELOID LINEAGE DIVERSIFICATION. **Annual Review of Immunology**, v. 24, n. 1, p. 705–738, abr. 2006.
- LAURENTI, E.; GÖTTGENS, B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. **Nature**, v. 553, n. 7689, p. 418–426, jan. 2018.
- LÓPEZ-RODRÍGUEZ, C.; ARAMBURU, J.; BERGA-BOLAÑOS, R. Transcription factors and target genes of pre-TCR signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 12, p. 2305–2321, jun. 2015.
- LU, J. et al. Children Diagnosed as Mixed-Phenotype Acute Leukemia Didn't Benefit from the CCLG-2008 Protocol, Retrospective Analysis from Single Center. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 31, n. 1, p. 32–37, mar. 2015.
- MARTIN, C. H. et al. Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. **Nature Immunology**, v. 4, n. 9, p. 866–873, set. 2003.
- MAYER, G. Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e Recptores de Células T -papel nas respostas imunes. *In: **Microbiology and Immunology On-line***, Mayer G. editor. 2017. Disponível em: <<https://www.microbiologybook.org/Portuguese/chap10-9.gif>>. Acesso em: 02 set. 2019.
- MCCULLOCH, E. A. Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis (Henry Stratton Lecture, 1982). **Blood**, v. 62, n. 1, p. 1–13, jul. 1983.
- MCGRAW, T. P. et al. Terminal deoxynucleotidyl transferase-positive acute myeloblastic leukemia. **American Journal of Hematology**, v. 10, n. 3, p. 251–258, maio 1981.
- MORRISON, S. J. et al. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. **Development (Cambridge, England)**, v. 124, n. 10, p. 1929–1939, maio 1997.
- MURPHY, K. et al. **Janeway's immunobiology**. 8th ed ed. New York: Garland Science, 2012.

- NEUMANN, M. et al. FLT3 Mutations in Early T-Cell Precursor ALL Characterize a Stem Cell Like Leukemia and Imply the Clinical Use of Tyrosine Kinase Inhibitors. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53190, 24 jan. 2013a.
- NEUMANN, M. et al. Whole-exome sequencing in adult ETP-ALL reveals a high rate of DNMT3A mutations. **Blood**, v. 121, n. 23, p. 4749–4752, 6 jun. 2013b.
- NOGUERA, N. I., et al. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 19, n. 8, p. 1479. 2005.
- NORONHA, E. P., et al. The profile of Immunophenotype and genotype aberrations in subsets of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Front. Oncol.** v.9, n. 316, p. 1-10, abr. 2019.
- ORKIN, S. H. Priming the hematopoietic pump. **Immunity**, v. 19, n. 5, p. 633–634, nov. 2003.
- ORKIN, S. H.; ZON, L. I. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 631–644, fev. 2008.
- PALOMERO, T. et al. Activating mutations in NOTCH1 in acute myeloid leukemia and lineage switch leukemias. **Leukemia**, v. 20, n. 11, p. 1963–1966, nov. 2006.
- PATEL, K. P. et al. TdT expression in acute myeloid leukemia with minimal differentiation is associated with distinctive clinicopathological features and better overall survival following stem cell transplantation. **Modern Pathology**, v. 26, n. 2, p. 195–203, fev. 2013.
- 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, ago. 2014.
- PAUL, F. et al. Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. **Cell**, v. 163, n. 7, p. 1663–1677, dez. 2015.
- PIETRAS, E. M. et al. Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 1, p. 35–46, jul. 2015.
- PUI, C. H.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 371; n. 9617; p. 1030–1043; 2008.
- PUI, C.-H. et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 27, p. 2938–2948, 20 set. 2015.
- ROSSI, J. G. et al. Lineage switch in childhood acute leukemia: An unusual event with poor outcome. **American Journal of Hematology**, v. 87, n. 9, p. 890–897, set. 2012.
- RUBNITZ, J. E. et al. Acute mixed lineage leukemia in children: the experience of St Jude Children's Research Hospital. **Blood**, v. 113, n. 21, p. 5083–5089, 21 maio 2009.
- SCHMIDT, C. A. et al. Rearrangements of T-cell receptor delta, gamma and beta genes in acute myeloid leukemia coexpressing T-lymphoid features. **Leukemia**, v. 6, n. 12, p. 1263–1267, dez. 1992.
- SCHMIDT, C. A. et al. Heterogeneity of V52 TCR 8 Gene Rearrangements in Acute Myeloid Leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, v. 16, n. 1–2, p. 73–77, jan. 1994.
- SCHWARZ, B. A.; BHANDoola, A. Circulating hematopoietic progenitors with T lineage potential. **Nature Immunology**, v. 5, n. 9, p. 953–960, set. 2004.

- SCIMONE, M. L. et al. A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 18, p. 7006–7011, 2 maio 2006.
- SEREMETIS, S. V. High frequency of clonal immunoglobulin or T cell receptor gene rearrangements in acute myelogenous leukemia expressing terminal deoxyribonucleotidyltransferase. **Journal of Experimental Medicine**, v. 165, n. 6, p. 1703–1712, 1 jun. 1987.
- SHANMUGAM, V.; DORFMAN, D. M. Acute myeloid leukemia with minimal differentiation (AML M0) mimicking acute lymphoblastic leukemia. **American Journal of Hematology**, v. 94, n. 8, p. 955–956, ago. 2019.
- SILVA, F. P. G. et al. Trisomy 13 correlates with RUNX1 mutation and increased FLT3 expression in AML-M0 patients. **Haematologica**, v. 92, n. 8, p. 1123–1126, 1 ago. 2007.
- SIMMONS, S. et al. Biphenotypic B-lymphoid/myeloid cells expressing low levels of Pax5: potential targets of BAL development. **Blood**, v. 120, n. 18, p. 3688–3698, 1 nov. 2012.
- SMITH, L. J. et al. Lineage infidelity in acute leukemia. **Blood**, v. 61, n. 6, p. 1138–1145, jun. 1983.
- SMITH, M. A. et al. Declining childhood and adolescent cancer mortality: Childhood & Adolescent Cancer Mortality. **Cancer**, v. 120, n. 16, p. 2497–2506, 15 ago. 2014.
- SUNG, L. et al. Effectiveness of supportive care measures to reduce infections in pediatric AML: a report from the Children’s Oncology Group. **Blood**, v. 121, n. 18, p. 3573–3577, 2 maio 2013.
- SZCZEPAŃSKI, T. et al. Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage. **Blood**, v. 93, n. 12, p. 4079–4085, 15 jun. 1999.
- SZCZEPANSKI, T., et al. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. **Blood**. v. 99; v. 7; p. 2315-2323; 2002.
- TANG, Q. et al. Dissecting hematopoietic and renal cell heterogeneity in adult zebrafish at single-cell resolution using RNA sequencing. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 10, p. 2875–2887, 2 out. 2017.
- THALHAMMER-SCHERRER, R. et al. The Immunophenotype of 325 Adult Acute Leukemias: Relationship to Morphologic and Molecular Classification and Proposal for a Minimal Screening Program Highly Predictive for Lineage Discrimination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 117, n. 3, p. 380–389, mar. 2002.
- THIEDE, C. et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis: Presented in part at the 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology December 1-5, 2000, San Francisco, CA (abstract 2334). **Blood**. v. 99; n. 12, p. 4326-4335. 2002.
- TSAPOGAS, P. et al. The Cytokine Flt3-Ligand in Normal and Malignant Hematopoiesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1115, 24 maio 2017.
- TSUKIMOTO, I. et al. Risk-Stratified Therapy and the Intensive Use of Cytarabine Improves the Outcome in Childhood Acute Myeloid Leukemia: The AML99 Trial From the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 24, p. 4007–4013, 20 ago. 2009.

TUSSIWAND, R. et al. The preTCR-dependent DN3 to DP transition requires Notch signaling, is improved by CXCL12 signaling and is inhibited by IL-7 signaling. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 11, p. 3371–3380, nov. 2011.

VAN DER VELDEN, V. H. J.; VAN DONGEN, J. J. M. MRD Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Using Ig/TCR Gene Rearrangements as Targets for Real-Time Quantitative PCR. In: ERIC SO, C. W. (Ed.). **Leukemia**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. v. 538p. 115–150.

VAN DONGEN, J. J. M. et al. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II: Possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders. **Clin Chim Acta**, v. 198, n. 93, 1991.

VAN DONGEN, J. J. M. et al. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. **Blood**, v. 125, n. 26, p. 3996–4009, 25 jun. 2015.

VAN LOCHEM, E. G. et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. **Cytometry**, v. 60B, n. 1, p. 1–13, jul. 2004.

VAN VLIERBERGHE, P. et al. *ETV6* mutations in early immature human T cell leukemias. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 13, p. 2571–2579, 19 dez. 2011.

VIRCHOW, R. Weisses Blut. **Froriep's Notizen**. v. 36; n. 148; 1845.

WADA, H. et al. Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. **Nature**, v. 452, n. 7188, p. 768–772, abr. 2008.

WEERKAMP, F.; PIKE-OVERZET, K.; STAAL, F. J. T. T-sing progenitors to commit. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 125–131, mar. 2006.

WEINBERG, O. K.; ARBER, D. A. Mixed-phenotype acute leukemia: historical overview and a new definition. **Leukemia**, v. 24, n. 11, p. 1844–1851, nov. 2010.

WELTGESUNDHEITSORGANISATION. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Revised 4th edition ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2017.

WILSON, M. et al. EVI1 Interferes with Myeloid Maturation via Transcriptional Repression of *Cebpa*, via Binding to Two Far Downstream Regulatory Elements. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 26, p. 13591–13607, 24 jun. 2016.

WOLACH, O.; STONE, R. M. How I treat mixed-phenotype acute leukemia. **Blood**, v. 125, n. 16, p. 2477–2485, 16 abr. 2015.

WOOD, B. L. et al. T-lymphoblastic leukemia (T-ALL) shows excellent outcome, lack of significance of the early thymic precursor (ETP) immunophenotype, and validation of the prognostic value of end-induction minimal residual disease (MRD) in children's oncology group (COG) study AALL0434. **Blood**. v. 124; n. 1; 2014.

WOUTERS, B. J. et al. Distinct gene expression profiles of acute myeloid/T-lymphoid leukemia with silenced CEBPA and mutations in NOTCH1. **Blood**, v. 110, n. 10, p. 3706–3714, 15 nov. 2007.

XING, S. et al. Tcf1 and Lef1 are required for the immunosuppressive function of regulatory T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 4, p. 847–866, 1 abr. 2019.

YAMAMOTO, R. et al. Clonal Analysis Unveils Self-Renewing Lineage-Restricted Progenitors Generated Directly from Hematopoietic Stem Cells. **Cell**, v. 154, n. 5, p. 1112–1126, ago. 2013.

YAN, L. et al. Clinical, immunophenotypic, cytogenetic, and molecular genetic features in 117 adult patients with mixed-phenotype acute leukemia defined by WHO-2008 classification. **Haematologica**, v. 97, n. 11, p. 1708–1712, 1 nov. 2012.

YU, Q.; SHARMA, A.; SEN, J. M. TCF1 and  $\beta$ -catenin regulate T cell development and function. **Immunologic Research**, v. 47, n. 1–3, p. 45–55, jul. 2010.

YUI, M. A.; ROTHENBERG, E. V. Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 8, p. 529–545, ago. 2014.

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

ZHANG, Y. et al. Hematopoietic Hierarchy – An Updated Roadmap. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 12, p. 976–986, dez. 2018.

## IX. Anexos

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** ESTUDOS MULTI-INSTITUCIONAL DAS LEUCEMIAS INFANTIS: CONTRIBUIÇÃO DOS MARCADORES IMUNO-MOLECULARES NA DISTINÇÃO DE SEUS SUBTIPOS E DE FATORES DE RISCOS ETIOPATOGENICOS.

**Pesquisador:** Maria do Socorro Pombo de Oliveira

**Área Temática:** A critério do CEP

**Versão:** 6

**CAAE:** 33243214.7.0000.5274

**Instituição Proponente:** Coordenação de Pesquisa

**Patrocinador Principal:** FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.164.004

#### Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (B\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1284176\_E1.pdf, de 06/02/2019) e/ou do Projeto Detalhado (Projeto\_Multi\_Biorrepositorio\_Emenda\_1\_27Set2018.doc, de 27/09/2018).

#### INTRODUÇÃO

Importância da identificação de biomarcadores em leucemias da criança e do adolescente. Nas últimas quatro décadas, o progresso no tratamento do câncer na infância e na adolescência foi extremamente significativo. Hoje, em torno de 70% das crianças e adolescentes acometidos de leucemias podem ser curados, e tratados em centros especializados. A maioria deles terá boa qualidade de vida após o tratamento adequado. As incidências de câncer infantil no Brasil apresentam taxas variáveis, dependendo da área geográfica sugerindo fatores ambientais ou de estilo de vida. Atualmente redes de atendimentos à criança com câncer estão bem estabelecidas fortalecendo o tratamento clínico e as interações para execução de investigações científicas. Desta forma, apesar do câncer infantil ser raro, as pesquisas realizadas neste grupo de neoplasias, tem impacto na saúde pública, particularmente na qualidade de vida, pois a grande maioria câncer

**Endereço:** SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-049

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.164.004

atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1284176_É1.pdf	06/02/2019 19:52:07		Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CONEP_1394043.pdf	06/02/2019 19:47:01	Maria do Socorro Pombo de Oliveira	Aceito
Outros	Formulario_Submissao_06022019.pdf	06/02/2019 19:37:45	Maria do Socorro Pombo de Oliveira	Aceito
Outros	Projeto_EMILI_Termo_de_Acordo_Biorrepositorio_paginas_assinaturas_04022019.pdf	06/02/2019 19:32:43	Maria do Socorro Pombo de Oliveira	Aceito
Outros	Projeto_Emili_Termo_de_Acordo_Modelo_29_Outubro_2018.doc	06/02/2019 19:31:58	Maria do Socorro Pombo de Oliveira	Aceito
Outros	Projeto_Emili_Termo_de_Acordo_Modelo_29_Outubro_2018.pdf	06/02/2019 19:31:39	Maria do Socorro Pombo de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_EMILI_Criancas_Emenda1_27092018_Final_limpa.doc	06/02/2019 19:26:00	Maria do Socorro Pombo de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_EMILI_Criancas_Emenda1_27092018_Final.doc	06/02/2019 19:25:52	Maria do Socorro Pombo de Oliveira	Aceito
Outros	Sumario_modificacoes_04fevereiro2019.docx	06/02/2019 19:18:24	Maria do Socorro Pombo de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Multi_Biorrepositorio_Emenda_1_27Set2018.doc	06/02/2019 19:18:00	Maria do Socorro Pombo de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Multi_Biorrepositorio_Emenda_1_27Set2018_versao_limpa.doc	06/02/2019 19:17:49	Maria do Socorro Pombo de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto_08.07.2014.pdf	08/07/2014 12:48:48		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-049

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

